



Synthèse de prodrogues bispécifiques du chondrosarcome, vectorisées vers les protéoglycanes et activables en milieu hypoxique

Donia Ghedira-Hellara

► To cite this version:

Donia Ghedira-Hellara. Synthèse de prodrogues bispécifiques du chondrosarcome, vectorisées vers les protéoglycanes et activables en milieu hypoxique. Chimie organique. Université Clermont Auvergne [2017-2020]; Université de Monastir (Tunisie), 2018. Français. NNT : 2018CLFAC087 . tel-02284471

HAL Id: tel-02284471

<https://theses.hal.science/tel-02284471>

Submitted on 11 Sep 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE CLERMONT AUVERGNE
Et
UNIVERSITE DE MONASTIR

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES FONDAMENTALES, CLERMONT-FD
ET
ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES BIOLOGIQUES, BIOTECHNOLOGIE ET
SANTE, MONASTIR

THESE EN CO-TUTELLE INTERNATIONALE

Présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

Spécialité : Chimie Organique et Thérapeutique

Par **Donia Ghedira Hellara**

**Synthèse de prodrogues bispécifiques du
chondrosarcome, vectorisées vers les protéoglycanes et
activables en milieu hypoxique.**

Soutenue publiquement le « 10 décembre 2018 », devant la commission d'examen

Rapporteurs :

Pr. Nicolas Masurier, Institut des Biomolécules Max Mousseron (UMR 5247 CNRS UM ENSCM), Montpellier

Dr. Sylvie Mavel, U1253 Imagerie et Cerveau, Tours

Directeur de thèse :

Pr. Jean-Michel Chezal, UMR 1240 IMoST INSERM/Université Clermont Auvergne, Clermont-Fd

Pr. Farhat Farhat, Faculté de Pharmacie de Monastir, Tunisie

Examineurs :

Pr. Jean-Michel Chezal, UMR 1240 IMoST INSERM/Université Clermont Auvergne, Clermont-Fd

Pr. Farhat Farhat, Faculté de Pharmacie de Monastir, Tunisie

Dr. Valérie Weber, UMR 1240 IMoST INSERM/Université Clermont Auvergne, Clermont-Fd

Dr. Elisabeth Miot-Noirault, UMR 1240 IMoST INSERM/Université Clermont Auvergne, Clermont-Fd

REMERCIEMENTS

Ce manuscrit de thèse est l'aboutissement d'un parcours de quatre années que je n'aurais pas pu réaliser seule. Je tiens à remercier chaleureusement toute personne qui, de près ou de loin, a contribué à l'accomplissement de ce cheminement.

Je souhaite tout d'abord exprimer ma plus profonde reconnaissance à mes encadrants de thèse en France, le Professeur Jean Michel Chezal et le Docteur Valérie Weber, pour m'avoir offert l'opportunité de participer à ce projet de recherche pluridisciplinaire. Je vous remercie pour votre disponibilité, votre rigueur scientifique et votre encadrement attentionné.

Je remercie également mon encadrant en Tunisie, le Professeur Farhat Farhat, que j'ai connu depuis que j'étais étudiante en 2^{ème} année pharmacie à la Faculté de Pharmacie de Monastir. Je vous remercie cher Maître pour votre soutien, vos qualités humaines et votre disponibilité.

Je suis sensible à l'honneur que me font le Professeur Nicolas Masurier et le Docteur Sylvie Mavel pour avoir accepté d'évaluer ce travail et d'en être les rapporteurs. Je remercie également le Docteur Elisabeth Miot-Noirault pour l'intérêt qu'elle a porté à ce travail en tant qu'examinatrice.

Je remercie le Docteur Jamil Kraiem, membre invité à ma soutenance de thèse, envers qui je porte la plus grande gratitude : tu étais la 1^{ère} personne à m'inculquer les bases de la discipline et à me faire découvrir le monde de la recherche au laboratoire.

Mes remerciements vont également aux biologistes ayant contribué à ce travail : Docteur Caroline Peyrode, Aurélien Voissière et Elise Maubert.

Je souhaite remercier également Docteur Magalie Vivier et Monsieur Fernand Leal pour les analyses RMN et infra-rouge en France et M^{me} Emna Benzarti pour les analyses RMN en Tunisie, le Professeur Marie-Joséphée Galmier et Monsieur Sébastien Tarrit pour les études de stabilité par HPLC et de LC-MS.

Je ne saurais oublier de remercier avec la plus profonde gratitude le Docteur Emmanuel Moreau : tu es la personne à qui je dois ce parcours de thèse en co-tutelle, ta serviabilité, aimabilité et dévouement sont vraiment rarissimes, je te remercie infiniment et je te suis reconnaissante !!

Un grand merci à Mouniati Colo, la secrétaire de l'Inserm et à Damien Canitrot pour leur gentillesse, aide et disponibilité.

Aux différents chimistes de l'Inserm, les stagiaires en master ou les doctorants que j'ai eu le plaisir de rencontrer au cours de mes passages à l'Inserm et avec qui j'ai partagé de très beaux moments : Aurélie, Audrey, Ludivine, Axel, Nancy, Jean Jacques, Cherubin, Laura, Boutheina. Un clin d'œil spécial à Yvain Gérard, je te remercie pour ta serviabilité et pour les bons moments qu'on a

partagés ensemble à la paillasse et je souhaite un excellent avenir digne de tes compétences et de ton parcours !

Enfin, je remercie du fond de mon cœur :

- ma famille, spécialement ma très chère maman qui était toujours à côté de moi dans les moments les plus difficiles, qui m'a gâté avec ses petits bons repas et qui m'a toujours comblé de son amour et affection ! que Dieu te préserve en bonne santé !

- mon mari Walid qui a partagé avec moi les moments les plus difficiles de ce parcours de thèse et qui a su patienter et supporter mes absences pour des mois. Merci Walid, je te dédie ce travail en signe de reconnaissance pour ton aide et tes sacrifices !

- je remercie toute personne que j'ai connue à la Faculté de Pharmacie de Monastir, spécialement mes chers Maîtres qui ont contribué à ma formation et ma progression au fil des années, c'est grâce à vous que je suis là maintenant, je suis et je resterai toujours reconnaissante envers vous tous !

SOMMAIRE

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1	GENERALITES SUR LE CHONDROSARCOME	23
1.1	PLACE DU CHONDROSARCOME AU SEIN DU GROUPE DES TUMEURS OSSEUSES	23
1.2	DEFINITION	24
1.3	EPIDEMIOLOGIE	24
2	FACTEURS DE RISQUE DU CHONDROSARCOME	24
3	CLASSIFICATION DES CHONDROSARCOMES	25
3.1	HISTOLOGIE ET HISTOGENESE DU TISSU CARTILAGINEUX	26
3.2	LES CHONDROSARCOMES CONVENTIONNELS	30
3.2.1	LE CHONDROSARCOME PRIMAIRE CONVENTIONNEL INTRA-MEDULLAIRE OU CENTRAL	30
3.2.1.1	EPIDEMIOLOGIE ET SITES D'ATTEINTE	30
3.2.1.2	SYMPTOMATOLOGIE CLINIQUE ET IMAGERIE	30
3.2.1.3	HISTOPATHOLOGIE	30
3.2.2	LES CHONDROSARCOMES SECONDAIRES	33
3.2.2.1	LE CHONDROSARCOME PERIPHERIQUE SECONDAIRE	33
3.2.2.2	LE CHONDROSARCOME CENTRAL SECONDAIRE	34
3.2.2.3	LE CHONDROSARCOME DU PERISOTE OU JUXTA-CORTICAL	34
3.3	LES CHONDROSARCOMES NON CONVENTIONNELS	35
3.3.1	LE CHONDROSARCOME DEDIFFERENCIE	35
3.3.2	LE CHONDROSARCOME MESENCHYMATEUX	36
3.3.3	LE CHONDROSARCOME A CELLULES CLAIRES	36
4	PATHOGENESE ET BIOPATHOLOGIE DU CHONDROSARCOME	37
4.1	LA « NICHE » OSSEUSE: UN SANCTUAIRE POUR LA CROISSANCE TUMORALE DU CHONDROSARCOME	37
4.2	DEREGULATION DES VOIES DE SIGNALISATION	39
4.2.1	LA VOIE DE SIGNALISATION HEDGEHOG/ParaTHormone related Peptide (Hh/PTHrP)	39
4.2.2	DEREGULATION DU CYCLE CELLULAIRE : LES VOIES DE SIGNALISATION pRb, p53	40
4.3	MUTATION DES ENZYMES ISOCITRATE DEHYDROGENASE IDH1/IDH2	41
4.4	MUTATION DES GENES <i>EXT1</i> ET <i>EXT2</i>	42
4.5	MUTATION DU GENE <i>COL2A1</i>	43
5	TRAITEMENT	43
5.1	LE TRAITEMENT CHIRURGICAL	43
5.2	PLACE DE LA RADIOTHERAPIE ET DE LA CHIMIOOTHERAPIE	45

5.2.1	LA RADIOTHERAPIE-----	45
5.2.1.1	MECANISMES DE LA RADIORESISTANCE-----	45
5.2.1.2	INDICATIONS DE LA RADIOTHERAPIE ET EVALUATION DU BENEFICE CLINIQUE A TRAVERS LA LITTERATURE-----	45
5.2.2	LA CHIMIOOTHERAPIE -----	47
5.2.2.1	MECANISMES DE LA CHIMIORESISTANCE -----	47
5.2.2.2	INDICATIONS DE LA CHIMIOOTHERAPIE ET EVALUATION DU BENEFICE CLINIQUE A TRAVERS LA LITTERATURE-----	48
5.3	PRONOSTIC DE LA MALADIE-----	50
5.3.1	LES FACTEURS PRONOSTIQUES CLINIQUES ET PARACLIQUES -----	50
5.3.1.1	LE TYPE HISTOLOGIQUE-----	50
5.3.1.2	LE GRADE HISTOLOGIQUE-----	51
5.3.1.3	LA MARGE CHIRURGICALE-----	52
5.3.1.4	LA LOCALISATION ANATOMIQUE-----	52
5.3.2	LES NOUVEAUX MARQUEURS MOLECULAIRES PREDICTIFS DU PRONOSTIC-----	52
5.4	PLACE DES THERAPIES CIBLEES DANS LE TRAITEMENT DU CHS -----	53
5.4.1	LES INHIBITEURS DES RECEPTEURS A ACTIVITE TYROSINE KINASE -----	53
5.4.2	LES INHIBITEURS DES ISOCITRATE DESHYDROGENASES -----	54
5.4.3	LES INHIBITEURS DE m-TOR -----	54
5.4.4	LES INHIBITEURS DE LA VOIE HEDGEHOG -----	55
5.4.5	LES INHIBITEURS DE LA PROTEINE ANTI-APOPTOTIQUE BCL-2-----	56
5.4.6	LES INHIBITEURS D'ACTEURS CLEFS DU CYCLE CELLULAIRE -----	56
5.4.7	LES INHIBITEURS DE L'HISTONE DESACETYLASE -----	56
5.4.8	CIBLAGE DE LA NICHE OSSEUSE -----	57
6	CONTEXTE DE NOS TRAVAUX -----	58
6.1	L'HYPOXIE TUMORALE -----	59
6.1.1	DEFINITION ET PHYSIOPATHOLOGIE DE L'HYPOXIE TUMORALE -----	59
6.1.2	REPOSE ADAPTATIVE A L'HYPOXIE TUMORALE : LA VOIE DE SIGNALISATION HIF -----	61
6.1.3	MECANISMES DE LA CHIMIO ET RADIORESISTANCE DU TISSU TUMORAL HYPOXIQUE -----	62
6.1.3.1	CHIMIORESISTANCE-----	62
6.1.3.2	RADIORESISTANCE -----	63
6.1.4	TRAITEMENTS CIBLANT L'HYPOXIE -----	65
6.1.5	LES PRODRUGUES ACTIVABLES EN MILIEU HYPOXIQUE: CONCEPTION, BIOACTIVATION ET CRITERES D'ACTIVITE-----	67
6.1.5.1	LES COMPOSES QUINONIQUES -----	70
6.1.5.2	LES N-OXYDES AROMATIQUES -----	71

6.1.5.3	LES N-OXYDES ALIPHATIQUES	73
6.1.5.4	LES COMPOSES NITRO(HETERO)AROMATIQUES	74
6.1.5.5	NOUVELLES HAPs LIBERANT DES EFFECTEURS AUTRES QUE LES AGENTS ALKYLANTS DE L'ADN	81
6.2	CIBLAGE DU STROMA TUMORAL DU CHONDROSARCOME	85
6.2.1	DEFINITION ET COMPOSITION DU STROMA TUMORAL	85
6.2.2	LA MATRICE EXTRACELLULAIRE DU STROMA TUMORAL DU CHONDROSARCOME : UN FOCUS SUR LES PROTEOGLYCANES	86
6.2.2.1	STRUCTURE	86
6.2.2.2	CLASSIFICATION	88
6.2.2.3	FONCTIONS	89
6.2.2.4	LES PROTEOGLYCANES DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE CARTILAGINEUSE	90
RESULTATS ET DISCUSSION		
1	PHARMACOMODULATION DU VECTEUR (AQ ET BRAS ESPACEUR)	99
1.1	SCHEMA GENERAL DE SYNTHESE	99
1.2	SYNTHESE DES PRECURSEURS	99
1.2.1	SYNTHESE DE L'ALCOOL 2-NITROIMIDAZOLE 6	99
1.2.2	SYNTHESE DU CHLORURE DE L'ACIDE N,N-BIS-(2-CHLOROETHYL)- PHOSPHORAMIDIQUE 8	110
1.2.3	SYNTHESE DES DIAMINES PRIMAIRES N,N-DISUBSTITUEES 18-22	113
1.2.3.1	SYNTHESE	113
1.2.3.2	ELEMENTS D'ELUCIDATION STRUCTURALE	117
1.3	SYNTHESE DES PRODRUGUES NON VECTORISEES 23-27	117
1.3.1	SYNTHESE	117
1.3.2	ELEMENTS D'ELUCIDATION STRUCTURALE	124
1.4	SYNTHESE DES COMPOSES VECTORISÉS AMMONIUMS QUATERNAIRES	128
1.4.1	SYNTHESE	128
1.4.2	ELEMENTS D'ELUCIDATION STRUCTURALE	136
1.5	EVALUATION BIOLOGIQUE DES DERIVES AQ 28-32 : AFFINITE POUR L'AGGREGANE, DIFFERENTIEL DE CYTOTOXICITE EN NORMOXIE VERSUS HYPOXIE ET CLIVAGE EN MILIEU HYPOXIQUE	138
2	SYNTHESE D'ANALOGUES BROMES	141
2.1	SYNTHESE DU DICHLORURE DE L'ACIDE N,N-BIS(2-BROMOETHYL)- PHOSPHORAMIDIQUE (34)	143
2.2	SYNTHESE DES PRODRUGUES AMINES III ^{aires} 35a et 35b	146
2.2.1	SYNTHESE	146
2.2.1.1	SYNTHESE DU COMPOSE 35a	147
2.2.1.2	SYNTHESE DU COMPOSE 35b	149

2.2.2	ELEMENTS D'ELUCIDATION STRUCTURALE-----	149
2.3	SYNTHESE DES PRODRUGUES VECTORISEES AMMONIUMS QUATERNAIRES -----	150
2.3.1	SYNTHESE DU COMPOSE 36a -----	150
2.3.2	SYNTHESE DU COMPOSE 36b -----	153
3	SYNTHESE D'ANALOGUES ISOMERES DE POSITION -----	155
3.1	SYNTHESE DES DIAMINES <i>N,N</i> -DISUBSTITUEES -----	156
3.1.1	METHODES EN UNE ETAPE UTILISANT UN 1,2-DIHALOGENOETHANE OU DU 2-HALOGENOETHANOL : METHODES 1, 3 ET 4-----	159
3.1.1.1	METHODE 1 -----	159
3.1.1.2	METHODE 3 -----	159
3.1.1.3	METHODE 4 -----	159
3.1.2	METHODE EN UNE ETAPE A PARTIR DU CHLOROACETALDEHYDE : METHODE 2 -----	159
3.1.3	METHODE EN DEUX ETAPES A PARTIR DU CHLORURE DE CHLOROACETYLE : METHODE 5	160
3.1.4	METHODE EN TROIS ETAPES A PARTIR DU 2-BROMOACETATE D'ETHYLE : METHODE 6 ---	160
3.2	VOIE A : RESULTATS ET DISCUSSION-----	162
3.3	VOIE B : RESULTATS ET DISCUSSION-----	164
3.4	VOIE C : RESULTATS ET DISCUSSION-----	165
3.5	ALTERNATIVES AUX ISOMERES DE POSITION -----	166
3.5.1	SYNTHESE DU COMPOSE 52-----	166
3.5.1.1	SYNTHESE DU DICHLORURE D'ACIDE (2-CHLOROETHYL)(PROP-2-YN-1-YL)PHOSPHORAMIDIQUE 48 -----	167
3.5.1.2	SYNTHESE DE LA 3-AZIDO- <i>N,N</i> -DIMETHYLPROPAN-1-AMINE 50 -----	169
3.5.1.3	REACTION DE COUPLAGE DE L'ALCOOL 6 AVEC LE DICHLORURE D'ACIDE (2-CHLOROETHYL)(PROP-2-YN-1-YL)PHOSPHORAMIDIQUE 48 POUR CONDUIRE AU DERIVE PHOSPHORODIAMIDATE 49 (Figure 124)-----	169
3.5.1.4	REACTION DE CHIMIE CLICK, CYCLOADDITION 1,3-DIPOLAIRE-----	169
3.5.1.5	QUATERNISATION DE LA FONCTION AMINE III ^{AIRE} -----	170
3.5.2	SYNTHESE DU COMPOSE 55-----	170
PARTIE EXPERIMENTALE		
1.	GENERAL INFORMATION -----	179
2.	EXPERIMENTAL PROTOCOLS-----	180

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Répartition du taux d'incidence des tumeurs osseuses en fonction de l'âge de survenue en Angleterre (1998-2007)	23
Figure 2: Illustration de la formation de la matrice extracellulaire du cartilage hyalin	27
Figure 3: Répartition de la MEC cartilagineuse en matrice pérircellulaire, territoriale et inter-territoriale ..	28
Figure 4a-c: Coupes histologiques des trois types de tissu cartilagineux: hyalin, élastique et fibreux.....	29
Figure 5: Une masse tumorale cartilagineuse intra-médullaire située au niveau de la métadiaphyse du fémur proximal, mesurant 9,5 cm, située. Une couleur blanche à gris bleuâtre, une surface de coupe lobulée ainsi qu'une destruction corticale sont observées	31
Figure 6a-d: Coupes histologiques de CHS conventionnels de différents grades	32
Figure 7: Représentation des différences histologiques observées entre les trois grades histologiques 1, 2 et 3 du CHS conventionnel	33
Figure 8: CHS secondaire périphérique se développant à partir d'un ostéochondrome, montrant un épaissement de la coiffe du cartilage	34
Figure 9: Coupe histologique d'un CHS dédifférencié, montrant une transition abrupte entre une zone de CHS conventionnel de bas grade (flèche à gauche) et la composante dédifférenciée avec des cellules fusiformes (flèche à droite)	35
Figure 10: Coupe histologique d'un CHS mésenchymateux, montrant un modèle bimorphe : des îlots de cartilage hyalin adjacentes à des îlots de cellules indifférenciées.....	36
Figure 11: Coupe histologique d'un CHS à cellules claires montrant un modèle bimorphe : des zones de chondrocytes d'apparence normale adjacentes à des zones de chondrocytes à cytoplasme clair et un large noyau	37
Figure 12a-b: Coupes histologiques d'un tissu tumoral cartilagineux, montrant l'étroite dépendance de la lésion tumorale du microenvironnement osseux.....	38
Figure 13: Illustration de la voie de signalisation Hh chez les mammifères.....	39
Figure 14: Effets métaboliques de la mutation IDH sur le cycle de Krebs : l'enzyme sauvage IDH produit l' α -cétoglutarate. L'enzyme mutante le convertit en 2-hydroxyglutarate, un oncométabolite potentiel	42
Figure 15: Evènements génétiques et moléculaires, précoces et tardifs, impliqués dans la genèse et la progression du CHS	43
Figure 16: Principe de la protonthérapie (SOBP : Spread-out Bragg Peak)	46
Figure 17: Illustration, par l'estimateur de Kaplan-Meier, de la corrélation entre la survie et le type histologique dans la série de Bindiganavile et al.	50
Figure 18: Illustration de l'hypoxie aiguë et chronique, au sein d'une masse tumorale proliférant autour d'un vaisseau sanguin	60
Figure 19: Anomalies structurales et fonctionnelles affectant le réseau vasculaire irriguant une tumeur..	61

Figure 20: Mécanisme moléculaire de la réponse adaptative à l'hypoxie, induite par HIF	62
Figure 21: Illustration de la corrélation entre la fraction de cellules vivantes et la dose d'irradiation nécessaire (en Gy), selon l'état d'oxygénation du tissu (en normoxie ou en hypoxie) (un ratio de 2,5-3 est nécessaire, visualisé par les traits pointillés)	64
Figure 22: Impact de l'hypoxie tumorale sur les traitements conventionnels des tumeurs : la chimiothérapie, la chirurgie et la radiothérapie	65
Figure 23: Illustration de l'amélioration de la biodisponibilité du dabigatran etexilate via l'approche de prodroge	66
Figure 24: Agencement structural des HAPs en trois unités fondamentales : trigger, linker et therapeutic warhead. Exemple d'une HAP nitroaromatique, le KS119	68
Figure 25: Mécanisme de bioactivation d'une HAP.....	69
Figure 26: Représentation schématique du mécanisme d'activation mono et diélectronique des HAPs par les réductases intracellulaires dans les conditions d'aérobie et d'anaérobie	69
Figure 27: HAPs de structure quinonique.....	70
Figure 28: Bioactivation à un électron et deux électrons de l'apaziquone	71
Figure 29: Bioactivations mono et di-électronique de la tirapazamine	72
Figure 30: Structure du Q6, un analogue de la TPZ ayant montré une meilleure activité antiproliférative (par inhibition de la topoisomérase II) et une sélectivité d'action accrue en milieu hypoxique	73
Figure 31: Structure du SN30000, un analogue de la TPZ	73
Figure 32: Bioactivation de l'AQ4N (banoxantrone).....	73
Figure 33: Composés nitro-imidazolés utilisés comme radiosensibilisateurs ou marqueurs de l'hypoxie in vitro ou in vivo	75
Figure 34: Bioactivation de l'évofosfamide, par un processus de réduction monoélectronique	76
Figure 35: L'évofosfamide diminue la fraction hypoxique de la tumeur sur un modèle murin de rhabdomyosarcome.....	77
Figure 36: Bioactivation de la pré-prodroge PTT-104 par une réduction mono- ou di-électronique	79
Figure 37: Structure et mécanisme de bioactivation monoélectronique de la prodroge KS119	80
Figure 38: Structure du « PNBC »	81
Figure 39: Structure de la camptothécine	81
Figure 40: Le CPT4 et le CPT6, deux analogues de la camptothécine, plus hydrosolubles et activables en milieu hypoxique.....	82
Figure 41: Métabolisme de l'irinotécan en métabolite actif, le SN-38.....	82
Figure 42: Mécanisme de bioactivation de la prodroge « IOS » pour donner le SN-38	83
Figure 43: Prodrogues activables en hypoxie du paclitaxel.....	83
Figure 44: Conception de prodrogues activables en hypoxie du SN-38 et du paclitaxel	84

Figure 45: Bioactivation du TH-4000 par une réduction mono-électronique	84
Figure 46: Exemples de HAPs libérant, après bioactivation en milieu hypoxique, des agents de thérapie ciblée	85
Figure 47: Représentation schématique de la composition du stroma tumoral	85
Figure 48: Représentation schématique de la structure tridimensionnelle de la MEC cartilagineuse, formée de chondrocytes, de fibres de collagènes et de PGs	86
Figure 49: Représentation schématique de la structure d'un monomère de PG.....	87
Figure 50: Structure de l'entité disaccharidique des GAGs de type héparane sulfate, chondroïtine sulfate, dermatane sulfate et kératane sulfate	88
Figure 51: Représentation schématique de l'aggrégane	90
Figure 52: Biodistribution de la radioactivité du [³ H]-Mel-AQ et du [³ H]-Mel	93
Figure 53: Conception structurale de la prodrogue ICF05016	94
Figure 54: Structures des composés clivable non vectorisé ICF05014 et non clivable vectorisé ICF05017 ..	94
Figure 55: Evaluation in vivo de l'efficacité anti-tumorale et de la toxicité des trois composés ICF05014, ICF05016 et ICF05017	95
Figure 56: Axes de pharmacomodulation du composé « hit » ICF05016	96
Figure 57: Rétrosynthèse des composés 28-32 analogues du « lead » ICF05016	99
Figure 58: Préparation de synthons 2-aminoimidazoles selon la méthode de Marckwald, au départ d'un α-aminoaldéhyde ou d'une α-aminocétone	100
Figure 59: Synthèse d'un 2-aminoimidazole N-substitué au départ d'un α-aminoacétal.....	100
Figure 60: Voies d'accès à l'alcool 6 selon Matteuci <i>et al.</i> (A) et O'Connor <i>et al.</i> (B).....	101
Figure 61: Méthode de préparation de l'imidazole III	102
Figure 62: Voie d'accès à l'alcool 6 au départ de l'imidazole III	102
Figure 63: Séquence réactionnelle retenue pour la préparation de l'alcool 6.....	102
Figure 64: Spectre RMN ¹ H du composé N-formylé 3 (dans le CDCl ₃ , 300 MHz) mettant en évidence la présence de deux rotamères	104
Figure 65: Mécanisme proposé pour la N-déformylation en milieu acide	105
Figure 66: Mécanisme de la cyclisation de Marckwald	105
Figure 67: Différentes voies de dérivatisation possibles de l'ester 2-nitroimidazole 5	107
Figure 68: Exemples de voies de conjugaison de nitroimidazoles fonctionnalisés en position C-5 à des molécules biologiquement actives	107
Figure 69: Mécanisme d'activation de la fonction acide par le chloroformiate d'isobutyle.....	108
Figure 70: Spectre RMN ¹ H (dans le DMSO-d ₆ , 400 MHz) du brut réactionnel de l'alcool 6, montrant une impureté minérale vers 6,53 ppm	110

Figure 71: Préparation du composé 8 au départ de la bis(2-chloroéthyl)amine HCl et du POCl ₃ à reflux..	111
Figure 72: Principe de révélation en CCM des agents alkylants à l'aide du système 4-NBP/KOH	112
Figure 73: Structure générale des diamines 18-22 synthétisées dans le cadre de l'étude de pharmacomodulation sur la partie vecteur du « lead »	113
Figure 74: Synthèse de <i>N,N</i> -dialkylaminobutylamines au départ de dérivés chloroacétamide <i>N,N</i> -disubstitués	113
Figure 75: Synthèse de diamines <i>N,N</i> -disubstituées au départ de dérivés bromonitriles commercialisés	114
Figure 76: Synthèse de Gabriel des diamines <i>N,N</i> -disubstituées au départ du phthalimide de potassium .	114
Figure 77: Mécanisme d'obtention des amines 18-22 par hydrazinolyse des phthalimides correspondants	116
Figure 78: Séquence réactionnelle pour la préparation des composés 23-27 analogues du « lead » ICF05016	118
Figure 79: Suivi de la cinétique de formation composé 24d par RMN ³¹ P	119
Figure 80: Suivi de la cinétique de formation composé 26a par RMN ³¹ P	120
Figure 81: RMN ³¹ P des composés 25a-d montrant la présence constante d'une impureté phosphorée (16,8 à 17,6 ppm)	123
Figure 82: Spectre RMN ¹ H (dans le CDCl ₃) de la fraction majoritaire élue lors de la synthèse du composé 25c (structures des composés 25c et de l'impureté présumée 25AA)	123
Figure 83: Mise en évidence du couplage H-H et H-P dans le cas des protons CH ₂ OP du composé 23c (dans le CDCl ₃ , 500 MHz)	126
Figure 84: Spectre HRMS en mode électrospray du composé 25d	127
Figure 85: Réaction de quaternisation des précurseurs amines III ^{aires} 23-27	128
Figure 86: Spectre RMN ³¹ P du brut réactionnel du composé 29g.....	131
Figure 87: Spectre RMN ¹ H du brut réactionnel du composé 29g	132
Figure 88: Spectre RMN ¹³ C (dans le CD ₃ OD, 500 MHz) du brut réactionnel du composé 29g.....	132
Figure 89: Structure présumée de l'impureté issue de la cyclisation intramoléculaire	133
Figure 90: Spectre RMN ³¹ P du brut réactionnel issu de la réaction à reflux entre l'iodure d'isopropyle et le composé 23a.....	134
Figure 91: Spectre RMN ³¹ P du brut réactionnel du composé 31h	135
Figure 92: Spectre HRMS du composé 31d.....	137
Figure 93: Principe de la SPR et illustration d'un sensorgramme de biodétection	139
Figure 94: Cytotoxicités des 12 composés sélectionnés en SPR, sur la lignée HEMC-SS, exprimées en IC ₅₀ (μM) et différentiels de cytotoxicité en normoxie versus hypoxie.....	140
Figure 95: Structure des analogues bromés envisagées 36a et 36b	141
Figure 96: Approche rétrosynthétique pour la préparation des analogues dibromés 36a et 36b	141

Figure 97: Différence d'activité cytotoxique entre l'évofosfamide et son analogue chloré sur la lignée H460	142
Figure 98: Synthèse du composé 34 au départ de la diéthanoline	143
Figure 99: Spectre RMN ^1H (dans le CD_3OD , à 500 MHz) du composé 33 (obtenu selon la méthode de Flader et al.) indiquant la présence d'une impureté à une teneur $\sim 16\%$ molaire.....	144
Figure 100: Spectre RMN ^1H (dans le D_2O , à 500 MHz) du composé 33, indiquant la présence d'impureté, de la morpholine.HBr et de la diéthanoline.HBr	145
Figure 101: Séquence réactionnelle pour la préparation des composés bromés 35a et 35b.....	146
Figure 102: Suivi de la cinétique de formation du composé 35a par monitoring RMN ^{31}P	146
Figure 103: Profil en RMN ^{31}P d'une fraction du composé 35a à l'issue d'une purification sur colonne de gel de silice	147
Figure 104: Dégradation du composé 35a observée par RMN ^{31}P , montrant une augmentation des impuretés après passage sur colonne et évaporation prolongée.....	148
Figure 105: Extraits des spectres RMN ^1H (dans le CD_3OD) des formes base et chlorhydrate du composé 35a	150
Figure 106: Séquence réactionnelle pour la préparation de l'analogue bromé 36a du « lead » ICF05016	151
Figure 107: Profil RMN ^{31}P du brut réactionnel de la quaternisation du composé 35a avec l'iodure de méthyle	151
Figure 108: Profil HRMS du brut réactionnel de la réaction de quaternisation du 35a avec un excès d'iodométhane.....	152
Figure 109: Synthèse du dérivé bromure d'éthyldiméthylammonium 37	153
Figure 110: Synthèse du dérivé bromure d'éthyldiméthylammonium 36b	154
Figure 111: Structure générale des composés isomères de position 44a-c	155
Figure 112: Schémas rétrosynthétiques possibles pour l'accès aux isomères de position 44a-c	156
Figure 113: Structure générale des synthons diamines 40a-c.....	156
Figure 114: Différentes voies d'accès aux diamines 40a-c	157
Figure 115: Structure présumée du composé obtenu par la méthode 1	159
Figure 116: Schéma réactionnel en trois étapes pour la préparation des diamines 40a-c.....	161
Figure 117: Voies réactionnelles A et B d'accès aux phosphoramides 41a-c.....	162
Figure 118: Spectre RMN ^1H du dérivé 41c (CD_3OD , 500 MHz,).....	163
Figure 119: Préparation du dérivé phosphorylé 42.....	164
Figure 120: Structure du bisphosphoramide identifié comme le sous-produit majoritaire de la réaction entre le POCl_3 et le chlorhydrate du 2-bromoéthylamine à froid	164
Figure 121: Préparation du dérivé phosphoramidique N-méthyle 43b	165
Figure 122: Réaction de couplage "témoin"	165

Figure 123: Structures des composés envisagés 52 et 55, issus de l'approche de chimie clik.....	166
Figure 124: Voie de synthèse du composé 52, équivalent de l'isomère de position du lead ICF05016, portant un noyau triazole	167
Figure 125 : Schéma réactionnel pour la synthèse du dérivé phosphoramidique alcyne 48.....	167
Figure 126: Méthode de synthèse de l'azoture 50.....	169
Figure 127: Voie de synthèse du composé 55, équivalent du lead ICF05016	170

LISTE DS TABLEAUX

Tableau 1: Différents types de CHS, selon la base de classification	25
Tableau 2: Teneur en O ₂ , exprimée en P _{O2} (en mmHg), dans une variété de tumeurs versus leurs analogues sains (review de Brown et al.)	65
Tableau 3: Résultats des trois réactions de préparation du composé 8, indiquant le temps de reflux et le rendement, selon l'échelle de la réaction	111
Tableau 4: Liste des prodrogues préparées 23-27	118
Tableau 5: Déplacements chimiques (en ppm dans le CDCl ₃ , 500 MHz) des protons du méthyle et du méthylène pour les composés de la série N,N-diméthyle substituée, montrant la présence du composé 23d sous une forme chlorhydrate.....	122
Tableau 6: Déplacements chimiques (en ppm, dans le CDCl ₃), multiplicités et constante de couplage des signaux RMN ¹ H et ¹³ C relatifs aux entités 2-nitroimidazole et dichlorophosphorodiamidate pour le composé 23c.....	125
Tableau 7: Liste des prodrogues AQ 28-32.....	130
Tableau 8: Déplacements en RMN ¹ H (500 Mz) et ¹³ C (126 MHz) dans le CD ₃ OD des protons et carbones des méthylènes et méthyle(s) en α de l'azote du dérivé AQ 31c, comparativement à son précurseur 26c	136
Tableau 9: Méthodes décrites dans la littérature pour la préparation du composé 33	143
Tableau 11: Résultats en termes de rendement et de pureté des synthèses des lots 1 et 2 du composé 33	144
Tableau 11: Résumé des essais réalisés pour l'obtention du composé 35a	148
Tableau 12: Voies réactionnelles d'accès aux diamines : conditions opératoires, substrats utilisés dans la littérature et résultats obtenus	158

LISTE DES ABREVIATIONS

4-NBP :	4-(4'-nitrobenzyl)pyridine
ACN :	Acétonitrile
AcOEt :	Acétate d'éthyle
ADC :	Antibody Drug Conjugate
ADME :	Adsorption, Distribution, Elimination, Métabolisme
AKR1C3 :	Aldo-cétoréductase 1C3
AMM :	Autorisation de Mise sur le Marché
AQ :	Ammonium Quaternaire
Bcl-2 :	B-cell lymphoma 2
CCM :	Chromatographie sur Couche Mince
CD₃OD :	Méthanol deutéré
CDCl₃ :	Chloroforme deutéré
CHS :	Chondrosarcome
CI₅₀ :	Concentration Inhibitrice 50
COSY :	Correlation Spectroscopy
CYP450 :	Cytochrome P450
DCM :	Dichlorométhane
DIPEA :	<i>N,N</i> -diisopropyléthylamine
DMF :	Diméthylformamide
DMSO-<i>d</i>₆ :	Diméthylsulfoxyde deutéré
EGFR :	Epidermal Growth Factor Receptor
EPR :	Enhanced Permeability and Retention
équi. :	Equivalents
Et₂O :	Ether diéthylique
EtOH :	Ethanol
FGF :	Fibroblast Growth Factor
FGFR :	Fibroblast Growth Factor Receptor
GAGs :	Glycosaminoglycanes
HAP :	Hypoxia Activated Prodrug
HCR :	Hypoxia Cytotoxicity Ratio
HEMC-SS :	Human Extraskelatal Myxoid Chondrosarcoma Cell Lines
Hh :	Hedgehog
HIF :	Hypoxia Induced Factor
HPLC :	High Performance Liquid Chromatography
HRE :	HIF Response Element
HRMS :	High Resolution Mass Spectra
HSQC :	Heteronuclear Single Quantum Coherence
HTC :	Hh Transducing Complex
IDH :	Isocitrate Dehydrogenase
IHh :	Indian Hedgehog

IRM :	Imagerie par Résonnance Magnétique Nucléaire
MDR:	Multi Drug Resistance
MEC :	Matrice Extracellulaire
Mel :	Melphalan
MeOH :	Méthanol
m-TOR :	mammalian Target of rapamycin
NQO1:	Quinone oxydoréductase 1
PDGFR:	Platelet-derived Growth Factor Receptor
PGCS :	Protéoglycanes chondroïtine sulfate
PGHS :	Protéoglycanes héparanes sulfate
P-gp:	Permeability glycoprotein
PGs :	Protéoglycanes
PI3K :	Phosphatidylinositol-3-kinase
P_{O2}:	Pression partielle en oxygène
pRb :	Retinoblastoma protein
PTC:	Patched
PTHrP:	ParaThyroid Hormone-related Protein
Rdt :	Rendement
RECIST:	Response Evaluation Criteria In Solid Tumors
RMN:	Résonnance Magnétique Nucléaire
SMO:	Smoothened
SPR :	Surface Plasmonic Resonance
SUFU :	Suppressor of Fused
ta :	Température ambiante
TEA :	Triéthylamine
TEP :	Tomographie par Emission de Positrons
THF :	Tétrahydrofurane
TK:	Tyrosine Kinase
TPZ :	Tirapazamine
u.m.a :	unité de masse atomique
VEGFR:	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

INTRODUCTION

AVANT-PROPOS

Avant-propos de la thèse

Mes travaux de doctorat ont débuté le 24 avril 2015 et se sont déroulés d'une part en France à l'UMR 1240 INSERM/UCA sur un total de 12 mois et d'autre part en Tunisie à la Faculté de Pharmacie de l'Université de Monastir, où j'occupe un poste d'assistante hospitalo-universitaire.

Mes recherches doctorales ont porté sur le chondrosarcome, tumeur du cartilage, décrite comme une pathologie cancéreuse chimio et radio-résistante, notamment de par la nature de son microenvironnement tumoral (i.e. matrice extracellulaire chondrogénique très importante limitant la diffusion des principes actifs, faible vascularisation et hypoxie). Le chondrosarcome souffre actuellement de l'absence d'une prise en charge thérapeutique satisfaisante, le seul traitement efficace reste l'exérèse chirurgicale avec une marge large de sécurité dans le tissu normal, indispensable pour le contrôle local de la tumeur, et donc l'amélioration de la survie. Ainsi, une chimiothérapie adjuvante voire néo-adjuvante se révélerait d'un grand intérêt. C'est dans cette optique que l'UMR1240 développe des prodrogues bispécifiques en mettant à profit deux caractéristiques du chondrosarcome, la forte densité en protéoglycanes, constituants majeurs de la matrice extracellulaire, et l'hypoxie du tissu tumoral.

Dans ce contexte, mes travaux de thèse ont consisté à synthétiser des analogues d'une prodrogue vectorisée d'une moutarde azotée développée au laboratoire, **ICF05016**. Plus spécifiquement, mes travaux ont concerné l'étude de relations structure-activité au niveau du vecteur ammonium quaternaire, de la longueur du bras espaceur et de la nature de la moutarde phosphoramidique (dérivés bromés et isomères).

Avant-propos du manuscrit

Ce manuscrit est composé de quatre parties. La première est consacrée à une étude bibliographique présentant la pathologie cancéreuse du cartilage et la place des stratégies conventionnelles de traitement (la chimiothérapie, la radiothérapie et la chirurgie) ainsi que les agents de thérapies ciblées dans sa prise en charge, puis introduisant les notions utiles à la compréhension de ce travail telles que l'hypoxie tumorale, les prodrogues activables en hypoxie et les caractéristiques du stroma tumoral du chondrosarcome. Le second chapitre est dédié à la description et à la discussion des synthèses organiques réalisées et s'achèvent sur les évaluations biologiques des prodrogues synthétisées tant en termes d'affinité pour l'aggrecane, qu'en termes d'activation en milieu réducteur et de cytotoxicité sur une lignée cellulaire de chondrosarcome humain. La troisième partie conclut les travaux de thèse et introduit les perspectives notre projet. Enfin, la quatrième partie décrit les protocoles expérimentaux de synthèses organiques associés aux caractérisations structurales des molécules. Cette dernière partie a été volontairement rédigée

en anglais afin de faciliter son inclusion dans une publication ; une partie de ces travaux vient d'ailleurs de faire l'objet récemment d'un article dans *l'European Journal of Medicinal Chemistry* :

Ghedira, D.; Voissière, A.; Peyrode, C.; Kraiem, J.; Gerard, Y.; Maubert, E.; Vivier, M.; Miot-Noirault, E.; Chezal, J.-M.; Farhat, F.; et al. Structure-Activity Relationship Study of Hypoxia-Activated Prodrugs for Proteoglycan-Targeted Chemotherapy in Chondrosarcoma. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, 158, 51–67.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1 GENERALITES SUR LE CHONDROSARCOME

1.1 PLACE DU CHONDROSARCOME AU SEIN DU GROUPE DES TUMEURS OSSEUSES

Le chondrosarcome (CHS) fait partie du groupe des tumeurs osseuses qui regroupent une large variété d'entités clinico-pathologiques distinctes. Ces tumeurs peuvent prendre naissance à partir des cellules osseuses ou de leurs précurseurs, avec une évolution bénigne ou maligne, associée ou non à des métastases. On parle alors de tumeurs osseuses primitives, dont la part d'incidence ne dépasse pas 1% de l'incidence globale de l'ensemble des tumeurs humaines. Elles peuvent aussi avoir comme origine des cellules non osseuses et sont alors connues sous le nom de tumeurs osseuses secondaires. Il s'agit, dans ce cas, de métastases osseuses, complications fréquentes de plusieurs types de cancers (sein, prostate, rein, etc...). Au sein de ce groupe de tumeurs osseuses, certaines sont purement ostéolytiques. D'autres conduisent plutôt, à la production d'une nouvelle matrice pouvant être calcifiée (cas de l'ostéosarcome), extracellulaire cartilagineuse (cas du CHS) et peuvent aussi induire des lésions mixtes ostéolytiques/ostéoblastiques **(1, 2)**.

La classification communément adoptée des tumeurs osseuses tient compte de la différenciation tissulaire. Au sein du groupe des tumeurs osseuses malignes primitives, nous distinguons essentiellement trois principales catégories : l'ostéosarcome, le CHS et le sarcome d'Ewing. L'ostéosarcome et le sarcome d'Ewing affectent principalement le sujet jeune avec des pics d'incidence vers 15-18 ans. Un autre pic d'âge est à noter pour l'ostéosarcome vers l'âge de 50 ans **(3)**. Le CHS, quant à lui, touche principalement des sujets adultes. Du point de vue fréquence, il occupe la 2^{ème} position après l'ostéosarcome parmi l'ensemble des tumeurs osseuses malignes primitives **(4) (Figure 1)**.

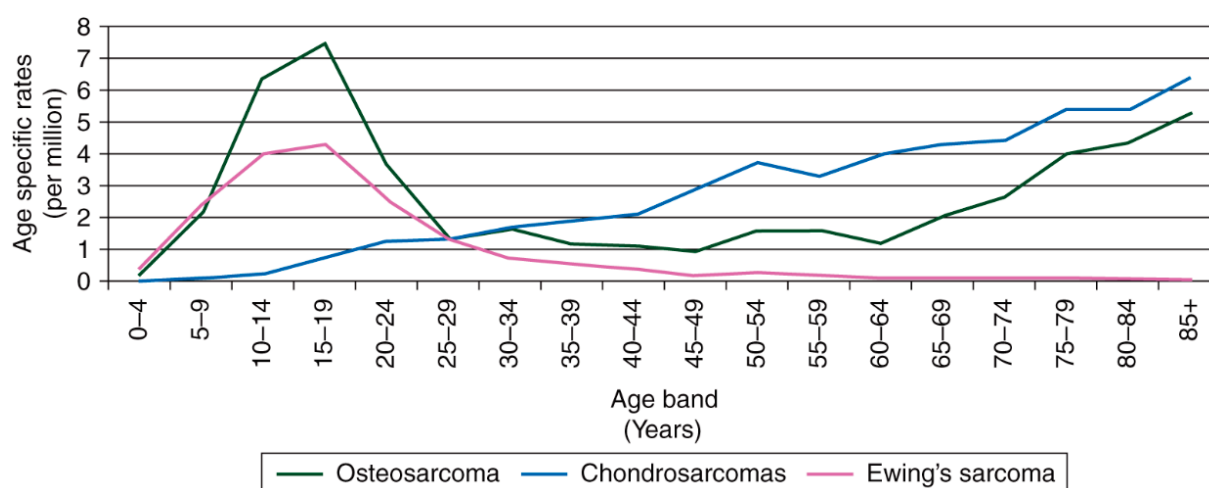


Figure 1: Répartition du taux d'incidence des tumeurs osseuses en fonction de l'âge de survenue en Angleterre (1998-2007) (5)

Nous présenterons dans cette partie dédiée au rappel bibliographique, une revue complète sur cette pathologie maligne dans tous ses aspects : épidémiologique, clinique, histologique, étiopathiopathologique, ainsi que l'état de l'art en matière de stratégies thérapeutiques. Nous

aborderons, au terme de cette revue, les pistes potentielles pour la mise au point de nouvelles thérapies et nous clôturons par nos objectifs qui convergent vers cet axe.

1.2 DEFINITION (2, 4, 6, 7)

Le terme « chondrosarcome » ne désigne pas une seule entité tumorale, mais un groupe hétérogène de tumeurs, dérivant de la même origine mésenchymateuse et partageant la caractéristique de produire une matrice tumorale cartilagineuse. On parle donc de « chondrosarcomes ». La croissance de ces tumeurs est lente, la récurrence locale est relativement élevée et les métastases sont rares.

La tumeur peut prendre naissance à partir du cartilage et des tissus mous, mais peut aussi se développer à partir de l'os. Tout le squelette peut être atteint avec, toutefois, une prédilection pour le pelvis et les os longs (le fémur et l'humérus proximal). Concernant l'âge de survenue, les patients diagnostiqués sont majoritairement des adultes entre 30 et 60 ans, avec une très légère prédilection pour le sexe masculin. Ces critères sont à affiner en fonction du type de CHS, en effet le CHS se développant à partir du cartilage et des tissus mous est plus observé chez les hommes et les patients d'âge supérieur à 50 ans, tandis que l'origine osseuse a une incidence plus élevée chez les femmes et les patients d'âge inférieur à 50 ans.

1.3 EPIDEMIOLOGIE

Le CHS est une tumeur maligne, considérée comme orpheline, occupant la 2^{ème} position en terme de fréquence, tout âge confondu, après l'ostéosarcome **(4)** et la 1^{ère} position chez le sujet adulte **(2)**. Il représente une part de 10 à 30% de l'ensemble des tumeurs osseuses malignes primitives **(4, 8, 9)**. Les données épidémiologiques extraites des registres du cancer en Europe indiquent une incidence annuelle de ~ 0,1/100 000 habitants **(10)**.

En France, une incidence annuelle de 1,7/1 000 000 habitants a été rapportée, avec une prévalence d'environ 150 cas **(11)**.

2 FACTEURS DE RISQUE DU CHONDROSARCOMME

Certains facteurs ou antécédents médicaux relatifs à l'historique du patient ont été associés à un risque plus élevé de développer un CHS. Nous en citerons principalement deux, à savoir des antécédents d'irradiation (CHS radio-induit, représentant 1/10^{ème} des sarcomes radio-induits et touchant le bassin, le fémur ou l'épaule) **(12, 13)** et la présence de lésions bénignes du cartilage. Dans ce dernier cas, la transformation maligne survient à partir d'enchondromes **(14)** ou d'ostéenchondromes **(15)**.

Les enchondromes sont des tumeurs intra-osseuses cartilagineuses bénignes, se développant dans la médullaire osseuse, notamment au niveau des mains (50 % des cas) mais aussi au niveau des os longs. Généralement solitaires, certains patients peuvent développer des enchondromes multiples, que l'on appelle des enchondromatoses, avec notamment la maladie d'Ollier ou encore le syndrome de Maffucci qui, lui, est caractérisé par une enchondromatose associée à des hémangiomes des tissus mous **(16, 17)**.

L'ostéochondrome, ou exostose, est la tumeur osseuse bénigne la plus fréquente. Elle correspond à une excroissance osseuse bien différenciée, produite par une coiffe de cartilage germinatif pendant la croissance. On peut, là aussi, diagnostiquer des ostéochondromes multiples ou ostéochondromatoses (15, 17).

Toutes ces tumeurs bénignes sont potentiellement évolutives en CHS, notamment d'atteintes multiples. Une étude rétrospective et multicentrique de Verdegaal *et al.* en 2011 (14) portant sur 161 patients atteints de la maladie d'Ollier et du syndrome de Maffucci a permis l'identification de deux groupes de patients avec des risques différents d'évolution en CHS, selon les localisations de l'enchondromatose : un groupe à risque important (44%-50%) pour les localisations des os longs et du squelette axial *versus* un groupe à risque plus faible (14%) pour les localisations des os courts des mains et/ou des pieds. Le risque de transformation maligne en CHS est particulièrement plus élevé pour la localisation pelvienne (*3,8). Des décès liés à la maladie ont été observés uniquement chez les patients atteints d'enchondromatoses des os longs ou plats.

L'ostéochondrome solitaire ou les ostéochondromes multiples peuvent aussi évoluer en CHS, mais la probabilité est toutefois faible, moins de 1 % des cas et 3 % à 5 % des cas respectivement (15).

3 CLASSIFICATION DES CHONDROSARCOMES (2, 6, 7)

Les CHS constituent un groupe hétérogène de tumeurs. Différents critères anatomiques, histologiques, primitifs *versus* secondaires, peuvent être utilisés pour les classer en sous-groupes distincts (Tableau 1).

Nous distinguons d'abord les CHS primitifs, qui émergent *de novo*, et les CHS secondaires qui se développent sur des lésions cartilagineuses bénignes pré-existantes.

Selon le site anatomique, nous différencions les tumeurs centrales qui se développent dans la cavité médullaire des os longs, des tumeurs périphériques qui se développent sur la coiffe cartilagineuse.

Se basant sur l'aspect histologique, un critère général a été adopté et permet de subdiviser les CHS en type conventionnel, lorsque l'examen microscopique montre une différenciation du cartilage hyalin semblable à celle du cartilage non néoplasique, et non-conventionnel correspondant à des variantes histologiques rares (mésenchymateux, à cellules claires et dédifférenciés). Le type conventionnel représente le type le plus rencontré (85%), avec une prédominance de la localisation intra-médullaire (CHS conventionnel central ou intra-médullaire) *versus* la forme périphérique (15%), se développant elle à partir de la surface d'un os.

Tableau 1: Différents types de CHS, selon la base de classification

Classification anatomique	Intramédullaire (central)
	Périphérique
	Juxta-cortical (péri-ostéal)
CHS primaire <i>versus</i> secondaire	Primaire (émerge <i>de novo</i>)
	Secondaire : prend naissance à partir d'une ébauche bénigne, de type :
	* ostéochondrome ou enchondrome * ostéochondromatose ou enchondromatose.
Classification histologique	Conventionnel
	Non conventionnels : dédifférencié, mésenchymateux, à cellules claires

Les CHS conventionnels et non-conventionnels (mésenchymateux, à cellules claires et dédifférenciés) montrent des caractéristiques épidémiologiques, anatomiques, radiologiques, pronostiques et thérapeutiques distinctes. Des marqueurs moléculaires et des altérations génétiques spécifiques ont pu aussi être identifiés **(18)**. Se basant sur une combinaison de ces critères, il serait possible d'établir un diagnostic différentiel fiable entre des tumeurs morphologiquement similaires, de situer la tumeur au sein d'une entité clinico-pathologique bien déterminée, et donc de décider de la prise en charge thérapeutique appropriée.

Avant d'aborder une description plus fine des différents types histologiques du CHS, il apparaît nécessaire de rappeler au préalable l'histologie du tissu cartilagineux non tumoral, ainsi que son histogenèse.

3.1 HISTOLOGIE ET HISTOGENESE DU TISSU CARTILAGINEUX (19-24)

Le tissu cartilagineux est un tissu conjonctif, élastique, solide, compact, translucide, déformable et non minéralisé. Il assure un rôle de soutien, facilite les mouvements et joue un rôle primordial dans l'ossification. Par rapport aux autres tissus conjonctifs, les cartilages ont la propriété de n'être ni vascularisés (sauf chez le fœtus), ni innervés.

Des analogies importantes entre le tissu cartilagineux et le tissu osseux existent et sont dues essentiellement au fait qu'ils se développent de façon coordonnée et conjointe jusqu'à la puberté. Le tissu cartilagineux constitue la plus grande partie du squelette embryonnaire et fœtal. Au cours de l'ossification primaire, la grande majorité de ce tissu est remplacée par du tissu osseux. A la puberté, il ne reste plus que les cartilages de conjugaison entre la métaphyse et l'épiphyse de l'os. Ces cartilages de conjugaison interviennent, au cours de l'enfance et de l'adolescence, dans la croissance des os longs, donc dans la taille du futur adulte. La croissance en longueur des os s'effectue grâce à la prolifération des cartilages de conjugaison suivie d'une ossification endochondrale, intervenant chez le fœtus et tout au long de la croissance jusqu'à l'âge adulte. Pendant toute la période de croissance staturale post-natale, la croissance des os longs est sous la dépendance de facteurs hormonaux : en effet les hormones sexuelles contrôlent la production d'IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1), qui agit sur la plaque métaphysaire et provoque la croissance des os. Ce contrôle s'opère de façon directe, mais aussi de façon indirecte par stimulation de la production de l'hormone de croissance GH (Growth Hormone) qui, à son tour, augmente IGF-1. Quand tous les cartilages de conjugaison ont été remplacés par du tissu osseux et qu'il ne reste plus de chondrocytes susceptibles de se diviser, la croissance en longueur des os longs est terminée et la taille définitive de l'individu est atteinte.

Contrairement aux tissus des organes parenchymateux, formés de 95% de cellules, les tissus conjonctifs et notamment cartilagineux sont composés à 90-95% d'une matrice extracellulaire (MEC) au sein de laquelle baignent les cellules cartilagineuses peu abondantes (chondrocytes et chondroblastes). Cette matrice est composée de 70 à 75% d'eau, ce qui assure la déformabilité du cartilage, et de deux constituants majeurs, les fibres de collagène et les protéoglycanes (PGs), s'enchevêtrant pour donner une structure supramoléculaire particulièrement élaborée et dense, au sein de laquelle sont dispersés les chondrocytes **(Figure 2)**.

➤ **Les fibres de collagène** : représentent 10–20% du poids sec du cartilage articulaire et sont composées principalement du type II et de quantités réduites, mais fonctionnellement importantes, des types VI, IX, X et XI.

➤ **Les protéoglycanes** : ce sont des protéines polysaccharidiques complexes, formées d'une protéine porteuse sur laquelle viennent se fixer, par liaison covalente, plusieurs chaînes de glycosaminoglycanes (GAGs). Les PGs, avec les fibres de collagène, sont tous les deux responsables de la compressibilité élastique du cartilage.

Etant l'un des deux piliers de notre approche de ciblage bispécifique développée au cours de ce projet de thèse, une revue bibliographique étayant les différents aspects des PGs (structure, classification, fonctions biologiques et implication dans les processus tumoraux) leur sera consacrée dans la partie **6.2.2.** de ce manuscrit.

➤ **Les chondrocytes** : leur rôle consiste à assurer la synthèse et la dégradation de toutes les composantes de la MEC cartilagineuse, dans laquelle ils sont dispersés.

Les chondrocytes du cartilage mûr sont des cellules volumineuses et arrondies, qui ne se divisent plus. Ils ont pour rôle de maintenir l'intégrité de la matrice cartilagineuse et de préserver ses propriétés mécaniques en assurant la synthèse et la dégradation des molécules matricielles (synthèse de cytokines et facteurs de croissance, des collagènes, des PGs, d'enzymes protéolytiques, des récepteurs pour l'hormone de croissance, des vitamines A et D, d'œstrogènes, etc).

Etant un tissu non vascularisé, les chondrocytes vivent en quasi autarcie et en milieu anaérobie. Les échanges métaboliques des chondrocytes et leur nutrition sont assurés par diffusion sur plusieurs millimètres à travers la MEC, à partir du périchondre. Ce dernier est une capsule fibreuse construite de cellules mésenchymateuses différenciées en fibroblastes et située sur la périphérie d'une ébauche cartilagineuse. Tous les cartilages hyalins, à l'exception des cartilages articulaires, sont recouverts d'un périchondre. Dans ce dernier cas, la nutrition des chondrocytes dépend du liquide synovial, par diffusion et convection.

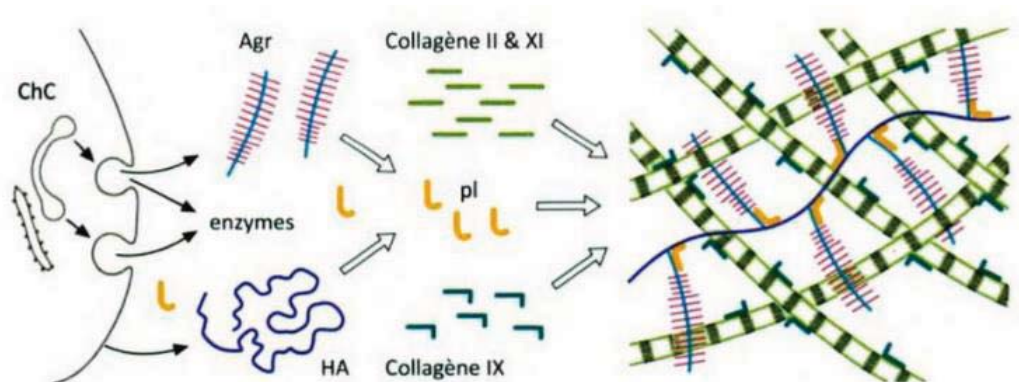


Figure 2: Illustration de la formation de la matrice extracellulaire du cartilage hyalin (19)

[Agr : monomère d'aggrécane ; ChC : chondrocyte ; HA : Acide hyaluronique ; pl : protéine de liaison.

Les monomères d'aggrécane et d'acide hyaluronique, tous deux sécrétés par les chondrocytes, s'assemblent grâce à des protéines de liaison pour donner de grands agrégats. Ceux-ci s'enchevêtrent au sein d'un réseau de fibres de collagène pour donner une MEC de structure supramoléculaire].

La MEC cartilagineuse peut être subdivisée en trois zones : la matrice péri-cellulaire, la matrice territoriale et la matrice inter-territoriale. Les fibres de collagène sont localisées essentiellement dans les matrices territoriales et inter-territoriales. Leur diamètre et densité augmentent, selon un gradient, depuis la zone territoriale vers la zone inter-territoriale. Quant aux PGs, ils forment un réseau plus fin au niveau de la matrice péri-cellulaire, où ils se trouvent attachés, via des récepteurs, à la membrane des chondrocytes (20) (Figure 3).

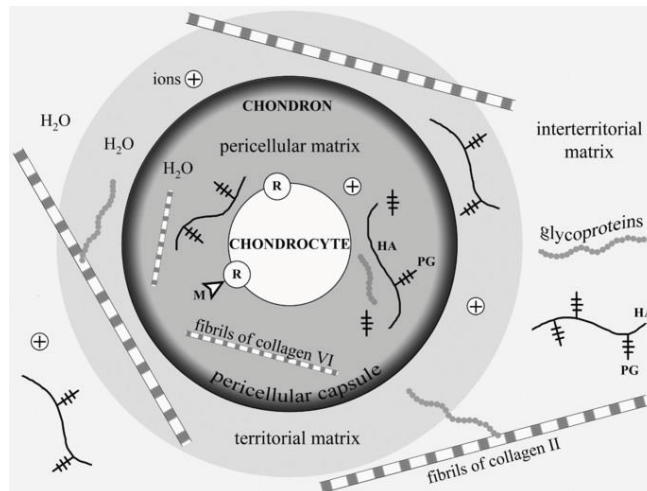
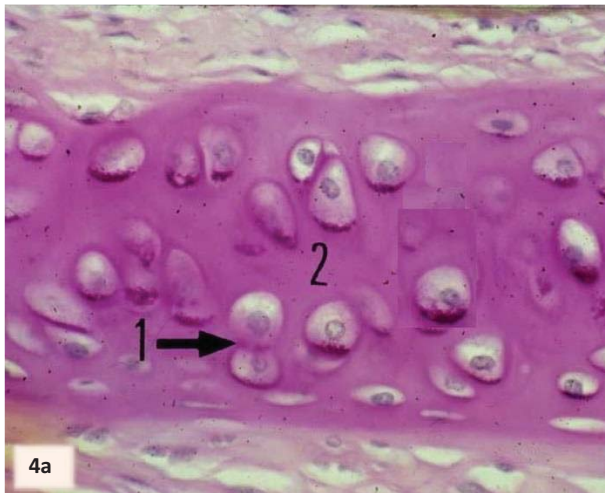


Figure 3: Répartition de la MEC cartilagineuse en matrice péri-cellulaire, territoriale et inter-territoriale (20)
[PG –proteoglycanes; HA – hyaluronic acid, GP – glycoproteins; M – morphogènes; R -molecular receptors of chondrocyte's membrane; (+) ions (K^+ , Na^+ , H^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+})]

Selon la composition et l'organisation de la MEC, notamment en termes de concentration en fibres de collagène ou de fibres d'élastine, on distingue trois types histologiques de tissu cartilagineux (hyalin, fibreux, élastique) avec des caractéristiques et localisations différentes (19):

- **Le cartilage hyalin :** il est le plus répandu dans l'organisme et constitue le précurseur de l'os en développement. On le trouve dans les voies respiratoires, la cloison nasale, à la surface des articulations mobiles (cartilage articulaire), le squelette laryngé, au niveau des côtes et des vertèbres (cartilage costal) et comme ébauches cartilagineuses du tissu osseux. Il a une apparence blanc vitreux et une épaisseur moyenne de 1,5 mm chez l'homme. Les microfibrilles de collagène, peu abondantes et de petit calibre, disposées en un réseau à mailles larges, ne sont pas visibles en microscopie optique, d'où l'aspect amorphe et homogène de la MEC du cartilage hyalin (Figure 4a).
- **Le cartilage élastique :** Il se distingue par la présence de nombreuses fibres élastiques et par une densité cellulaire beaucoup plus importante que les autres types de cartilage (Figure 4b). Il se distingue du cartilage hyalin par son opacité, sa couleur jaunâtre et sa grande flexibilité. On le retrouve dans le pavillon de l'oreille, les ailes du nez, l'épiglotte ou certains petits cartilages du larynx par exemple.
- **Le cartilage fibreux ou fibrocartilage :** Contrairement au précédent, sa MEC contient d'épais faisceaux de fibres de collagène de type I, orientés selon les lignes de forces

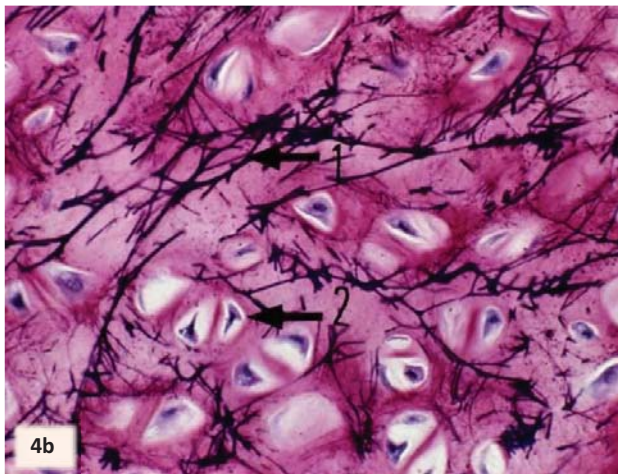
de tension du tissu. On le retrouve dans des zones de jonction mécanique comme les disques intervertébraux, les ménisques ou les insertions ligamenteuses et tendineuses (**Figure 4c**).



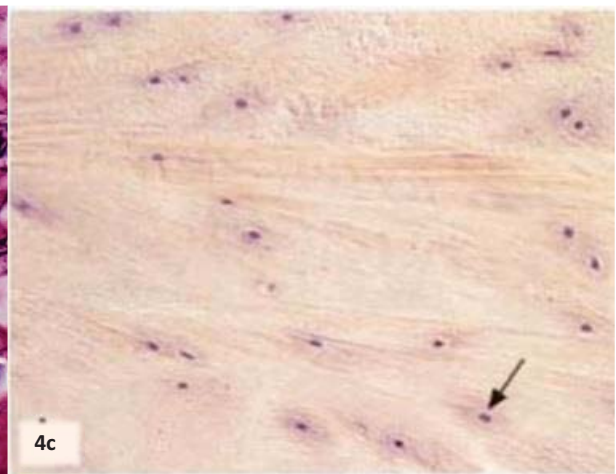
Coupe d'un cartilage hyalin, au niveau de la trachée, vue par microscopie photonique à fond clair et coloré au PAS (Periodic Acid Schiff).

En 1 : de petits groupements isogéniques issus de la division des chondrocytes.

En 2 : la substance fondamentale de la MEC colore fortement au PAS grâce à sa forte teneur en mucopolysaccharides acides, plus particulièrement en chondroïtine sulfate (21).



Coupe d'un cartilage élastique, au niveau de l'épiglotte, colorée à la fuchsine paraldéhyde, montrant un réseau dense de fibres élastiques entourant les groupements isogéniques (flèche en 2) (21).



Coupe d'un cartilage fibreux, au niveau d'un disque intervertébral, coloré à l'hématoxyline-éosine (×100), montrant des faisceaux épais de fibres de collagènes. Les chondrocytes, désignés par les flèches, sont entourés d'une zone basophile (19).

Figure 4a-c: Coupes histologiques des trois types de tissu cartilagineux: hyalin, élastique et fibreux

Concernant l'histogenèse du tissu cartilagineux, les chondrocytes dérivent embryologiquement de la condensation de certaines cellules souches mésenchymateuses primitives qui se différencient en chondroblastes et s'entourent de matrice cartilagineuse pour devenir des chondrocytes. Durant le développement embryonnaire, certains facteurs de transcription exercent une régulation d'expression hiérarchique afin d'orienter la différenciation des cellules souches mésenchymateuses totipotentes vers la lignée des chondrocytes. Parmi ces facteurs de transcriptions, la protéine Sox-9 (codée par un gène *Sry-related*) s'est montrée jouer un rôle switch déterminant dans la chondrogenèse précoce et son expression a été observée dans les sites où le mésenchyme primitif se condense en structure cartilagineuse (22).

3.2 LES CHONDROSARCOMES CONVENTIONNELS

Les CHS conventionnels représentent 85% de tous les CHS, et la majorité prennent naissance au niveau de la cavité médullaire des os.

3.2.1 LE CHONDROSARCOME PRIMAIRE CONVENTIONNEL INTRA-MEDULLAIRE OU CENTRAL

3.2.1.1 EPIDEMIOLOGIE ET SITES D'ATTEINTE (2, 6, 7, 9)

Correspondant au type le plus commun de tous les CHS primitifs, le CHS intra-médullaire touche en majorité les adultes entre 50 et 70 ans, avec une légère prédominance masculine (sex-ratio de 1,5-2).

Tout le squelette axial et appendiculaire peut être touché. L'os pelvien (en particulier l'os iliaque), représentant environ 1/3 des cas, ainsi que les os tubulaires longs, sont les plus fréquemment atteints, notamment le fémur proximal, suivi par l'humérus proximal et le fémur distal. D'autres sites du squelette peuvent être touchés, comme la colonne vertébrale, l'omoplate, le sternum mais avec des incidences très faibles.

3.2.1.2 SYMPTOMATOLOGIE CLINIQUE ET IMAGERIE (2, 6, 7, 9)

Les CHS évoluent généralement de façon insidieuse, progressive (plusieurs mois à années) sans symptomatologie spécifique. Ils s'accompagnent le plus fréquemment d'une douleur, accompagnée d'un gonflement musculo-squelettique. Il est parfois diagnostiqué après une fracture pathologique (rapportée dans 27% des cas). Au niveau des os longs, le CHS primitif implique le plus souvent la métaphyse, suivie par la diaphyse.

Lors d'un tel gonflement local douloureux, un examen radiologique est réalisé et permet de révéler, dans le cas d'un CHS conventionnel central, la présence de régions lysées et sclérosées, avec de petites calcifications caractéristiques souvent appelées des calcifications en « pop-corn ». Toutefois, ces caractéristiques ne permettent, que rarement, de discriminer entre des lésions bénignes, frontières et malignes. Certains éléments radiologiques sont plus prédictifs, tel que la présence d'une composante tumorale extra-osseuse ou une destruction de la zone corticale de l'os, orientant vers un phénotype malin. Pour compléter l'examen radiologique, un bilan scanner est réalisé afin de mieux visualiser la dégradation de la zone corticale de l'os et la minéralisation de la MEC, mais aussi afin de réaliser un bilan d'extension de la maladie, qui conduit notamment à des métastases pulmonaires. L'imagerie par résonance magnétique nucléaire (IRM) vient compléter le scanner, car elle permet de visualiser de façon plus fiable l'extension extra-osseuse de la maladie. Son intérêt réside donc dans l'évaluation de l'envahissement de la moelle osseuse et des tissus mous et s'avère primordiale pour le bilan d'extension pré-opératoire qui, lui, conditionne les marges chirurgicales.

3.2.1.3 HISTOPATHOLOGIE (7, 23)

Le CHS conventionnel intra-médullaire se traduit par de grandes lésions, habituellement supérieures à 4 cm de diamètre, avec un aspect lobulaire, généralement de consistance ferme mais

aussi mucoïde, de couleur blanche ou gris bleuâtre et souvent graveleux en raison de la présence de calcifications dans la matrice (**Figure 5**).

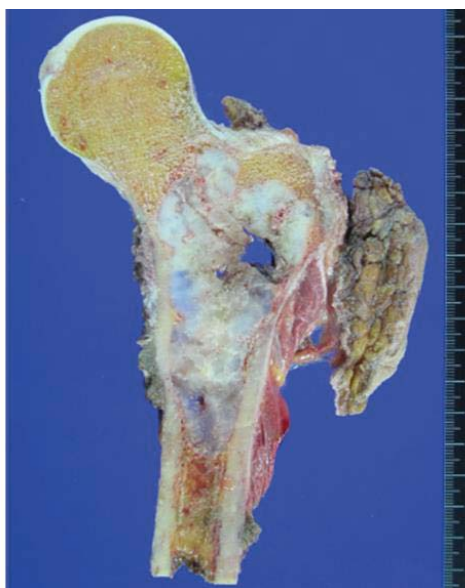


Figure 5: Une masse tumorale cartilagineuse intra-médullaire située au niveau de la métadiaphyse du fémur proximal, mesurant 9,5 cm et montrant une couleur blanche à gris bleuâtre, une surface lobulée et une destruction corticale (7).

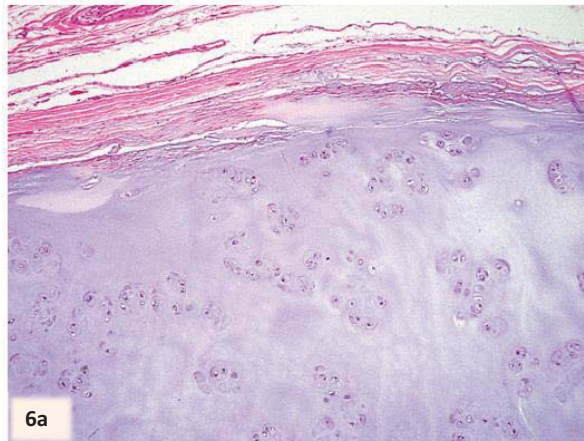
L'examen histologique du CHS intra-médullaire révèle la présence de lobules d'un cartilage hyalin avec des variabilités au niveau de la densité cellulaire, de la taille des noyaux, de la calcification, du nombre de mitoses et un changement myxoïde (7). Ce dernier est défini par une dégénérescence de la MEC, affectant la nature, l'abondance ainsi que la distribution des composantes matricielles (fibres de collagènes et PGs) entre les zones péricellulaire, territoriale et interterritoriale, comme le résultat de l'hyperactivité des chondrocytes tumoraux qui produisent rapidement ces composantes de la substance fondamentale en quantité abondante (24).

En 1977, Evans *et al.* (25) ont instauré une classification histologique du CHS selon trois grades histologiques (1, 2 et 3) se basant sur les caractéristiques précédemment citées : la densité cellulaire, la taille des noyaux, la calcification, le nombre de mitoses et le changement myxoïde. Ces grades corréleront fortement avec le degré de malignité de la tumeur et ils constituent un critère prédictif fiable du pronostic de la maladie (survenue de récurrences et/ou de métastases).

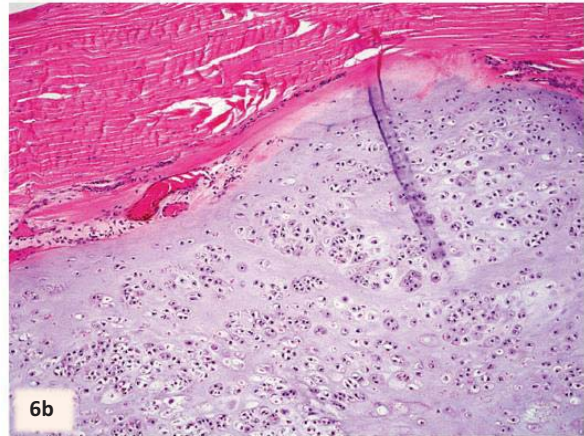
- **Grade 1 (bas grade de malignité) :** le tissu tumoral est caractérisé par une faible densité cellulaire et une matrice cartilagineuse chondroïde abondante semblable à celle du cartilage hyalin. La tumeur de grade 1 a un comportement clinique indolent et aucun potentiel métastatique (25) (**Figure 6a**).
- **Grade 2 (grade intermédiaire) :** il s'agit de lésions de plus grande cellularité. Un élargissement de la taille du noyau est observé et un changement de la MEC vers un modèle myxoïde dégénératif peut s'opérer. L'apparition d'un stroma myxoïde indique que la tumeur devient agressive, surtout si une activité mitotique est associée (25) (**Figure 6b**).

➤ **Grade 3 (haut grade de malignité) :** les lésions sont encore de plus grande cellularité, avec l'apparition d'une matrice myxoïde, au détriment de la matrice chondroïde. Les tumeurs présentent un plus grand nombre de mitoses et des atypies nucléaires abondantes (**Figure 6c-d**). Des foyers de nécrose sont habituellement observés (**25, 26**).

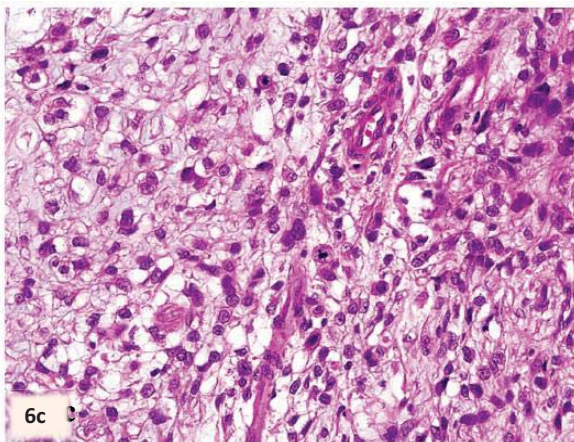
Seuls les grades 2 et 3 sont significativement associés à une probabilité de métastases, qui se localisent essentiellement au niveau pulmonaire. Signalons que plus de 90% des CHS conventionnels sont des tumeurs de grade bas à intermédiaire (**6, 7, 27**).



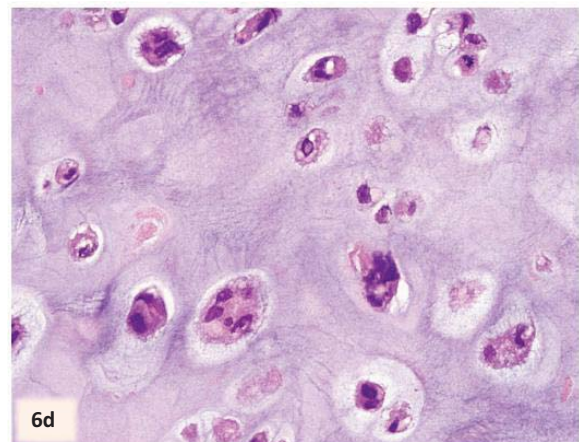
CHS de grade 1, montrant une matrice chondroïde d'une faible cellularité.



CHS de grade 2, montrant une cellularité plus importante, comparée au grade 1, et une invasion des tissus mous.



CHS de grade 3, montrant une cellularité encore augmentée et des atypies cellulaires.



CHS de grade 3 avec de nombreuses cellules tumorales pléomorphes et multinuclées.

Figure 6a-d: Coupes histologiques de CHS conventionnels de différents grades (7)

La **Figure 7** résume les différences histologiques décrites entre les trois grades histologiques : bas, intermédiaire et de haute malignité.

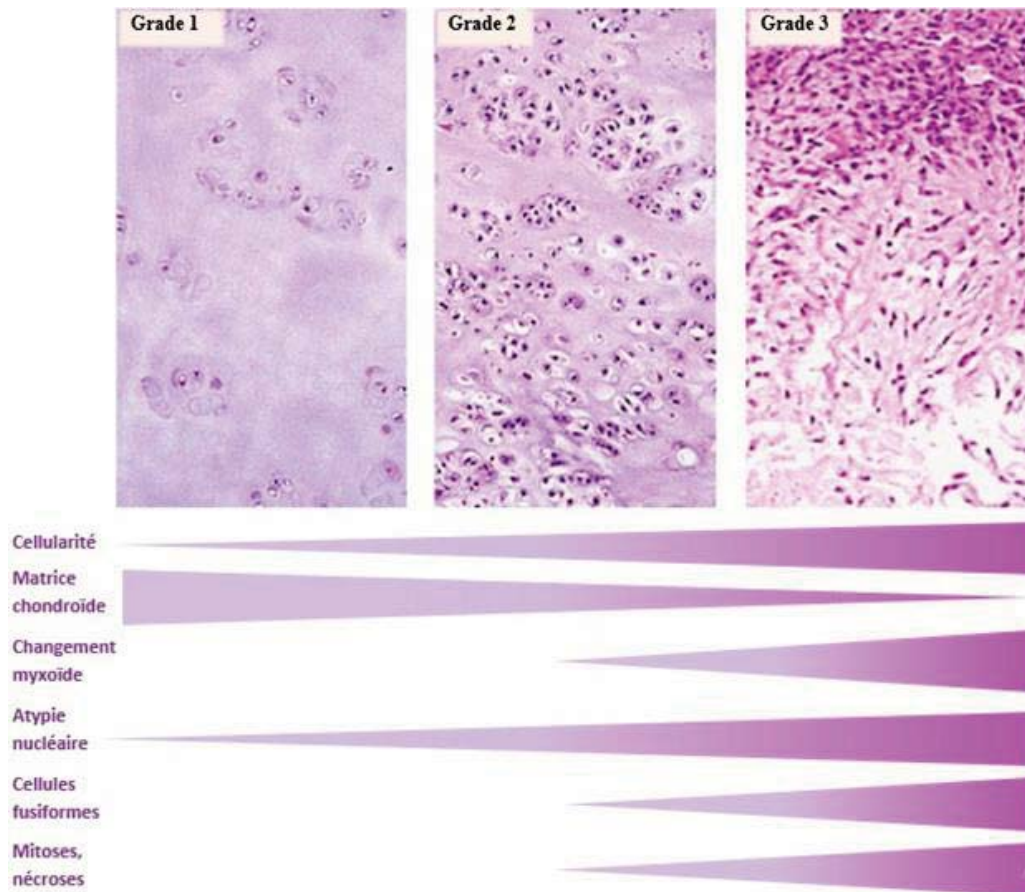


Figure 7: Représentation des différences histologiques observées entre les trois grades histologiques 1, 2 et 3 du CHS conventionnel (7)

Malgré sa grande utilité, la classification d'Evans ne permet pas toujours d'établir avec certitude un diagnostic différentiel, par exemple entre un endochondrome ou un ostéochondrome et un CHS de bas grade. Le diagnostic est pourtant crucial pour une prise en charge adéquate du patient. De plus, la stratification en grades histologiques est soumise à une variabilité inter-observateurs, créant des disparités de conclusions entre anatomopathologistes (28). Il est donc important de pouvoir utiliser pour la classification des CHS, des marqueurs moléculaires plus pertinents et corrélant avec une situation clinique, plutôt qu'un grade histologique (29).

3.2.2 LES CHONDROSARCOMES SECONDAIRES

Les CHS secondaires émergent sur une lésion de nature bénigne de type ostéochondrome ou enchondrome. Ils peuvent être centraux ou périphériques, mais les lésions périphériques sont plus fréquentes (7).

3.2.2.1 LE CHONDROSARCOME PERIPHERIQUE SECONDAIRE (7)

La transformation maligne en CHS périphérique peut être observée chez 1% des cas d'ostéochondromes solitaires et 3-5% des cas d'ostéochondromatose. Le CHS se développant sur un ostéochondrome est généralement solitaire et de bas grade.

Dans ces cas, une prolifération tissulaire se poursuivant après atteinte de la maturation squelettique, l'apparition de douleurs ou encore la présence d'une coiffe épaisse de cartilage hyalin (supérieure à 1,5-2,0 cm d'épaisseur) sont des éléments évocateurs d'une transformation maligne (**Figure 8**).

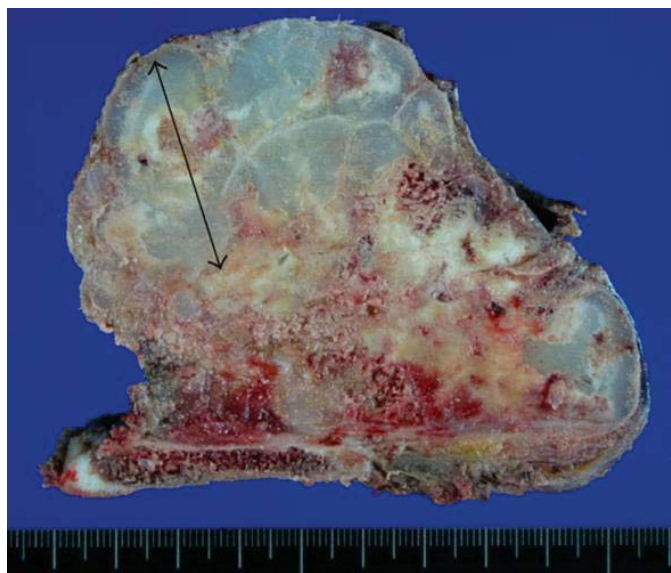


Figure 8: CHS secondaire périphérique se développant à partir d'un ostéochondrome, montrant un épaissement de la coiffe du cartilage (7)

3.2.2.2 LE CHONDROSARCOME CENTRAL SECONDAIRE (7)

Tout comme pour les CHS provenant d'une dégénérescence maligne d'un ostéochondrome, les CHS centraux secondaires sont généralement des tumeurs de bas grade, se développant par transformation maligne des enchondromes (extrêmement rare) ou enchondromatoses (la maladie d'Ollier ou le syndrome de Maffucci).

L'apparition d'une douleur ainsi que d'une masse de tissu mou, de zones de destruction osseuse, d'une érosion endostéale, d'une réaction du périoste et de fractures sans traumatisme important évoquent une transformation maligne des enchondromatoses. Par conséquent, la détection d'une invasion des tissus environnants et/ou d'un changement myxoïde marqué est un élément important pour le diagnostic de la transformation maligne.

3.2.2.3 LE CHONDROSARCOME DU PÉRIOSTE OU JUXTA-CORTICAL

Le périoste est une membrane fibreuse blanchâtre gainant l'os, à l'exception de ses surfaces articulaires et jouant un rôle essentiel dans la vascularisation et la croissance de l'os, notamment en épaisseur (**19**). Le CHS périosté est un sous-type rare, se développant sur la surface externe de l'os. Il représente moins de 2% de l'ensemble des CHS et affecte des adultes plus jeunes que dans le cas du CHS conventionnel, avec un pic d'incidence entre la 3^{ème} et la 4^{ème} décennie de vie. Le site d'atteinte le plus commun est la région métaphysaire des os longs, en particulier le fémur et l'humérus. La lésion est le plus souvent large et couverte par une pseudo-capsule fibreuse. La masse est souvent ronde à ovale, lobulée et blanc graveleux, avec des zones d'ossification enchondrale et de calcification dispersée. Les caractéristiques histologiques du CHS périosté sont

similaires à celles du CHS conventionnel. Les cas décrits sont quasiment tous de grade 1 ou 2. Là encore, les symptômes sont souvent non spécifiques (7).

3.3 LES CHONDROSARCOMES NON CONVENTIONNELS

Parallèlement aux CHS conventionnels, il existe des CHS dits « non conventionnels », représentant environ 15% des cas de CHS et regroupant les CHS dédifférenciés, les CHS mésoenchymateux et les CHS à cellules claires.

3.3.1 LE CHONDROSARCOMA DEDIFFERENCIE (2, 6, 7, 9)

Les CHS dédifférenciés comptent pour 10% de tous les CHS. Ils sont souvent classés comme un CHS de grade 4, en raison d'un comportement hautement malin et agressif, associé à un mauvais pronostic avec un taux de survie à 5 ans de seulement 10%, dû à l'apparition quasi-systématique de métastases. Leur pic d'incidence se situe entre 50 et 60 ans, avec comme localisations les plus fréquentes le fémur et le pelvis, les lésions se produisant majoritairement dans la cavité médullaire de l'os.

Le tissu tumoral se présente sous différents aspects, mais la caractéristique commune est la présence d'un dimorphisme tumoral, combinant une composante cartilagineuse bien différenciée (enchondrome ou CHS de grade 1) et une composante non-cartilagineuse agressive (un sarcome de haut grade tel qu'un ostéosarcome ou fibrosarcome) envahissant les tissus mous adjacents (Figure 9).

L'IRM est souvent la meilleure technique d'imagerie qui permet de confirmer le diagnostic du CHS dédifférencié, à travers la visualisation de la composition bimorphe de la tumeur.

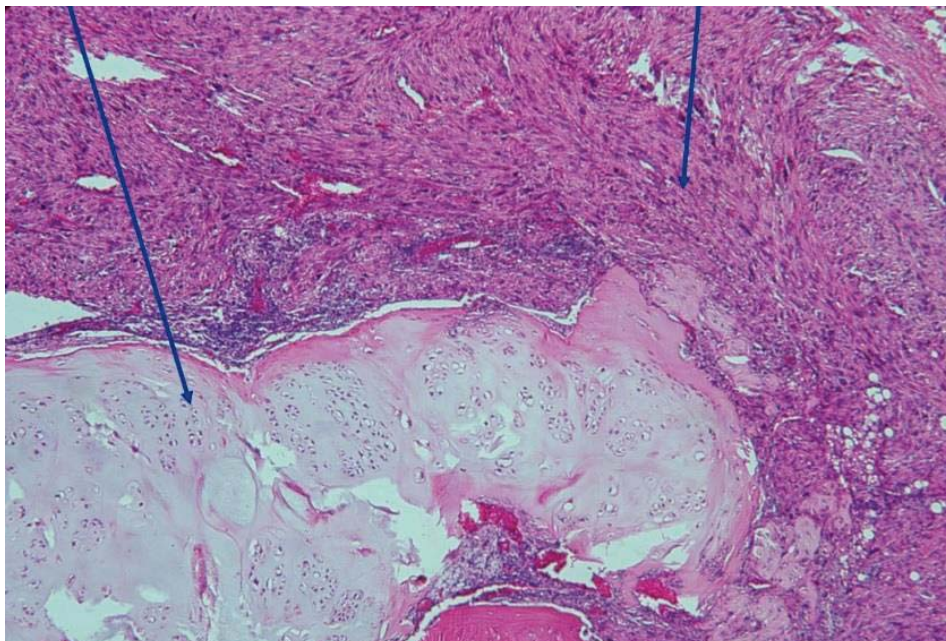


Figure 9: Coupe histologique d'un CHS dédifférencié, montrant une transition abrupte entre une zone de CHS conventionnel de bas grade (flèche à gauche) et la composante dédifférenciée avec des cellules fusiformes (flèche à droite) (16)

3.3.2 LE CHONDROSARCOME MESENCHYMATEUX (2, 6, 7, 9)

Il s'agit d'une variante histologique rare, très maligne, représentant moins de 2-13% de tous les CHS primitifs et il peut être extra-squelettique dans près de 30 à 40 % des cas.

Contrairement au CHS conventionnel et dédifférencié, cette variante affecte plutôt des populations jeunes (entre 20 et 30 ans) et touche indifféremment l'homme et la femme.

Les sites d'atteinte les plus fréquents sont le squelette axial, avec notamment la région craniofaciale (15-30%) et les tissus extra-squelettiques (notamment la dure-mère crânienne et médullaire), et ce contrairement aux autres CHS. D'autres sites d'atteinte incluent le fémur, les côtes, la colonne vertébrale, le bassin et l'humérus.

Histologiquement, la présence d'un modèle bimorphe avec des zones de haute cellularité formées de cellules mésenchymateuses indifférenciées, de couleur bleue, rondes ou fusiformes et des îlots de cartilage hyalin différencié est pathognomonique du CHS mésenchymateux (**Figure 10**).

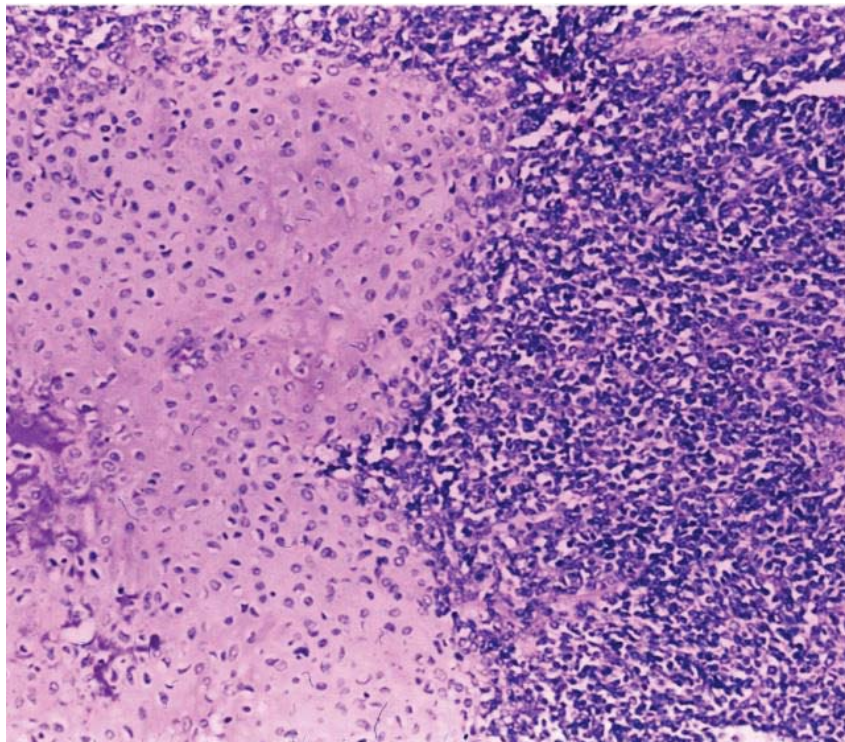


Figure 10: Coupe histologique d'un CHS mésenchymateux, montrant un modèle bimorphe : des îlots de cartilage hyalin adjacentes à des îlots de cellules indifférenciées (16)

3.3.3 LE CHONDROSARCOME A CELLULES CLAIRES (2, 6, 7)

Il s'agit d'une variante rare, de malignité de bas grade à intermédiaire, représentant 1-2% de tous les CHS. Les lésions ont une prédilection pour l'épiphyse des os longs, contrairement au CHS conventionnel qui tend plutôt à toucher la région métadiaphysaire.

Histologiquement, le CHS à cellules claires présente également une composition bimorphe : des zones faites de chondrocytes tumoraux d'apparence normale, adjacentes à des zones contenant des chondrocytes d'un aspect gonflé, avec un cytoplasme clair et vide et un large noyau arrondi (**Figure 11**).

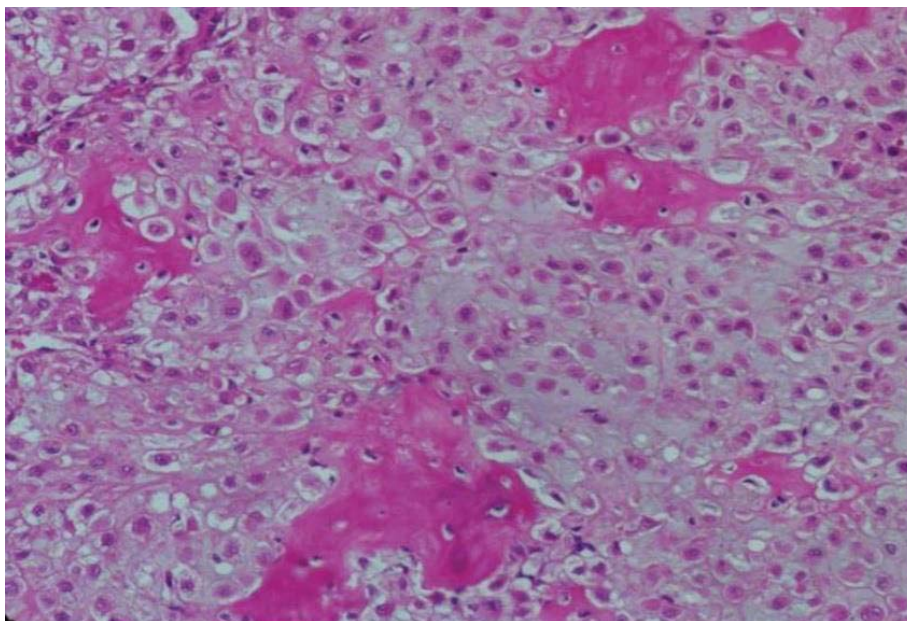


Figure 11: Coupe histologique d'un CHS à cellules claires montrant un modèle bimorphe : des zones de chondrocytes d'apparence normale adjacentes à des zones de chondrocytes à cytoplasme clair et un large noyau (16)

4 PATHOGENESE ET BIOPATHOLOGIE DU CHONDROSARCOME

Les mécanismes du processus tumoral dans le cas du CHS ne sont pas encore totalement élucidés. C'est en effet le cas de tous les sarcomes osseux qui restent peu explorés, à l'exception du sarcome d'Ewing où une translocation chromosomique a été bien identifiée. La majorité des patients n'ont pas de facteurs de risque spécifiques et les connaissances sur la pathogenèse sont encore limitées **(1)**.

Historiquement, une théorie connue sous le nom de « Seed and soil » ou « la graine et le sol » a été émise par le chirurgien anglais Stephen Paget à la fin du 19^{ème} siècle pour expliquer le processus métastatique. Celle-ci fait appel à la notion de « niche » qui est un microenvironnement spécialisé favorisant l'émergence de cellules souches tumorales en leur fournissant tous les éléments nécessaires à la prolifération et dissémination **(30)**. Cette même théorie s'est avérée valable pour expliquer le processus de développement tumoral dans le cas des tumeurs osseuses primitives, particulièrement l'ostéosarcome et le CHS **(31)**. Ensuite, les recherches fondamentales et translationnelles, parallèlement à l'avènement de techniques hautement performantes de cytogénétique (hybridation génomique comparative et séquençage à haut débit) ont permis de cartographier des régions chromosomiques impliquées dans la pathogenèse du CHS et de corrélérer la dérégulation de certaines voies de signalisation cellulaire avec la transformation maligne.

4.1 LA « NICHE » OSSEUSE: UN SANCTUAIRE POUR LA CROISSANCE TUMORALE DU CHONDROSARCOME

Le concept de « niche osseuse » a été d'abord décrit pour l'hématopoïèse normale qui est soutenue par la niche ostéoblastique locale. Celle-ci est formée d'ostéoblastes, établissant un tissu

«epithelial-like» qui interagit physiquement avec les cellules souches hématopoïétiques, situées près de la surface osseuse, et contribue à leur maintien en phase de repos (32).

A partir de cette observation, le concept de niche osseuse a fortement évolué et a été appliqué aux cellules souches cancéreuses. Une « niche » est un microenvironnement fonctionnel capable de promouvoir l'émergence de cellules souches tumorales en leur fournissant tous les facteurs nécessaires à la prolifération. Naturellement, ce concept est bien connu dans le contexte des hémopathies malignes telles que le myélome multiple ou la leucémie. Actuellement, il est discuté pour les tumeurs solides et se trouve appuyé par la théorie de « la graine et le sol ». Celle-ci stipule que la distribution des métastases ne peut être l'œuvre du hasard, et que les métastases sont dues à la dépendance de la graine (la cellule cancéreuse) par rapport au sol (l'organe touché par la métastase), comme le résultat d'interactions favorables complexes entre les cellules tumorales métastatiques et le microenvironnement de l'organe (33).

Dans le cas des tumeurs osseuses primitives, y compris le CHS, la théorie de « la graine et le sol » a trouvé sa place et a été largement documentée (1, 31, 32). Le développement du CHS semble, en effet, dépendre de l'environnement osseux qui est important pour la pathogenèse de la tumeur (34). Par ailleurs, l'examen histologique du CHS conventionnel révèle la présence d'ostéoclastes en contact étroit avec les cellules tumorales du cartilage (32). Un cercle vicieux est établi entre le microenvironnement osseux (la moelle osseuse pour le CHS central ou le périoste pour le CHS périphérique) et les chondrocytes tumoraux lors de la progression du CHS. L'invasion de l'os par des chondrocytes tumoraux affecte l'équilibre entre l'ostéogenèse et la résorption osseuse qui est activée *via* l'induction de la formation d'ostéoclastes. Ceci induit la libération de facteurs initialement piégés dans la matrice osseuse, modifie la vascularisation et l'immunité locales et contribue ainsi à la survie, la croissance, la prolifération et la diffusion des cellules tumorales. Les cellules tumorales, quant à elles, sécrètent des facteurs d'activation des ostéoclastes, renforçant ainsi le déséquilibre ostéogenèse/résorption osseuse (Figure 12) (1, 32).

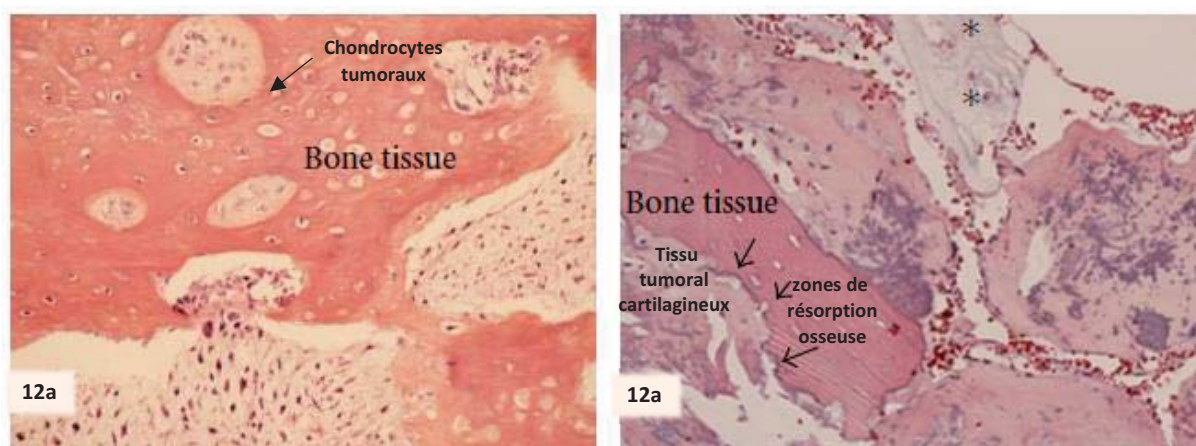


Figure 12a-b: Coupes histologiques d'un tissu tumoral cartilagineux, montrant l'étroite dépendance de la lésion tumorale du microenvironnement osseux (32)

[a : Les chondrocytes tumoraux s'infiltrent à l'intérieur du tissu osseux. b : Apparition de foyers de résorption osseuse].

4.2 DEREGULATION DES VOIES DE SIGNALISATION

4.2.1 LA VOIE DE SIGNALISATION HEDGEHOG/Parathyroid hormone related Peptide (Hh/PTHrP)

La voie de signalisation Hedgehog (Hh) constitutive est impliquée dans plusieurs processus fondamentaux, notamment dans la différenciation cellulaire au cours du développement embryonnaire, le maintien de l'homéostasie tissulaire, le renouvellement continu, la réparation des tissus et l'entretien des cellules souches.

La signalisation Hh a lieu *via* un complexe protéique intracellulaire appelé HTC (Hh Transducing Complex), dont la composition dépend de l'état d'activation. À la surface des cellules répondant au signal Hh, les récepteurs transmembranaires Patched (PTC) et Smoothened (SMO) sont responsables, respectivement, de la perception du signal Hh dans le milieu extracellulaire et de la transduction du signal. A l'état basal, soit en l'absence d'un ligand Hh, PTC réprime SMO, d'où le maintien du facteur de transcription GLI sous une forme inactive. La voie est ainsi inactivée. Suite à la liaison d'un ligand Hh à PTC, l'inhibition de SMO est levée, le facteur de transcription GLI subit une translocation dans le noyau, déclenchant ainsi une cascade d'événements moléculaires qui conduisent *in fine* à l'expression de gènes impliqués dans la croissance et la division cellulaires (Figure 13).

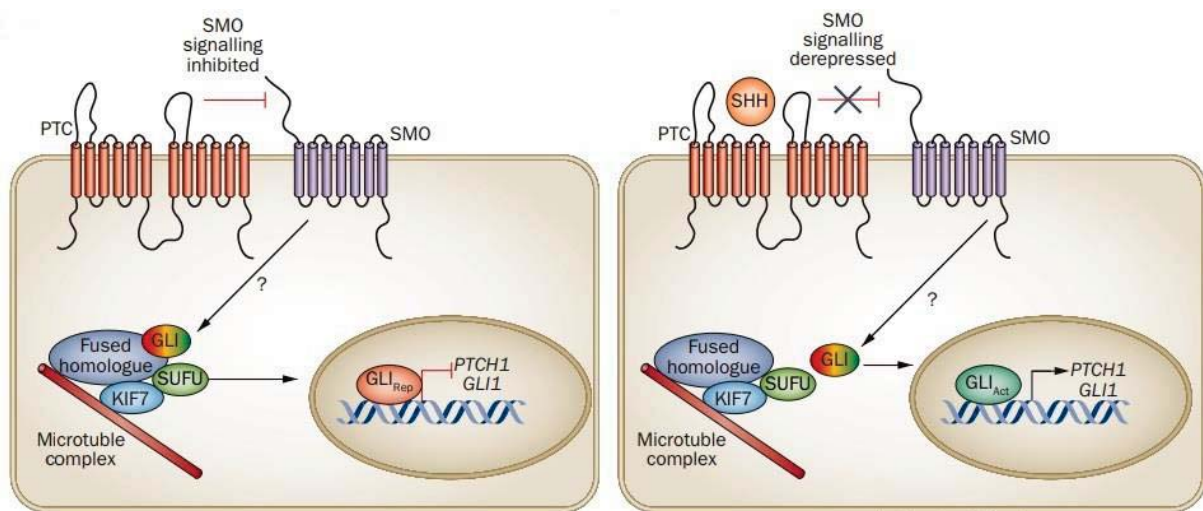


Figure 13: Illustration de la voie de signalisation Hh chez les mammifères (35)

[A gauche : Etat basal où SMO est inhibé : le facteur de transcription GLI est maintenu sous une forme inactive *via* le complexe HTC qui contient SUFU (Suppressor of Fused). A droite : Un ligand Hh (SHH : Sonic Hedgehog) se lie à PTC levant l'inactivation de SMO, le facteur de transcription GLI subit une translocation dans le noyau d'où le déclenchement d'une cascade d'événements moléculaires].

La voie Hh est l'une des voies de signalisation les plus impliquées dans les transformations malignes, y compris dans le cas du CHS, *via* le ligand Indian Hedgehog (IHH) et avec la participation de la Parathyroid hormone-related protein (PTHrP). Elle joue, un rôle crucial dans le contrôle de la croissance cartilagineuse et osseuse. Dans le cas d'une lésion maligne, la signalisation Ihh/PTHrP est dérégulée, *via* la perte du contrôle feed-back négatif qu'exerçait la PTHrP sur l'expression d'Ihh, d'où une signalisation Hh aberrante maintenant la cellule dans un état de prolifération (29, 35-37).

En culture cellulaire, la prolifération des chondrocytes tumoraux se trouve augmentée sous l'effet du ligand Ihh et diminuée par les inhibiteurs de cette même voie (36). D'autre part, l'étude de Sun *et al.* (38) a démontré que l'extinction de l'expression de GLI1 par siRNA conduit à la baisse de l'expression de deux médiateurs importants, PTCH1 et SMO, et freine la croissance et la survie des cellules du CHS.

Dans le CHS conventionnel, l'induction de la voie Ihh/PTHrP a été impliquée dans la pathogenèse et la progression de la tumeur (39). Dans les ostéochondromes, les molécules de signalisation Ihh/PTHrP sont souvent absentes, mais se ré-expriment parallèlement à la transformation maligne en CHS périphérique (40). Dans l'analyse génomique systématique de Tarpey *et al.* (41) portant sur 49 patients atteints de différents types de CHS, des mutations touchant divers acteurs de la voie Hh/PTHrP, tels que PTCH1, SUFU et GLI1, ont été isolées dans 18% des cas.

4.2.2 DEREGULATION DU CYCLE CELLULAIRE : LES VOIES DE SIGNALISATION pRb, p53

La majorité des cellules d'un organisme normal sont quiescentes (en phase G0). Le passage dans une phase de prolifération nécessite le déclenchement du cycle cellulaire, défini comme un « point de non-retour ». Passé celui-ci, la cellule progresse dans le cycle cellulaire, qui est composé de quatre phases: G1 (précède la synthèse d'ADN), S (synthèse de l'ADN) et G2 qui précède la phase M (mitose).

Les points de surveillance du cycle cellulaire (*cell cycle checkpoints*) assurent le contrôle de la qualité du cycle cellulaire, et en particulier la fidélité de la duplication du matériel génétique. Ils sont représentés principalement par les deux voies pRb-E2F et p53. En cas d'anomalies, ces mécanismes de surveillance stoppent la progression du cycle cellulaire et activent des processus de réparation ou de mort cellulaire par apoptose.

→ La voie pRb-E2F contrôle le checkpoint qui engage irréversiblement la cellule dans le cycle cellulaire. Les protéines de la famille pRb (pour *retinoblastoma protein*, p130 et p107) séquestrent les facteurs de transcription E2F, bloquent leur activité transcriptionnelle dans les cellules quiescentes ou en début de phase G1 et exercent ainsi un contrôle négatif sur la division cellulaire.

→ La voie p53 se situe notamment au niveau du point de surveillance G1→S : elle implique l'activation de la protéine p53, facteur de transcription, capable en particulier d'activer la transcription du gène de la protéine inhibitrice p21, s'en suit une augmentation de la synthèse de p21 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1) qui bloque le passage en phase S et conduit à l'arrêt du cycle cellulaire. p53 protéine est codée par le gène suppresseur de tumeurs *TP53* et elle est l'une des principales voies de signalisation de l'apoptose. Elle est stabilisée en réponse à de nombreux stimuli de stress cellulaire (lésions de l'ADN, hypoxie...) et induit l'expression de gènes impliqués dans l'apoptose. Lorsque la protéine p53 est déficiente, l'arrêt en G1 n'est plus assuré et les cellules entrent en phase S malgré la présence d'anomalies de l'ADN. S'en suit alors deux mécanismes fondamentaux de l'oncogenèse à savoir: la perte du contrôle du cycle cellulaire, d'où une prolifération anarchique, et la résistance à la mort cellulaire par apoptose (19, 42, 43).

Les dérégulations des deux voies pRb et p53 ont été décrites dans presque tous les types de cancers humains (44). Dans le cas du CHS conventionnel central, des altérations de type aberrations génétiques, touchant ces deux voies ont été mises en évidence. Nous pouvons citer en particulier : l'amplification de 12q13 et 8q24 et la délétion de 9p21. Les locus de plusieurs gènes importants pour le contrôle du cycle cellulaire sont, en effet, situés dans ces régions (45). Aussi, des mutations du gène *TP53* sont rencontrées dans la quasi-totalité des cas de CHS de haut grade, suggérant une intervention tardive de cette voie p53 dans le processus tumoral et son implication dans la progression de la maladie (46). Comme exemples, Scharge *et al.* (47) ont isolé des altérations de la voie pRb dans 96% des cas du CHS central de haut grade, tandis que pour la série de Tarpey *et al.* (41), des altérations des voies pRb et p53 ont été mises en évidence chez 33% et 20% des patients, respectivement. Ces aberrations sont également retrouvées dans le CHS périphérique (48).

4.3 MUTATION DES ENZYMES ISOCITRATE DEHYDROGENASE IDH1/IDH2

Il s'agit de deux enzymes homodimériques, présentant une forte homologie, localisées respectivement dans le cytoplasme et les peroxysomes, et la matrice mitochondriale des cellules. Ces enzymes catalysent une réaction d'oxydo-réduction qui convertit l'isocitrate en α -cétooglutarate (connu aussi sous le nom de 2-oxoglutarate) parallèlement à la réduction du co-facteur NADP en NADPH et la libération de dioxyde de carbone. Ces enzymes sont impliquées dans bon nombre de processus biologiques, comme la phosphorylation oxydative mitochondriale, le métabolisme de la glutamine, la régulation du statut redox de la cellule (en contrôlant la production de NADPH, principal agent réducteur utilisé dans les réactions biosynthétiques dans la cellule) (49).

Les enzymes mutantes IDH1/IDH2 acquièrent une nouvelle activité, *via* laquelle l' α -cétooglutarate est transformé en une structure apparentée, le 2-hydroxyglutarate, connu comme un oncométabolite potentiel. Produit en quantités importantes dans les cellules hébergeant la mutation IDH, le 2-hydroxyglutarate inhibe, *via* un mécanisme compétitif, des enzymes dépendantes de l' α -cétooglutarate. Ces enzymes sont notamment les ADN-déméthylases TET-2, les histones déméthylases JumonjiC, les prolyl hydroxylases et les lysyl hydroxylases nécessaires au repliement et la maturation du collagène, et les prolyl hydroxylases qui régulent l'expression du facteur inductible par l'hypoxie (HIF) en activant sa dégradation par le protéasome. Les enzymes mutantes IDH sont donc impliquées dans divers processus cellulaires comme les dérégulations épigénétiques, l'hypoxie, l'angiogenèse et la maturation du collagène (50-52) (Figure 14).

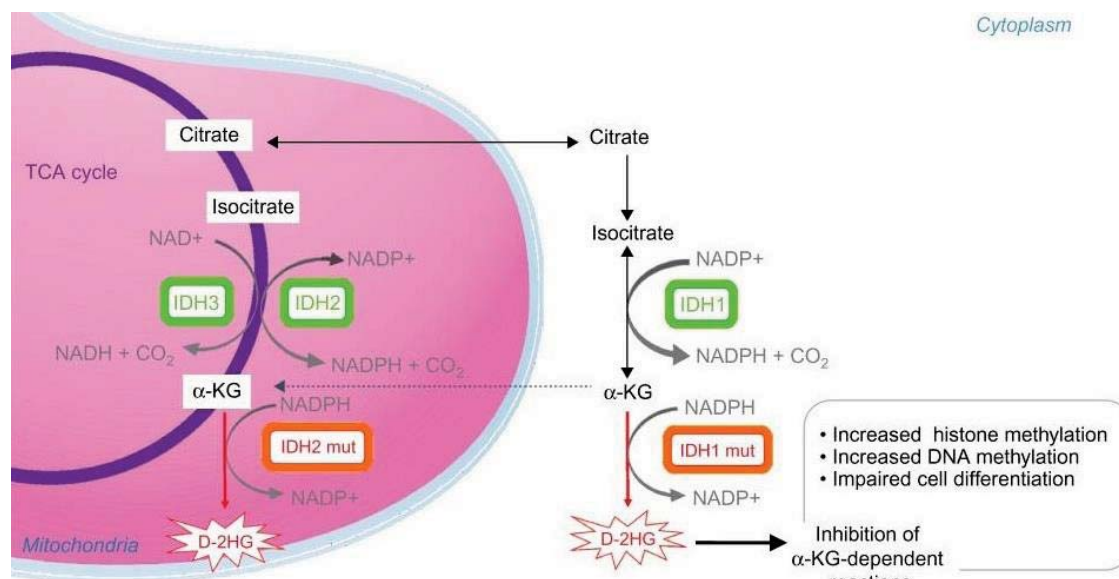


Figure 14: Effets métaboliques de la mutation IDH sur le cycle de Krebs : l'enzyme sauvage IDH produit l'α-cétoglutarate. L'enzyme mutante le convertit en 2-hydroxyglutarate, un oncométabolite potentiel (53).

La mise en évidence des mutations IDH1/IDH2 somatiques dans des tumeurs cartilagineuses a été publiée consécutivement par deux équipes. D'une part, Amary *et al.* (54) ont isolé des mutations hétérozygotes de IDH1 (R132) ou de IDH2 (R172) chez des patients atteints de CHS central de haut grade (2 et 3) et de type dédifférencié, mais pas chez des patients atteints de CHS conventionnel secondaire périphérique ou d'ostéochondrome. D'autre part, l'étude multicentrique de Pansuriya *et al.* (55) a permis d'identifier ces mutations chez des patients atteints de la maladie d'Ollier (81%), du syndrome de Maffucci (77%) et de tumeurs solitaires tel que l'enchondrome, pointant vers leur rôle dans la transformation maligne.

4.4 MUTATION DES GENES *EXT1* ET *EXT2* (56, 57)

Les gènes exostosine-1 (*EXT1*) et exostosine-2 (*EXT2*) codent pour les protéines EXT glycosyltransférases, impliquées dans la biosynthèse de l'héparane sulfate, GAGs des PGs. Ces dernières jouent un rôle dans la diffusion de l'Ihh, de la PTHrP et du facteur de croissance des fibroblastes (FGF), tous impliqués dans la prolifération et la différenciation des chondrocytes.

Les mutations *EXT1/EXT2* ont été isolées dans les CHS secondaires périphériques qui sont le résultat de la transformation maligne d'un ostéochondrome, déjà connu pour héberger des mutations de l'un de ces deux gènes. La plupart des mutations *EXT1/EXT2* sont inactivantes, ce qui provoque l'arrêt prématuré de la synthèse des protéines EXT et la perte de leur fonction. La voie de signalisation Hh se trouve affectée par des chaînes héparanes sulfates défectueuses, d'où des défauts de formation de la collerette osseuse. Les cellules *EXT*^{-/-} perdent leur capacité à répondre aux signaux de polarisation ou d'orientation du chondrocyte, se développent ainsi hors de l'os, puis recrutent des cellules normales pour former un ostéochondrome. L'Ihh/PTHrP et FGF sont souvent absents dans les ostéochondromes, mais se re-expriment en cas de transformation maligne en CHS périphérique.

4.5 MUTATION DU GENE COL2A1 (41)

Le gène *COL2A1* code pour la chaîne α des fibres de collagène de type II, constituant majeur du cartilage articulaire. Les mutations constitutives de *COL2A1* conduisent à des altérations touchant le squelette et l'œil et peuvent conduire à une perturbation importante de la structure de la MEC cartilagineuse et donc de la signalisation, avec une implication potentielle dans l'oncogenèse.

Dans leur analyse génomique systématique de 49 individus atteints de CHS, Tarpley *et al.* (41) rapportent une hypermutation fréquente du gène *COL2A2* (des insertions, délétions et réarrangements) dans 37% des cas. Aussi, les tumeurs de haut grade (CHS conventionnels de grade 2, 3 et CHS dédifférenciés) étaient significativement les plus susceptibles d'héberger une mutation *COL2A1*, comparées aux tumeurs de bas grade.

La **Figure 15** résume les différents mécanismes moléculaires et génétiques, précoces et tardifs, impliqués dans la genèse et la progression du CHS.

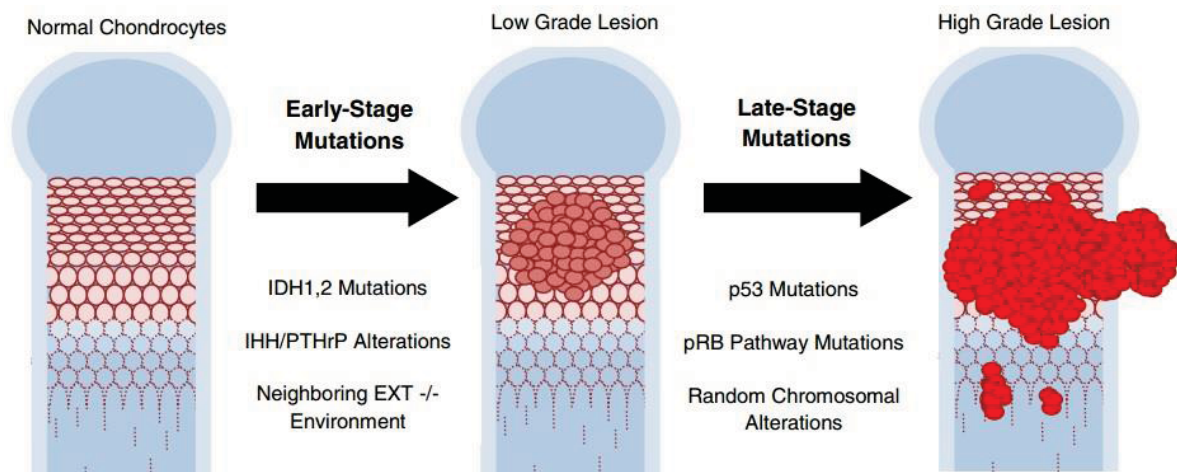


Figure 15: Evènements génétiques et moléculaires, précoces et tardifs, impliqués dans la genèse et la progression du CHS (58)

5 TRAITEMENT

5.1 LE TRAITEMENT CHIRURGICAL

Un traitement chirurgical basé sur une exérèse complète est considéré à ce jour, comme le pilier de la prise en charge thérapeutique du CHS. Actuellement et dans le cas d'un CHS non métastatique (tous grades et sous-types inclus), la chirurgie offre une chance de guérison au patient. Le management optimal du traitement chirurgical fait encore l'objet de débats entre les spécialistes et dépend essentiellement de la localisation et du grade histologique.

Dans le cas d'un CHS de bas grade, un curettage intra-lésionnel pouvant être suivi par un traitement adjuvant local (phénolisation ou cryochirurgie) est réalisé dans 40 % des cas. Le traitement local adjuvant peut être utilisé avec succès uniquement dans le cas de lésions confinées à l'os. Dans certains cas, une reconstruction des tissus peut être réalisée grâce à des techniques d'ostéosynthèse, de greffe osseuse ou de pose de prothèse. Les greffes osseuses ont montré des résultats cliniques prometteurs à long terme et un contrôle local satisfaisant (2, 6, 7). Une méta-

analyse publiée en 2011, comparant la résection chirurgicale avec une large marge de sécurité *versus* le curetage intra-lésionnel dans le cas du CHS intramédullaire de grade 1, a conclu que cette dernière technique peut être utilisée comme alternative dans le cas de localisations extra-pelviennes, sans pour autant augmenter le risque de survenue de récidives locales ou de métastases **(59)**. L'étude de Campanacci *et al.* sur une population de patients atteints de CHS du squelette appendiculaire de bas grade sans signes radiologiques d'agressivité a conclu aussi aux mêmes résultats **(60)**. D'autres résultats issus de séries rétrospectives comparatives rapportent, toutefois, une récurrence locale et une progression de la maladie chez des patients atteints de CHS de grade 1 traités par la technique de curetage intra-lésionnel, comparés à un groupe de patients traités par excision locale **(61, 62)**.

Pour tous CHS de grade histologique haut ou intermédiaire, pour une tumeur de grande taille, dans le cas d'une localisation pelvienne et une implication intra-articulaire ou de tissus mous, l'approche générale recommandée par le National Comprehensive Cancer Network (<https://www.nccn.org/>) est une excision locale, en bloc, avec de larges marges chirurgicales. Ces marges chirurgicales consistent à enlever une partie des tissus sains environnants dans tous les plans autour de la tumeur pour éviter les risques de récidives. Ces exérèses larges sont toutefois responsables d'une morbidité considérable et nécessitent une prise en charge reconstructive, ceci dépendant essentiellement de la localisation **(63, 64)**.

Dans le cas de patients présentant des lésions non opérables de consistance mucoïde (habituellement un CHS conventionnel de grade 2 ou 3), l'aspiration de la tumeur est une option palliative pour soulager les douleurs **(6)**. Pour certaines localisations particulières tel que le CHS laryngé, la résection est conservatrice car ce type est habituellement de bas grade avec un pronostic relativement favorable **(65)**.

L'élément crucial dans l'acte chirurgical est la marge de sécurité histologiquement adéquate qu'il faut assurer lors de la résection, car les tissus tumoraux résiduels sont une cause importante de récurrence locale ou de dissémination métastatique **(65)**. Une récurrence peut survenir 10 ans après la chirurgie et est alors associée à une mauvaise survie globale. En général, avec les stratégies de traitement actuel (incluant la thérapie adjuvante locale), le taux de récurrence locale est bas pour le CHS de grade 1 **(6)**. Les taux de survie à 10 ans pour des tumeurs de grade 1 et 3 sont respectivement de 95 et 69 % en absence de récurrence, contre seulement 73 et 21 % en cas de récurrence locale, selon les résultats de l'étude rétrospective de Andreou *et al.* **(66)** portant sur un groupe homogène de 115 patients atteints de CHS primaire central, tous traités selon le même protocole chirurgical. Ces chiffres montrent l'importance de la prise en charge chirurgicale initiale du CHS.

En cas de récurrence, la conduite à tenir dépendra du grade de la tumeur primitive, de son évolution histologique ainsi que de la localisation. Un arbre décisionnel est alors mis en place. Dans le cas d'une récurrence locale solitaire après un CHS de grade 1, sans progression histologique et localisée dans un os long, le traitement de choix reste à nouveau un curetage intra-lésionnel associé à une thérapie adjuvante locale. Dans le cas de l'invasion des tissus mous dans le CHS de grade 1, une résection large en bloc est alors recommandée. La prise en charge d'une récurrence locale des

CHS de grade 2 ou 3 localisés dans les os longs et plats consiste, par contre, en une résection en bloc, bien qu'il soit souvent difficile d'atteindre de larges marges de sécurité adéquates **(6)**.

Dans certains cas, une amputation peut s'avérer nécessaire, et ce dans 12 et 40 % des cas pour des CHS de grade 2 et 3, respectivement, selon Angelini *et al.* **(67)**.

5.2 PLACE DE LA RADIOTHERAPIE ET DE LA CHIMIOOTHERAPIE

En raison de l'absence d'études randomisées, prospectives et de grandes ampleurs, le bénéfice escompté de l'utilisation de la radiothérapie et/ou de la chimiothérapie chez des patients ayant déjà bénéficié d'un traitement chirurgical demeure à ce jour sujet à débat **(68)**. La radiothérapie adjuvante et/ou la chimiothérapie peuvent être proposées à des fins palliatives pour les patients ayant des CHS à haut risque dans un contexte d'incertitude quant à leurs effets et efficacité **(69)**.

5.2.1 LA RADIOTHERAPIE

5.2.1.1 MECANISMES DE LA RADIORESISTANCE

Le CHS est considéré comme une tumeur relativement radio-résistante pour deux raisons. D'une part, les cellules du CHS prolifèrent lentement avec un taux de division cellulaire relativement bas, tandis que la radiothérapie agit sur les cellules en division **(6)**. D'autre part, le CHS est une tumeur solide fortement hypoxique, c'est-à-dire avec une faible teneur en oxygène au niveau du tissu tumoral. Etant donné que l'oxygène est un radio-sensibilisateur, dont la présence est primordiale pour que les radiations ionisantes puissent exercer leur action cytotoxique *via* la formation d'espèces réactives, les cellules tumorales dans les zones hypoxiques se trouvent donc peu sensibles à l'irradiation **(70)** (*cet aspect sera étayé dans le paragraphe 6.1.3.2. dédié aux mécanismes de la radiorésistance*).

5.2.1.2 INDICATIONS DE LA RADIOTHERAPIE ET EVALUATION DU BENEFICE CLINIQUE A TRAVERS LA LITTERATURE

Il n'existe pas, actuellement, de données suffisantes pour soutenir l'utilisation de la radiothérapie en routine. Toutefois, elle peut être envisagée dans deux situations :

- **comme un traitement curatif** après une résection incomplète, visant à atteindre un contrôle local maximal de la tumeur ;
- **comme un traitement palliatif** lorsque la résection est impossible ou jugée potentiellement associée à une morbidité importante (CHS avancé ou non opérable, ou CHS mésenchymateux potentiellement plus radiosensibles).

En ce qui concerne l'**indication curative**, la radiothérapie est indiquée dans le cas de CHS de haut grade, dédifférenciés ou mésenchymateux, peu favorables à une résection en bloc. Des doses supérieures à 60 Gy sont alors requises pour assurer un contrôle local de la tumeur. Cependant, l'application de cette dose avec une radiothérapie conventionnelle à base de photons hautement énergétiques est souvent impossible à proximité d'organes critiques, notamment de type neurologique, dans les cas de CHS de la base du crâne et du squelette axial. **(6, 65)**

Dans une étude de van Maldegem *et al.* (68) sur une cohorte de 171 patients atteints d'un CHS conventionnel central non opérable, la radiothérapie apparaît comme une pratique courante dans la prise en charge de la maladie localement avancée, au sein des deux centres de référence étudiés. Il apparaît qu'elle améliore la prise en charge en termes de survie. Les patients ayant reçu des cures de radiothérapie montrent une survie globale de 27% à 3 ans *versus* 8% pour ceux sans radiothérapie. Un bénéfice sur la survie, pour les patients ayant uniquement une atteinte locale sans métastases, a été démontré ($p=0,0032$).

Compte tenu des limites de la radiothérapie conventionnelle utilisant les photons, des modalités alternatives d'irradiation ont été évaluées, avec les techniques d'hadronthérapie, c'est-à-dire utilisant les hadrons (neutrons, protons et ions carbone).

La **protonthérapie** consiste à traiter des tumeurs avec des faisceaux de protons accélérés et se présente comme une technique d'irradiation de précision réservée aux cas où les tumeurs se trouvent à proximité d'organes critiques et sensibles aux radiations. Cette technique repose, en effet, sur la propriété physique qu'ont certaines particules, dont le proton, de déposer le maximum d'énergie qui leur a été communiquée en fin de parcours, et ce contrairement aux photons dont l'énergie délivrée diminue progressivement en fonction de la profondeur de pénétration du rayonnement dans le corps, exposant ainsi les tissus sains avoisinants aux effets toxiques de l'irradiation. Le proton, suite à sa pénétration dans le tissu, voit son énergie s'accroître lentement au fur et à mesure qu'il se ralentit pour augmenter de façon notable très peu avant de s'arrêter. Connue sous le nom du « pic de Bragg », la dose délivrée en fin de parcours est donc la plus élevée, épargnant ainsi les tissus sains des effets délétères de l'irradiation. Cependant, il est nécessaire d'étaler ce pic sur la largeur de la tumeur, car il est trop fin pour irradier toute une tumeur, on parle du « pic de Bragg étalé » (71, 72) (Figure 16).

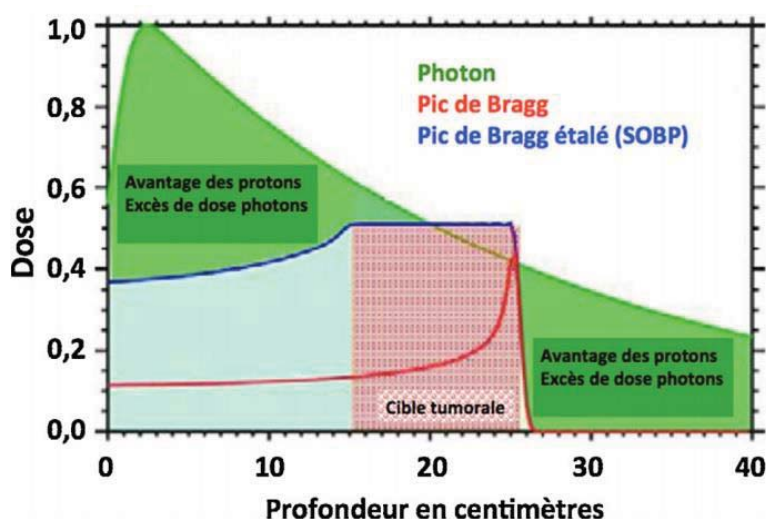


Figure 16: Principe de la protonthérapie (SOBP : Spread-out Bragg Peak) (72)

Cette technique s'est avérée bénéfique en complément de la chirurgie chez des patients se présentant avec des CHS de la base du crâne et du squelette axial partiellement opérables. Des taux de contrôle local variant de 85% et 100% avec des protocoles mixtes photon-proton ou

protons seuls, avec des effets indésirables limités ont été rapportés dans plusieurs études (73-75). Pour exemple, Munzenreider *et al.* (76), dans leur étude portant sur 229 patients atteints de CHS de la base du crâne, rapportent des résultats meilleurs que ceux de la littérature pour une combinaison de radiothérapie conventionnelle et de protonthérapie avec un contrôle local, à 10 ans, atteint chez 92% des patients. Une étude clinique de phase II, utilisant la protonthérapie est actuellement en cours sur des CHS localisés au niveau du crâne (NCT00496522).

↳ La radiothérapie avec des **ions carbone** représente une autre modalité attrayante d'irradiation, combinant les avantages physiques des protons avec une activité radiobiologique plus élevée. Shulz-Ertner *et al.* (77) ont démontré l'intérêt de cette carbonothérapie en termes d'efficacité et de sécurité chez 54 patients traités entre 1998 et 2005 pour des CHS de la base du crâne, avec une tumeur résiduelle après la chirurgie. Avec un suivi médian sur 33 mois, les taux de contrôle local ont été de 96% et 90% à 3 et 4 ans, respectivement avec une survie globale de 98 % à 5 ans. Une autre étude plus récente avec un suivi à 10 ans, a permis de confirmer l'intérêt de cette thérapie dans le cas de CHS de la base du crâne avec une amélioration de la survie globale des patients (OS supérieure à 90 % à 10 ans). En outre, la toxicité tardive de grade 3 de ce protocole combiné était plus faible, comparé à la radiothérapie protonique (78).

↳ D'autres particules de type **ions d'hélium** ou **néon** ont été utilisées et conduisent à un taux de contrôle local de 78% sur 5 ans, comme ceci a été décrit par Castro *et al.* (79). Une étude prospective de phase III évaluant l'efficacité de la carbone thérapie *versus* la protonthérapie sur des CHS localisés au niveau du crâne est actuellement en cours de recrutement (NCT01182753).

Le traitement **palliatif**, quant à lui, s'adresse à des patients atteints de CHS inopérables, douloureux, particulièrement le CHS méenchymateux qui est, par ailleurs, plus radiosensible (6). Des preuves limitées provenant de séries assez anciennes suggèrent un bénéfice de la radiothérapie conventionnelle. Une stabilisation de la maladie a pu être atteinte dans la série de Mc Naney *et al.* (80) sur des patients traités par la radiothérapie seule avec des doses comprises entre 40 et 70 Gy avec un suivi médian sur 53 mois. Des données de l'Hôpital Princess Margaret au Canada (81) supportent l'observation que la radiothérapie conventionnelle permet, parfois, un contrôle local de la tumeur et un soulagement de la douleur.

5.2.2 LA CHIMIOTHERAPIE

5.2.2.1 MECANISMES DE LA CHIMIORESISTANCE

La résistance des tumeurs à la chimiothérapie est la résultante de changements moléculaires observés dans les cellules cancéreuses et de la nature du microenvironnement tumoral. Dans le CHS, les mécanismes responsables de la chimiorésistance ne sont pas totalement élucidés. Plusieurs caractéristiques phénotypiques de la tumeur y participent.

- L'accès des anti-cancéreux jusqu'à leurs cibles peut être entravé par une abondante MEC cartilagineuse dense mais aussi avasculaire. La quantité d'agents cytotoxiques acheminés par la circulation sanguine vers le tissu cartilagineux, est faible et donc insuffisante pour

exercer une action cytotoxique. Ces agents doivent, en plus, diffuser sur une distance de plusieurs millimètres avant d'atteindre les chondrocytes tumoraux cibles (6).

- Le faible potentiel prolifératif des cellules du CHS conduit à une faible sensibilité de cette tumeur à la majorité des agents de chimiothérapie conventionnelle agissant sur les cellules en division (6).
- L'expression de la glycoprotéine P (*Permeability-GlycoProtein*) par les cellules du CHS pourrait également avoir un rôle dans la chimiorésistance. Cette protéine, codée par le gène de la multi-résistance aux médicaments (*Multi Drug Resistance, MDR-1*) est une pompe ATP-dépendante, présente au niveau membranaire et qui permet d'excréter de petites molécules comme celles utilisées en chimiothérapie (82).
- La niche osseuse, qui contribue à la survie et à la prolifération des cellules souches tumorales du CHS, a été aussi bien identifiée comme un paramètre majeur régulant le processus métastatique et un sanctuaire responsable de la résistance aux agents anti-cancéreux. Dans ce cas, le phénomène est médié par des facteurs solubles tels que des cytokines et des molécules d'adhésion, responsables d'une résistance *de novo* (32).
- Enfin, l'hypoxie tumorale, une caractéristique commune des tumeurs solides, est responsable pour une large part de la chimiorésistance du CHS, où ce phénomène est particulièrement exacerbé. Une faible teneur en oxygène déclenche, en effet, une cascade de réponses cellulaire et moléculaires, qui concourent toutes à un phénotype chimiorésistant (*cet aspect sera étayé dans le paragraphe 6.1.3.1. dédié aux mécanismes de la chimiorésistance du tissu tumoral hypoxique*).

5.2.2.2 INDICATIONS DE LA CHIMIOTHERAPIE ET EVALUATION DU BENEFICE CLINIQUE A TRAVERS LA LITTERATURE

Traditionnellement, la chimiothérapie a été toujours considérée comme peu efficace pour le traitement du CHS. Le nombre de cas relativement limité, l'absence de séries prospectives et homogènes (avec inclusion de patients présentant une grande variabilité en termes de grade histologique, central ou périphérique, conventionnel, dédifférencié, mésenchymateux ou à cellules claires) limitent la valeur significative des études cliniques sur de nouvelles approches de chimiothérapie (69, 83, 84).

Les types histologiques conventionnel et non conventionnel à cellules claires sont généralement considérés comme chimio-réfractaires (6). Quelques études cliniques ou des descriptions de cas sporadiques rapportent, tout de même, une réponse à des protocoles de chimiothérapie. Celle-ci semble avoir un rôle notamment en cas de récurrence locale rapide et agressive, ou dans les cas à fort potentiel métastatique (65). Devant les situations de CHS avancé de haut grade, et en l'absence d'autres options thérapeutiques, ce sont les protocoles de chimiothérapie indiqués dans les ostéosarcomes de haut grade (à base d'anthracyclines) qui sont utilisés (84). La réponse, évaluée selon les critères RECIST (*Response evaluation criteria in solid tumors*), demeure toutefois faible (11,5% pour le type conventionnel et 0% pour le type à cellules

claires selon la série rétrospective d'Italiano *et al.* **(85)**). Dans un essai de phase II (NCT00073983), une chimiothérapie associant la gemcitabine et le docétaxel (à J1 et J8 pendant 15 cycles de 21 jours, avec une évaluation tous les 2 cycles puis tous les 4 cycles) chez des patients atteints de CHS avancés a permis une stabilisation de la maladie dans 14% des cas **(86)**. Provenzano *et al.* **(69)** ont également décrit une régression de la tumeur et une amélioration symptomatique après un traitement à base de gemcitabine chez un patient atteint d'un CHS conventionnel périphérique secondaire métastatique suivi sur 18 mois. Cette thérapie avait été proposée en seconde ligne après l'échec d'autres agents de chimiothérapie (doxorubicine/ifosfamide, ifosfamide à forte dose, cisplatine/étoposide). La cohorte rétrospective de van Maldegem *et al.* **(68)** menée auprès de deux grands centres européens pour le traitement des cancers osseux, rapporte, elle aussi, une amélioration significative de la survie (26% à 3 ans *versus* 8%, $p=0,05$), avec une survie globale de 20 mois *versus* 15 mois, et ce chez des patients atteints de CHS conventionnel avancé inopérable (grades 2 et 3) y compris métastatique, traités par la doxorubicine (ou encore l'imatinib ou le sirolimus).

Concernant le type histologique mésenchymateux de haut grade, il est plutôt considéré comme chimiosensible. Une chimiothérapie adjuvante à base de doxorubicine, à l'instar des autres sarcomes osseux, semble avoir un rôle positif. Par ailleurs, une réponse positive à des protocoles de chimiothérapie utilisés dans le cas du sarcome d'Ewing (VIDE : Vincristine-Ifosfamide-Doxorubicine-Etoposide ou VDC/IE : Vincristine-Doxorubicine-Cyclophosphamide et Ifosfamide-Etoposide) a été rapportée dans la série de Dantonello *et al.* **(87)** ou encore à des combinaisons à base d'anthracyclines (31% de réponse selon les critères RECIST dans la série d'Italiano *et al.* **(85)**). L'étude de Cesari *et al.* **(88)** confirme encore ce caractère de chimiosensibilité du CHS mésenchymateux : les patients en rémission complète après chirurgie et bénéficiant d'une chimiothérapie adjuvante avaient atteint une survie à 10 ans sans progression de la maladie dans 76 % des cas, *versus* 10% uniquement en l'absence de chimiothérapie.

Devant un CHS mésenchymateux métastatique, une chimiothérapie palliative doit être envisagée **(6, 65)**.

Notons aussi que les tumeurs mésenchymateuses avec un pourcentage élevé de petites cellules et un contenu cartilagineux limité sont considérées comme les plus sensibles à la chimiothérapie et la radiothérapie, comme pour les autres sarcomes à petites cellules **(89)**.

Enfin, une étude clinique de phase II (JapicCTI-121850) menée en 2016 a montré que le CHS mésenchymateux répond à la trabectedine, un anti-cancéreux d'origine marine approuvé en 2007 en Europe pour le traitement de 2^{ème} et 3^{ème} ligne des sarcomes avancés des tissus mous **(90)**, et ce en comparaison avec un groupe placebo ayant reçu les meilleurs soins palliatifs (*best supportive care*). La survie sans progression de la maladie était de 12,5 mois pour le groupe traité *versus* 1 mois pour le groupe témoin **(91)**.

5.3 PRONOSTIC DE LA MALADIE

5.3.1 LES FACTEURS PRONOSTIQUES CLINIQUES ET PARACLINIQUES

Les facteurs pronostiques du CHS ne sont pas encore bien identifiés à ce jour car seulement quelques grandes études de suivi à long terme sont disponibles (25, 59, 66-68, 83, 92-98). Leur identification est d'une importance capitale, non seulement pour prédire le pronostic du patient, mais aussi pour guider le clinicien vers la stratégie thérapeutique optimale (92, 96). Actuellement, on dispose de divers marqueurs pour évaluer l'évolution de la maladie : le type et le grade histologiques, la marge chirurgicale et la localisation anatomique (6, 7). Toutefois, un besoin demeure pour des études prospectives et comparatives, pouvant éventuellement conduire à une base factuelle pour guider le traitement des patients (96).

5.3.1.1 LE TYPE HISTOLOGIQUE

Dans la série rétrospective de Bindiganavile *et al.* (92) visant à élucider les facteurs pronostiques du CHS, le type histologique s'est révélé avoir l'incidence la plus déterminante sur le pronostic, avec une corrélation significative avec l'évolution de la maladie (Figure 17).

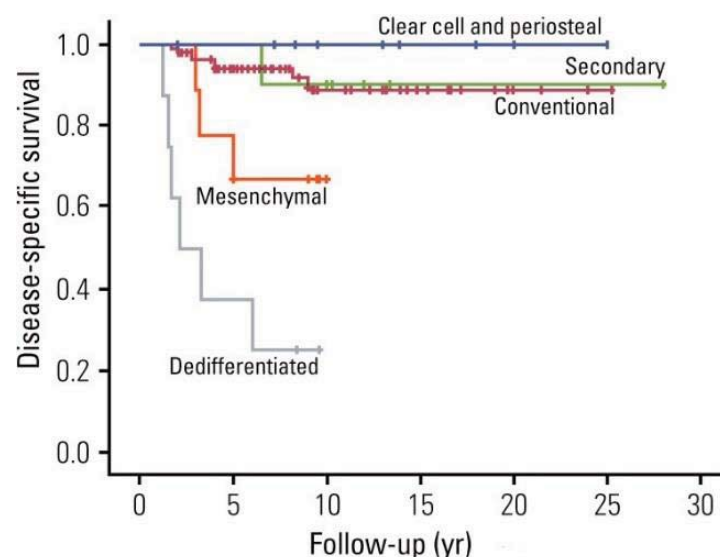


Figure 17: Illustration, par l'estimateur de Kaplan-Meier, de la corrélation entre la survie et le type histologique dans la série de Bindiganavile *et al.* (92).

[Les types à cellules claires, périosté et les formes secondaires montrent la meilleure survie (100% et 90%±9,5% à 10 ans), tandis que le type dédifférencié montre les taux de survie les plus bas (37,5%±17,1% à 10 ans) (p=0,002)]

Au sein du type conventionnel central, le pronostic est fortement corrélé au grade histologique (voir le paragraphe 5.3.1.2.). La nécrose de la tumeur et les mitoses sont aussi des facteurs de mauvais pronostic (6, 7).

Dans le cas du CHS conventionnel périphérique secondaire, la transformation maligne de l'ostéochondrome est généralement de bas grade, le pronostic global est bon et une survie à long terme est atteinte pour 70-90% des patients. Le taux de récurrence locale varie avec la marge histologique, de 0-15% dans les cas largement réséqués et de 57-78% dans les cas d'une résection marginale ou intra-lésionnelle. Concernant le CHS conventionnel périphérique central provenant

de l'enchondromatose, il est, généralement, lui aussi, de bas grade et dépend de la localisation anatomique **(7)**.

Le sous-type périosté a un pronostic favorable par rapport à celui du CHS intramédullaire. La survie globale sans métastase à 5 ans est d'environ 83%. L'invasion de la cavité médullaire est peu fréquente et les métastases sont exceptionnelles et se produisent très tardivement **(7)**.

Le type mésenchymateux, quant à lui, est d'une haute malignité et agressivité et son pronostic est mauvais. Ceci est lié à une fréquence élevée de récurrence locale précoce et de métastases à distance, de localisation souvent pulmonaire. Près de 20% des patients se présentent déjà avec des métastases lors du diagnostic initial, mais celles-ci peuvent survenir même après 20 ans, ce qui nécessite un suivi régulier à long terme **(2, 6, 7, 84, 99-101)**.

Dans une étude prospective d'un groupe de 23 patients ayant fait l'objet d'un suivi complet de leur évolution, la survie était de 54,6% à 5 ans et de 27,3% à 10 ans **(102)**. Deux autres études **(103, 104)** rejoignent les mêmes résultats avec une survie à 10 ans de 28% et 20%, respectivement. Le décès lié à la maladie est survenu dans 73,9% des cas, 6 mois à 23 ans après le diagnostic initial de la tumeur.

D'autres facteurs indicateurs d'un mauvais pronostic dans le cas du type mésenchymateux sont la douleur et la localisation centrale plutôt que périphérique **(100)**.

Dans le cas du CHS dédifférencié, le pronostic est sombre et il est déterminé par le pourcentage de la composante dédifférenciée ; son identification est donc cruciale pour le management de la maladie. Nota *et al.* **(96)** ont identifié ce paramètre comme un facteur prédictif influençant la survie sans récurrence (*disease-free survival*). Le taux de survie globale est inférieur à 10% à 5 ans, avec une durée de survie médiane de 7,5 mois. Alors que le contrôle local est atteint dans la majorité des cas, les métastases qui se développent à distance demeurent le plus grand défi clinique et elles sont rencontrées chez 90% des patients **(6, 7)**. Dans la série de Bindiganavile *et al.* **(92)**, le type dédifférencié était également associé aux chiffres les plus bas en termes de survie globale.

5.3.1.2 LE GRADE HISTOLOGIQUE

Au sein du type conventionnel, le grade histologique est considéré à ce jour comme le meilleur facteur prédictif du pronostic, en termes de taux de survie, de survenue de récurrence locale et/ou de métastase **(2, 6, 7, 25, 105)**. Dans leur revue systématique de la littérature de 2014, Nota *et al.* **(96)** ont conclu, à travers l'analyse de 13 études portant sur un total de 1114 patients, que le pronostic du CHS central est généralement bon pour les bas grades histologiques, mais pauvre et associé avec les taux de survie les plus bas pour les grades 2 et 3.

Les tumeurs de grade 1 sont cliniquement indolentes, prolifèrent lentement sans risque de diffusion métastatique. La survie à 5 ans est de 89% et après traitement chirurgical, le pronostic est favorable **(68)**.

Les grades 2 et 3 représentent près de 10% des CHS centraux conventionnels et sont associés à un risque plus élevé de métastases et/ou de récurrence locale **(68)**. La survie à 5 ans après traitement chirurgical est de 57% pour le groupe combiné de grades 2 et 3 **(27, 106)**.

5.3.1.3 LA MARGE CHIRURGICALE

Dans le cas d'une tumeur opérable, la possibilité de réaliser une excision complète du site tumoral primaire avec une large marge de sécurité s'étendant dans tous les plans autour de la tumeur **(98)**, est un facteur pronostique très important car la récurrence locale, bien plus que les métastases, est la principale cause de décès **(65)**. Dans l'étude de Lee *et al.* **(65)** portant sur 8 patients atteints d'un CHS de la tête et du cou, le seul cas de décès était lié à un échec du contrôle local de la tumeur en raison d'une incapacité à assurer une marge de sécurité suffisante lors de l'excision. Dans la série de Donati *et al.* **(93)** portant sur 61 patients atteints de CHS secondaire périphérique du pelvis de grades 1 et 2, un taux de récurrence locale de 3% a été trouvé après une large résection, *versus* 23% après une excision inadéquate. Une étude rétrospective sur 227 patients associe, elle aussi, l'importance de la marge chirurgicale au taux de survie, comparativement à une résection marginale ou une résection intra-lésionnelle ($p < 0,04$) **(98)**. Cette corrélation entre marge chirurgicale et bon pronostic semble consensuelle.

5.3.1.4 LA LOCALISATION ANATOMIQUE

D'après l'étude de Bindiganavile *et al.* **(92)**, la localisation anatomique est également prédictive de l'évolution de la maladie pour le type conventionnel central. En effet, elle est significativement corrélée avec le nombre de décès liés à la maladie ainsi que la survenue de récurrence locale et de métastases. Les tumeurs de haut grade avec une localisation axiale affichent un mauvais pronostic comparativement à la localisation appendiculaire. La localisation pelvienne a été identifiée comme un facteur de mauvais pronostic affectant la survie globale, d'après la revue systématique de la littérature publiée par Nota *et al.* (13 études, 1114 patients) **(96)**.

5.3.2 LES NOUVEAUX MARQUEURS MOLECULAIRES PREDICTIFS DU PRONOSTIC

Parallèlement aux avancées réalisées dans l'exploration de la biopathologie des CHS, de nouveaux marqueurs moléculaires spécifiques ont pu être identifiés et caractérisés comme indicateurs du pronostic. **107**

La détection immunohistochimique des sous-types de collagène peut offrir un aperçu sur la différenciation cellulaire et le pronostic. Le collagène de type II et X, ainsi que les PGs de type aggrécane, orientent vers un phénotype néoplasique mature et un bon pronostic, tandis que le collagène de type I indique une transition vers un phénotype plus prolifératif, dédifférencié et associé à un mauvais pronostic **(107)**.

La surexpression de la COX-2 a été significativement associée avec le grade histologique et une diminution de la survie selon l'étude d'Endo *et al.* **(108)**, un résultat qui ne concorde pas avec une étude précédente de Sutton *et al.* **(109)**.

La Bcl-2, une protéine impliquée dans la régulation de l'apoptose, peut également être utilisée comme marqueur fiable pour la distinction entre le CHS de bas grade et l'ostéochondrome. Son niveau d'expression augmente lors de la transformation maligne des ostéochondromes et parallèlement avec la progression du CHS conventionnel **(40, 110)**.

La détection d'aberrations génétiques, de type altérations de la 17p1, mutations de *TP53* et perte d'expression de p16, pourrait être le témoin d'une progression du CHS vers un grade supérieur, car il s'agit d'évènements génétiques tardifs **(46)**.

Toutefois, utilisés seuls, aucun de ces marqueurs moléculaires n'a montré, jusqu'à présent, une valeur pronostique supérieure à celle du grade histologique combiné aux marges chirurgicales.

5.4 PLACE DES THERAPIES CIBLEES DANS LE TRAITEMENT DU CHS

Devant l'absence d'amélioration significative de la survie des patients atteints de CHS, la radio- et chimiorésistance de cette tumeur et une meilleure compréhension de la biopathologie et de physiopathologie du CHS, des approches thérapeutiques plus ciblées sont en cours de développement. Nous pouvons notamment évoquer :

- Les inhibiteurs des récepteurs à activité tyrosine kinase et leurs ligands ;
- Les inhibiteurs des enzymes isocitrate déshydrogénases IDH1/IDH2;
- Les inhibiteurs de m-Tor ;
- Les inhibiteurs de la voie Hedgehog ;
- Les inhibiteurs de PTHrP/Bcl-2 ;
- Les inhibiteurs d'acteurs clefs du cycle cellulaire.

5.4.1 LES INHIBITEURS DES RECEPTEURS A ACTIVITE TYROSINE KINASE

Les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) sont des récepteurs transmembranaires importants avec une large variété de ligands de type facteurs de croissance, tels que EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), FGFR (Fibroblast Growth Factor Receptor), VEGFR (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor), etc. Leur fonction est de réguler, entre autres, la prolifération cellulaire, l'angiogénèse et l'apoptose. Une signalisation aberrante *via* ces récepteurs est impliquée dans plusieurs cancers et a conduit à l'introduction des inhibiteurs des récepteurs à activité tyrosine kinase dans l'arsenal thérapeutique en oncologie (axitinib, erlotinib, sorafénib, dasatinib, etc). Mis sur le marché il y a une quinzaine d'années, les inhibiteurs de ces récepteurs contribuent à améliorer significativement la prise en charge de nombreux cancers, au premier rang desquels la leucémie myéloïde chronique avec l'arrivée du Glivec® (imatinib) en 2002 **(111)**.

Une surexpression de récepteurs TK tels que PDGFR (Platelet-derived Growth Factor Receptor), VEGFR, EGFR, etc a été démontrée dans les sarcomes osseux, y compris certains types de CHS **(112, 113)**.

Concernant le PDGFR, les cellules osseuses sont des cibles importantes pour les facteurs de croissance dérivés des plaquettes, car ceux-ci stimulent la prolifération des ostéoblastes et des chondrocytes. Le récepteur PDGF- α est, par exemple, surexprimé dans les ostéosarcomes, les rhabdomyosarcomes, le sarcome d'Ewing et les CHS, et joue un rôle dans la pathogénèse, l'invasion et les métastases à distance. L'expression de PDGFR est corrélée avec un phénotype métastatique et un mauvais pronostic **(114)**. Dans l'étude de Sulzbacher *et al.* **(115)**, l'expression du récepteur PDGF- α était significativement corrélée au grade histologique avec une expression significativement plus élevée dans les CHS de grade 3. L'analyse des données de survie révèlent une survie globale significativement plus courte chez les patients avec une surexpression du

récepteur PDGF- α ($p = 0,0172$). Ce dernier se présente donc comme une cible thérapeutique potentielle, dont l'inhibition permettrait d'améliorer le pronostic de la maladie.

Tsavaris *et al.* **(116)** ont rapporté très récemment un cas de CHS mésoenchymateux métastatique ayant manifesté une amélioration sous pazopanib, un inhibiteur de plusieurs récepteurs TK (VEGFR- 1, -2, et -3, PDGFR- α et - β et KIT), après échec d'une chimiothérapie de 1^{ère} ligne à base de doxorubicine et d'ifosfamide. Trois études cliniques de phase II chez des patients présentant un CHS conventionnel avancé sont actuellement en cours pour évaluer l'intérêt d'inhibiteurs de TK : le pazopanib (NCT01330966), l'imatinib (Glivec®) (NCT00928525) et le régorafénib (NCT02389244). D'autre part, le facteur pro-angiogénique VEGF intervient dans la progression du CHS. Ainsi, son antagonisme pourrait réduire la croissance de la tumeur et son potentiel métastatique **(117)**. Dans l'étude rétrospective de Jones *et al.* **(118)**, l'analyse des données de 10 patients atteints de CHS avancé ou métastatique évolutif traités par une thérapie anti-VEGF de type pazopanib ou ramucirumab (dans le cadre d'essais cliniques) montre qu'un bénéfice en termes de stabilisation de la maladie peut être atteint.

5.4.2 LES INHIBITEURS DES ISOCITRATE DESHYDROGENASES

Ces enzymes apparaissent comme des cibles thérapeutiques attrayantes pour le traitement futur du CHS **(53, 84, 119, 120)**. Le traitement *in vitro* de lignées cellulaires de CHS présentant la mutation *IDH-1* avec un inhibiteur de IDH-1 diminue la production de l'oncométabolite 2-hydroxyglutarate, induit l'apoptose et inhibe la progression tumorale **(84)**.

Malgré que les données préliminaires obtenues chez les patients atteints de leucémie et traités par des inhibiteurs de l'IDH suggèrent une efficacité considérable, les résultats sur des tumeurs solides, incluant le CHS, sont encore trop précoces pour conclure **(84)**. Deux études portant sur AGI-5198, un inhibiteur spécifique de IDH-1, montrent des résultats contradictoires quant à l'effet de cet inhibiteur sur la viabilité, la prolifération et la migration cellulaire, suggérant un rôle plus complexe des dérégulations épigénétiques dans le cadre du CHS **(121, 122)**. L'expression de l'enzyme mutante a été utilisée pour la sélection des patients pouvant participer à des essais cliniques de phase 1 évaluant le profil pharmacocinétique et l'efficacité de nouveaux inhibiteurs de l'IDH (AG-120 et AG-221) dans le cadre du CHS (NCT02073994, NCT02273739).

5.4.3 LES INHIBITEURS DE m-TOR

m-TOR (*mammalian target of rapamycin*), la cible de la rapamycine (un anti-fongique et immunosuppresseur naturel) chez les mammifères et PI3K (phosphatidylinositol-3-kinase)/Akt sont deux voies de signalisation extrêmement inter-liées, fonctionnant comme des modulateurs critiques de la prolifération et de la survie cellulaire, aussi bien dans les conditions physiologiques que pathologiques. PI3K/Akt est un régulateur clef de la survie face au stress cellulaire, d'où son rôle majeur dans le processus tumoral **(123)**.

À l'heure actuelle, les applications thérapeutiques de cette voie dans le domaine de l'oncologie sont en plein essor **(124)**. Cependant, les inhibiteurs de m-TOR n'ont montré, pour l'instant, que des résultats modestes dans les essais cliniques, peut-être en raison de l'activation de la voie PI3K/Akt **(83)**. La dérégulation de la signalisation m-TOR a été mise en évidence dans plusieurs

types de tumeurs, y compris le CHS où les deux voies PI3K/Akt et PI3K/mTOR sont activées. L'implication de cette voie dans les CHS est suggérée par des taux élevés de la protéine ribosomale S6 phosphorylée (m-TOR contrôle l'appareil traductionnel en activant la protéine p70 S6 kinase), détectée dans 69% des CHS conventionnels et 44 % des CHS dédifférenciés et par une diminution de la croissance de lignées cellulaires et de xénogreffes de CHS en réponse à BEZ235, un inhibiteur de PI3K/mTOR **(125)**.

Dans une étude récente rétrospective de phase II, 10 patients atteints d'un CHS récurrent inopérable ont reçu une association de sirolimus (ou rapamycine) et de cyclophosphamide. Ce traitement a permis un taux de contrôle de la maladie de 70% (réponse objective pour 10% des patients et une stabilisation pour 60% des patients pendant au moins 6 mois) **(126)**. Actuellement, trois essais cliniques de phases I/II ou II utilisant des inhibiteurs de m-TOR sont en cours sur le CHS : NCT02821507 (sirolimus/cyclophosphamide), NCT03190174 (Nab-rapamycin/nivolumab), NCT02008019 (everolimus, actuellement suspendu pour défaut d'approvisionnement).

5.4.4 LES INHIBITEURS DE LA VOIE HEDGEHOG

Des expériences *in vitro* ont montré une augmentation de la prolifération cellulaire après traitement de cellules de CHS avec la glycoprotéine Hedgehog recombinante. L'utilisation d'inhibiteurs de la voie Hedgehog, tel que l'IPI-926 (ou saridegib), conduit, quant à elle, à une réduction de la prolifération cellulaire *in vitro* et une inhibition significative de la croissance tumorale sur un modèle de xénogreffes de CHS **(127, 128)**.

Compte tenu des résultats pré-cliniques intéressants, un essai clinique randomisé de phase II (NCT01310816) étudiant l'effet d'IPI-926 *versus* placebo chez des patients atteints de CHS métastatiques ou localement avancés a été mené, mais n'a montré malheureusement aucune différence en termes de survie sans progression de la maladie et de survie globale entre les deux bras de l'étude. Un petit sous-ensemble de patients a, toutefois, présenté une réduction mineure de la taille de leur tumeur **(129)**.

Le GDC-0449 (ou vismodegib), un antagoniste de la voie Hedgehog par inhibition de SMO, a obtenu son AMM en 2013 pour le traitement du carcinome basocellulaire métastatique ou localement invasif. Cette molécule pourrait voir ses indications s'étendre à d'autres sarcomes dont le CHS (NCT01267955, NCT01154452). L'essai de phase II (NCT01267955) réalisé chez des patients atteints de CHS avancé évolutif, a montré une stabilisation de la maladie à 6 mois pour seulement 25,6 % des cas et une survie sans progression de 3,5 mois, n'atteignant pas les objectifs en terme de bénéfice à 6 mois. Ces résultats étaient donc décevants mais suggèrent toutefois une efficacité dans le cadre du CHS conventionnel évolutif de grade 1 ou 2 **(130)**. Une évaluation dans le cadre d'une association avec la chimiothérapie chez ces sous-groupes de patients pourrait être utile, se basant sur les résultats d'études pré-cliniques suggérant que l'inhibition la voie Hh est susceptible d'inverser le phénomène de multi-résistance aux cytotoxiques en downrégulant la P-gp (largement exprimée dans le CHS) comme cela a été observé pour la doxorubicine dans le cas du cancer du sein **(131)**.

5.4.5 LES INHIBITEURS DE LA PROTEINE ANTI-APOPTOTIQUE BCL-2

Les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) et Bcl-XL sont surexprimées dans tous les sous-types de CHS (40). Des stratégies interférant avec Bcl-2 afin de rétablir la voie apoptotique pourraient s'avérer pertinentes, tels qu'une thérapie anti-sens *Bcl-2* ou des antagonistes de Bcl-2 (29). Des BH3-mimétiques (BH3 est un antagoniste naturel de Bcl-2), comme ABT-737 et son analogue par voie orale ABT-263 (navitoclax), se fixent avec une forte affinité à Bcl-2/Bcl-x et rétablissent ainsi le phénomène apoptotique. ABT-263 inhibe la croissance cellulaire et induit l'apoptose sur deux modèles cellulaires de CHS (SW-1353 et CS-1) *in vivo*, conduisant à une inhibition de la croissance tumorale et une amélioration de la survie des souris traitées (132). D'autre part, des résultats pré-cliniques ont montré une restauration de la chimiosensibilité des cellules cancéreuses du CHS à la doxorubicine et le cisplatine après inhibition de Bcl-2 par ABT-737 (133).

5.4.6 LES INHIBITEURS D'ACTEURS CLEFS DU CYCLE CELLULAIRE

L'expression de la survivine, membre de la famille de protéines inhibitrices de l'apoptose, a été mise en évidence sur des lignées cellulaires de CHS. Son ciblage, par un siRNA, résulte en un arrêt du cycle cellulaire et l'augmentation des taux d'apoptose (134). Cependant, malgré des résultats prometteurs *in vitro*, ces approches sont encore loin de franchir le cap vers les essais cliniques.

Le ciblage à différents niveaux de l'oncoprotéine c-Myc, impliquée dans la progression du CHS, peut résulter en une régression de la tumeur et une induction de l'apoptose. Plusieurs approches tels que des oligonucléotides anti-sens, des analogues de l'ADN et de petites molécules ciblant les voies dépendantes du c-Myc peuvent augmenter l'efficacité des traitements actuels du CHS (135). Le celastrol, une petite molécule d'origine naturelle, inhibe significativement la prolifération cellulaire, la migration et l'invasion et induit l'apoptose en bloquant la voie de signalisation CIP2A/c-MYC *in vitro* (136).

5.4.7 LES INHIBITEURS DE L'HISTONE DESACETYLASE

Une dernière approche ayant montré des résultats précliniques intéressants se focalise sur le ciblage des mécanismes épigénétiques de régulation *via* les inhibiteurs de l'histone désacétylase. Plusieurs études ont révélé les rôles clés que joue l'acétylation ou la désacétylation dans l'expression de gènes spécifiques dans les cellules cancéreuses (137). Ainsi, les inhibiteurs de l'histone désacétylase provoquent une variété de changements phénotypiques, tels que l'arrêt du cycle cellulaire, la réversion morphologique des cellules transformées, l'apoptose et la différenciation. L'inhibition de la croissance tumorale et l'induction de la différenciation des chondrocytes tumoraux a été récemment rapportée en utilisant un inhibiteur de l'histone désacétylase de la familles des depsipeptides (138). Un essai de phase II évaluant la romidepsine, un depsipeptide, dans le cancer des tissus mous non opérable ou métastatique est actuellement en cours (NCT00112463).

5.4.8 CIBLAGE DE LA NICHE OSSEUSE

La niche osseuse du CHS représente un microenvironnement adéquat pour la survie et la prolifération des cellules souches cancéreuses. Le ciblage de ses composantes pourrait représenter de ce fait une stratégie thérapeutique intéressante **(1, 32)**.

Les ostéoclastes sont, d'une part, des acteurs clefs du phénomène de résorption osseuse observé dans le CHS, avec un rôle démontré dans la prolifération de la tumeur **(139)**. Des études précliniques utilisant les bisphosphonates (des inhibiteurs de la résorption osseuse), tels que l'acide zolédronique, ont apporté la preuve du concept de l'utilité d'une stratégie anti-résorption osseuse **(140)**. L'acide zolédronique exerce son action sur le remodelage osseux par induction de l'apoptose des ostéoclastes et inhibe la prolifération des cellules tumorales de l'ostéosarcome, du CHS et du sarcome d'Ewing *in vitro* et la progression tumorale *in vivo*. Dans un modèle pré-clinique de CHS, l'acide zolédronique ralentit le développement primaire de la tumeur chez la souris ainsi que la récurrence après un curetage intra-lésionnel et augmente dans les deux la survie globale. Ainsi, le ciblage des ostéoclastes peut être utilisé comme une stratégie pour la prévention de la récurrence **(141)**. Un essai clinique de phase Ib, évaluant la sécurité et efficacité d'une thérapie néo-adjuvante anti-ostéoclastes, à base d'acide zolédronique, dans le traitement du CHS opérable de tout grade est actuellement en cours (NCT03173976).

Toujours dans le même contexte du bénéfice des bisphosphonates, une étude pré-clinique sur un modèle orthotopique de CHS humain a exploré l'effet d'une immunothérapie utilisant les cellules T V γ 9V δ 2, une sous population de lymphocytes T $\gamma\delta$ intervenant dans l'immunité anti-tumorale mais dépourvues d'action sur les cellules de CHS. Les résultats ont montré que ces lymphocytes exercent un effet antitumoral puissant sur les cellules tumorales lorsque celles-ci sont prétraitées avec le zolédronate **(142)**.

Le traitement cytokinique représente une autre approche thérapeutique pertinente du CHS. L'oncostatine M, un membre de la famille des cytokines IL-6 principalement produite par les macrophages, les neutrophiles et les lymphocytes T, est un facteur cytostatique pour les cellules du CHS *in vitro* et *in vivo*. D'autres cytokines de la même famille, dont IL-6 avec son récepteur soluble et IL-27, sont aussi capables de réduire la croissance du CHS, mais avec une moindre efficacité **(143)**. La liste n'est pas exhaustive, mais elle nous fournit des preuves quant à l'intérêt du ciblage ou la modulation des composantes de la niche osseuse **(32)**.

6 CONTEXTE DE NOS TRAVAUX

La prise en charge thérapeutique du CHS repose principalement sur la chirurgie. Toutefois son utilité se trouve compromise devant certaines localisations anatomiques délicates ou un stade métastatique. Egalement, elle est confrontée à une probabilité relativement élevée de récurrences locales. Les thérapies ciblées, quant à elles, n'ont pas prouvé cliniquement leur efficacité jusqu'à ce jour. Aucune amélioration n'a donc pu être apportée en terme de survie globale des patients depuis plusieurs années.

D'autre part, les traitements conventionnels de chimiothérapie exposent à une toxicité redoutable augmentant les risques de morbidité et affectant la qualité de vie voire même la survie des patients. L'amélioration de l'index thérapeutique demeure donc le défi à relever lorsqu'il s'agit de développer un agent cytotoxique.

Parmi les stratégies visant un tel objectif, nous pouvons notamment citer des stratégies de "*targeted drug delivery*" basées sur l'utilisation d'un vecteur (ou encore transporteur) établissant une liaison préférentielle avec une ou plusieurs cibles tumorales, et permettant d'offrir des opportunités pour le développement d'une thérapie non seulement efficace mais surtout sélective de la tumeur. En effet, ces stratégies, en permettant de limiter la diffusion vers les tissus sains non cibles, devraient limiter les effets indésirables généralement associés à toute cure de chimiothérapie. Cette approche d'adressage de principes actifs vers un tissu tumoral donné est déjà un domaine en plein essor (144-146) avec de multiples exemples :

↳ **d'adressage actif**, notamment avec des anticorps. Plus d'une trentaine d'ADC (*Antibody Drug Conjugate*) sont actuellement en étude clinique. Nous en citons, à titre d'exemple : le trastuzumab emtansine, un anticorps monoclonal humanisé anti-HER2, lié de façon covalente par une liaison thioéther à un inhibiteur de microtubules dérivé de la maytansine, utilisé actuellement dans la prise en charge des cancers du sein HER2, et le brentuxumab vedotin, un ADC qui libère un agent anti-mitotique, la monométhyl auristatine E sélectivement au niveau des cellules tumorales exprimant l'antigène CD30 (possède l'AMM en France pour la prise en charge des lymphomes hodgkiniens et des lymphomes anaplasiques à grandes cellules systémiques).

↳ **d'adressage passif**, utilisant notamment des liposomes ou des nanoparticules, mettant à profit l'effet EPR (*Enhanced Permeability and Retention*). Nous citons à titre d'exemple : des nanoliposomes PEGylés de doxorubicine, une formulation liposomale de vincristine, des nanoparticules d'albumine qui véhiculent le paclitaxel en intracellulaire, etc.

Partant de l'ensemble de ces données, il devient raisonnable de développer et valider une thérapie qui puisse améliorer, par l'utilisation d'un vecteur, la délivrance d'un cytotoxique au niveau du tissu tumoral du CHS, grâce à une affinité exaltée pour les chondrocytes tumoraux ou leur microenvironnement. Dans ce cadre, la MEC du CHS pourrait s'avérer être une cible tout à fait pertinente. Deux caractéristiques retiennent plus particulièrement notre attention, à savoir :

- ***l'hypoxie sévère du tissu cartilagineux tumoral du CHS*** : l'hypoxie est, en effet, une caractéristique commune des tumeurs solides, à l'origine des chimio et radiorésistances.

Elle a été déjà mise à profit, depuis une trentaine d'années, pour le design de prodrogues s'activant sélectivement en milieu hypoxique.

- **les protéoglycanes du stroma tumoral**, qui sont fortement chargés négativement. Cibler les PGs de ce stroma est une stratégie développée au sein de notre unité de recherche depuis plusieurs années, tant sur les plans diagnostique que thérapeutique.

6.1 L'HYPOXIE TUMORALE

6.1.1 DEFINITION ET PHYSIOPATHOLOGIE DE L'HYPOXIE TUMORALE

Les tissus humains sont totalement dépendants *vis-à-vis* de l'oxygène (O₂) indispensable à la phosphorylation oxydative, seul mécanisme cellulaire efficace, rentable et suffisante pour la production de l'énergie. Dans les tissus, la concentration en O₂ dépend de la vascularisation et elle varie largement entre les différents organes (147). Les valeurs s'écartent largement des valeurs atmosphériques de 21% (ou 150 mmHg) et elle se situent entre 4 et 14% dans les tissus bien perfusés, et entre 0,7 et 7% dans les organes à bas débit de perfusion (148, 149).

Cette teneur tissulaire en O₂ est soumise à une régulation stricte et elle est déterminée par la quantité d'O₂ transportée par le sang, par le flux sanguin irriguant le tissu, ainsi que par la capacité de diffusion de l'O₂ vers l'espace extra-vasculaire (147). Dans un tissu sain, les apports en oxygène sont en adéquation avec les besoins cellulaires. Lorsqu'un déséquilibre survient, à l'origine d'une hypoxie tissulaire, une réponse physiologique adaptative est déclenchée afin de rétablir l'homéostasie (150).

L'hypoxie est définie comme une chute de la teneur en oxygène au-dessous des valeurs physiologiques. C'est une caractéristique majeure du microenvironnement tumoral, présente dans 50-60% des cas de tumeurs solides localement avancées (151). Son implication dans le processus tumoral des hémopathies malignes (les tumeurs liquides) a été aussi récemment décrite (152). La distribution de l'hypoxie est extrêmement hétérogène au sein d'un tissu tumoral et on distingue des zones d'hypoxie légère (2% P_{O2}) et d'autres d'hypoxie sévère (< 0,1% P_{O2}) (153).

Concernant l'hypoxie tumorale, elle est le résultat de différents facteurs. Elle est, d'abord, intrinsèquement causée par une vascularisation tumorale défectueuse et de nature chaotique et/ou incomplète, résultant en une livraison perturbée de l'O₂ et l'apparition de sous-populations cellulaires en **hypoxie aigue** ou **chronique** (Figure 18) (147).

👉 **Le modèle d'hypoxie chronique** a été d'abord proposé par Thomlinson et Gray (154) pour expliquer l'instauration de l'hypoxie dans les tumeurs. Ces chercheurs ont constaté que la distance qui séparait les capillaires sanguins de la zone de nécrose dans le tissu tumoral était constante (≈150 μm). Cette distance correspondait à la distance maximale de diffusion de l'O₂. Ils ont alors émis l'hypothèse qu'un gradient de diffusion de l'O₂, depuis les vaisseaux vers la zone de nécrose, devait être responsable de l'apparition, à proximité de la zone de nécrose, de cellules hypoxiques viables. Compte tenu de la limitation de diffusion de l'O₂, les cellules situées à plus de 90-100 μm du vaisseau perfusé le plus proche, ne sont plus suffisamment oxygénées et sont donc en hypoxie. En l'absence de traitement, l'hypoxie tumorale engendrée par l'augmentation des

distances inter-capillaires et par la limite de diffusion de l'O₂ est irréversible, on parle donc d'hypoxie chronique.

Toutefois, ce modèle ne permet pas d'expliquer à lui seul la présence de toutes les zones d'hypoxie observées. En effet, dans un certain nombre de tumeurs, les principales zones hypoxiques étaient juxtaposées à des zones convenablement oxygénées. En 1987 Chaplin *et al.* (155) élucident ce phénomène communément appelé depuis sous le terme **d'hypoxie tumorale aigue**.

↳ **L'hypoxie tumorale aigue** résulte d'une altération temporaire de la perfusion sanguine responsable de la survenue d'une hypoxie de type ischémique, réversible et transitoire. La tumeur passe par des cycles d'hypoxie aigue suivie par une ré-oxygénation, se produisant à proximité des vaisseaux sanguins en raison de l'effondrement vasculaire intermittent (**Figure 18**).

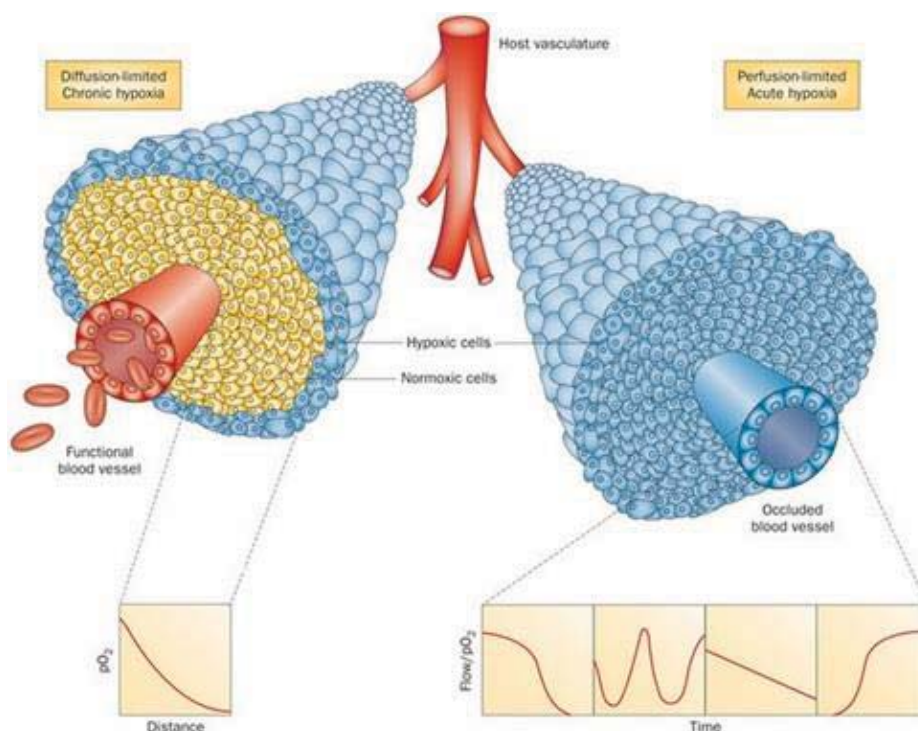


Figure 18: Illustration de l'hypoxie aigue et chronique, au sein d'une masse tumorale proliférant autour d'un vaisseau sanguin (156)

En effet, les masses tumorales sont caractérisées par de nombreuses anomalies structurales et fonctionnelles de la micro-circulation intra-tumorale. Le développement d'un apport sanguin permettant de fournir l'O₂ et les nutriments est essentiel pour la croissance et la dissémination tumorale dans les tumeurs solides. Pour y faire face, un processus de néo-angiogenèse intra-tumorale se déclenche, caractérisé par un développement anarchique de vaisseaux défectueux, présentant une couverture péricytaire incomplète et une association péricytaire faible au tube vasculaire central. A ces anomalies structurales se surajoutent des anomalies fonctionnelles: formation de microanévrismes, ruptures du mur vasculaire, établissement de jonctions artério-veineuses, tous susceptibles de provoquer des perturbations voire des inversions du flux sanguin. Des compressions vasculaires ou la formation de thrombus intra-vasculaires peuvent par ailleurs conduire à une occlusion temporaire de vaisseaux (147, 157-160) (**Figure 19**).

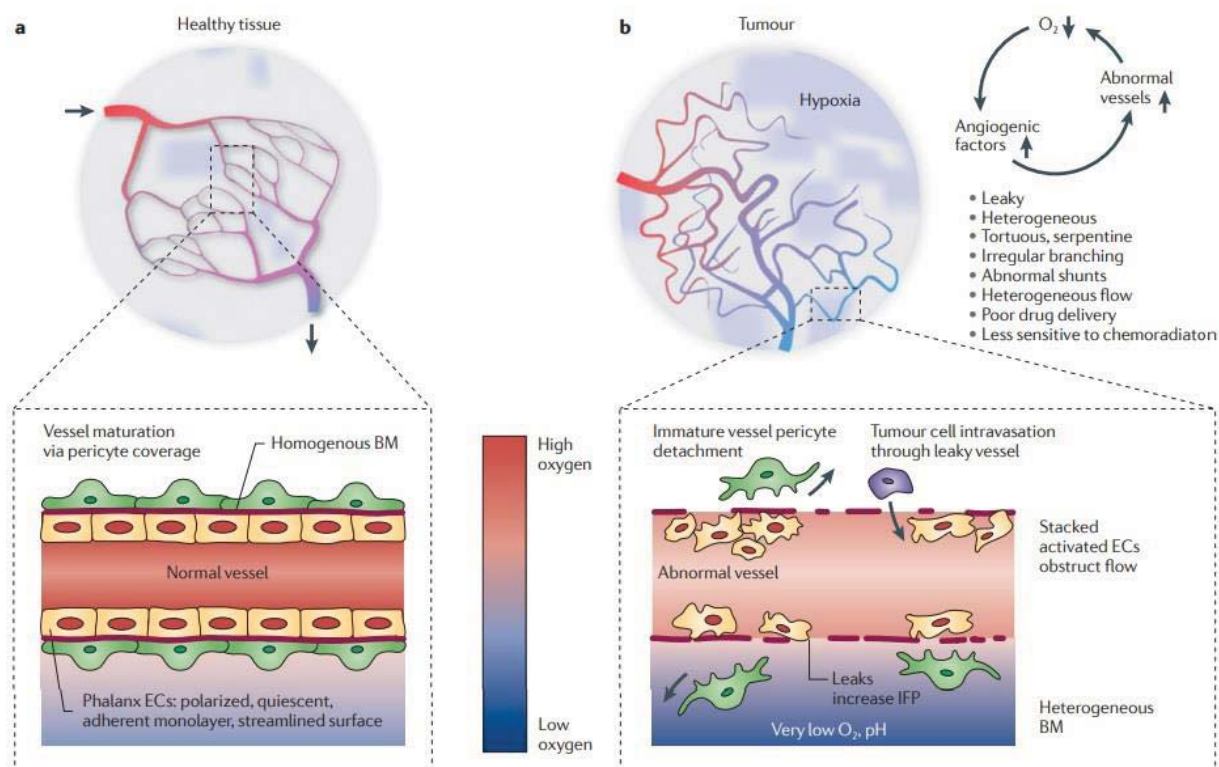


Figure 19: Anomalies structurales et fonctionnelles affectant le réseau vasculaire irriguant une tumeur (160)

[a/Dans un tissu sain non tumoral, un réseau vasculaire bien structuré est formé. b/Dans les vaisseaux sanguins irriguant la tumeur, le réseau vasculaire ainsi que l'endothélium et le mur vasculaire, présentent des anomalies structurales et fonctionnelles, à l'origine de l'apparition de zones en hypoxie sévère. BM : membrane basale, EC : cellules endothéliales, IFP : pression dans le fluide interstitiel]

La vascularisation défectueuse est très souvent amplifiée et aggravée par des facteurs extrinsèques, tels que l'anémie consécutive au développement tumoral ou induite par la chimiothérapie anticancéreuse. La capacité du sang à transporter l' O_2 se trouve alors diminuée, aggravant encore ainsi le degré d'hypoxie (161).

6.1.2 REPONSE ADAPTATIVE A L'HYPOXIE TUMORALE : LA VOIE DE SIGNALISATION HIF

A mesure que la tumeur progresse d'un stade précoce à un stade tardif, l'approvisionnement en O_2 s'amenuise. Les cellules cancéreuses doivent donc modifier leur métabolisme vers un phénotype glycolytique anaérobie, résultant en une production d'énergie moins efficace et une acidose intra-cellulaire. Pour pouvoir survivre, les cellules cancéreuses doivent faire face à ce micro-environnement acide, et ce *via* une série de réponses adaptatives (162).

Les réponses biologiques à l'hypoxie sont nombreuses, et impliquent essentiellement une voie de signalisation médiée par les HIFs (Hypoxia Induced Factors), une famille de facteurs de transcription hétérodimériques, composés d'une sous-unité α sensible à l'oxygène (HIF-1 α , HIF-2 α et HIF-3 α) et une sous-unité HIF-1 β dont l'expression est constitutive.

La réponse moléculaire à l'hypoxie se manifeste par la stabilisation du HIF- α , suivie par sa translocation dans le noyau, où il se dimérise avec HIF-1 β et se lie à des séquences spécifiques HRE (*HIF Response Element*) au niveau de la région promoteur de gènes cibles impliqués dans des processus clés comme l'angiogenèse, la survie cellulaire, le métabolisme, la croissance et l'invasion

tumorale, la réponse immunitaire, la chimio- ou radio-résistance.... Les gènes cibles les plus caractérisés sont ceux du VEGF, du transporteur du glucose (GLUT-1), de l'érythropoïétine et de l'anhydrase carbonique IX. Dans un grand nombre de cancers humains, les protéines HIF-1 sont surexprimées (163, 164) (Figure 20).

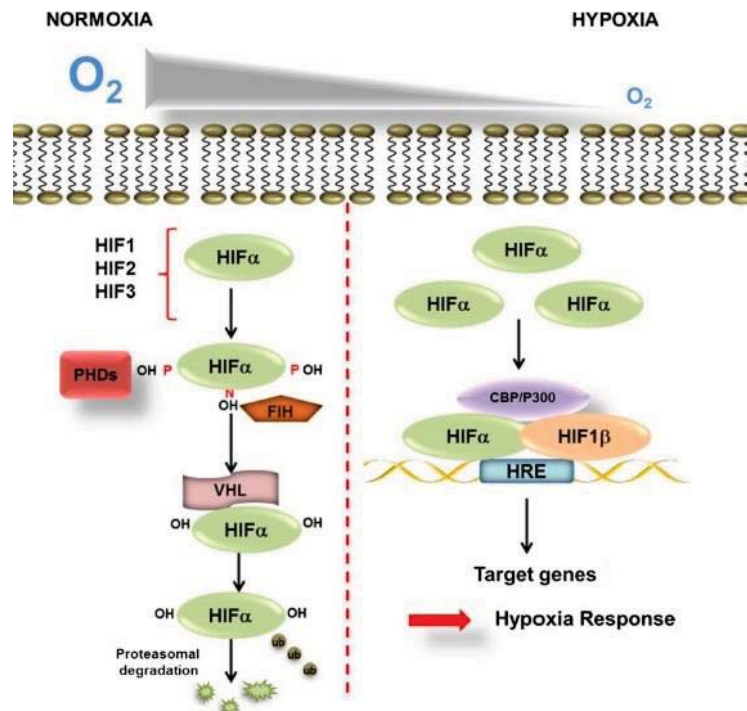


Figure 20: Mécanisme moléculaire de la réponse adaptative à l'hypoxie, induite par HIF (165).

[En situation de normoxie, les facteurs HIF- α sont hydroxylés par les protéines PHD (prolyl-4-hydroxylases) et FIH (factor inhibiting HIF-1), puis polyubiquitinylés par la protéine suppresseur de tumeur « von Hippel-Lindau » (VHL) pour s'orienter vers la voie de dégradation par le protéasome. En situation d'hypoxie, les facteurs HIF- α ne sont pas hydroxylés et subissent une translocation dans le noyau où ils se dimérisent avec HIF-1 β pour donner un facteur de transcription. En s'associant aux co-activateurs transcriptionnels (CBP ou p300), il induit, après fixation sur un motif HRE (HIF Response Element) au niveau de la région promoteur de gènes cibles, la transcription de gènes cibles].

6.1.3 MECANISMES DE LA CHIMIO ET RADIORESISTANCE DU TISSU TUMORAL HYPOXIQUE

Dans les tumeurs solides, les cellules en hypoxie développent des phénotypes tumoraux radio et chimiorésistants, invasifs et agressifs, conduisant, quel que soit le traitement, à un mauvais pronostic.

6.1.3.1 CHIMIORESISTANCE

Plusieurs mécanismes induits par l'hypoxie sont responsables de la chimiorésistance :

↳ Les zones hypoxiques, « sanctuaires » pour les cellules néoplasiques

Au même titre que pour l'O₂ et les nutriments, les molécules de chimiothérapie souffrent d'un mauvais acheminement vers les régions tumorales distantes des vaisseaux, en raison d'un périmètre de diffusion limité : seules les cellules les plus proches du vaisseau perfusé subiront donc

l'action cytotoxique du médicament, alors que des concentrations infra-thérapeutiques voire nulles seront obtenues dans les zones plus distantes du réseau vasculaire **(166, 167)**.

Des différences d'efficacité du cytotoxique (comme le docétaxel et la doxorubicine) au niveau d'un tissu tumoral, en fonction du degré d'oxygénation de la zone, ont pu être mises en évidence grâce à des biomarqueurs spécifiques (γ H2Ax pour les dommages de l'ADN, caspase-3 ou -6 pour l'apoptose et Ki-67 pour la prolifération cellulaire). Après traitement, l'expression de γ H2aX et de caspase-3 ou -6 est observée de façon prédominante dans les régions voisines des vaisseaux fonctionnels, alors que celle de Ki-67 est faible dans ces mêmes régions. Ces effets confirment la limitation de la diffusion et de l'efficacité du médicament à distance de la microcirculation **(168)**.

🔗 **L'hypoxie, synonyme de phénotype malin et agressif (169-172)**

L'hypoxie joue un rôle crucial et central dans le processus cancéreux *via* la pression de sélection qu'elle impose aux cellules, favorisant ainsi l'émergence de clones cellulaires de phénotype plus malin et agressif et de résistance exacerbée aux anticancéreux. Ces clones résistants sont à l'origine du repeuplement de la tumeur et de l'échec des traitements. Ce phénotype agressif est lié à des mutations génétiques, telles que celle du gène suppresseur de tumeur *Tp53* ou encore à l'expression de protéines favorisant la transition épithélio-mésenchymateuse conduisant à un potentiel métastatique et invasif plus important.

Aussi, et comme nous l'avons déjà évoqué précédemment, l'hypoxie déclenche des changements dans l'expression d'une multitude de gènes impliqués dans des processus clés conduisant à la progression de la tumeur, y compris l'angiogenèse, la survie cellulaire (sélection de populations cellulaires résistantes à l'apoptose), le métabolisme, la croissance et l'invasion tumorale, la réponse immunitaire, la chimio- ou radiorésistance et l'hyper-mutation (par inhibition des mécanismes de réparation de l'ADN).

🔗 **L'hypoxie, des cellules "dormantes"**

Enfin, la plupart des agents anticancéreux sont efficaces contre les cellules à taux de prolifération élevé, alors que les cellules dans les zones hypoxiques peuvent être soit quiescentes soit à faible taux de croissance en raison de l'absence d'oxygène et de nutriments.

🔗 **Augmentation du phénomène d'efflux en milieu hypoxique**

L'augmentation de l'expression des gènes codant pour des glycoprotéines membranaires d'efflux des médicaments (*MultiDrug Resistance genes*) est un mécanisme connu de la résistance des cellules tumorales aux cytotoxiques, responsable d'une diminution de leur concentration intracellulaire **(173)**. En milieu hypoxique, l'expression de ces gènes de résistance se trouve encore augmentée. A titre d'exemple, l'expression de *MDR1* se trouve particulièrement induite par le HIF-1 α et a été rapportée dans les tumeurs gastriques, du colon et du sein. Celle de *MRP2* s'est avérée impliquée dans la résistance à la doxorubicine induite par le HIF-1 α observée sur des lignées cellulaires de cancer du sein **(174-176)**.

6.1.3.2 RADIORESISTANCE

L'hypoxie tumorale est un acteur clef dans le phénomène de radiorésistance car l'O₂ est un radio-sensibilisateur potentiel. Sa présence au moment de l'irradiation ionisante amplifie la

cascade radicalaire initiée par la radiolyse de l'eau et la production d'espèces réactives de l'O₂ conduisant, comme mécanismes principaux, à des dommages au niveau des brins d'ADN, difficile à réparer par la cellule **(70)**.

Par conséquent, l'effet cytotoxique des radiations se trouve compromis en conditions hypoxiques. Ainsi les cellules tumorales en situation d'hypoxie deviennent jusqu'à trois fois plus résistantes à la radiothérapie que celles en conditions normoxiques. Une radiorésistance significative est notamment observée dans des zones tumorales présentant des teneurs en oxygène P_{O2} inférieures à 0,13 mmHg. Les cellules tumorales dans ces zones peuvent ainsi survivre malgré l'irradiation et ensuite permettre de repeupler la tumeur **(177) (Figure 21)**.

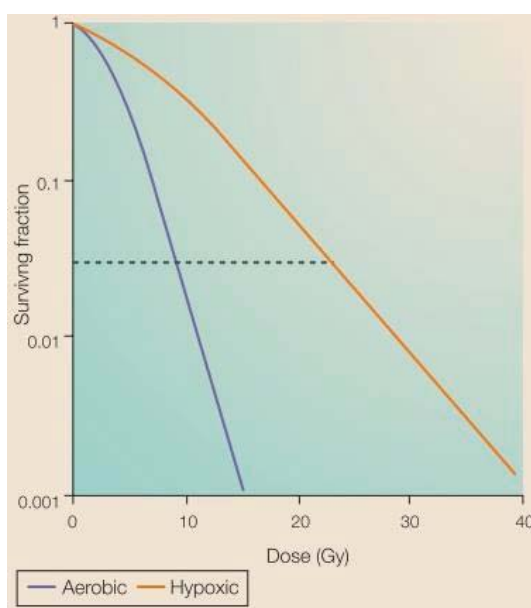


Figure 21: Illustration de la corrélation entre la fraction de cellules vivantes et la dose d'irradiation nécessaire (en Gy), selon l'état d'oxygénation du tissu (en normoxie ou en hypoxie) (un ratio de 2,5-3 est nécessaire, visualisé par les traits pointillés) **(167)**

De nombreuses études cliniques ont confirmé l'effet délétère de l'hypoxie chez les patients traités par radiothérapie et atteints de différents types de tumeurs tels que les cancers du col de l'utérus, le cancer de la tête et du cou **(178-180)**. Hockel *et al.* **(178)** ont étudié l'oxygénation de tumeurs localement avancées du col de l'utérus, après exérèse chirurgicale chez 103 patientes traitées par radiothérapie, afin d'établir une corrélation avec la progression de la maladie. La survie sans récurrence à 3 ans était d'environ 75% chez les patientes avec des tumeurs non hypoxiques (P_{O2} médiane > 10 mmHg), et chutait à près de 40% dans le cas de tumeurs en hypoxie (P_{O2} médiane < 10 mmHg). L'état d'oxygénation de la tumeur apparaît donc comme un facteur prédictif significatif de la progression tumorale et de la radiorésistance. Dans une autre étude sur 34 patients atteints de cancers de la tête et du cou, Nordsmark *et al.* **(180)** ont montré que le taux d'oxygénation au niveau des ganglions métastatiques était le facteur prédictif le plus significatif pour évaluer la réponse à la radiothérapie.

La **Figure 22** résume les effets délétères de l'hypoxie tumorale sur les traitements conventionnels (la chimiothérapie, la chirurgie et la radiothérapie) et qui conduisent *in fine* à une insensibilité des tumeurs et à un mauvais pronostic.

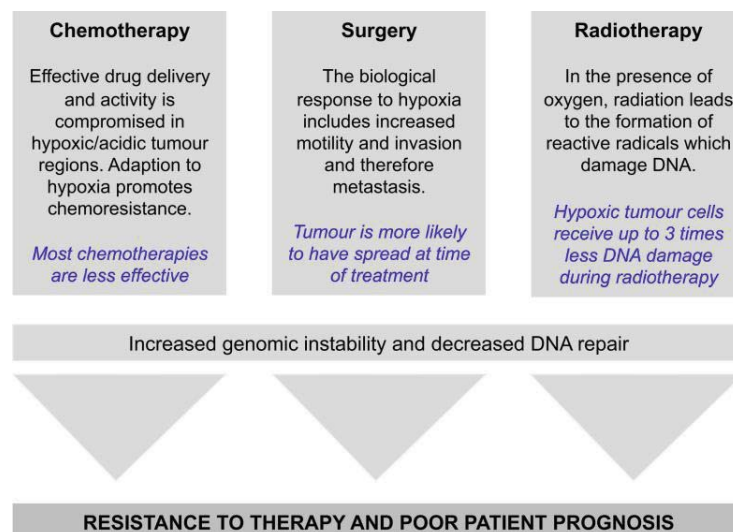


Figure 22: Impact de l'hypoxie tumorale sur les traitements conventionnels des tumeurs : la chimiothérapie, la chirurgie et la radiothérapie (153)

6.1.4 TRAITEMENTS CIBLANT L'HYPOXIE

L'évidence irréfutable du rôle crucial que joue l'hypoxie dans le processus tumoral fait d'elle une cible intéressante, pouvant être exploitée avec un drug design rationnel. En outre, la majorité des tissus normaux sont dépourvus de régions d'hypoxie sévère, et l'hypoxie physiologique observée dans plusieurs organes sains est peu agressive ou douce. L'hypoxie sévère observée dans de nombreuses tumeurs solides est donc une spécificité tumorale, potentiellement exploitable comme cible thérapeutique **(181) (Tableau 2)**.

Tableau 2: Teneur en O₂, exprimée en P_{O2} (en mmHg), dans une variété de tumeurs *versus* leurs analogues sains (review de Brown *et al.*) (167)

	P _{O2} médiane dans le tissu tumoral (nombre de patients)		P _{O2} médiane dans le tissu sain (nombre de patients)	
Glioblastome	4,9	(10)	ND	
	5,6	(14)	ND	
Tumeur de la tête et du cou	12,2	(30)	40,0	(14)
	14,7	(23)	43,8	(30)
	14,6	(65)	51,2	(65)
Cancer pulmonaire	7,5	(17)	38,5	(17)
Cancer du sein	10,0	(15)	ND	
Cancer du pancréas	2,7	(7)	51,6	(7)
Cancer du col de l'utérus	5,0	(8)	51	(8)
	5,0	(74)	ND	
	3	(86)	ND	
Cancer de la prostate	2,4	(59)	30,0	(59)
Sarcome des tissus mous	6,2	(34)	ND	
	18	(22)	ND	

[P_{O2} : pression partielle en O₂, mesurées à l'aide d'une électrode à oxygène « Eppendorf ». ND : Non déterminée].

Globalement, deux approches ont été explorées pour le ciblage des cellules hypoxiques :

☞ La 1^{ère} approche consiste en l'inhibition de cibles moléculaires nécessaires pour la survie des cellules hypoxiques, particulièrement HIF-1 et ses partenaires en aval ou en amont (182). Elle ne sera pas développée dans ce manuscrit.

☞ La seconde approche est basée sur l'exploitation de la différence de la teneur en O₂, et donc du potentiel redox, entre les zones hypoxiques et celles normoxiques pour le développement de prodrogues s'activant sélectivement en milieu hypoxique fortement réducteur. Il s'agit des **Prodrogues Activables en Hypoxie** (HAPs, *Hypoxia Activated Prodrugs*) qui génèrent des espèces cytotoxiques préférentiellement en milieu hypoxique (183).

Pour rappel, la notion de « prodrogue » a été introduite en thérapeutique en 1958 par Adrien Albert pour désigner un composé pharmacologiquement inactif, qui, une fois dans l'organisme, subit une biotransformation par diverses voies métaboliques (une réaction enzymatique ou chimique) pour donner l'entité pharmacologiquement active (184, 185). Par définition, une prodrogue doit être inactive ou au moins manifester une activité significativement inférieure à celle de l'entité générée *in vivo* après bioactivation. La conception structurale d'une prodrogue se fait par une liaison directe entre l'entité active et le motif destiné à subir la réaction de biotransformation, ou encore par insertion d'un bras espaceur (un « linker ») lorsque l'encombrement stérique ou les fonctions chimiques présentes ne permettent pas une liaison directe (186). L'approche de prodrogues a émergé dans l'objectif d'optimiser les propriétés physico-chimiques d'une molécule, déterminantes de son devenir dans l'organisme, c'est-à-dire son **Absorption, Distribution, Métabolisme et Excrétion** (propriétés pharmacocinétiques ADME) (exemple de la Figure 23). Ensuite, cette approche a été mise à profit pour augmenter la sélectivité d'un médicament envers sa cible, améliorant ainsi son efficacité et limitant sa toxicité systémique ou spécifique de certains organes (187).

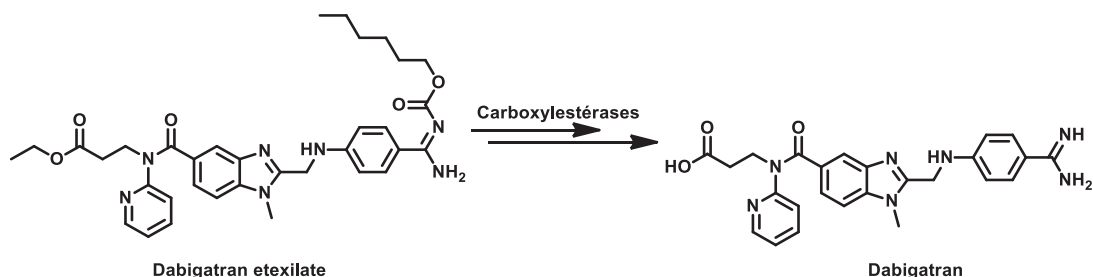


Figure 23: Illustration de l'amélioration de la biodisponibilité du dabigatran etexilate *via* l'approche de prodrogue (188)

[Le dabigatran etexilate est une prodrogue appartenant à la classe des anti-coagulants oraux, inhibiteur direct de la thrombine (Pradaxa; Boehringer Ingelheim Pharma GmbH, Ingelheim, Germany). La molécule active, le dabigatran, est multi-chargée et très polaire (log P = -2,4), d'où une biodisponibilité nulle après administration orale (0%). Le dabigatran etexilate, une prodrogue bifonctionnelle, est rendue plus lipophile, grâce au masquage des deux fonctions les plus polaires, l'acide carboxylique et l'amidinium, sous la forme d'un ester et d'un carbamate, respectivement. La biodisponibilité se trouve ainsi améliorée après administration orale (7%).]

Les HAPs ont été développées dans le cadre de ce dernier objectif, c'est-à-dire augmenter la sélectivité de l'agent cytotoxique envers les tissus tumoraux, épargnant ainsi les tissus sains des

multiples toxicités redoutables et connues de la chimiothérapie anti-cancéreuse. Actuellement, elles se présentent comme une nouvelle classe de thérapies, moderne et innovante, permettant l'adressage et la distribution sélectives de l'agent cytotoxique ou cytostatique dans les cellules tumorales hypoxiques résiduelles, situées à distance des vaisseaux sanguins (183).

6.1.5 LES PRODRUGUES ACTIVABLES EN MILIEU HYPOXIQUE: CONCEPTION, BIOACTIVATION ET CRITERES D'ACTIVITE (153, 167, 181, 183, 189-191)

Pendant les trois dernières décennies, un certain nombre de HAPs ont été développées. Plusieurs molécules ont progressé vers les essais cliniques, mais aucune d'entre elles n'a encore l'AMM pour l'utilisation clinique, un fait qui traduit, en partie, les défis et limites auxquels se trouve confronté le développement de cette classe de thérapies ciblées.

Les HAPs sont administrées sous une forme inactive, s'activant par bioréduction grâce à des oxydo-réductases endogènes dans les cellules hypoxiques, où elles libèrent l'espèce cytotoxique. Elles sont ainsi conçues pour agir sélectivement au niveau des cellules hypoxiques.

L'absence des HAPS jusqu'à présent en clinique se justifie, en partie, par la complexité de conception d'une HAP, car une variété de critères est à prendre en compte. Bien que dépendant de la tumeur à traiter, certaines propriétés sont communes et doivent être respectées :

↳ **Bonne délivrance du principe actif au niveau des régions hypoxiques dans les tumeurs solides.**

Les facteurs qui déterminent la délivrance du médicament sont complexes et dépendent, en partie, des caractéristiques physico-chimiques de la molécule. Parmi ces facteurs, le profil pharmacocinétique systémique, la capacité d'extravasation et de pénétration à travers plusieurs couches de cellules tumorales pour atteindre la fraction hypoxique et la rétention à l'intérieur de ces dernières sont des paramètres clefs. Selon Wilson *et al.* (192), la sélectivité pour les cellules hypoxiques en culture ne se traduit pas nécessairement par une activité similaire *in vivo*, car plusieurs facteurs spécifiques de la prodrogue et de la tumeur (l'expression des réductases, la sensibilité intrinsèque aux cytotoxiques libérés et la cinétique de ré-oxygénation et de recrutement de cellules hypoxiques) interviennent lors de la translation de l'activité depuis le *in vitro* vers le *in vivo* et peuvent être des déterminants critiques.

↳ **Activation préférentielle dans des conditions d'hypoxie sévère pour éviter une activation dans des tissus non-cibles.**

↳ **Activité cytotoxique sur des cellules non prolifératives, comme cela est le cas des cellules en hypoxie.**

↳ **Diffusion optimale de l'entité cytotoxique afin de contrôler le ciblage.**

Afin de développer une sélectivité optimale, l'agent cytotoxique issue de la bioactivation de la HAP doit posséder une bonne stabilité, mais exercer son action cytotoxique rapidement pour éviter à terme une distribution large dans l'organisme, nuisant donc à une activité localisée à la zone tumorale. Des espèces avec des demi-vies longues peuvent montrer une sélectivité potentielle pour les cellules hypoxiques sur des cultures cellulaires, mais leur efficacité, quant à un ciblage

sélectif des régions hypoxiques *in vivo*, n'est pas certaine. Toutefois, un effet sur les cellules normoxiques en périphérie directe des zones hypoxiques, appelé effet « **bystander** » est tout à fait intéressant. Après activation en zones hypoxiques, et dans le cas où l'agent cytotoxique libéré est suffisamment stable pour diffuser au-delà de son site d'activation primaire, son effet cytotoxique peut s'étendre pour inclure les zones tumorales voisines normoxiques, et ainsi agir de façon plus large sur la tumeur.

D'un point de vue structural, les HAPs sont schématiquement composées de trois parties fondamentales :

- une « **gâchette ou trigger** » qui correspond au groupement déclencheur du processus de bioactivation;
- un « **espaceur ou linker** » ;
- et une « **ogive ou therapeutic warhead** » c'est à dire l'agent thérapeutique proprement dit, libéré après bioactivation (**Figure 24**) (193).

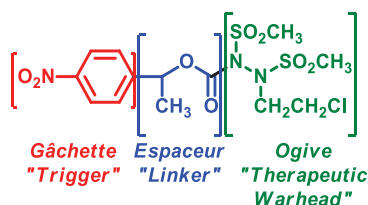


Figure 24: Agencement structural des HAPs en trois unités fondamentales : *trigger*, *linker* et *therapeutic warhead*.
Exemple d'une HAP nitroaromatique, le KS119 (193)

Les **gâchettes** sont des groupements fonctionnels masquant l'activité cytotoxique en normoxie, mais susceptibles d'être réduits *in vivo* en hypoxie afin de générer l'agent cytotoxique, tout en étant elle-mêmes transformées en une entité non toxique qui se voit éliminée. Les réactions de réduction sont favorisées en absence partielle ou totale d'oxygène (167).

Les HAPs déjà décrites dans la littérature, possèdent diverses gâchettes donnant leur nom à la classe de HAPs :

- les quinones ;
- les *N*-oxydes aromatiques ;
- les *N*-oxydes aliphatiques ;
- les nitro(hétéro)cycliques ;
- les complexes de métaux.

L'étape d'activation des HAPs est catalysée par une variété d'oxydoréductases et diffère selon la classe de la prodrogue. Les modèles pré-cliniques ont amélioré la compréhension des enzymes impliquées dans le métabolisme de bio-réduction des HAPs, mais d'autres études sont encore nécessaires. Pour la majorité des classes, le processus de bioréduction est inhibée en présence de l'O_2 , d'où la spécificité d'activation en milieu hypoxique. Cette action inhibitrice de l'O_2 se manifeste par une compétition directe sur l'électron unique de la 1^{ère} forme réduite de la

prodrogue. En milieu normoxique, cet électron sera capté par l'O₂, régénérant ainsi la forme initiale de la prodrogue et empêchant son activation (**Figure 25**).

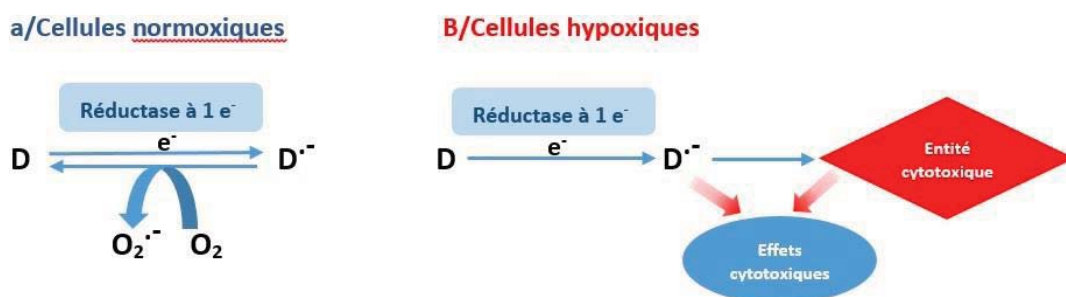


Figure 25: Mécanisme de bioactivation d'une HAP

[La prodrogue, substrat d'une réductase intra-cellulaire monoélectronique, est transformée en un radical libre dont le devenir dépend de la teneur de la cellule en O₂ : a/ Dans les cellules normoxiques : l'électron non apparié sur ce radical est récupéré rapidement par l'O₂ du milieu, régénérant ainsi la prodrogue initiale et un anion superoxyde, peu cytotoxique. b/ Dans les cellules hypoxiques : le radical est conservé et exerce une action cytotoxique, soit par lui-même soit après conversion en d'autres espèces plus cytotoxiques].

Des oxydoréductases catalysent typiquement des réductions mono-électroniques ou di-électroniques, respectivement dépendantes et indépendantes de la pression en O₂ (**Figure 26**). Toutefois, la fréquence et amplitude de leur expression dans les tumeurs humaines est peu définie.

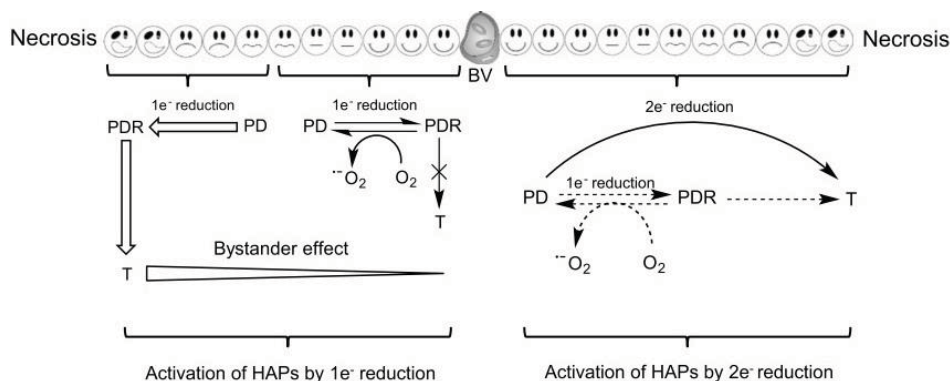


Figure 26: Représentation schématique du mécanisme d'activation mono et diélectronique des HAPs par les réductases intracellulaires dans les conditions d'aérobic et d'anaérobic (183)

[BV : Blood Vessel, PD : Prodrug, PDR : Prodrug Radical, T : Toxic drug, les smileys représentent les cellules tumorales]

↳ **Les réductions mono-électroniques** génèrent des espèces réactives qui conduisent à l'agent cytotoxique en hypoxie mais qui peuvent être facilement ré-oxydés en présence d'O₂, entraînant un cycle métabolique futile dans les tissus normoxiques. Cette étape réversible garantit que l'activation de la prodrogue soit restreinte aux tissus manifestant une P_{O2} diminuée. Le sous-produit radical superoxyde de ce processus est facilement détecté par une enzyme, la superoxyde dismutase, qui fait partie des processus de défense physiologique de l'organisme contre les radicaux libres. Ainsi, les HAPs développent une toxicité minimale dans les tissus normoxiques.



En revanche, **les réductions di-électroniques** catalysées par d'autres oxydoréductases sont irréversibles et indépendantes de la P_{O_2} du tissu. Dans ces conditions, la libération de la prodrogue ne sera conditionnée que par l'expression enzymatique des divers tissus.

A ce jour, le rôle de diverses oxydoréductases a été rapporté dans la littérature, avec notamment les oxydoréductases de type flavonoïdes à un électron, telle que la NAD(P)H réductase cytochrome P450-dépendante. Son rôle dans la bioréduction des HAPs a été démontré sur des cultures de cellules humaines, notamment pour les prodrogues nitro(hétéro)cycliques et quinoniques. Cependant, la fréquence d'expression dans les cancers humains semble être basse et ne corrèle généralement pas avec les biomarqueurs de l'hypoxie telle que l'anhydrase carbonique IX. Plusieurs oxydoréductases à deux électrons ont également été identifiées dans l'activation de HAPs, telle que la quinone oxydoréductase 1 (NQO1 ou DT-diaphorase) et l'aldo-cétoréductase 1C3 (AKR1C3), qui sont exprimées dans certains types de tumeurs, mais également dans les tissus normaux.

La facilité d'activation des HAPs a été souvent associée, avec succès, avec leurs valeurs de potentiel standard d'oxydoréduction $E^\circ(\text{ox/red})$. Dans la série nitro-aromatique de Granchi *et al.* (194) par exemple, les potentiels variaient de -0,77 à -0,61 V, traduisant une susceptibilité accrue à la réduction, et donc une transformation rapide de la molécule suite à la conversion $\text{NO}_2 \rightarrow \text{NHOH}$. Rappelons que des E° très bas (négatifs) impliquent des réducteurs forts.

Nous allons exposer, dans ce qui suit, les propriétés des principales classes de HAPs : les composés quinoniques, les *N*-oxydes aromatiques, les *N*-oxydes aliphatiques et les composés nitro(hétéro)aromatiques cycliques. Les candidats les plus intéressants au sein de chaque classe seront suffisamment passés en revue.

6.1.5.1 LES COMPOSES QUINONIQUES

Les quinones représentent une famille très vaste de composé à visée thérapeutique (fluoroquinolones, anthracyclines, vitamines K, etc) et la plus ancienne dans le contexte des prodrogues bioactivables. Le développement des quinones comme HAPs a été fait à partir d'une observation réalisée en 1980 : la mitomycine C est préférentiellement active sur les cellules hypoxiques tumorales. Cependant, sa sélectivité d'action en milieu hypoxique était modérée, ce qui a conduit au développement d'autres composés quinoniques dotés d'un plus grand différentiel d'activité en normoxie *versus* hypoxie. C'est ainsi que la porfiromycine, la RH1 et l'apaziquone (EO9) ont été développées (Figure 27).

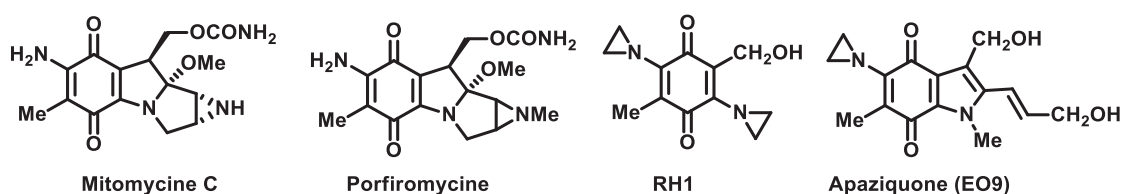


Figure 27: HAPs de structure quinonique (189)

L'activation des quinones peut impliquer une réduction monoélectronique, notamment assurée par la NADPH/CYP450 réductase, mais également une réduction diélectronique avec la DT-

diaphorase. L'implication de cette seconde enzyme conduit à une perte de sélectivité, l'espèce cytotoxique, une hydroquinone alkylante de l'ADN, étant générée en conditions d'aérobie dans des cellules qui l'expriment. Cette constatation a été plus particulièrement exemplifiée avec l'apaziquone de structure indole quinonique. Les études pré-cliniques ont montré que l'apaziquone était capable de cibler, d'une part, la fraction hypoxique des tumeurs déficitaires en DT-diaphorase, et d'autre part, les tumeurs sur-exprimant la DT-diaphorase indépendamment du taux d'O₂. Sa sélectivité sera donc régie par le taux d'expression de cette enzyme au niveau tumoral (**Figure 28**).

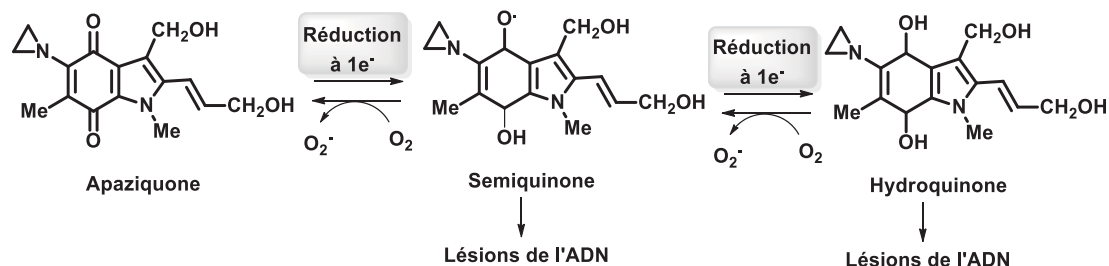


Figure 28: Bioactivation à un électron et deux électrons de l'apaziquone (183)

Se basant sur les résultats précliniques favorables, l'apaziquone a été évaluée en clinique, mais les résultats de la phase II furent décevants avec absence de réponses partielles ou complètes sur différents types de cancers. Cet échec semble être lié à trois points faibles dans la conception des essais cliniques : l'évaluation de la prodrogue seule (et non comme les autres HAPs testées dans le cadre d'une association), la non prise en compte dans les critères d'inclusion des patients du profil enzymatique et de la fraction hypoxique de la tumeur (**195**), ainsi que des propriétés pharmacocinétiques défavorables. Concernant ce dernier aspect, l'apaziquone est rapidement éliminée de la circulation générale après administration intraveineuse (demi-vie < 20 min) et possède une faible capacité à extravaser depuis un vaisseau sanguin et pénétrer à travers les multicouches des cellules tumorales pour atteindre la fraction hypoxique de la tumeur, comme cela a été démontré *in vitro* (**196**).

Cette pharmacocinétique peu favorable a été mise à profit dans le cadre d'essais cliniques portant sur des tumeurs superficielles de la vessie à cellules transitionnelles, où l'administration locorégionale par cathéter est possible, dans le cadre d'une thérapie adjuvante. Le profil enzymatique de ces cellules, quant à l'expression des enzymes activant l'apaziquone, a été vérifié (**197**). Les résultats de deux essais de phase III (NCT00598806 et NCT00461591) (**198, 199**) n'ont individuellement pas montré d'intérêt de l'apaziquone en termes de taux de survenue de récurrence à 2 ans. Toutefois, combinés, ils ont fait apparaître un critère important pour avoir une significativité sur le taux de récurrence, à savoir le temps à respecter entre l'administration de l'apaziquone et la résection transurétrale de la tumeur (>30 min post-TURBT) (**200**), ce qui a conduit à de nouveaux essais de phase III (NCT032224182 et NCT02563561).

6.1.5.2 LES N-OXYDES AROMATIQUES

Le chef de file de cette famille est la tirapazamine (TPZ), un benzotriazène-di-N-oxyde, rapportée pour la 1^{ère} fois dans la littérature en 1986 avec un différentiel de cytotoxicité hypoxie

versus normoxie *in vitro* de 300. Cette molécule a été la première HAP à atteindre l'étude clinique et a fait à ce jour l'objet du plus grand nombre d'évaluations en clinique.

La bioactivation de la TPZ se fait essentiellement par une réduction à un électron *via* la cytochrome P450 oxydoréductase, générant un radical TPZ[•]. En l'absence d'oxygène, ce radical TPZ[•] subit une conversion spontanée en un radical benzotriazinyle et un autre hydroxyle, générant tous deux des dommages au niveau de l'ADN et inhibant la topoisomérase II (201). En présence d'O₂, la TPZ subit un cycle futile pour régénérer le composé de départ avec la formation concomitante de radical superoxyde. Parallèlement, une réduction à deux électrons *via* la DT-diaphorase pourrait s'opérer, diminuant l'effet cytotoxique escompté. En effet, les cellules ne subiraient alors pas l'effet des radicaux libres, le radical TPZ[•] générant directement son dérivé mono N-oxyde, non toxique (Figure 29).

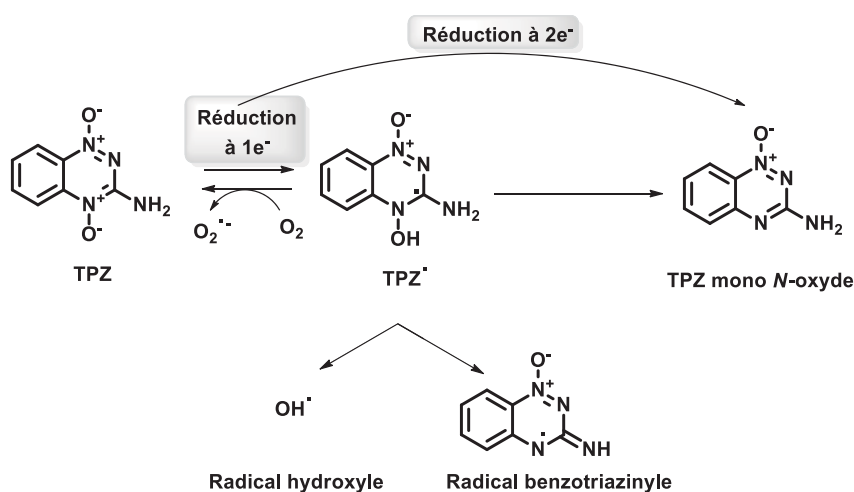


Figure 29: Bioactivations mono et di-électronique de la tirapazamine (183)

Une grande sélectivité d'action de la TPZ en milieu hypoxique a été démontrée sur plusieurs lignées cellulaires (202). Aussi, les études pré-cliniques *in vivo* associant la TPZ à la radiothérapie ou à une chimiothérapie par le cisplatine se sont montrées très prometteuses, justifiant les premiers essais cliniques dans les années 1999 (203). Après de nombreux essais de phase II avec des résultats prometteurs, les phases III se sont révélées décevantes notamment en termes de toxicité hématologiques et n'ont pas montré de bénéfice en termes de survie, comparativement aux traitements conventionnels, dans différents types de cancers (204-206). Elle fait toutefois encore l'objet de diverses études cliniques.

Plusieurs propriétés de cette prodrogue ont sans doute limité son efficacité, notamment son activation rapide même dans des conditions d'hypoxie douce, à l'origine d'une certaine toxicité pour les cellules normoxiques, mais aussi une pauvre pénétration dans les tissus tumoraux profonds hautement hypoxiques (207). En outre, les patients n'ont pas fait l'objet d'une évaluation de leur niveau d'hypoxie tumorale. Comme pour l'apaziquone, cet échec traduit le besoin d'identifier des sous-populations de patients manifestant des niveaux élevés d'hypoxie tumorale susceptibles d'être de bons répondeurs au traitement (208).

La TPZ a fait l'objet de plusieurs études de pharmacomodulation afin d'optimiser ses propriétés, grâce à des modèles *in silico* combinés à des approches expérimentales. Nous pouvons citer notamment le composé Q6, ayant affiché une meilleure sélectivité que la TPZ à la fois *in vitro* et *in vivo*, parmi la série d'analogues développée par Chang *et al.* (209) (Figure 30).

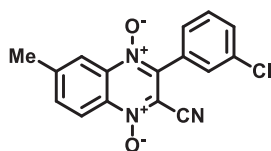


Figure 30: Structure du Q6, un analogue de la TPZ ayant montré une meilleure activité antiproliférative (par inhibition de la topoisomérase II) et une sélectivité d'action accrue en milieu hypoxique (209)

Le SN30000 (CEN-209) est aussi un analogue benzotriazène-di-*N*-oxyde, issu d'une étude de pharmacomodulation de la TPZ (Figure 31). Ses caractéristiques métaboliques et d'extravasation ont été particulièrement améliorées par rapport à la TPZ, ce qui lui a permis d'atteindre le compartiment de cellules tumorales hypoxiques à des concentrations plus élevées (210). Le SN30000 a montré une bonne activité en pré-clinique, toutefois des études complémentaires ont montré une sensibilité à la photodégradation et une toxicité aigüe chez la souris en relation avec la formation d'un métabolite *N*-1-oxyde (211).

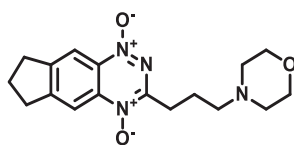


Figure 31: Structure du SN30000, un analogue de la TPZ (183)

6.1.5.3 LES *N*-OXYDES ALIPHATIQUES

La banoxantrone (AQ4N), de structure alkylaminoanthraquinone, est la première HAP de type *N*-oxyde aliphatique. Sa réduction conduit *via* le passage par un intermédiaire mono-*N*-oxyde (AQM) au produit bioactif, AQ4, intercalant de l'ADN et inhibiteur de topoisomérase II (Figure 32). La forme *N*-oxyde confère à AQ4N des propriétés sel-like, d'où une grande hydrosolubilité (212).

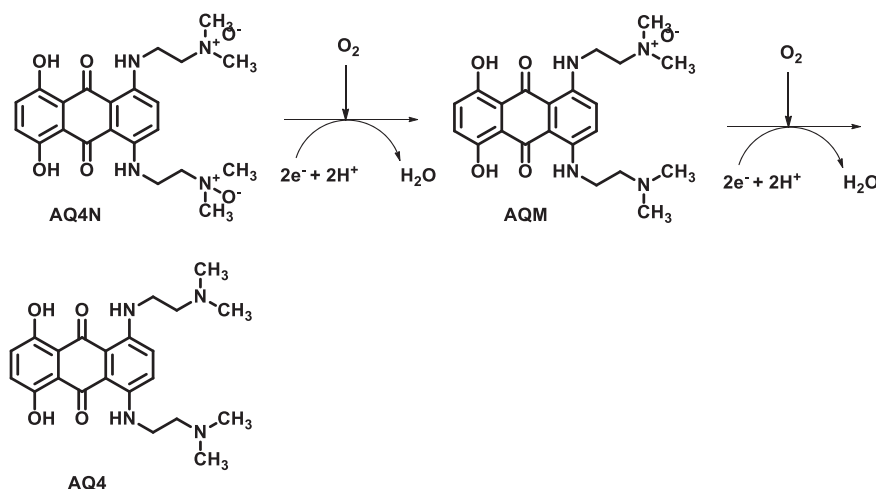


Figure 32: Bioactivation de l'AQ4N (banoxantrone) (183)

La capacité d'intercalation de l'ADN du dérivé AQ4 est facilitée par la charge δ^+ des chaînes latérales aminoalkyle de la forme amine protonée, permettant une interaction électrostatique stabilisante avec les phosphates du squelette de l'ADN. En revanche, la charge partielle δ^- sur la fonction N-oxyde de l'AQ4N, rend une telle interaction impossible car elle devient plutôt répulsive, annihilant la capacité d'intercalation de la prodrogue AQ4N.

Contrairement aux autres familles, ce dérivé N-oxyde aliphatique n'est pas activé par la NAD(P)H réductase cytochrome P450-dépendante et ne conduit donc pas à la formation d'espèces oxygénées réactives. Dans les tumeurs humaines, la bio-réduction de l'AQ4N implique une étape à deux électrons, probablement dépendante de la présence du CYP1A, 2B6 et 3A et d'autres isoformes non encore identifiées, mais aussi de la Nitric Oxide Synthase (NOS), une enzyme surexprimée dans les tumeurs **(212)**.

En normoxie, l'AQ4N a affiché des cytotoxicités très faibles voire nulle ($Cl_{50} > 100 \mu M$) sur un panel de 60 lignées de cellules tumorales, alors que dans des conditions réductrices, les valeurs de Cl_{50} sont de l'ordre du nanomolaire **(192, 213, 214)**.

Des études de captation cellulaire et de distribution de l'AQ4N et de son métabolite actif AQ4 sur une lignée de fibroblastes humains (à forte expression de la topoisomérase II) ont montré que le métabolite actif est retenu en quantité non négligeable (jusqu'à 26%) dans les différents compartiments cellulaires (cytoplasme, membrane nucléaire et noyau), et ce contrairement à la prodrogue AQ4N. AQ4 est donc capable de diffuser dans les cellules tumorales normoxiques adjacentes, donnant lieu à un effet bystander **(213)**. Les résultats des études précliniques *in vivo* combinant l'AQ4N à la radiothérapie ou la chimiothérapie (thiotépa, cyclophosphamide ou cisplatine) ont démontré une amélioration de la réponse anti-tumorale *versus* des thérapies cytotoxiques conventionnelles, justifiant ainsi les premières études cliniques **(215, 216)**.

Dans leur étude translationnelle de phase I sur des échantillons de biopsie de patients atteints de divers cancers, Albertella *et al.* **(217)** ont démontré l'activation de l'AQ4N dans les compartiments hypoxiques des tumeurs. Les auteurs ont dosé AQ4 dans les biopsies ainsi qu'un marqueur endogène de l'hypoxie (Glut1). Leurs résultats montrent que la forme activée AQ4 s'accumule préférentiellement dans les tissus tumoraux comparativement aux tissus normaux, et que sa concentration est corrélée à l'expression de Glut1. Les concentrations les plus élevées ont été obtenues dans des tumeurs très hypoxiques comme les cancers de la vessie. Celles-ci dépassent les concentrations actives définies dans les protocoles *in vitro*, justifiant la poursuite des études. Toutefois, aucune étude ne semble encore actuellement active (pas de résultats depuis 2007 sur Clinical Trial). Un analogue deutéré de l'AQ4N (sur les méthyles), OCT1002, est actuellement en cours d'étude clinique **(218)**.

6.1.5.4 LES COMPOSES NITRO(HETERO)AROMATIQUES

Cette classe de composés s'est montrée comme la plus efficace en termes d'activation en milieu hypoxique. Elle utilise une fonction un cycle nitro(hétéro)aromatique comme gâchette déclenchant le processus de bioactivation et de libération de l'agent cytotoxique. Le cycle peut être de type benzyle, furane, thiophène ou imidazole.

Des composés nitro-imidazolés ont été déjà utilisés en clinique, d'abord comme radiosensibilisateurs, c'est-à-dire des oxygène-mimétiques (exemples : misonidazole, étanidazole et mimorazole), puis comme des marqueurs de l'hypoxie pour l'imagerie des cellules hypoxiques par des techniques immuno-histochimiques sur des prélèvements tissulaires (pimonidazole, EF5) ou d'imagerie TEP (Tomographie par Emission de Positrons) *in vivo* ($[^{18}\text{F}]$ -Fluoromisonidazole, $[^{18}\text{F}]$ -pimonidazole, $[^{18}\text{F}]$ -fluortanidazole) (Figure 33).

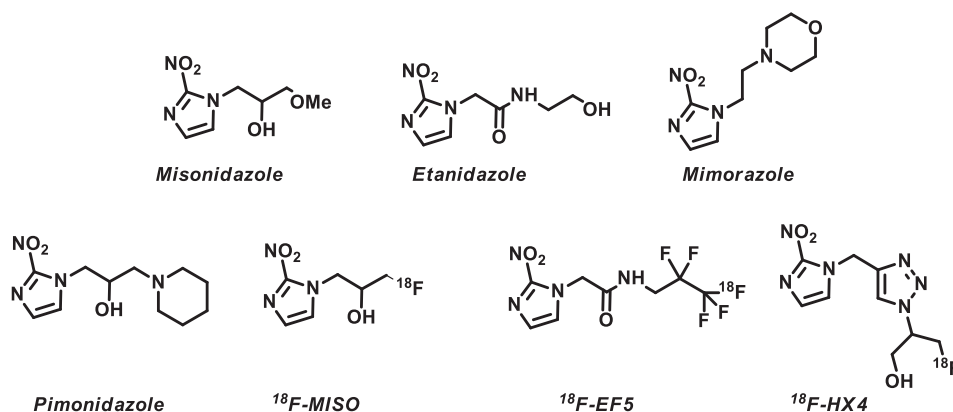


Figure 33: Composés nitro-imidazolés utilisés comme radiosensibilisateurs ou marqueurs de l'hypoxie *in vitro* ou *in vivo* (189)

Leur intérêt ayant été validé comme marqueurs de l'hypoxie, la structure nitro(hétéro)aromatique est maintenant utilisée pour développer des HAPs.

Diverses études rapportées dans la littérature relatent des travaux de synthèse pour le développement de HAPs de type nitroaromatique ainsi que l'évaluation de leur différentiel de cytotoxicité dans des conditions d'hypoxie *versus* normoxie. Dans une série de prodrogues *p*-nitrobenzyle de type sulfonylhydrazines de Seow *et al.* (219), une sélectivité d'activation en hypoxie a été obtenue avec libération d'une entité alkylante ciblant la position O-6 des résidus guanine de l'ADN. D'autre part, Granchi *et al.* (194) ont conçu une série de prodrogues nitroaromatiques capables de libérer sélectivement en hypoxie, le β -aminopropionitrile inhibiteur de la lysyl-oxydase, enzyme extracellulaire identifiée comme une cible thérapeutique innovante en oncologie.

L'activation des HAPs de type nitroaromatiques est initiée par un processus à un seul électron, médié par la NAD(P)H cytochrome P450 réductase. L'addition d'un électron par l'enzyme génère un radical anion de type nitro. En présence d' O_2 , ce radical est rapidement ré-oxydé pour régénérer la prodrogue inactive et un anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$). Par conséquent, la concentration du radical anion nitro à l'état d'équilibre est faible voire pratiquement non détectable (199). En revanche, dans les conditions d'hypoxie, ce radical anion subit vraisemblablement une dismutation suivie par une réduction, et ce à travers l'addition successive d'électrons, pour produire des entités de type nitroso, hydroxylamino et amino. Ce processus a été démontré pour des nitrobenzénoides para substitués (220). Alors que le groupement nitro exerce un effet électro-attracteur (par effets mésomère et inductif) sur le cycle aromatique, le groupement nitroso, hydroxylamino et amino sont, quant à eux, des électro-donneurs par effet mésomère (grâce aux paires d'électrons libres).

Cette inversion de la réactivité résulte en l'activation de la prodrogue pour produire les espèces cytotoxiques **(221)**. Selon les résultats de Borch *et al.* **(222)**, l'introduction d'un groupement électroattracteur sur le cycle nitro(hétéro)aromatique augmente la cytotoxicité en normoxie, d'où la diminution de la sélectivité d'action en normoxie *versus* hypoxie. A l'opposé de ceci, des substituants électrodonneurs diminuent considérablement la cytotoxicité à la fois dans les conditions de normoxie et d'hypoxie, mais augmentent la sélectivité d'action en milieu hypoxique.

Les nitroaromatiques cycliques ayant déjà montré une activité en pré-clinique et/ou en clinique seront exposés ci-après.



L'ÉVOFOSFAMIDE

L'évofosfamide, connu sous le nom de TH-302, initialement développé par l'entreprise Threshold Pharmaceuticals puis testé en clinique en collaboration avec la firme pharmaceutique Merck, est actuellement, sans doute, la HAP la plus étudiée en clinique. De ce fait, elle constitue la molécule de référence dans notre étude.

L'évofosfamide est un composé 2-nitroimidazole qui, par fragmentation sélective en conditions hypoxiques, libère la moutarde bromoisophosphoramide (Br-IPM) qui est un puissant agent d'alkylation de l'ADN **(Figure 34)**. Face aux dommages créés au niveau de l'ADN par cette entité alkylante, la réponse cellulaire se manifeste par la phosphorylation de l'histone H2AX (produisant le marqueur de dommage à l'ADN, γ H2AX), l'activation de Chk-1 (Checkpoint kinase 1, une sérine/thréonine kinase coordonnant la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN), d'où l'arrêt du cycle cellulaire, et l'inhibition de l'expression de HIF-1 α **(223)**.

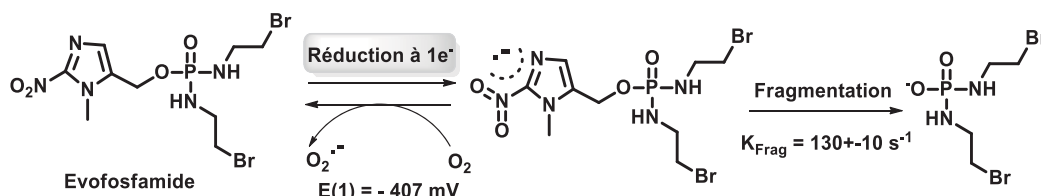


Figure 34: Bioactivation de l'évofosfamide, par un processus de réduction monoélectronique (224)

L'inactivation de la thiorédoxine réductase, une enzyme qui régule plusieurs procédés cellulaires, dont l'apoptose et la protection de la cellule contre les dommages causés par les espèces réactives de l'O₂, est aussi un mécanisme d'action proposé pour l'évofosfamide **(225)**.

Une fois activée dans les zones hypoxiques, l'espèce cytotoxique alkylante diffuse dans les tissus non hypoxiques environnants, agissant sur ces cellules par effet bystander **(226)**. Cet effet a été mis en évidence dans l'étude de Saggar *et al.* **(227)** où des changements du taux de certains biomarqueurs spécifiques de la réponse antitumorale (γ H2aX : un marqueur des dommages de l'ADN, caspase-3 ou -6 : des marqueurs de l'apoptose et Ki-67 : un marqueur de la prolifération cellulaire) ont été détectés dans toutes les régions tumorales, y compris les zones normoxiques proches des vaisseaux sanguins fonctionnels.

In vitro, l'évofosfamide a montré une sélectivité d'action intéressante pour les cellules hypoxiques. Dans les premiers travaux de Duan *et al.* **(228)** ayant abouti à la mise au point de ce composé, l'évofosfamide a manifesté un différentiel d'activité en hypoxie *versus* normoxie égal à

400 sur la lignée cellulaire H460 d'un cancer de poumons non à petites cellules, à forte expression de la DT-diaphorase. Le large screening réalisé ensuite par Meng *et al.* (226) sur un panel de lignées cancéreuses de tumeurs solides a montré des ratios de cytotoxicité hypoxie *versus* normoxie allant de 11 pour la lignée cellulaire U87-MG de glioblastome-astrocytome jusqu'à 600 pour une lignée cellulaire de mélanome (SK-MeL-5).

Dans le cas des tumeurs liquides, l'évofosfamide a fait également preuve d'une action apoptotique sur la lignée cellulaire 5T33MM du myélome multiple (229).

Cette efficacité *in vitro* s'est confirmée dans des études pré-cliniques *in vivo*, l'évofosfamide possédant une activité cytotoxique très importante dans les zones hypoxiques de tumeurs solides (230, 231) et potentialisant l'effet anti-tumoral de chimiothérapies classiques (227). Les travaux de Duan *et al.* (228) ont conclu à un puissant effet cytotoxique *in vivo* sur un modèle orthotopique de xénogreffe de tumeur pancréatique PaCa-2 en monothérapie, mais aussi une efficacité très prononcée en combinaison avec la gemcitabine. Associé à différents agents cytotoxiques conventionnels (docétaxel, cisplatine, pemetrexed, irinotécan, doxorubicine, gemcitabine et temozolomide), il augmente leur activité cytotoxique, comme le montre les résultats de l'étude de Li *et al.* (230) réalisée sur 11 modèles de xénogreffes de tumeurs humaines (cancer des poumons non à petites cellules, cancer du colon, cancer de la prostate, fibrosarcome, mélanome et cancer du pancréas). La plupart des études ont été réalisées sur des tumeurs solides mais l'effet de l'évofosfamide ne s'y limite pas. En agissant sur les cellules hypoxiques résidant dans le microenvironnement de la moelle osseuse, l'évofosfamide développe une activité dans les leucémies myéloïdes aiguës (229).

Un effet radio-sensibilisateur de l'évofosfamide a été également décrit en pré-clinique sur un modèle de xénogreffe de tumeurs humaines (un rhabdomyosarcome d'une souris syngénique R1 et une lignée de cancer humain des poumons non à petites cellules H460). Le traitement par l'évofosfamide réduit significativement la fraction hypoxique de plus de 80 %, tel que visualisé par des images TEP (utilisant le traceur d'hypoxie [¹⁸F]-HX4 et réalisée à J₀ et J₄ en amont et après administration de l'agent cytotoxique à la dose de 25mg/Kg pendant quatre jours consécutifs), d'où un retard significatif de la croissance tumorale (Figure 35). Combiné avec la radiothérapie à la dose de 8 Gy, ce ralentissement est encore accentué. De plus, une imagerie TEP avec le même traceur d'hypoxie en amont du traitement, permettant d'évaluer le statut hypoxique de la tumeur, s'avère prédictive de la réponse à l'évofosfamide (232).

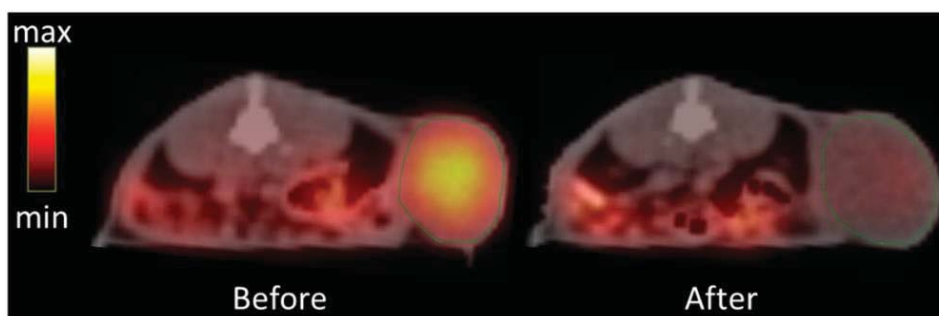


Figure 35: L'évofosfamide diminue la fraction hypoxique de la tumeur sur un modèle murin de rhabdomyosarcome (233)

Compte tenu de ce spectre d'activité anti-cancéreuse démontré en pré-clinique, la molécule a pu progresser vers les essais cliniques. Depuis le 1^{er} dépôt de brevet en 2005 par Threshold Pharmaceuticals, l'évofosfamide a été testé, dans le cadre d'un co-développement avec la compagnie Merck. En monothérapie ou en association avec la radiothérapie ou des agents de chimiothérapie, il a fait l'objet d'investigations cliniques dans plus de 27 essais cliniques sur diverses tumeurs. Parmi elles, nous pouvons citer les sarcomes des tissus mous, les tumeurs pancréatiques, le cancer des poumons non à petites cellules, le mélanome, le cancer œsophagien, les cancers hématologiques, etc (<https://clinicaltrials.gov/>).

Les essais de phase I sur l'évofosfamide en monothérapie ont démontré une réponse tumorale sur plusieurs types de cancers et ont conclu à une bonne tolérance, avec comme principale toxicité, une toxicité dermatologique et des muqueuses de haut grade, particulièrement à des doses supérieures à 240 mg/m².

Dans le cadre d'essais cliniques de phase II sur le cancer pancréatique localement avancé ou métastatique (NCT01144455, 214 patients) et le sarcome des tissus mous (NCT01440088), l'évofosfamide a été testé en association avec une chimiothérapie conventionnelle, la gemcitabine et la doxorubicine, respectivement.

Dans le cas de l'essai NCT01144455, les résultats ont conclu à un bénéfice de l'évofosfamide à la dose de 240 mg/m² (T₂₄₀) ou 340 mg/m² (T₃₄₀), dans le cadre d'une association avec la gemcitabine, en termes de survie sans progression de la maladie (5,6 pour le bras ayant reçu la combinaison *versus* 3,6 pour le bras ayant reçu la gemcitabine seule, p=0,005), de réponse tumorale (12%, 17%, et 26% pour la gemcitabine, gemcitabine + T₂₄₀ et la gemcitabine + T₃₄₀, respectivement, p = 0,04) ainsi que de diminution du marqueur tumoral CA 19-9 (-5,398 pour la gemcitabine *vs* -549 U/mL pour la gemcitabine + T₃₄₀, respectivement, p = 0,008). Les toxicités observées touchaient surtout la peau et les muqueuses (dont 2% seulement de grade 3) ainsi que les lignées sanguines (myélosuppression, dont 55% de grade 3 ou 4) **(234)**.

Les résultats de l'essai de phase II NCT01440088, combinant doxorubicine et évofosfamide, évalués également par les mêmes critères (survie sans progression de la maladie, survie globale et réponse tumorale) ont été considérés eux-aussi comme « favorables », comparativement avec les résultats obtenus avec un bras témoin traité par la doxorubicine seule (chimiothérapie de 1^{ère} ligne) **(235)**.

Se basant sur ces résultats, l'évofosfamide a pu progresser vers deux grands essais de phase III, multicentriques et randomisés **(227, 233)**:

- **MAESTRO (NCT01746979)**, évaluant cette prodrogue, toujours dans le cadre d'une association avec la gemcitabine, dans l'adénocarcinome du pancréas localement avancé, non opérable ou métastatique, *versus* la gemcitabine seule.
- **TH-CR-406/SARC021 (NCT01440088)**, évaluant cette prodrogue en association avec la doxorubicine, dans le sarcome des tissus mous localement avancé, non opérable ou métastatique, *versus* la doxorubicine seule.

La publication des résultats obtenus au terme des deux essais fut toutefois décevante pour la communauté médicale. Ces études n'ont pas montré de bénéfice, en termes de survie globale

(objectif principal), comparativement à l'agent conventionnel de chimiothérapie utilisé en monothérapie. Toutefois, des résultats intéressants, en termes de survie sans progression de la maladie et de réponse tumorale (objectifs secondaires), ont été rapportés pour le bras traité par l'association avec la doxorubicine (236). Un antagonisme entre l'évofosamide et la doxorubicine a été proposé par Anderson *et al.* (237) comme un facteur responsable, en partie, de l'échec de cette association en clinique. Un mécanisme de type transfert de charge entre le radical anion de l'évofosamide et le noyau quinonique de la doxorubicine, empêchant ainsi la libération de l'entité cytotoxique alkylante, a été démontré.

A ce jour, d'autres essais cliniques sont en cours de recrutement ou de réalisation (<https://clinicaltrials.gov/>). Une liste complète de l'ensemble des essais cliniques déjà à terme et ceux en cours est accessible *via* le même web.



LE PR-104

Il s'agit d'une pré-prodrogue ester phosphate hydrosoluble, portant un mésylate et un brome, tous deux des groupements plus réactifs, car meilleurs nucléofuges, que le chlore conventionnellement incorporé dans les structures alkylantes de l'ADN.

Le PR-104 subit une hydrolyse rapide *in vivo* dans la circulation générale par des phosphatases, pour donner une prodrogue alcool, plus lipophile, le PR-104A. La réduction monoélectronique, par la CYP 450 réductase par exemple, génère un radical nitro intermédiaire, qui subit un cycle redox futile et régénère rapidement la prodrogue PR-104A. En l'absence d'O₂, l'intermédiaire radical nitro subit une série de réactions conduisant à la formation d'une para-hydroxylamine PR-104H, comme métabolite intra-cellulaire majoritaire, et d'une para-amine PR-104M. La réduction diélectronique par l'aldo-cétoréductase 1C3 (AKR1C3) contourne la formation de cet intermédiaire sensible à l'O₂ et génère directement les métabolites actifs dans des conditions aussi bien de normoxie que d'hypoxie (Figure 36). Dans ce cas, la sélectivité est dépendante du niveau d'expression de l'aldo-cétoréductase 1C3 dans les cellules tumorales (238).

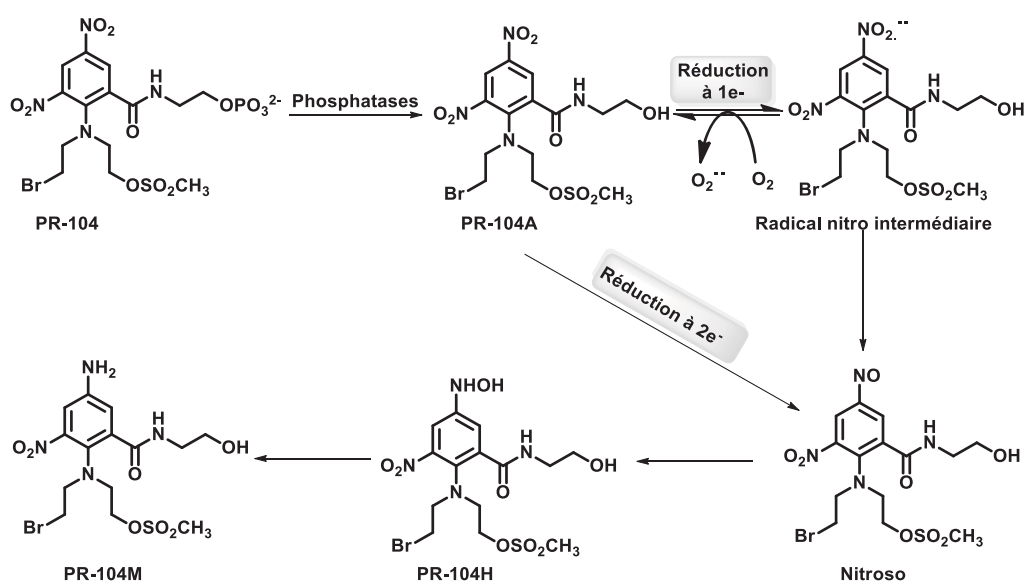


Figure 36: Bioactivation de la pré-prodrogue PTT-104 par une réduction mono- ou di-électronique (183)

Les métabolites cytotoxiques PR-104H et PR-104M forment des ponts inter-caténaires au niveau de l'ADN et sont capables de diffuser localement d'où un effet *bystander* (**238, 239**).

In vitro, l'étude de Patterson *et al.* (**240**) sur un panel de dix lignées cellulaires tumorales humaines a conclu à une sélectivité d'action du PR-104A en milieu hypoxique, traduite par un différentiel de cytotoxicité en hypoxie *versus* normoxie allant de 10 à 100, selon la lignée. Comparé à une autre HAP, la TPZ, le PR-104A a manifesté une cytotoxicité légèrement supérieure dans des conditions d'hypoxie sur la plupart des lignées cellulaires considérées. Comparé à un agent cytotoxique conventionnel non HAP, le chlorambucil, le PR-104A s'est montré 10 fois plus cytotoxique.

Compte tenu de ces résultats, la PR-104 a été transféré en clinique. Un nombre d'essais cliniques de phase I sur une variété de tumeurs a été mené sur une variété de tumeurs : des cancers solides (NCT01358227), en association avec le docétaxel ou la gemcitabine (NCT00459836), sur le cancer des poumons à petites cellules seul (NCT00544674) ou en association avec le docétaxel (NCT00862134) et sur le cancer du foie en association avec le sorafenib (NCT00862082). Les résultats n'étaient toutefois pas favorables, en termes de survie et de tolérance (notamment hématologique), d'où l'arrêt de ces études (**241**). Le développement de cette HAP semble pour l'instant stoppé, notamment en raison de sa faible tolérance.



Le KS119 et le KS119W

Le KS119 est une HAP nitroaromatique de 2^{ème} génération, développée par le laboratoire Sartorelli, de structure chimique 1,2-bis(méthylsulfonyl)-1-(2-chloroéthyl)-2-[[1-(4-nitrophényl)éthoxy]carbonyl]hydrazine. Le nitrobenzyle est le *trigger*, l'oxycarbonyle le *linker* et la 1,2-bis(méthylsulfonyl)-1-(2-chloroéthyl)hydrazine, ou « 90CE », l'entité cytotoxique libérée après une réduction monoélectronique en milieu hypoxique par la NADPH cytochrome P450 réductase, la NADH cytochrome b5 réductase et la xanthine oxydase (**Figure 37**). Cette entité alkylante a une demi-vie très courte (~30 s dans les conditions physiologiques de pH et de température et forme des ponts inter-caténaires entre les bases guanine et cytosine de l'ADN (**242**). Une telle demi-vie est associée à une faible diffusion dans les tissus sains voisins, et donc à peu d'effet *bystander*. *In vitro*, un ratio HCR égal à 5 a été observé sur des cultures de cellules malignes de la lignée EMT6 (**219**).

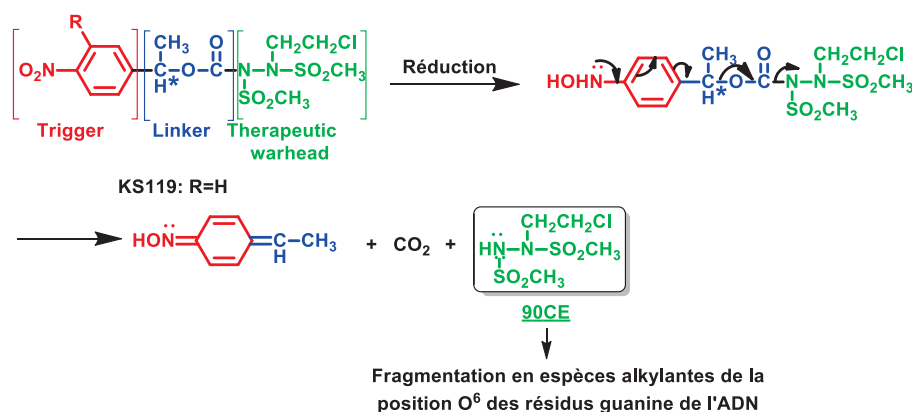


Figure 37: Structure et mécanisme de bioactivation monoélectronique de la prodrogue KS119

Notons que le KS119 émane déjà d'une stratégie d'optimisation de la structure du PNBC (1,2-bis(méthylsulfonyl)-1-(2-chloroéthyl)-2-[(4-nitrobenzyloxy)carbonyl]hydrazine), un cytotoxique alkylant dont la sélectivité d'activation en milieu hypoxique était faible (**Figure 38**). A la différence du PNBC, le KS119 possède un groupement méthyle sur le méthylène de l'espaceur, se traduisant par deux différences fondamentales de réactivité et d'activité : **(i)** une plus grande sélectivité d'activation en milieu hypoxique est atteinte, la présence du méthyle bloquant une voie secondaire d'activation non sélective connue avec le PNBC (par thiolysse *via* une SN_2 médiée par le glutathion) **(ii)** la présence du méthyle introduit un centre asymétrique dans la structure du KS119, à l'origine de deux énantiomères, mais aussi d'atropoisomères stables, pouvant être isolés, et doués de propriétés physiques et biologiques différentes (plus grande lipophilie et cytotoxicité pour la forme ouverte) (**242**).

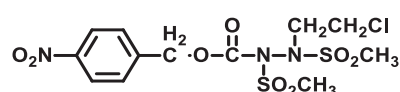


Figure 38: Structure du « PNBC » (**242**)

La faible hydrosolubilité du KS119 n'a pas permis son développement en clinique. Un analogue phosphate ($R=OPO(OH)_2$), plus hydrosoluble, le KS119W, a été ainsi développé (coefficient de partage octanol/eau ~ 151 *versus* 22,5) (**242**).

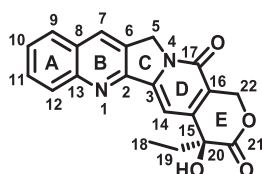
In vitro, Le KS119W a montré une cytotoxicité analogue à celle du KS119 sur la lignée cellulaire tumorale EMT6 du cancer de sein. La sélectivité d'activation en milieu hypoxique est aussi conservée, avec des différentiels de cytotoxicité en hypoxie *versus* hypoxie de l'ordre de 1000 (à une concentration de 10 μ M). *In vivo*, le KS119W s'est révélé comme un adjuvant efficace à la radiothérapie sur un modèle de tumeur EMT6 chez la souris BALB/c Rw (**243**). Le transfert de cette HAP en clinique ne semble pas avoir lieu.

6.1.5.5 NOUVELLES HAPs LIBERANT DES EFFECTEURS AUTRES QUE LES AGENTS ALKYLANTS DE L'ADN



LES DERIVES DE LA CAMPTOTHECINE

La (20S)-Camptothécine est un alcaloïde naturel isolé à partir de *Camptotheca acuminata*, inhibiteur puissant de l'ADN topoisomérase I. Son utilisation en clinique a été limitée par sa grande toxicité, sa faible hydrosolubilité et son instabilité chimique en milieu biologique avec ouverture du cycle lactone (**Figure 39**).



Camptothécine

Figure 39: Structure de la camptothécine

Afin d'y remédier, plusieurs travaux de pharmacomodulation de la camptothécine ont été réalisés. Nous pouvons citer les dérivés plus hydrosolubles et activables en milieu hypoxique conçus par Zhang *et al.* (**244**), conjuguant la camptothécine, sur la position 20, avec des gâchettes de structure indolequinone ou nitroaromatique (4-nitrobenzyle et 4-nitrofurane). Parmi l'ensemble des composés de leur série, deux composés (CPT4 et CPT6) ont montré une cytotoxicité plus faible en conditions hypoxiques *versus* normoxiques, mais avec des HCR, toutefois, faibles de 1,7 et 4,1, respectivement. La bioactivation a été démontrée pour le dérivé quinonique CPT4 (**Figure 40**).

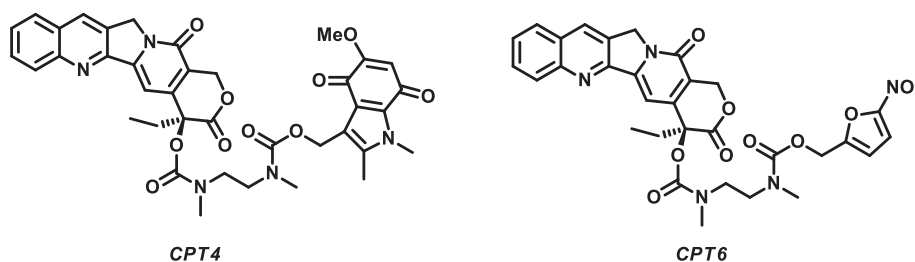


Figure 40: Le CPT4 et le CPT6, deux analogues de la camptothécine, plus hydrosolubles et activables en milieu hypoxique

Une observation récente de Bertozzi *et al.* (**245**), rapportant une diminution simultanée, sous l'action de dérivés de la camptothécine, de l'expression de HIF-1 α et de la transcription hypoxie-induite de certains gènes, renforce l'intérêt des HAPs de la camptothécine.

En 2017, les travaux récents de Jin C *et al.* (**246**) ont porté sur la conjugaison du SN-38 avec un hétérocycle 2-nitroimidazole. Le SN-38 est le métabolite actif de l'irinotécan, un anti-cancéreux puissant dérivé de la camptothécine et utilisé, entre autres, pour le traitement des tumeurs colorectales (**Figure 41**).

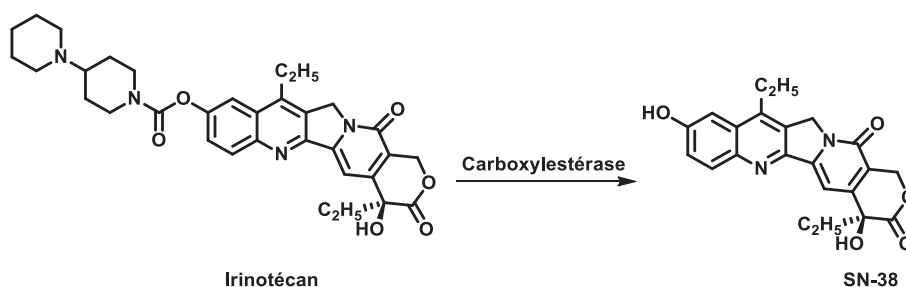


Figure 41: Métabolisme de l'irinotécan en métabolite actif, le SN-38

Deux prodrogues variant par la nature du *linker*, de type éther ou bis(carbamate) ont été évaluées en termes de bioréduction par les CYP450 microsomaux et de cytotoxicité en hypoxie *versus* normoxie sur deux lignées cellulaires tumorales (HT29 et H460, à forte expression de la DT-diaphorase). La libération de SN-38 n'est que partielle (environ 20%) pour ces deux prodrogues et les HCR obtenus sont faibles pour les deux lignées (de l'ordre de 4 pour la meilleure prodrogue IOS, à savoir celle de type éther) (**Figure 42**).

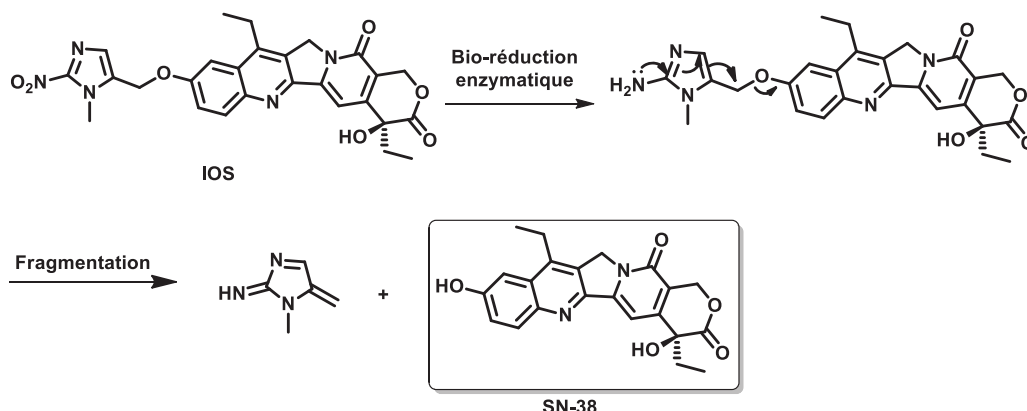


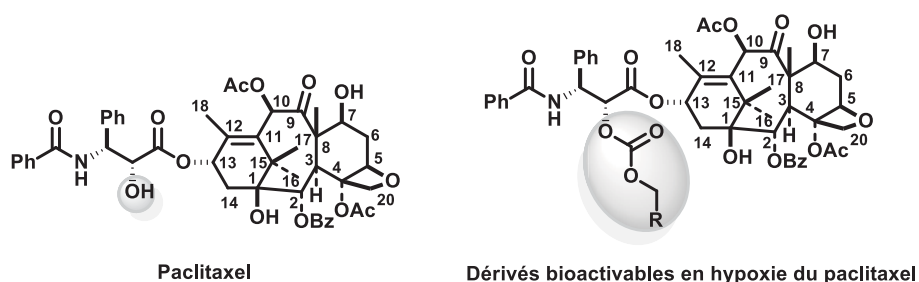
Figure 42: Mécanisme de bioactivation de la prodrogue « IOS » pour donner le SN-38



LES DERIVES DU PACLITAXEL

Le paclitaxel est un anti-cancéreux d'origine naturelle extrait à partir de *Taxus brevifolia*, agissant par inhibition du fuseau mitotique. Tout comme la camptothécine, son utilisation en thérapeutique s'est toujours confrontée à un défi de formulation, en rapport avec une très pauvre hydrosolubilité, mais aussi à une toxicité dose-limitante.

L'application du concept d'activation sélective en milieu hypoxique, par le développement de prodrogues du paclitaxel, pourrait représenter une approche intéressante pour réduire sa toxicité et améliorer son index thérapeutique. Précisément, l'alcool sur la position C20, nécessaire pour que le paclitaxel exerce son activité antimitotique, devrait être transitoirement inactivé au sein de la prodrogue. Ceci a fait l'objet des travaux de Damen *et al.* (247) qui ont conjugué cet alcool, *via* une fonction carbonate, à un trigger de type nitro- ou azido-aromatique (Figure 43). Toutefois, aucune évaluation de la bioréduction de ces composés et de leur cytotoxicité en hypoxie n'a été rapportée, la majorité d'entre eux n'étant en fait pas des prodrogues car dotées de cytotoxicités en normoxie équivalentes à celles du paclitaxel (un mécanisme de libération secondaire semble impliqué).



Paclitaxel

Dérivés bioactivables en hypoxie du paclitaxel

Figure 43: Prodrogues activables en hypoxie du paclitaxel

Plus récemment, Jin C *et al.* (248) ont pu aboutir à des prodrogues du SN-38 et du paclitaxel stables dans le plasma humain et bioactivables rapidement sous l'action de la nitroréductase. Conjugués à un 2-nitromidazole sur la position N-1 *via* une fonction carbonate, ils ont montré une sélectivité d'action intéressante en milieu hypoxique *in vitro*.

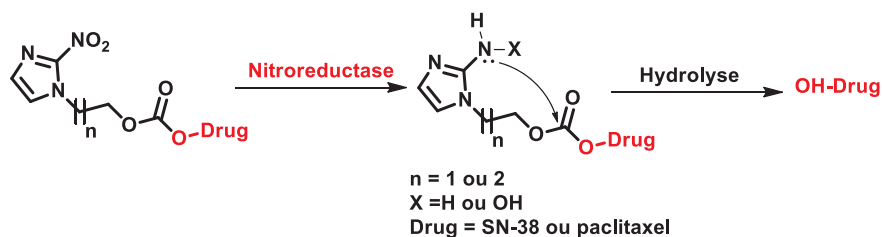


Figure 44: Conception de prodrogues activables en hypoxie dérivés du SN-38 et du paclitaxel (248)



HAPS LIBÉRANT DES AGENTS DE THÉRAPIE CIBLÉE

La large majorité des HAPs développées à ce jour libèrent des effecteurs qui créent des dommages irréversibles au niveau de l'ADN, de type ponts intra- ou inter-caténaux, cassures simples ou double-brins, poisons du fuseau, etc. Le TH-4000, ou bromure de tarloxotinib, représente un changement réel de stratégie car il s'agit de la première HAP libérant un agent de thérapie ciblée, le TH-4000E qui est un inhibiteur irréversible du récepteur EGFR à activité TK. La libération du tarloxotinib se fait par réduction monoélectronique dans les zones hypoxiques de la tumeur, d'où une meilleure sélectivité et une moindre toxicité, comparée aux inhibiteurs actuels du EGFR tels que l'erlotinib (**Figure 45**).

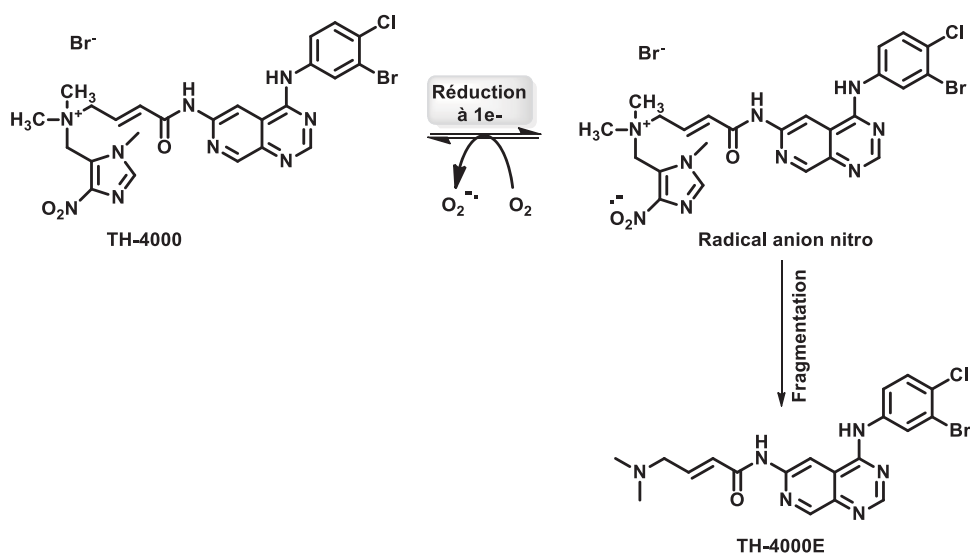
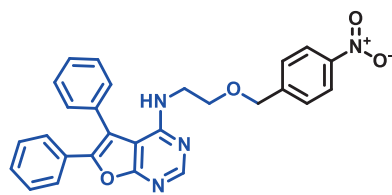


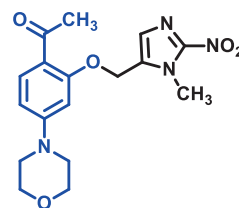
Figure 45: Bioactivation du TH-4000 par une réduction mono-électronique (183)

Des études pré-cliniques ont montré que le TH-4000 est plus actif que l'erlotinib sur des xénogreffes de cellules de cancer des poumons non à petites cellules, présentant ou non des mutations d'EGFR (**249**). Des phases cliniques II pour le traitement de cette même tumeur chez des patients présentant une mutation du récepteur EGFR (T790M-négative) (NCT02454842), ainsi que pour le traitement du carcinome épidermoïde métastatique de la tête et du cou ou de la peau (NCT02449681) ont été réalisées mais toutes deux arrêtées pour manque d'efficacité.

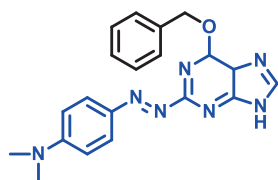
Enfin, d'autres HAPs libérant des agents de thérapie ciblée sont actuellement au stade des investigations pré-cliniques, tels que le CH-01 qui libère un inhibiteur de la voie de réponse aux dommages de l'ADN, Chk1/Aurora A, le BCCA621C qui libère une protéine kinase ADN-dépendante, etc (**250-252**) (**Figure 46**).



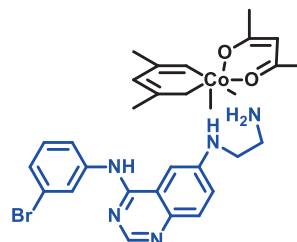
HAP libérant le CH-01, un inhibiteur de la Chk1/Aurora A



BCCA621C: une HAP libérant une protéine kinase ADN-dépendante



HAP libérant un inhibiteur de la O⁶-alkylguanine alkyltransférase



HAP libérant un inhibiteur de EGFR

Figure 46: Exemples de HAPs libérant, après bioactivation en milieu hypoxique, des agents de thérapie ciblée

6.2 CIBLAGE DU STROMA TUMORAL DU CHONDROSARCOME

6.2.1 DEFINITION ET COMPOSITION DU STROMA TUMORAL

Le microenvironnement tumoral, ou stroma tumoral, est un tissu de soutien composé de plusieurs types cellulaires : les cellules tumorales, les cellules du réseau vasculaire (cellules endothéliales, péricytes, fibroblastes) et les cellules du système immunitaire (lymphocytes, macrophages, mastocytes, cellules dendritiques, etc). Un ensemble de facteurs de croissance et de facteurs angiogéniques, tels que VEGF, y est aussi piégé. Ces cellules et facteurs sont immergés dans une MEC hautement dynamique et fonctionnelle, à structure tridimensionnelle, faite de macromolécules sécrétées par les cellules du stroma tumoral (**Figure 47**) (253-255).

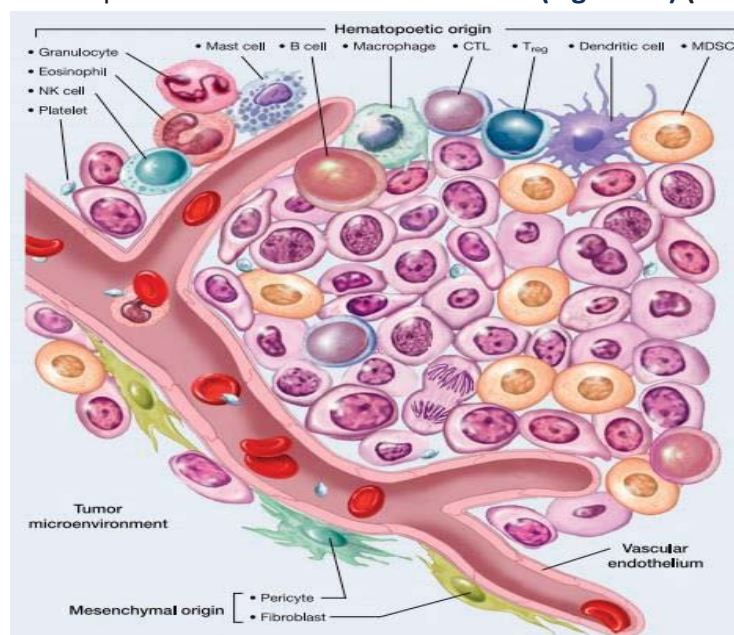


Figure 47: Représentation schématique de la composition du stroma tumoral (256)
[NK cell: Natural Killer cell, MDSCs: Myeloid-derived-suppressor cells, CTL: Cytotoxic T cells]

Le stroma tumoral détermine en partie le phénotype tumoral, en termes d'invasion et de métastases. Ses différentes composantes pourraient constituer, de ce fait, des cibles spécifiques et pertinentes pour le développement de nouvelles thérapeutiques anti-cancéreuses, moins toxiques (253).

6.2.2 LA MATRICE EXTRACELLULAIRE DU STROMA TUMORAL DU CHONDROSARCOME : UN FOCUS SUR LES PROTEOGLYCANES

La MEC fournit le volume, la forme et la force aux membranes basales et à de nombreux tissus physiologiques, tels que l'os et le cartilage. Bien au-delà de ce simple rôle de soutien mécanique et structural, elle intervient dans le développement des tissus et offre une matrice spatiale pour les événements de signalisation cellulaire, par le biais de différents récepteurs de facteurs de croissance et de molécules d'adhésion, telles que les intégrines.

Le rôle de la MEC dans l'oncogenèse a été largement documenté. En effet, les métastases surviennent lorsque les cellules tumorales acquièrent une capacité à dégrader l'architecture du tissu normal et migrent en dehors des espaces interstitiels après avoir franchi les limites de la MEC dans laquelle elles baignent (255).

Concernant le tissu cartilagineux sain comme tumoral, cette MEC, de nature chondrogénique, est élaborée par les chondrocytes et est essentiellement composée, comme précédemment décrit, de collagène et d'un réseau de PGs (Figure 48). Ces derniers, de par leur forte densité de charge négative, sont des cibles potentielles intéressantes pour une stratégie de type "*targeted drug delivery*" basée sur l'utilisation d'un vecteur établissant une liaison préférentielle, de nature électrostatique, avec les groupements chargés négativement exhibés à leur surface.

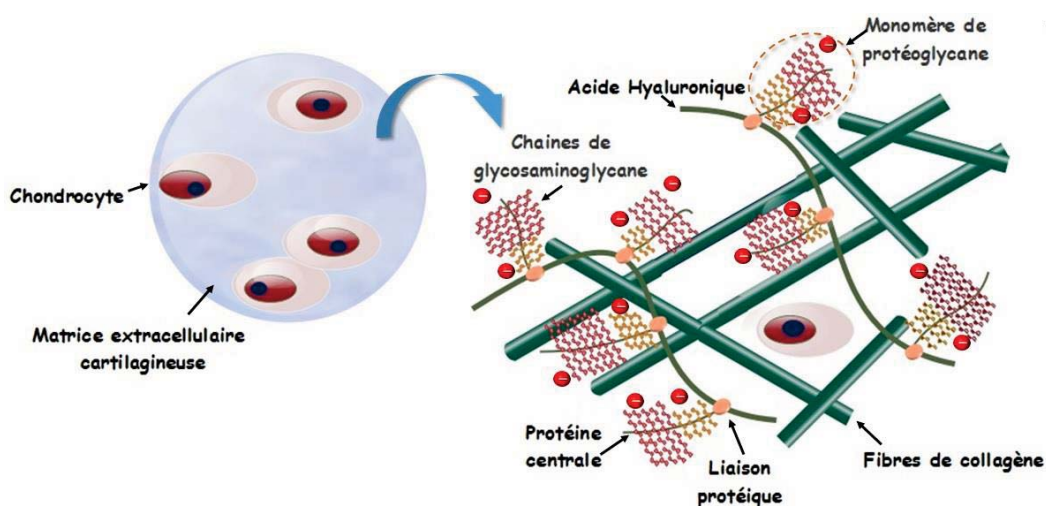


Figure 48: Représentation schématique de la structure tridimensionnelle de la MEC cartilagineuse, formée de chondrocytes, de fibres de collagènes et de PGs

6.2.2.1 STRUCTURE (255)

Les PGs sont des glycoprotéines ubiquitaires, trouvées dans la plupart des tissus mammifères, composées d'un noyau protéique spécifique sur lequel sont greffées, par une liaison covalente, une ou plusieurs chaînes de GAGs. Le nombre de chaînes greffées sur la protéine centrale est

déterminé par le nombre de sites d'attachement présents sur la protéine centrale, marqués par le motif dipeptidique Ser-Gly.

Les GAGs sont des macromolécules glucidiques, longtemps désignées sous le terme de « mucopolysaccharides acides » en raison de leur forte capacité de rétention de l'eau (muco), de leur nature glucidique (polysaccharides) et de leur caractère acide provenant de leurs multiples fonctions acides faibles chargées négativement à pH physiologique. Il s'agit de polysaccharides linéaires, de longueur variable, dont l'unité élémentaire est un disaccharide anionique possédant des fonctions sulfate et carboxylate, et contenant toujours une hexosamine (glucosamine ou galactosamine) et un autre ose (acide glucuronique, acide iduronique, galactose). Un motif trisaccharidique formé de deux molécules de galactose et d'une molécule de xylose assure la liaison du polymère polysaccharidique à la protéine centrale (**Figure 49**).

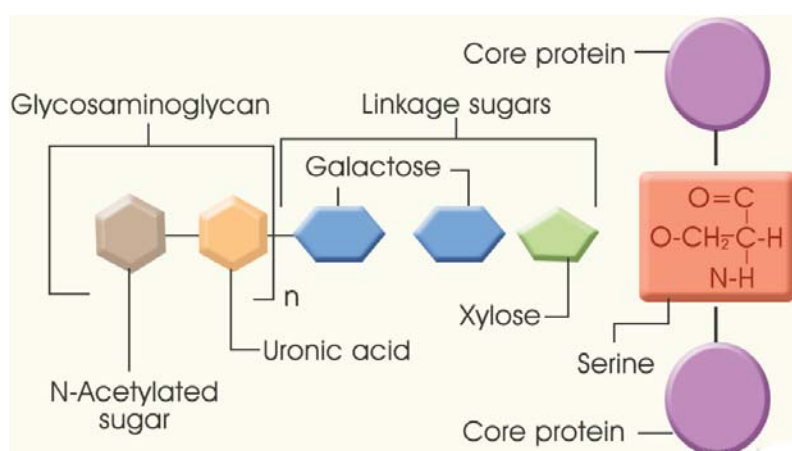


Figure 49: Représentation schématique de la structure d'un monomère de PG

Les principaux GAGs présents dans la MEC sont l'acide hyaluronique, le chondroïtine-sulfate, le dermatane-sulfate, l'héparane-sulfate et le kératane-sulfate, se distinguant par la nature de l'unité élémentaire disaccharidique (**Figure 50**). Celle-ci est constituée :

- d'acide β -D-glucuronique (GlcUA) ou L-iduronique (L-idUA) et d'une N-acétyl- ou N-sulfate-D-glucosamine, sulfatés en 2-O et 6-O pour les héparanes sulfates ;
- d'acide β -D-glucuronique (GlcUA) et une N-acétyl-D-galactosamine (GalNAc), pour les chondroïtines sulfates. Les sulfatations concernent soit l'alcool secondaire du C4 (chondroïtine 4-sulfates), soit l'alcool primaire du C6 (chondroïtine 6-sulfates) de la GalNAc.
- d'acide L-iduronique (L-idUA) et une N-acétyl-D-galactosamine (GalNAc), sulfatée en C4, pour le dermatane sulfate.
- de β -D-Galactose (Gal) et une N-acétyl-D-glucosamine (GluNAc) sulfatée en C6, pour le kératane sulfate.

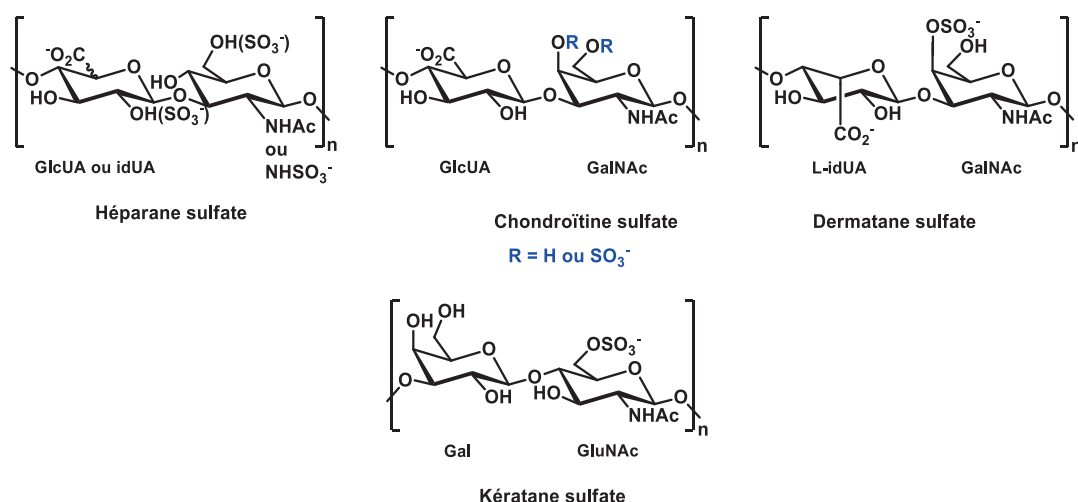


Figure 50: Structure de l'entité disaccharidique des GAGs de type héparane sulfate, chondroïtine sulfate, dermatane sulfate et kératane sulfate

L'acide hyaluronique, quant à lui, est un polymère d'une entité disaccharidique composée d'acide D-glucuronique et de D-N-acétylglucosamine, sans groupements sulfates. Il ne se lie pas à une protéine centrale et ne forme pas un monomère de PGs. En revanche, les agrégats de PGs correspondent à une molécule d'acide hyaluronique sur laquelle se lient de multiples PGs. Cette architecture leur confère une complexité structurale et fonctionnelle assez élevée.

Les GAGs forment de longues chaînes anioniques qui attirent, grâce aux résidus sulfate et carboxylate, les cations dont notamment le potassium, le calcium ou le sodium et repousse les anions, conduisant à une augmentation de l'osmolarité au niveau de la MEC, et donc à un effet Donnan. Ceci explique la forte teneur en eau du cartilage articulaire, par exemple. Ces charges négatives sont aussi largement responsables d'attractions électrostatiques avec certaines protéines tels que des facteurs de croissance, des cytokines, des lipoprotéines, et de l'établissement de liaisons hydrogène et d'interactions de van der Waals.

6.2.2.2 CLASSIFICATION (257, 258)

Actuellement, plus de 40 PGs ont été découverts. Selon leur localisation, ils sont classés en quatre familles principales, elles-mêmes subdivisées en sous-familles en fonction de l'homologie génétique et protéique, la taille moléculaire, la composition de leurs sous-unités di-saccharidiques et la nature de leur protéine centrale. On distingue :

- les PGs intracellulaires, avec la seryglycine ;
- les PGs de surface, comme : le syndécane, le glypicane, ... ;
- les PGs péricellulaires avec le perlicane, l'agrine, les collagènes XVIII et XV ;
- les PGs extracellulaires ou matricielles.

Les PGs à héparanes sulfates (PGHS) sont activement sécrétées dans la MEC au niveau péricellulaire (incluant le perlicane et l'agrine), ou sont présents à la surface cellulaire (syndécane et glypicane). Les PGHS se lient à la plupart des protéines de structure dans la MEC *via* des interactions protéine-protéine ou des interactions HS-protéine (255).

A l'opposition des PGHS, les PGs chondroïtine sulfate (PGCS) sont largement présentes au niveau extracellulaire, avec des agrégats de grande taille sécrétés directement dans la MEC (aggrécane, versicane, brevicane...), ou encore de petits PGs riches en leucine (SLRPs : biglycane, lumican...). Les PGCS se lient à différentes composantes de la MEC, dont ils régulent les fonctions, comme certains facteurs de croissance.

6.2.2.3 FONCTIONS

Les PGs sont des constituants majeurs de la MEC ainsi que des surfaces cellulaires, exerçant de nombreuses fonctions biologiques. Ils sont responsables du maintien de la turgescence tissulaire dans les matrices interstitielles et se comportent comme des tamis moléculaires dans les membranes basales **(257)**.

Outre ce rôle mécanique et structurel, les PGs sont impliqués dans le maintien de l'homéostasie et la différenciation tissulaires et dans les événements de signalisation cellulaire. Ils interagissent, en effet, avec des facteurs de croissance et des cytokines, *via* la création de gradients de concentration dans la MEC et contrôlent ainsi leur activité en les protégeant de la dégradation. Les PGs interagissent également avec la plupart des protéines présentes dans la MEC, notamment par le biais de leurs chaînes GAGs, mais aussi de leurs noyaux protéiques, modulant ainsi leurs activités **(254)**.

Une implication dans le processus tumoral leur est a été également attribué depuis déjà 50 ans. Il s'agit, en effet, d'acteurs clefs dans l'oncogenèse et l'angiogenèse grâce à leur capacité à interagir avec les ligands et récepteurs qui régulent ces phénomènes **(259, 260)**. Ainsi, le perlicane joue un rôle dans la régulation des signaux de prolifération et de migration cellulaires en réponse à des facteurs de croissance. Les HS contribuent aussi à la progression tumorale, comme ceci a été démontré dans le cas de plusieurs tumeurs. Dans le cancer du foie et du colon, par exemple, la progression de la tumeur est accompagnée par des changements quantitatifs et qualitatifs (composition) des GAGs du foie **(257)**, et une expression diminuée du syndécane et du glypicane, respectivement **(261)**. Le changement du taux des PGs, leur dénaturation ou dégradation, conduisent probablement à une altération des propriétés mécaniques et structurelles de la MEC. Il s'en suit une perturbation de divers mécanismes comme la prolifération, la signalisation cellulaire, la croissance et la survie cellulaires, la migration, l'invasion et l'angiogenèse impliqués dans la croissance tumorale. Les PGs du microenvironnement tumoral sont également reconnus comme des acteurs clefs dans le processus tumoral dans le cas du cancer du sein, offrant ainsi une piste potentielle pour le ciblage thérapeutique **(254)**.

En ce qui concerne le CHS, Oegema *et al.* **(262)** ont déjà suggéré, il y a plus de 30 ans, l'importance des PGs dans la croissance de la tumeur. En traitant le CHS chez des rats Swarm par un analogue de l'acide rétinoïque (Ro 11-1430), une régression significative du volume tumoral a été observée, accompagnée par une perte de PGs de la MEC, une diminution de l'absorption des sulfates et de la glucosamine, la production de PGs altérés et une augmentation de la minéralisation du tissu. Les auteurs postulaient que la diminution de la teneur en PGs était un moyen pour diminuer l'accessibilité des facteurs de croissance et augmenter l'infiltration de la tumeur par des cellules du système immunitaire.

6.2.2.4 LES PROTEOGLYCANES DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE CARTILAGINEUSE

Les GAGs constitutifs des PGs du cartilage articulaire sont essentiellement de trois types : l'acide hyaluronique, les sulfates de kératane et de chondroïtine (types 4 et 6). L'assemblage des sulfates de kératane et de chondroïtine, respectivement ≈ 60 et ≈ 100 unités, avec une protéine centrale forme l'aggrécane, le PG matriciel le plus abondant du cartilage hyalin articulaire. En s'agréant, *via* des liaisons protéiques, avec l'acide hyaluronique, elle forme des complexes supramoléculaires d'un poids moléculaire supérieur à 200 MDa (263) (Figure 51).

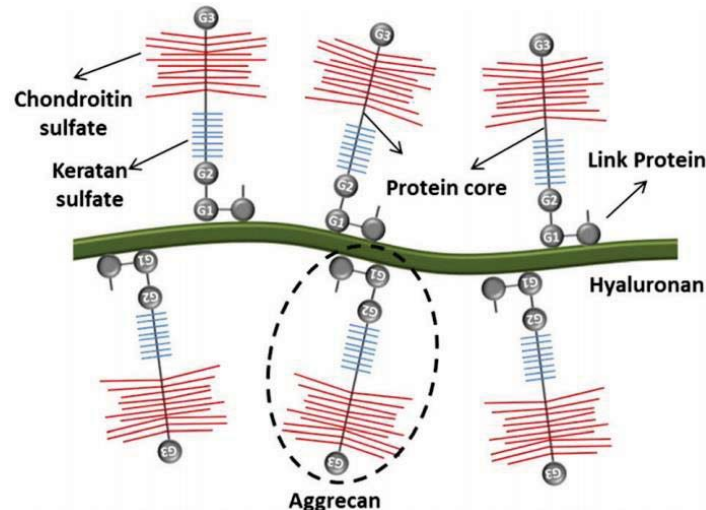


Figure 51: Représentation schématique de l'aggrécane (264)

[Les chondroïtines sulfate et les kératanes sulfate se lient à une protéine centrale entre ses domaines globulaires G2 et G3, formant le monomère d'aggrécane. Celui-ci interagit avec l'acide hyaluronique par des liaisons protéiques pour former le polymère d'aggrécane].

L'aggrécane occupe l'espace inter-fibrillaire de la MEC du cartilage et confère à ce dernier ses propriétés osmotiques et de résilience, c'est-à-dire sa résistance aux forces de compression, comme des amortisseurs hydrauliques. Tout comme les autres PGs, les charges négatives des fonctions sulfate et carboxylate exhibées à la surface génèrent un effet Donnan, d'où une forte hydratation de l'aggrécane, responsable de l'aspect gel de la MEC. D'autre part, la répulsion électrostatique résultante maintient l'intégrité du cartilage, c'est-à-dire son élasticité et sa résistance à la compression (265, 266). Compte tenu de ce rôle important, son altération se trouve impliquée dans la physiopathologie d'atteintes ostéoarticulaires, tels que l'ostéoarthrite (263, 264).

Outre l'aggrécane, d'autres PGs de taille plus petite, comme le versicane, la perlicane, la décorine, le biglycane ou la fibromoduline sont aussi présentes dans le cartilage articulaire. Tous ces PGs sont produits par les chondrocytes et sécrétés dans la MEC. Le perlicane est le PGHS majoritairement retrouvé dans la structure de la capsule entourant les chondrocytes, et se lie à plusieurs facteurs de croissance, y compris les FGFs et les VEGFs (267).

OBJECTIFS

L'unité de recherche UMR 1240 INSERM/UCA développe depuis plusieurs années une stratégie de vectorisation vers les PGs de la MEC, moyennant une fonction ammonium quaternaire (AQ). Celle-ci, porteuse d'une charge positive, est attirée par les charges négatives des groupes sulfate et carboxylate des PGs et s'accumule donc au niveau des structures cartilagineuses par établissement de liaisons ioniques.

Cette stratégie d'adressage actif utilisant la fonction AQ comme agent de vectorisation de principes actifs vers le cartilage a fait l'objet d'un brevet mondial déposé par Madelmont JC *et al.* (WO 2001000621 A1) **(268)**, dont l'objet était de proposer un management ciblé, tant diagnostique que thérapeutique, des pathologies dégénératives et tumorales du cartilage.

Concernant l'application diagnostique, notre unité a validé les potentialités du radiotracer ^{99m}Tc -NTP15-5 (*N*-[triéthylammonium]-3-propyl-1,4,7,10,13-pentaazacyclopentadécane radiomarqué au ^{99m}Tc) pour le diagnostic *in vivo* et le suivi du CHS par scintigraphie **(269-271)**. Ce radiotracer est actuellement transféré en clinique pour une première évaluation chez l'homme.

La preuve du concept a également été apportée pour de nombreuses molécules thérapeutiques, tels que des anti-inflammatoires, des chondroprotecteurs pour l'arthrite et l'arthrose **(272-274)** et des anticancéreux pour le CHS **(275-277)**. Concernant cette dernière application, la conjugaison de la fonction AQ avec le Melphalan (Mel), un agent alkylant de l'ADN a donné des résultats prometteurs sur des modèles précliniques *in vitro* et *in vivo* **(278)**. D'abord, l'affinité du Mel conjugué (Mel-AQ) pour l'aggrécane de la MEC du cartilage a été démontrée *in vitro* par la technique de résonance plasmonique de surface (*Surface Plasmonic Surface, SPR*), avec une constante de dissociation K_D dans la gamme du millimolaire ($2,25 \pm 0,92$ mM), alors que dans les mêmes conditions le Mel non conjugué ne présentait aucune interaction. *In vivo*, les biodistributions du Mel et du Mel-AQ, radiomarqués au tritium, ont été étudiées sur un modèle de rat SWARM de CHS de grade 2. L'autoradiographie quantitative sur animal entier a montré une accumulation rapide de la radioactivité dans les tissus cartilagineux pour le Mel-AQ, mais pas pour le Mel **(Figure 52)**.

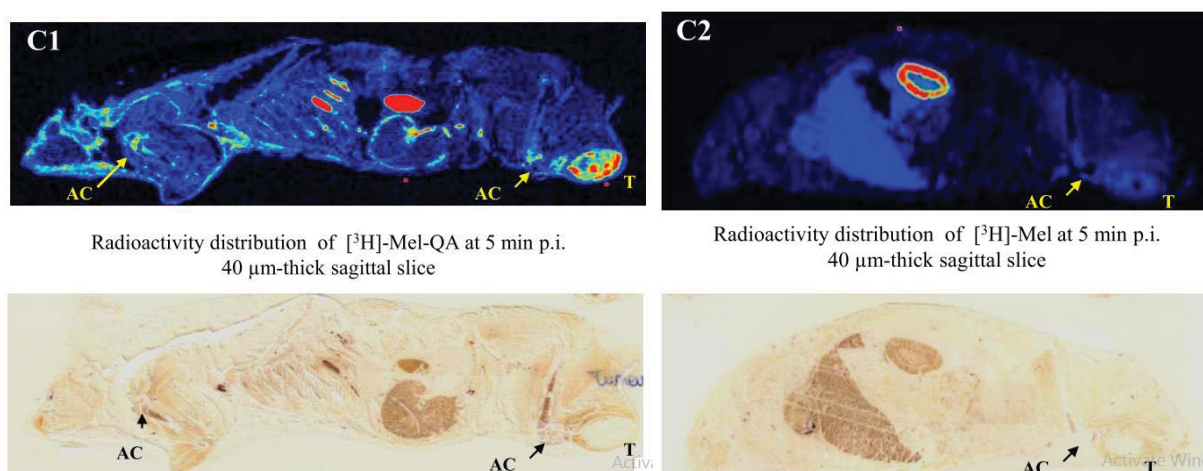


Figure 52: Biodistribution de la radioactivité du $[^3\text{H}]$ -Mel-AQ et du $[^3\text{H}]$ -Mel (279)

Concernant l'amélioration de l'index thérapeutique du Mel par cette approche de conjugaison avec une fonction AQ, la toxicité hématologique ainsi que la chute du poids de l'animal après

traitement sont moins importantes, comparativement avec le Mel non conjugué. L'approche de conjugaison améliore donc significativement l'index thérapeutique, vraisemblablement par une biodistribution plus ciblée de l'agent cytotoxique. Enfin, l'évaluation du volume tumoral, la scintigraphie *in vivo* des PGs (utilisant le radiotracer ^{99m}Tc -NTP 15-5), la spectroscopie RMN ^1H -HRMAS et les analyses histologiques de biopsies, ont apporté la confirmation que la conjugaison d'une fonction d'AQ au Mel n'affecte pas son action cytotoxique *in vivo*.

Dans la continuité de ces travaux, l'unité UMR 1240 INSERM/UCA a envisagé d'étendre l'approche de ciblage des PGs de la MEC du CHS vers une stratégie de ciblage bispécifique. En effet, l'hypoxie sévère du microenvironnement tumoral du CHS laisse à penser qu'une prodrogue activable en milieu hypoxique serait potentiellement bénéfique, mais devrait d'abord atteindre physiquement les chondrocytes tumoraux dispersés dans la MEC cartilagineuse dense. Une HAP conjuguée à une fonction AQ pourrait donc permettre, théoriquement, d'améliorer l'acheminement de la prodrogue vers le tissu cartilagineux, suivi par sa bioactivation et libération de l'agent cytotoxique sélectivement dans les régions hypoxiques de la tumeur.

Expérimentalement, la preuve du concept d'une telle approche a pu déjà être apportée dans le cadre de travaux antérieurs, où une HAP nommée **ICF05016**, conçue comme illustré dans la **Figure 53**, a été évaluée quant à son affinité pour l'aggrécane (exprimée par le K_D) et son différentiel de cytotoxicité en hypoxie *versus* normoxie (HCR, *Hypoxia Cytotoxicity Ratio*) sur une lignée cellulaire de CHS humain (HEMC-SS).

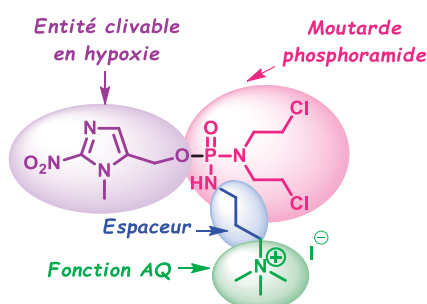


Figure 53: Conception structurale de la prodrogue ICF05016

Parallèlement, deux autres composés ont été synthétisés et évalués, toujours en termes du K_D et de HCR, afin de pouvoir valider l'approche du ciblage bispécifique (**Figure 54**):

- Un dérivé nitroimidazole, donc clivable en hypoxie, non vectorisé **ICF05014** ;
- Un dérivé benzyle, donc non clivable en hypoxie, vectorisé **ICF05017**.

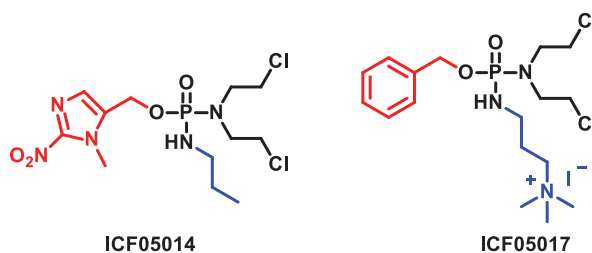


Figure 54: Structures des composés clivable non vectorisé ICF05014 et non clivable vectorisé ICF05017

La libération contrôlée de la prodrogue **ICF05016** a été validée lors d'une analyse par résonance magnétique nucléaire (RMN) du phosphore, qui a montré une libération rapide de l'entité alkylante en condition réductrice ($t_{1/2} = 3$ min *versus* > 24h dans le standard). La forte affinité *vis à vis* de l'aggrécane a été validée par SPR pour les dérivés vectorisés **ICF05016** et **ICF05017**, alors qu'elle est absente pour le dérivé non vectorisé **ICF05014**.

L'étude de l'activité cytotoxique en normoxie *versus* hypoxie sévère sur cultures 2D et 3D HEMC-SS a révélé des activités cytotoxiques intéressantes pour les composés **ICF05014** et **ICF05016**, avec des HCR de 7,5 et 6,8 en 2D et 17,4 et 3,1 en hypoxie, respectivement.

In vivo, l'évaluation sur un modèle de xénogreffe de cellules tumorales de la lignée cellulaire de CHS humain extra-squelettique myxoïde HEMC-SS chez la souris SCID, a montré une inhibition significative de la croissance tumorale égale à 62% à J₂₅ après arrêt du traitement. On peut noter une bonne tolérance du traitement : une moindre toxicité hématologique et absence d'altération du cartilage sain. En revanche, aucune activité n'a été observée pour les deux équivalents non vectorisés **ICF05014** et non clivable **ICF05017**, prouvant ainsi l'intérêt de notre stratégie de ciblage bispécifique (**Figure 55**).

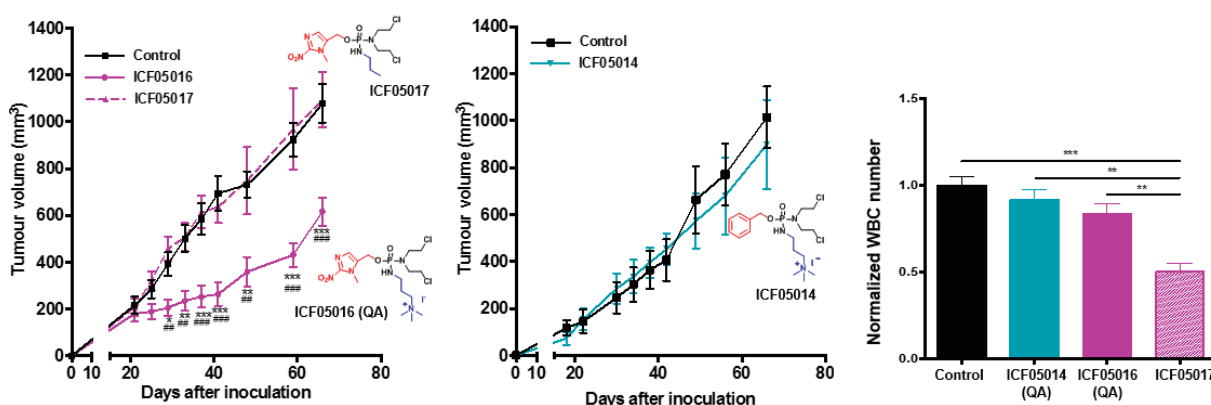


Figure 55: Evaluation *in vivo* de l'efficacité anti-tumorale et de la toxicité des trois composés **ICF05014**, **ICF05016** et **ICF05017**

En conclusion, il est nécessaire de combiner les deux approches de conjugaison à un AQ et d'activation en milieu hypoxique pour observer une action cytotoxique *in vivo*.

S'appuyant sur les résultats intéressants obtenus avec ce « lead » **ICF05016**, nous nous sommes proposés d'optimiser sa structure *via* une étude de pharmacomodulation, en vue d'élucider les relations structure-activité au sein de cette famille et d'aboutir éventuellement, à de nouveaux dérivés présentant un meilleur profil d'efficacité (un échappement tumoral a été observé après arrêt du traitement par **ICF05016**) et de sécurité.

Les quatre entités constitutives du composé tête de série sont sujet à une pharmacomodulation : l'agent cytotoxique, l'espaceur, l'AQ et l'entité clivable en milieu hypoxique. Dans ce travail de thèse, les trois premières entités constitutives de la prodrogue feront l'objet de nos travaux de pharmacomodulation (**Figure 56**).

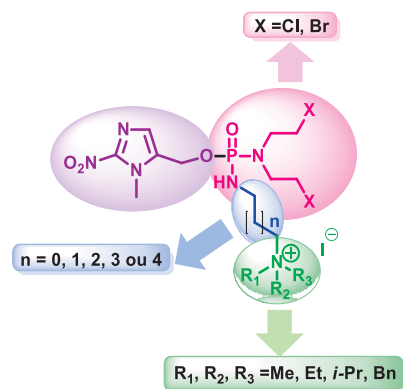


Figure 56: Axes de pharmacomodulation du composé lead ICF05016

La partie résultats et discussion s'articulera donc comme suit :

- **Une 1^{ère} partie : modification de la nature de la fonction ammonium quaternaire** (triméthylammonium, triéthylammonium, etc...), et **de la longueur du bras espaceur** ;
- **Une 2^{ème} partie : modification de la moutarde phosphoramidate** (isophosphoramidate et dérivés bromés).

La pertinence de ces prodrogues sera évaluée en termes d'affinité pour les PGs par SPR puis *in vitro* en termes de cytotoxicité.

Ces travaux de doctorat ont été subdivisés en diverses tâches, organisées entre l'UMR1240 INSERM/UCA en France et l'Université de Monastir en Tunisie.

RESULTATS ET DISCUSSION

1 PHARMACOMODULATION DU VECTEUR (AQ ET BRAS ESPACEUR)

1.1 SCHEMA GENERAL DE SYNTHESE

L'objectif de ce 1^{er} chapitre consiste à préparer des analogues du composé **ICF05016**, issus de la pharmacomodulation de la partie « vecteur ». Les modifications structurales entreprises en vue d'optimiser l'activité de ce « lead » portent sur la longueur de la chaîne du vecteur, ainsi que sur la nature de l'AQ lui-même, c'est-à-dire les substituants sur l'atome d'azote. Pour ceci, une séquence réactionnelle commune, s'alignant sur celle utilisée pour la synthèse du « lead », a été adoptée (**Figure 57**).

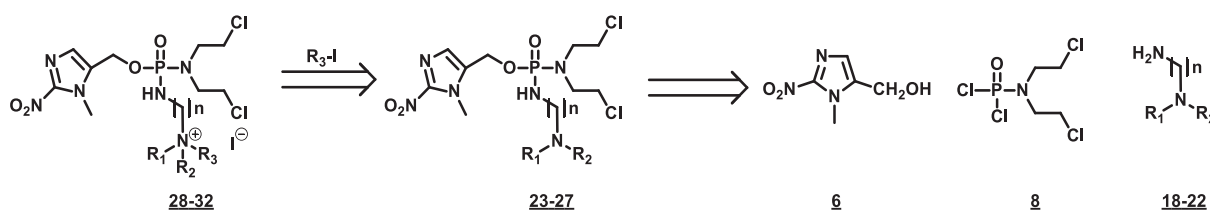


Figure 57: Rétrosynthèse des composés **28-32 analogues du « lead » **ICF05016****

Pour rappel, la fonction AQ sera introduite en dernière étape. Egalement, trois précurseurs des moutardes phosphorodiamidates **23-27** devront être préparées : l'alcool 2-nitroimidazole **6**, le dichlorure de l'acide *N,N*-bis(2-chloroéthyl)phosphoramidique **8** et une série de diamines *N,N*-disubstituées **18-22**.

1.2 SYNTHESE DES PRECURSEURS

1.2.1 SYNTHESE DE L'ALCOOL 2-NITROIMIDAZOLE **6**

Contrairement aux autres structures nitro(hétéro)aromatiques bioactivables en hypoxie, comme le 4-nitrobenzyle, le 2-nitrofurane et le 2-nitrothiophène, pour lesquelles des précurseurs fonctionnalisés tels que le 4-nitrobenzaldéhyde, le 5-nitrofuran-2-carbaldéhyde et le 5-nitrothiophène-2-carbaldéhyde sont accessibles dans le commerce, aucun précurseur direct du 5-hydroxyméthyl-1-*N*-méthyl-2-nitro-1*H*-imidazole (**6**) n'est disponible.

L'essor des HAPs utilisant un squelette 2-nitroimidazole comme entité bioréductible en milieu hypoxique a nécessité la mise au point de protocoles de synthèse standardisés, robustes et de rendements élevés, ce qui n'était pas le cas des premiers protocoles. Revenons sur les synthèses publiées donnant accès à la structure 2-nitroimidazole.

La structure 2-nitroimidazole peut être obtenue par diazotation de la structure 2-aminoimidazole correspondante. Cette dernière peut être obtenue par la synthèse de Marckwald décrite pour la première fois en 1892 et qui consiste en la condensation d'un chlorhydrate d' α -aminoaldéhyde (ou cétone) ou d' α -amino- β -cétoester soit avec un cyanate ou un thiocyanate, pour conduire aux imidazoles non-fonctionnalisés en *N*-1, *N*-3 (**280**), soit avec un iso(thio)cyanate d'alkyle ou d'aryle permettant d'obtenir un imidazole *N*-substitué (**281**) (**Figure 58**).

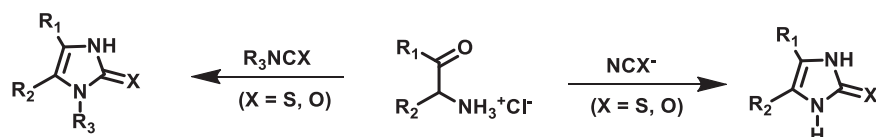


Figure 58: Préparation de synthons 2-aminoimidazoles selon la méthode de Marckwald, au départ d'un α -aminoaldéhyde ou d'une α -aminocétone (280)

Des α -amino-acétals ou cétals ont été ensuite utilisés comme substrat α -aminocarbonylé de départ et peuvent être couplés avec des dérivés de type cyanamide, thioxamate, carbodiimide ou ester imidique (281). L'utilisation de cyanamide permet d'obtenir la structure 2-aminoimidazole. A titre d'exemple, dans le protocole de synthèse d'un 2-amino-1-méthyl-1*H*-imidazole, publié par Cavalleri *et al.* (282), l'ester éthylique de la *N*-méthyl- β,β -diéthoxyalanine, un α -aminoacétal, est condensé avec le cyanamide en milieu acide (Figure 59).

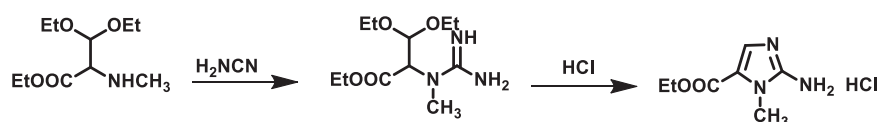


Figure 59: Synthèse d'un 2-aminoimidazole *N*-substitué au départ d'un α -aminoacétal (282)

La méthode de Marckwald pour obtenir un dérivé 2-amino-1-méthyl-1*H*-imidazole a ensuite été adaptée dans une procédure brevetée en 2007 par la société Threshold Pharmaceuticals et plus précisément par Matteuci *et al.*, à l'origine du développement de l'evofosfamide (WO 2007002931 A2, 2007) (283). La réaction est réalisée au départ de l'ester méthylique de la sarcosine qui est d'abord *N*-formylé par un traitement avec le formiate d'éthyle dans l'éthanol en présence d'une base, le carbonate de potassium. Le dérivé *N*-formylé obtenu subit ensuite une *C*-formylation par l'action d'une base forte, l'hydruure de sodium (NaH), en présence du formiate d'éthyle. La fonction amine est déprotégée en présence d'acide chlorhydrique concentré avant de réagir avec le cyanamide pour conduire au dérivé 2-amino-1-méthyl-1*H*-imidazole fonctionnalisé en 5 par un ester méthylique (Figure 60, voie A).

Ce mode opératoire présente, toutefois, l'inconvénient de produire l'ester 2-aminoimidazole-5-carboxylate de méthyle avec un rendement global faible à modeste et peu reproductible (répétée cinq fois sur une échelle de 82 g, des rendements allant de 10 à 25% ont été trouvés) (283).

Afin de pallier à ces soucis de rendement, de répétabilité et de robustesse du protocole de synthèse de Matteuci *et al.*, et en vue de permettre sa réalisation sur les moyennes et grandes échelles (de quelques grammes à plusieurs dizaines de grammes), O'Connor *et al.* (284) ont procédé à une série de modifications des conditions réactionnelles pour accéder à l'analogue 2-aminoimidazole-5-carboxylate d'éthyle. Dans leur publication dans « Nature Protocols » de 2016, O'Connor *et al.* (285) ont fourni une description très détaillée du protocole de préparation de cette molécule, avec mise en relief des points critiques, des précautions à prendre lors de chaque étape et du temps réactionnel optimal (285). Un rendement global allant de 48 à 54% a pu ainsi être atteint (Figure 60, voie B).

Dans les deux cas, l'intermédiaire 2-aminoimidazole-5-carboxylate d'alkyle obtenu est nitré, puis converti en alcool final cible (Figure 60).

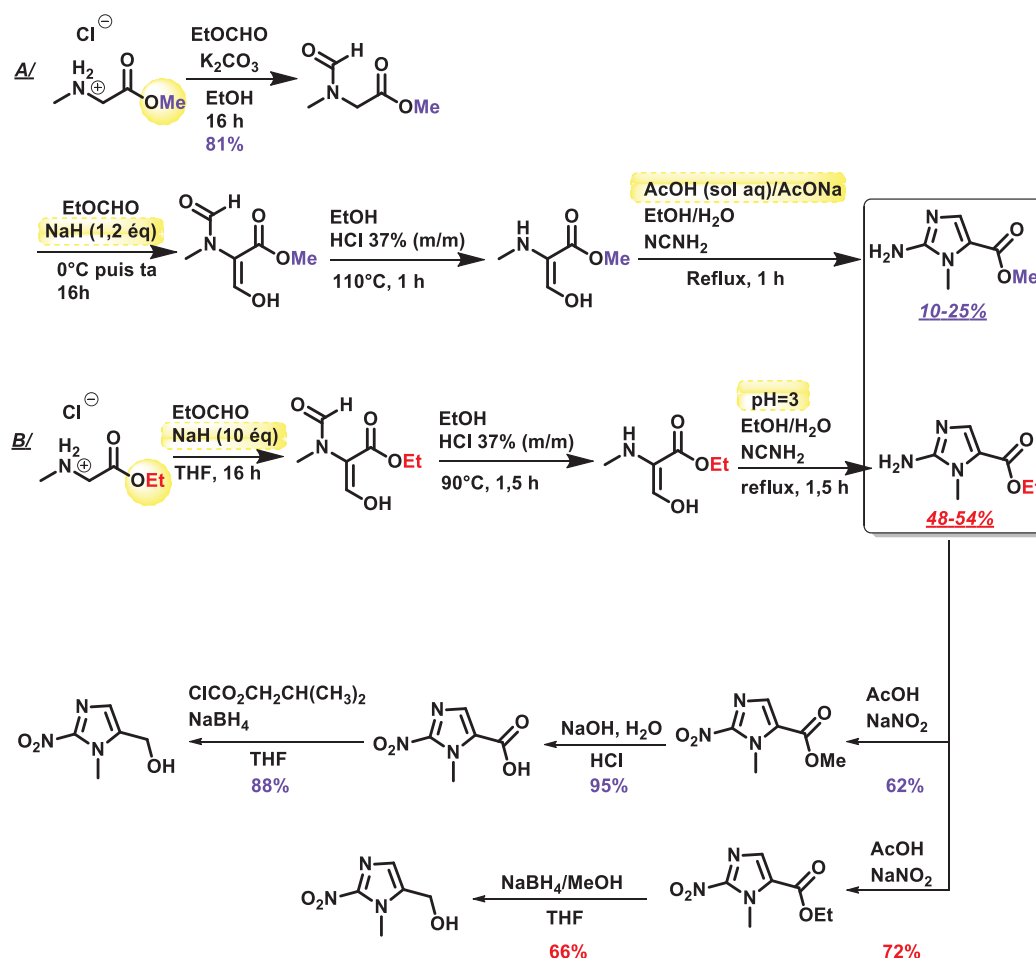


Figure 60: Voies d'accès à l'alcool **6** selon Matteucci *et al.* (A) et O'Connor *et al.* (B)
(Les éléments surlignés en jaune représentent les différences entre les deux voies)

Comme inconvénient de ce protocole, Jin C *et al.* (**246**) ont rapporté un souci de solubilité du substrat ester de la sarcosine de départ et une difficulté de « scale up » car de grandes quantités de NaH (10 équivalents) sont nécessaires pour la C- et N-formylation « one-pot » de O'Connor *et al.* L'application de ce mode opératoire à l'échelle de quelques grammes d'ester de la sarcosine nécessite, en effet, plusieurs grammes de NaH, ce qui compliquerait la mise en œuvre de la réaction. Pour y remédier, les auteurs ont mis au point une méthode innovante d'accès au synthon alcool (**6**) partant d'un dérivé 5-(((*tert*-butyldiméthylsilyl)oxy)méthyl)-1-méthyl-1*H*-imidazole **III** préparé en trois étapes selon une variante de la cyclisation de Marckwald rapportée dans la littérature (**286**, **287**). Pour ceci, un substrat de départ commercial, la 1,3-dihydroxyacétone dimère, a été utilisé, mais le rendement global de cette synthèse n'a pas été rapporté par les auteurs. La littérature rapporte un rendement quantitatif pour l'étape de silylation et un rendement variable, selon la nature du radical R de l'amine, pour les étapes de cyclisation et de nitration (pour exemple : 70-97% et 53-85%, respectivement, dans la série de Aulaskari *et al.* (**287**), d'où un rendement global de 33-75%) (**Figure 61**).

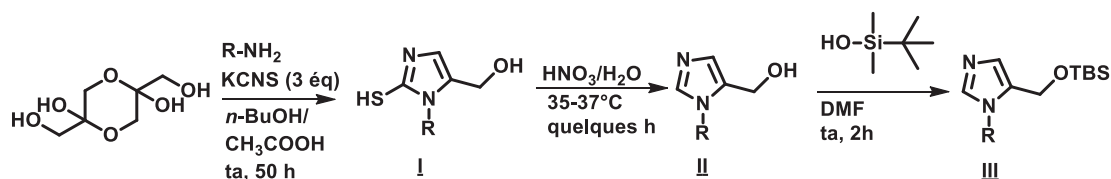


Figure 61: Méthode de préparation de l'imidazole **III** (287)

Partant de ce dérivé alcool protégé **III**, La fonction nitro est ensuite introduite en position 2 en quatre étapes consistant en : *i*) une lithiation suivie par l'ajout d'azoture de tosylé (TsN_3), *ii*) la déprotection de la fonction alcool, *iii*) la réduction de la fonction azoture par hydrogénation et enfin *iv*) la conversion de l'amine en dérivé nitré par diazotation de Sandmeyer (Figure 62).

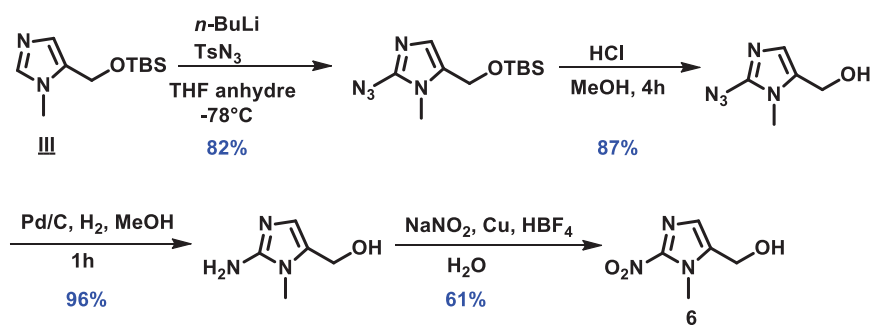


Figure 62: Voie d'accès à l'alcool **6** au départ de l'imidazole **III** (246)

Si l'on considère le rendement global de la préparation du composé **6** à partir de la 1,3-dihydroxyacétone, la voie de Jin *et al.* semble moins intéressante que celle de O'Connor *et al.* en termes de nombre d'étapes (7 *versus* 3) et de rendement global.

Compte tenu de ceci, nous avons opté, dans le cadre de nos travaux, pour la séquence réactionnelle de Matteucci *et al.* en réajustant les conditions opératoires au regard des améliorations apportées par O'Connor *et al.* Les différentes étapes permettant d'accéder au synthon alcool *N*-méthyl-2-nitroimidazole fonctionnalisé en position 5 (**6**) sont détaillées dans la Figure 63 et sont discutées ci-après.

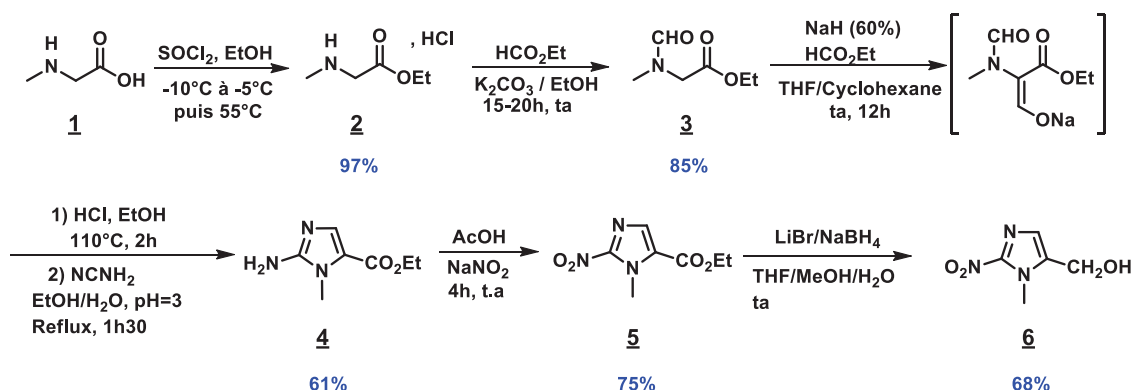


Figure 63: Séquence réactionnelle retenue pour la préparation de l'alcool **6**

La synthèse a été donc réalisée au départ de la sarcosine, selon une séquence en cinq étapes faisant intervenir des réactions d'estérification, de *N*- et *C*-formylation, de cyclisation selon Markwald, de diazotation et de réduction.

↳ **1^{ère} étape : Estérification**

Un acide aminé disponible dans le commerce, la *N*-méthyl glycine ou sarcosine (**1**), a donc été estérifié en milieu acide chlorhydrique, généré *in situ* en additionnant du chlorure de thionyle dans l'éthanol anhydre. L'analyse RMN ¹H réalisée dans le CDCl₃ corrobore la formation de l'ester éthylique avec l'apparition d'un quadruplet à 4,24 ppm et d'un triplet à 1,26 ppm, intégrant respectivement pour 2 et 3 protons avec une constante de couplage de 7,1 Hz. Cette étape a été réalisée avec un rendement quantitatif, et a conduit au dérivé **2** sous la forme de chlorhydrate.

↳ **2^{de} étape : *N*-formylation**

Le composé **2** a subi une *N*-formylation par l'action du formiate d'éthyle dans l'éthanol en présence d'un excès de carbonate de potassium (1,5 équivalents), pour donner directement le dérivé *N*-formamide **3**, avec un rendement de 85 % après extraction du milieu réactionnel.

L'utilisation de formiate d'éthyle à la place du formiate de méthyle, comme rapporté dans la procédure de Matteuci *et al.*, permet de s'affranchir d'éventuelles réactions de trans-estérification. Le choix d'un ester éthylique plutôt que méthylique s'appuie également sur les constatations d'O'Connor *et al.* en termes de solubilité : en effet l'ester méthylique est faiblement soluble dans le formiate d'éthyle, ce qui nuit au rendement et à la cinétique de *N*-formylation (16 h *versus* 3 h pour les esters méthylique et éthylique, respectivement).

Afin de fournir les composés **28-32** en quantité suffisante pour les études biologiques, cette réaction a été réalisée à trois reprises sur une échelle d'une trentaine de grammes. Ces conditions ont nécessité l'utilisation de quantités importantes de carbonate de potassium (> 30 g) à l'origine d'une difficulté d'homogénéisation du milieu réactionnel, voire même de l'arrêt de l'agitation si une agitation continue et vigoureuse n'est pas maintenue. Pour limiter ce phénomène, le volume de réaction a été augmenté pour le 3^{ème} lot (9 équivalents d'éthanol et de formiate d'éthyle ont été utilisés au lieu de 8) afin de faciliter l'agitation, ce qui explique probablement l'excellent rendement de 96% obtenu, comparativement aux 66 et 85% pour les deux précédents lots.

L'intermédiaire *N*-formylé **3** se présente sous la forme de deux rotamères, de par la présence de la fonction amide dont la libre rotation de la liaison N-CHO se trouve gênée. Les rotamères d'amide sont généralement considérés comme des conformères, s'inter-convertissant à température ambiante et en solution sauf en cas de gêne stérique importante (**288, 289**). Les deux rotamères du dérivé *N*-formylé **3** sont mis en évidence en analyse RMN ¹H par un dédoublement des signaux, notamment ceux relatifs aux protons du formyle, du *N*-méthyle et du méthylène en α de l'amide (**Figure 64**). Ce dédoublement des signaux est également observé sur le spectre RMN ¹³C.

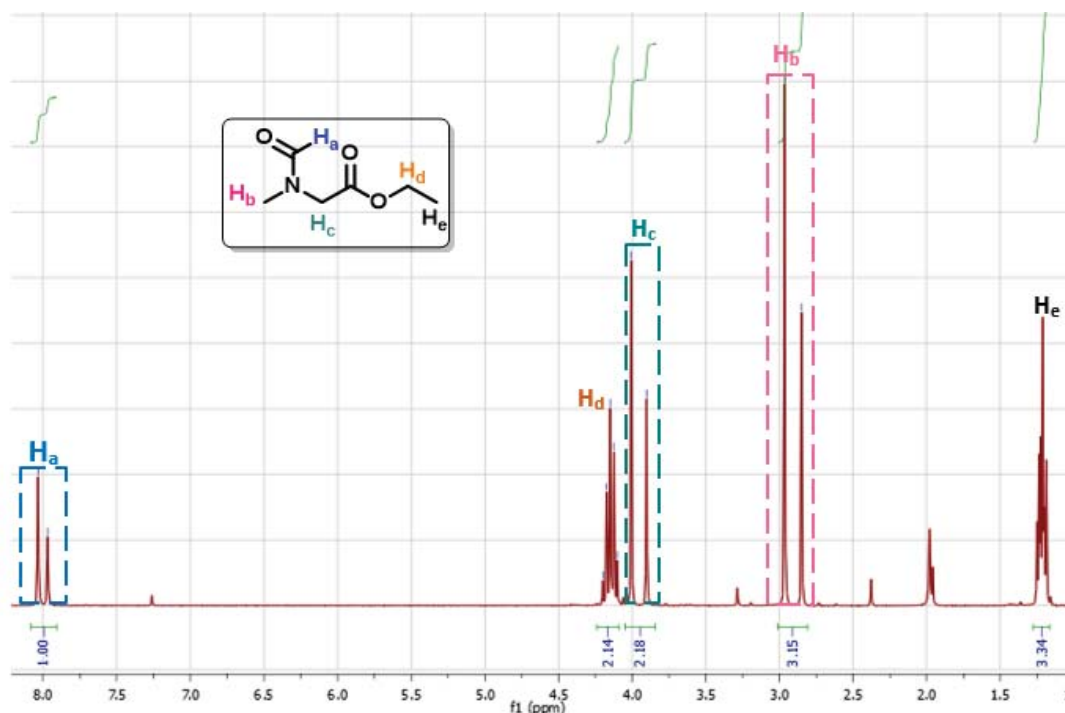


Figure 64: Spectre RMN ¹H du composé *N*-formylé **3** (dans le CDCl₃, 300 MHz) mettant en évidence la présence de deux rotamères



3^{ème} étape et 4^{ème} étape: C-Formylation et Cyclisation de Marckwald

La conversion du dérivé *N*-formylé **3** en ester 2-aminoimidazole **4**, premier intermédiaire cyclique de la synthèse, constitue l'étape clef mais aussi critique de la synthèse multi-étapes de l'alcool **6**, comme décrit par O'Connor *et al.* (284).

Nous avons procédé selon une méthode adaptée de celle de Matteuci *et al.* en remplaçant l'ester méthylique par l'ester éthylique et en tenant compte des récentes améliorations apportées par O'Connor *et al.*, uniquement pour le 3^{ème} lot, les deux premiers lots ayant été synthétisés antérieurement à la parution de la publication.

D'abord, l'intermédiaire *N*-formylé **3** a été C-formylé sur le carbone en α du carbonyle, par l'action du NaH en excès (1,5 équivalents) dans un mélange équimolaire de formiate d'éthyle et de THF. Le THF permet de mieux solubiliser les réactifs et d'assurer ainsi une meilleure réactivité et donc un contrôle plus aisé de la température du milieu réactionnel au cours de la réaction de formylation qui est hautement exothermique (284). La réaction doit être effectuée en milieu anhydre, dans un montage muni d'un bulleur. Notons que deux précautions sont nécessaires pour réussir cette réaction :

- L'hydruure de sodium sous forme d'une dispersion solide dans une huile minérale, doit être ajouté par petites fractions, sur une durée suffisamment lente (~40 min pour 10 g) et généralement à froid (0 °C) ;
- Le contrôle de la réaction peut nécessiter l'utilisation d'un bain de glace, qui ne doit pas être retiré immédiatement après la fin de l'addition de l'hydruure, mais maintenu plus longtemps afin de garantir un retour progressif du milieu réactionnel à la température ambiante.

Le non-respect de ces conditions a souvent résulté en un échec de la réaction par échauffement brusque du milieu réactionnel et dégagement intense et incontrôlable de dihydrogène, voire à un risque non négligeable d'explosion.

La formation de l'intermédiaire diformylé après une nuit d'agitation, se traduisait par une suspension laiteuse de couleur jaune pâle. Le solide obtenu a été récupéré par filtration, après trituration dans du cyclohexane afin d'éliminer les traces d'huile. Le composé a été isolé sous forme d'énolate puis directement engagé dans l'étape suivante sans caractérisation.

Comme déjà évoqué précédemment, le mode opératoire de O'Connor *et al.* offre un accès direct à cet intermédiaire énolate sodique au départ de l'ester éthylique de la sarcosine **2**. Un large excès d'hydruire est alors nécessaire pour accomplir à la fois les *N*- et *C*-formylations (10 équivalents pour 1 équivalent d'ester, soit 75 g de NaH pour 30 g d'ester *versus* 1,4 équivalents soit 9 g de NaH pour une *C*-formylation de la même quantité de substrat *N*-formylé). Nous avons choisi pour cette raison de procéder en deux étapes, passant par l'isolement du dérivé *N*-formylé **3**, afin de limiter les risques associés à l'utilisation de grandes quantités de NaH.

Le dérivé diformylé a été ensuite traité par un mélange éthanol / acide chlorhydrique concentré à reflux pendant 2 heures. De telles conditions entraînent une *N*-déformylation, sans hydrolyse de la fonction ester (**Figure 65**). Ensuite, un traitement de l'intermédiaire obtenu par un excès de cyanamide sous reflux à pH = 3 a conduit à la structure cyclique **4**, selon le mécanisme réactionnel illustré dans la **Figure 66**.

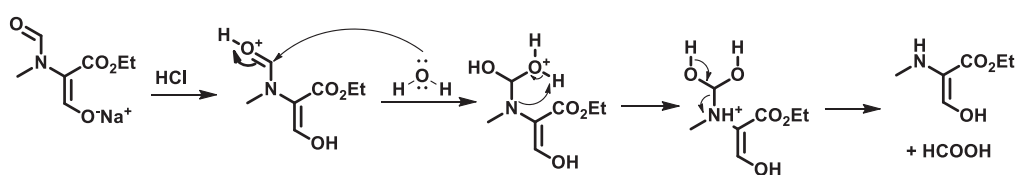


Figure 65: Mécanisme proposé pour la *N*-déformylation en milieu acide

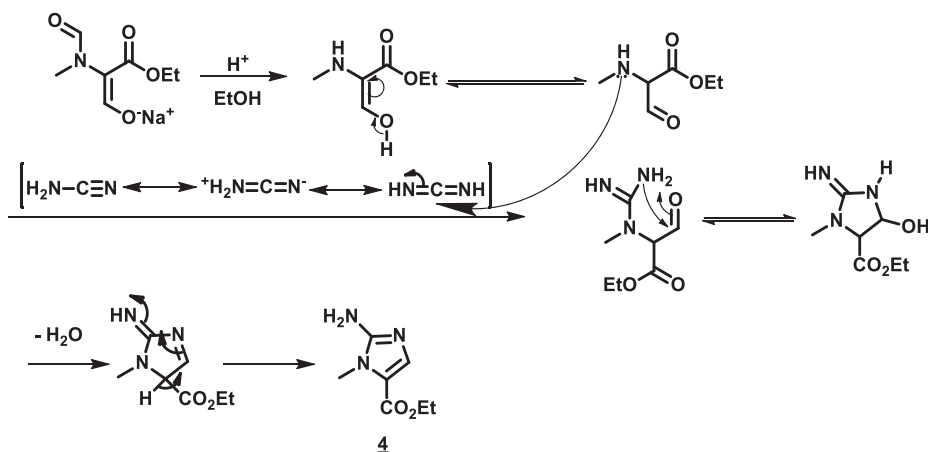


Figure 66: Mécanisme de la cyclisation de Marckwald

Deux équivalents de cyanamide ont été utilisés afin de favoriser le déplacement de l'équilibre vers la formation de l'ester 2-aminoimidazole-5-carboxylate **4**. Le pH du milieu réactionnel, initialement très acide, a été ajusté à 3, moyennant une solution aqueuse de NaOH 1M. Cette dernière a été préférée à l'utilisation d'un tampon acétate décrite dans le brevet de Matteuci *et al.*, pouvant

conduire à une hydrolyse partielle de l'ester éthylique d'après O'Connor. Les conditions adaptées de pH acide limiteraient cette réaction indésirable et amélioreraient ainsi le rendement global de la réaction (**284**).

Le milieu réactionnel est ensuite concentré jusqu'à 1/8 de son volume initial par évaporation du mélange hydro-alcoolique sous pression réduite, puis alcalinisation à un pH compris entre 8 et 9 par addition de carbonate de potassium. Dans ces conditions, l'ester **4** passe sous sa forme moléculaire puis précipite car peu soluble dans ce milieu. Le filtrat porté à froid permet souvent de récupérer une autre fraction du composé **4**.

L'adoption de l'ensemble de ces conditions de cyclisation lors de la préparation du 3^{ème} lot a permis de hausser le rendement de cette étape à 61% *versus* 25 et 47% pour les deux premiers lots synthétisés selon les conditions de Matteuci. Notons que cette variabilité inter-lots 1 et 2 en termes de rendement s'est manifestée malgré le maintien des mêmes conditions opératoires et de la même échelle de réaction (22 et 24,5 g de substrat **3**). Cette observation confirme celle d'O'Connor *et al.* qui, à travers les améliorations apportées, a pu aboutir à des rendements plus reproductibles (48 et 54%, n = 5 *versus* 15-21%, n = 5 pour Matteuci).

L'ester 2-aminoimidazole-5-carboxylate **4** a été caractérisé par son point de fusion et ses spectres IR, RMN ¹H et ¹³C, qui sont en accord avec la littérature (**284**). Le spectre RMN ¹H montre notamment un singulet à 7,39 ppm dans le CDCl₃ caractéristique du proton aromatique H-4 de l'imidazole.



4^{ème} étape : Diazotation

Le 2-nitroimidazole **5** a été obtenu par réaction de diazotation de l'amine **4** en présence d'un excès de nitrite de sodium dans l'acide acétique. D'un point de vue mécanistique, la fonction amine de l'ester **4** réagit avec l'ion nitrosonium formé *in situ* par réaction entre le nitrite de sodium et l'acide acétique pour donner un sel de diazonium. L'excès d'ion nitrite permet ensuite de réaliser une substitution nucléophile aromatique de la fonction diazonium, favorisée par la présence d'un groupement électroattracteur (i.e. carboxylate d'éthyle) en position 5 imidazolique, conduisant ainsi à la formation du produit désiré, i.e. le 2-nitroimidazole **5**. Une purification par chromatographie sur colonne de gel de silice, utilisant un éluant peu polaire (cyclohexane/acétate d'éthyle (AcOEt), 70/30, v/v) a permis d'isoler le dérivé nitré. Toutefois, de l'acide acétique a été parfois co-élué, auquel cas un lavage à l'eau a été réalisé. Les rendements de la réaction de diazotation ont varié de 39 à 75% (n=3).

La formation du produit nitré **5** est confirmée par RMN ¹H, avec notamment un glissement vers les champs faibles du signal relatif au proton aromatique H-4 de l'imidazole comparativement à son précurseur amino **4** (i.e. 7,70 ppm *versus* 7,39 ppm).



5^{ème} étape : Réduction

L'ester 2-nitroimidazole-5-carboxylate d'éthyle **5** est un composé clef ouvrant, à travers diverses possibilités de modifications fonctionnelles (hydrolyse, réduction et halogénéation), à des intermédiaires pouvant servir à la préparation de prodrogues nitro(hétéro)aromatiques bio-activables en hypoxie. La fonction ester peut, en effet, subir une hydrolyse pour donner un acide,

ou une réduction pour donner l'alcool **6**. A partir de ce dernier, deux autres dérivés sont accessibles (**Figure 67**):

- un dérivé $\text{CH}_2\text{-R}$ où R est un bon groupement partant (un halogène ou un mésylate). O'Connor *et al.* (**285**) ont obtenu le dérivé chloré avec un rendement de 66%, *via* une réaction de chloration par le chlorure de thionyle en présence de pyridine, mais rapportent un mauvais rendement pour le dérivé bromé.
- un aldéhyde, issu d'une oxydation douce par l'oxyde de manganèse avec un rendement de 52% selon O'Connor *et al.* (**285**).

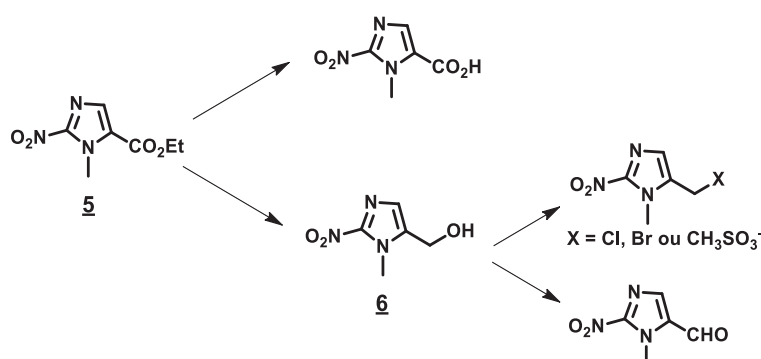


Figure 67: Différentes voies de dérivation possibles de l'ester 2-nitroimidazole **5** (**285**)

L'ensemble de ces dérivés fonctionnalisés en position C-5 imidazolique (acide, ester, alcool, dérivé halogéné ou mésylate et aldéhyde) peuvent être conjugués à des molécules biologiquement actives pour générer des prodrogues activables en milieu hypoxique (**Figure 68**).

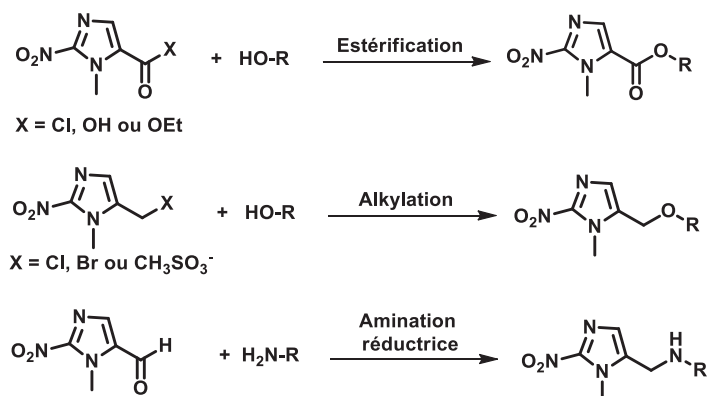


Figure 68: Exemples de voies de conjugaison de nitroimidazoles fonctionnalisés en position C-5 à des molécules biologiquement actives (**285**)

Dans notre cas, l'alcool 2-nitroimidazole **6** constitue le synthon cible car il permet, après activation par une base forte, l'introduction de la moutarde azotée au départ du dérivé dichloré **8**.

Le passage de l'ester **5** à l'alcool **6** est classiquement réalisé par Matteuci *et al.* (**283**) selon une méthode en deux étapes : une saponification suivie, après acidification, par une activation de la fonction acide par le chloroformiate d'isobutyle pour donner un intermédiaire activé de type anhydride mixte (**Figure 69**). Cette méthode est largement utilisée pour le couplage d'acides

aminés *N*-protégés dans le cadre de la synthèse peptidique (**290**, **291**). L'intermédiaire activé est ensuite réduit sélectivement par le borohydrure de sodium (NaBH_4) en milieu aqueux. Le rendement global de la réduction est supérieur à 80% (95% pour l'étape de saponification et 88% pour l'étape de réduction de l'intermédiaire anhydride) (**283**).

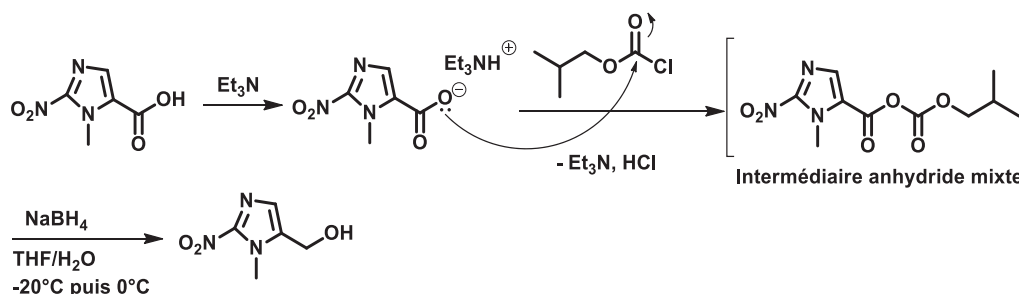


Figure 69: Mécanisme d'activation de la fonction acide par le chloroformiate d'isobutyle

Plus récemment, O'Connor *et al.* ont rapporté la réduction directe de l'ester **5** par le NaBH_4 (3 équivalents) dans un mélange tétrahydrofurane anhydre (THF)/méthanol (MeOH) (dans un rapport molaire 6/1). En effet, bien qu'en général la réduction d'esters aliphatiques par le NaBH_4 est cinétiquement très lente, certains composés font exception, à savoir : les esters aliphatiques possédant un(des) groupement(s) électroattracteur(s) (tel qu'un époxy, un chloro ou un cyano) adjacent(s) au carbonyle ou bien encore les esters (hétéro)aromatiques pouvant être activés par un(des) substituant(s) électroattracteur(s) (préférentiellement en position ortho et/ou para). Certains additifs peuvent également être utilisés afin d'exalter la force réductrice de NaBH_4 dans le THF: un acide de Lewis de type AlCl_3 , une catalyse par le LiCl ou le LiI , certains ions métalliques tels que TiCl_4 et CaCl_2 , l'iode I_2 , le ZnCl_2 ou bien encore le MeOH (**292**). Concernant ce dernier, Boechat *et al.* (**293**) ont déjà décrit le système $\text{NaBH}_4/\text{MeOH}/\text{THF}$ comme une méthode simple, rapide, générale, non couteuse et transposable à l'échelle industrielle pour la réduction d'esters méthyliques aromatiques (2-4 h de reflux dans le THF) conduisant aux alcools correspondants avec des rendements bons à excellents (88-97%). Dans le même contexte, Zhu *et al.* (**294**) ont réduit avec succès une série d'esters aromatiques, dont certains présentaient une forte gêne stérique autour du carbonyle, mais ceci a nécessité le remplacement du THF par le diglyme permettant un apport thermique plus important (chauffage à 162 °C).

Nous avons choisi de réaliser la réduction par l'hydrure de bore et de lithium (LiBH_4), formé *in situ* par réaction entre le bromure de lithium (LiBr) et l'hydrure de bore et de sodium (NaBH_4), dans un mélange THF/MeOH dans les proportions 80/20 (v/v). LiBH_4 est un donneur d'hydrures de force réductrice intermédiaire entre celles de LiAlH_4 et NaBH_4 . Comparé au premier, le LiBH_4 est un réducteur moins puissant, offrant une meilleure chimiosélectivité et permettant, particulièrement, la réduction d'aldéhydes, de cétones, d'esters et de lactones, en présence d'une fonction acide ou nitro, à 0 °C. Comparé au deuxième, le LiBH_4 est un réducteur plus puissant *vis-à-vis* de certaines fonctions chimiques comme la fonction ester. Pour cette dernière, la réaction de réduction est initiée par activation du carbonyle par le contre-ion métallique jouant le rôle d'acide de Lewis. Sachant que Li^+ est un acide de Lewis plus fort que Na^+ , l'activation du carbonyle se fait donc plus

efficacement et rapidement avec LiBH_4 . Outre son efficacité, LiBH_4 est plus soluble que NaBH_4 dans les solvants éthers communément utilisés dans les réactions de réduction (i.e. éther diéthylique, THF) **(295)**.

L'utilisation d'un mélange THF/MeOH dans la réaction de réduction du dérivé 2-nitroimidazole **4** a pour objectif d'exalter le pouvoir réducteur de l'hydrure. En effet, il est bien connu que les systèmes LiBH_4 /solvant étheré (éther diéthylique (Et_2O) ou THF)/MeOH (ajouté en quantité équimolaire par rapport à LiBH_4) sont associés à une puissance réductrice amplifiée. Ainsi, une réduction rapide et sélective des esters, lactones et époxydes, en présence d'une fonction acide carboxylique, nitro, carbamoyle ou chloro, a été observée dans un mélange Et_2O /MeOH à température ambiante ou à reflux. Le système LiBH_4 /THF/MeOH, quant à lui, est encore plus puissant et permet même de réduire sélectivement les amides I^{aires} en présence d'amides II^{aires} ou de sels d'acides carboxyliques. Egalement, les fonctions nitro, nitrile et acide carboxylique, connus toutes comme peu sensibles au LiBH_4 dans le THF, peuvent être réduites dans certains cas en associant du MeOH **(296)**.

Compte tenu de ces données, nous avons d'abord réalisé un 1^{er} essai avec le système LiBH_4 / Et_2O /MeOH, dont la force réductrice n'affecte pas la fonction nitro **(296)**. Au bout de 48 h d'agitation à température ambiante, la chromatographie sur couche mince (CCM) révélait encore la présence de l'ester de départ avec une quasi-absence de l'alcool. Après chauffage à reflux pendant 6 heures, la CCM montre la disparition de l'ester de départ mais l'alcool **6** n'a été obtenu qu'avec un rendement de 12%. Nous avons ainsi basculé vers le système LiBH_4 /THF/MeOH, dont la force réductrice exaltée présente l'inconvénient de potentiellement réduire la fonction nitroaromatique au même temps que la fonction alcool. Toutefois, ce phénomène n'a pas été mis en évidence lors de nos essais (où la température ne dépassait pas celle du milieu ambiant). En effet ni l'aminoalcool, ni l'aminoester n'ont été isolés. Toutefois, une élévation de la température conduit à un virage de la coloration de la solution de l'orangé au vert, suivie par la formation rapide d'un précipité jaune, avec l'apparition en CCM de nombreux sous-produits, dont certains ont pu être identifiés comme étant les esters méthyliques et éthyliques du produit dénitré. Il est donc primordial d'opérer à froid ou de maintenir, le cas échéant, le milieu réactionnel à température ambiante.

Le suivi de la réaction de réduction par CCM a montré qu'une conversion totale de l'ester de départ était atteinte au bout d'une durée moyenne de 12 heures, au terme de laquelle l'excès d'hydrure a été hydrolysé par une solution aqueuse saturée de chlorure d'ammonium (NH_4Cl). Le brut réactionnel a été ensuite concentré sous pression réduite afin d'éliminer le THF et le MeOH avant d'extraire le résidu aqueux par AcOEt . Il est, en effet, nécessaire de procéder ainsi car la solubilité de l'alcool **6** en phase aqueuse augmente en présence de THF et/ou de MeOH et peut donc affecter grandement le rendement de l'extraction liquide-liquide.

Après évaporation à sec de l'extrait organique, un solide jaune a été obtenu, dont la RMN ^1H , dans le $\text{DMSO}-d_6$ confirme la structure de l'alcool **6** mais révèle aussi la présence d'un singulet supplémentaire vers 6,53 ppm **(Figure 70)**. Le spectre RMN ^{13}C ne montre, quant à lui, aucun signal supplémentaire, orientant vers une nature minérale de l'impureté. Le signal à 6,53 ppm pourrait

correspondre au sel de lithium, $\text{LiB}(\text{OH})_4$, généré lors de l'hydrolyse du tétra-méthoxyborate de lithium formé en fin de réduction.

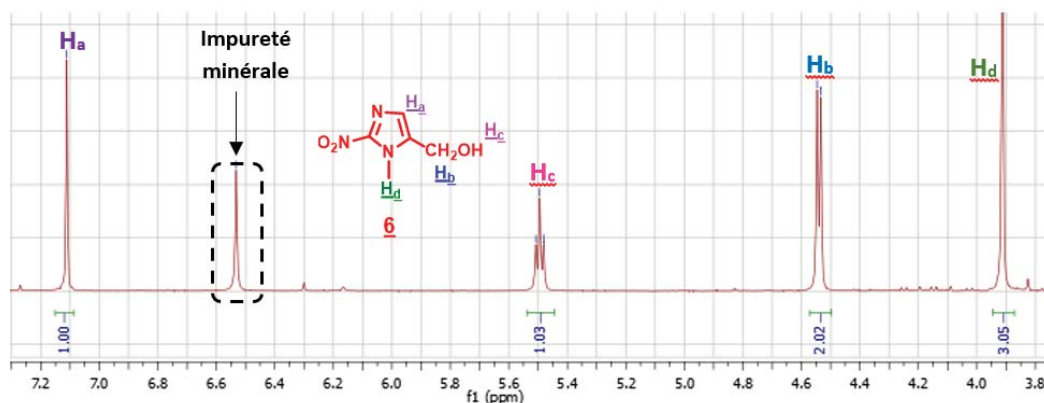


Figure 70: Spectre RMN ^1H (dans le $\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz) du brut réactionnel de l'alcool **6**, montrant une impureté minérale vers 6,53 ppm

Afin de se débarrasser de cette impureté, le solide jaune a été purifié par passage flash du brut réactionnel sur colonne de gel de silice surmonté d'un pad de Celite®545 avec élution par un mélange AcOEt/MeOH (98/2, v/v). Enfin, le solide obtenu est recristallisé à froid dans un système binaire à base d'AcOEt (solvant) et de cyclohexane (non-solvant), conduisant à l'alcool 5-hydroxyméthyl-1-*N*-méthyl-2-nitro-1*H*-imidazole **6** pur, avec un rendement variant entre 40 et 46% ($n=2$).

1.2.2 SYNTHÈSE DU CHLORURE DE L'ACIDE *N,N*-BIS-(2-CHLOROETHYL)-PHOSPHORAMIDIQUE **8**

La synthèse du dichlorure de l'acide *N,N*-bis-(2-chloroéthyl)phosphoramidique (**8**) a été notamment décrite dans le cadre de travaux de préparation de moutardes azotées apparentées au cyclophosphamide (**297-299**), ou pour accéder à des hétérocycles dioxaphosphorines à activités anti-bactérienne et anti-fongique *via* une condensation avec des dérivés de la benzophénone (**300**).

Deux voies sont rapportées dans la littérature, au départ d'un précurseur conventionnel commun (**7**) disponible dans le commerce et peu coûteux, la bis(2-chloroéthyl)amine sous sa forme base ou chlorhydrate, qui réagit avec un agent de phosphorylation, le trichlorure de phosphore (POCl_3) utilisé en excès :

- **La bis(2-chloroéthyl)amine sous sa forme base** : le POCl_3 est ajouté à froid, la réaction peut être réalisée sans solvant, avec chauffage (**301**), ou en présence d'un solvant (le dichlorométhane) à température ambiante (**302**).
- **La bis(2-chloroéthyl)amine sous sa forme chlorhydrate** : le milieu réactionnel est chauffé à reflux en présence de POCl_3 (106 °C), sans solvant (rendement > 80%), (**298**, **303**, **304**), ou encore en présence de solvant (toluène) (rendement ~ 75%) (**300**), pendant un temps allant de quelques heures à plusieurs jours (~ 4 jours). Une base telle que la triéthylamine (TEA)

peut être ajoutée lors de la réaction. La réaction est initiée à froid, à -78°C (**305**) (rendement $\sim 87\%$) ou à -5°C (**306**), dans le dichlorométhane (DCM), puis poursuivie à température ambiante pendant une nuit.

Nous avons choisi de préparer l'acide *N,N*-bis-(2-chloroéthyl)phosphoramidique (**8**) au départ du chlorhydrate de la bis(2-chloroéthyl)amine, sans solvant et en présence d'un excès de POCl_3 à reflux (**Figure 71**).

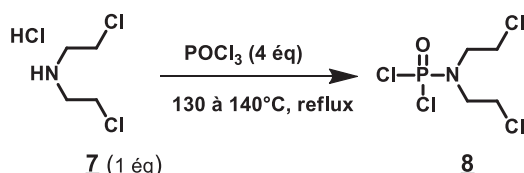


Figure 71: Préparation du composé **8** au départ de la bis(2-chloroéthyl)amine HCl et du POCl_3 à reflux

La réaction a été réalisée trois fois, sur des échelles différentes en substrat de départ (**Tableau 3**).

Tableau 3: Résultats des trois réactions de préparation du composé **8**, indiquant le temps de reflux et le rendement, selon l'échelle de la réaction

	Echelle de la réaction (g)	Temps de reflux (h)	Rendement (%)
Lot 1	1	15	0
Lot 2	5	80	46
Lot 3	10	80	55

Comme nous pouvons le noter, un temps de reflux de 15 h sur une échelle de 1 g était insuffisant pour permettre la phosphorylation de l'amine libre, le substrat de départ, identifié par CCM et par son point de fusion, étant récupéré dans son intégralité après évaporation à sec du brut réactionnel.

En opérant à plus grande échelle (5 et 10 g) avec prolongation du temps de reflux (80 h), la phosphorylation a pu avoir lieu. L'examen des données de la littérature permet de conclure sur l'existence d'une corrélation entre le temps de reflux et l'échelle de la réaction. De petites quantités semblent nécessiter un long temps de reflux, tandis que la phosphorylation complète de quelques dizaines de grammes nécessite un temps plus court. A titre d'exemple, un temps de reflux de 15 h a été rapporté par Cates *et al.* (**298**) (rendement $\sim 83,8\%$) et Lu *et al.* (**307**) (rendement $\sim 80\%$) pour des échelles respectives de 50 et 30 g, respectivement, tandis que ce temps a dû être porté à 75 h par McGuigan *et al.* (**303**) pour 10 g d'amine de départ.

Concernant l'isolement du composé **8**, quatre méthodes de purification ont été décrites dans la littérature :

- Une distillation du solide obtenu sous un vide poussé (point d'ébullition $126\text{-}129^{\circ}\text{C}$ à $1,5 \text{ mmHg}$) (rendement $\sim 75\%$) (**300**).
- Une simple élimination de l'excès de POCl_3 à l'aide de l'évaporateur rotatif, sans recours à la distillation, fournissant un composé pur d'après l'analyse RMN et la microanalyse. Le rendement de la réaction est quantitatif ($\sim 100\%$), d'après McGuigan *et al.* (**303**).

- Une recrystallisation, en procédant comme suit : l'excès de POCl₃ est distillé sous vide, puis le résidu est dissout dans l'acétone légèrement chauffée. La suspension obtenue est filtrée, le filtrat est évaporé et le résidu est séché sous vide. Ce produit est ensuite porté à reflux dans Et₂O, la suspension obtenue est filtrée à chaud pour éliminer les substances insolubles dans l'éther et le filtrat est concentré sous pression réduite. Comparée à la distillation sous pression réduite, celle-ci fournit le composé **8** avec un rendement légèrement amélioré (~ 83%) (**298**).
- Une recrystallisation à l'aide du système de solvants, acétone et éther de pétrole, à chaud (rendement ~ 82%) (**307**).
- Une chromatographie sur colonne de gel de silice, avec comme éluant du cyclohexane avec un gradient de polarité croissante en AcOEt (0 à 33%) (rendement~47%) (**305**).

En premier lieu, le protocole de recrystallisation proposé par Cates *et al.* (**298**) a été reproduit au laboratoire, mais le résultat n'a pas été concluant. Nous avons alors opté pour la méthode de purification par chromatographie du brut réactionnel sur colonne de gel de silice, en utilisant un mélange éluant de cyclohexane/AcOEt, (80/20, v/v). L'élution du produit a été suivie par CCM, en révélant à l'aide d'un réactif spécifique des composés alkylants : la 4-(4'-nitrobenzyl)pyridine (4-NBP) en milieu basique. L'utilisation de la 4-NBP (solution à 2,5% dans l'acétone) comme révélateur de CCM est dû au pouvoir nucléophile de l'azote de la pyridine, qui en s'attaquant à un carbone électrophile au sein d'une structure alkylante, produit, après traitement par l'hydroxyde de potassium (solution à 10% dans le MeOH), une intense coloration violette traduisant la formation d'un complexe de résonance NBP-agent alkylant (**Figure 72**). Cette réaction colorimétrique, qui mime l'alkylation des bases puriques et pyrimidiques de l'ADN, est sensible, quantitative et concentration dépendante, et constitue la base du « Test à la 4-NBP », qui permet d'évaluer le pouvoir alkylant de diverses molécules (**308, 309**).

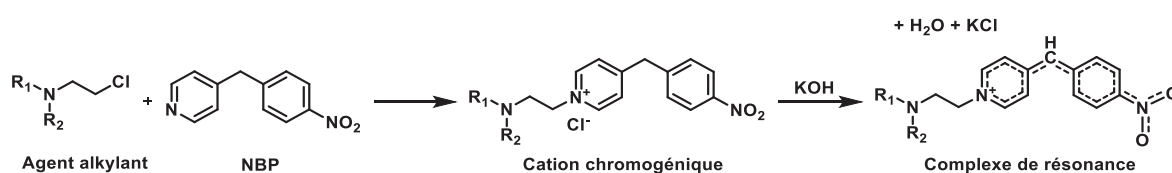


Figure 72: Principe de révélation en CCM des agents alkylants à l'aide du système 4-NBP/KOH

Après chromatographie sur colonne de gel de silice, un lavage supplémentaire par le cyclohexane conduit au dérivé **8** obtenu sous la forme de cristaux de couleur blanc-gris, avec des rendements de 46 et 55% (n=2).

Le composé **8** a été caractérisé par son point de fusion (57 °C, Litt. : 57-59 °C) et ses données spectrales, tous conformes à la littérature (**310**). En RMN ³¹P, le phosphore donne lieu à un singulet unique à 17,42 ppm. En analyse infra-rouge (IR), une bande intense et étroite est détectée vers 1265 cm⁻¹, correspondant à la vibration d'élongation de la liaison P=O.

1.2.3 SYNTHÈSE DES DIAMINES PRIMAIRES *N,N*-DISUBSTITUÉES 18-22

1.2.3.1 SYNTHÈSE

La préparation du composé tête de série **ICF05016** a été faite au départ de l'alcool **6**, de l'acide *N,N*-bis(2-chloroéthyl)phosphoramidique (**8**) et d'une amine commerciale, la *N,N*-diméthylaminopropylamine. Afin d'entreprendre les travaux d'optimisation de la structure de ce « lead » portant sur la partie du vecteur, il est nécessaire de pouvoir disposer d'une variété de diamines dissymétriques **18-22**, de longueur de chaîne carbonée variable et diversement substituées sur la fonction amine III^{aire} (**Figure 73**).

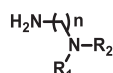


Figure 73: Structure générale des diamines **18-22** synthétisées dans le cadre de l'étude de pharmacomodulation sur la partie vecteur du « lead »

Concernant les substituants R_1 et R_2 , nous avons choisi les amines homologues *N,N*-diéthyle, *N,N*-diisopropyle, *N*-benzyl-*N*-méthyle et *N*-pipéridinyle. La longueur de la chaîne aliphatique linéaire entre les deux fonctions amines a été, quant à elle, modulée de 2 à 4 carbones.

La littérature rapporte une variété de voies d'accès à ce type de diamines au départ de différents substrats. Certaines sont plus spécifiques que d'autres, dans la mesure où elles permettent de préparer exclusivement des diamines avec une longueur de chaîne carbonée principale donnée. Ainsi le protocole multi-étapes de Seguin *et al.* (**311**) permet d'accéder à des *N,N*-dialkylaminobutylamines au départ de dérivés chloroacétamides *N,N*-disubstitués (**Figure 74**). L'amine I^{aire} a été introduite *via* une fonction nitrile et l'amine III^{aire} *via* une fonction amide. Les chloroacétamides, préparés par acylation d'une variété d'amines II^{aires} avec le chlorure de chloroacétyle, réagissent avec l'anion du cyanoacétate d'éthyle pour donner des α -cyanoesters qui subissent ensuite une saponification, décarboxylation puis réduction, à la fois du nitrile et de l'amide par le LiAlH_4 .

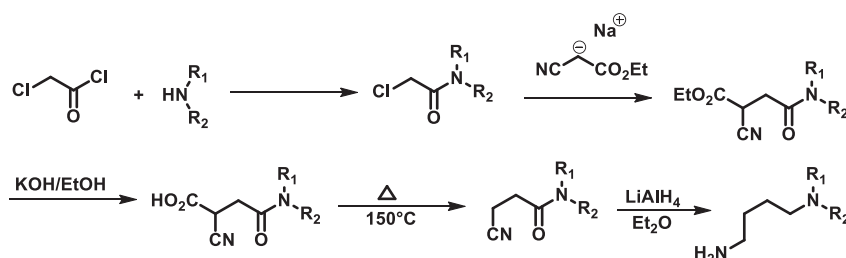


Figure 74: Synthèse de *N,N*-dialkylaminobutylamines au départ de dérivés chloroacétamide *N,N*-disubstitués (**311**)

Deux autres méthodes plus générales ressortent de la revue de la littérature et offrent la possibilité d'accès à un large éventail de structures diamines I^{aires}-III^{aires} avec diverses longueurs de chaîne et *N*-substituants :



Au départ de dérivés bromonitriles commercialisés (Figure 75)

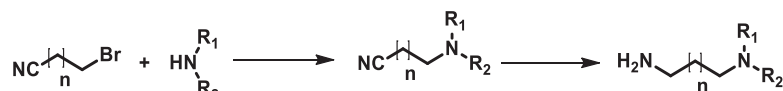


Figure 75: Synthèse de diamines *N,N*-disubstituées au départ de dérivés bromonitriles commercialisés

La 1^{ère} étape de substitution nucléophile du dérivé bromé par une amine II^{aire} se fait dans le THF ou l'acétonitrile (ACN), à reflux ou à température ambiante, en présence d'une base telle que le carbonate de potassium ou la *N,N*-diisopropyléthylamine (DIPEA) (**312**, **313**). Une étape de réduction de la fonction nitrile par hydrogénation catalytique (**312**, **313**) ou des donneurs d'hydrures (e.g. LiAlH₄) (**33**) est ensuite réalisée.



Au départ du phthalimide de potassium par une réaction de Gabriel

L'ensemble des diamines envisagées peuvent être obtenues selon la réaction de Gabriel (**314**). Il s'agit d'une méthode historiquement utilisée pour synthétiser des amines I^{aires} par réaction entre le phthalimide de potassium et un halogénure d'alkyle, donnant un *N*-alkylphthalimide. Ce dernier, sous l'action de l'hydrazine dans EtOH ou le MeOH, subit une hydrazinolyse libérant l'amine I^{aire}. La méthode de Gabriel présente l'avantage de fournir des amines I^{aires} non contaminées par des amines II^{aires} ou III^{aires} contrairement à la méthode d'alkylation directe de l'ammoniac, par exemple.

Certaines des diamines cibles **18-22** ont été décrites dans la littérature (**18a-b**, **19a-b**, **20b-c**, **22**), au départ de dérivés bromonitriles commercialisés ou encore *via* la méthode de Gabriel. Dans ce travail, nous avons opté pour une voie réactionnelle unique, à savoir la méthode de Gabriel, pour accéder à toutes les diamines souhaitées *N,N*-dialkyl substituées, *N*-benzyl-*N*-méthyl et *N*-pipéridinyl substituées (**Figure 76**).

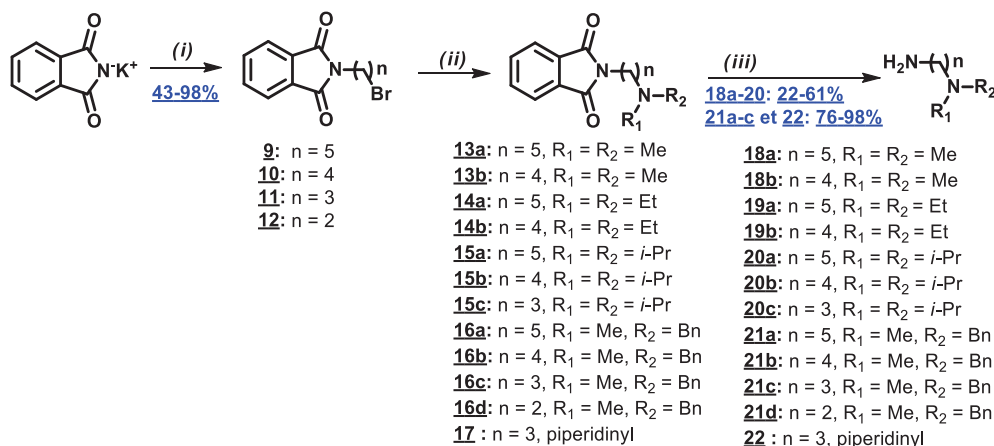


Figure 76: Synthèse de Gabriel des diamines *N,N*-disubstituées au départ du phthalimide de potassium

[(i) dibromoalcane, acétone, reflux, 24-48 h (ii) HNR₁R₂, K₂CO₃, ACN ou THF, reflux, 24 h (iii) hydrazine (solution aqueuse, 60%, m/m), EtOH, reflux, 12-24 h].



1^{ère} étape : Synthèse des *N*-bromoalkylphthalimides **9-12**

Les dérivés *N*-bromoéthyl-, *N*-bromopropyl, *N*-bromobutyl et *N*-bromopentyl phthalimides **9-12** sont commercialisés. Toutefois, ils ont été préparés, faute de disponibilité au moment de la synthèse des diamines, selon un protocole simple et largement décrit dans la littérature (**315**).

Le phthalimide de potassium a été, d'abord, généré *in situ* à partir du phthalimide et d'une solution hydro-alcoolique d'hydroxyde de potassium. La déprotonation est rendue facile grâce au caractère « acide » de l'atome d'hydrogène de la fonction imide ($pK_a \sim 9$) et la stabilisation par mésomérie de l'anion imidure (base conjuguée correspondante) due à la présence en position alpha de deux groupements carbonyles électroattracteurs **(314)**. L'anion phthalimide de potassium, un bon nucléophile, réagit selon un mécanisme S_N2 avec un dihalogénure d'alkyle, ici un dibromoalcane, utilisé en excès dans l'acétone, afin de limiter la formation du dérivé diphtalimide indésirable. La réaction de substitution a une cinétique lente, mais se trouve accélérée par le chauffage et l'utilisation d'un solvant polaire aprotique tel que l'acétone ou encore le diméthylformamide (DMF) **(316)**. Dans ces conditions, il devient même possible de chauffer au-dessous des températures de reflux (50°C pour l'acétone et 90°C pour le DMF), permettant ainsi d'obtenir rapidement le *N*-alkylphthalimide avec un bon degré de pureté **(314)**.

En fin de réaction, le brut réactionnel a été filtré et le filtrat évaporé permettant ainsi d'éliminer l'acétone mais non le dibromoalcane en excès. Les *N*-bromoalkylphthalimides **9-12** ont ensuite été purifiés par recristallisation, plutôt que par chromatographie sur colonne de gel de silice tel que décrit dans la littérature **(315, 316)**. Le procédé de recristallisation diffère selon la longueur de la chaîne du dérivé considéré :

- **Pour les dérivés à chaîne propyle et éthyle 11-12 :** l'ajout goutte à goutte de cyclohexane dans le résidu a permis de faire précipiter à froid le *N*-bromoalkylphthalimide ;
- **Pour les dérivés à chaîne pentyle et butyle 9-10 :** le *N*-bromoalkylphthalimide formé semble avoir une bonne solubilité dans le dibromoalcane en excès, ne permettant pas une précipitation directe par le cyclohexane. Il a donc été nécessaire d'éliminer au préalable cet excès par distillation sous pression réduite, avant de procéder à une recristallisation par le système AcOEt (solvant) et cyclohexane (non-solvant).

Dans les deux cas, un lavage des cristaux récupérés après filtration, par un mélange équimolaire $H_2O/EtOH$ refroidi à 0 °C, a permis d'isoler les *N*-bromoalkylphthalimides **9-12** purs, avec des rendements modérés à excellents allant de 43 à 98% et une pureté satisfaisante d'après les points de fusion mesurés, qui coïncident avec les données de la littérature, ainsi que les analyses spectrales de RMN 1H et ^{13}C **(317)**.

↳ **2^{de} étape : Synthèse des diamines protégées 13-17**

Les *N*-bromoalkylphthalimides obtenus **9-12** ont ensuite été substitués, toujours selon un mécanisme S_N2 , par une amine H^{aire} utilisée en excès (1,2-2,5 équivalents), dans l'ACN, en présence de carbonate de potassium (2,5 équivalents), à reflux pendant 24 h. Les diamines protégées **13-17** ont ainsi été obtenues après filtration et évaporation à sec du brut réactionnel.

Alors que les phthalimides d'amines *N,N*-dialkylsubstituées **13-15** ont été directement engagés dans l'étape suivante en raison d'une pureté satisfaisante des bruts réactionnels à l'issue de l'évaporation à sec du filtrat, les phthalimides d'amines *N*-pipéridinyl **17** et *N*-benzyl-*N*-méthyl substituées **16a-d** ont été, eux, préalablement purifiés par chromatographie sur colonne de gel de silice avec un mélange de cyclohexane/AcOEt/TEA (50/50/1, v/v/v). Dans le cas des dérivés

benzylés **16a-d**, la purification a pour but d'éliminer l'excès de *N*-méthylbenzylamine qui, avec un point d'ébullition de 184-189 °C, ne peut être séparée par simple évaporation du filtrat.



3^{ème} étape : Hydrazinolyse des diamines protégées **13-17**

Les amines **18-22** ont été enfin obtenues à partir des dérivés **13-17** par hydrazinolyse dans l'EtOH à reflux pendant une nuit. L'hydrazine réagit, d'abord, avec l'un des carbonyles de l'imide conduisant à une ouverture du cycle maléimide et formation des fonctions hydrazide d'acyle et amide. Ensuite, une réaction de substitution nucléophile intra-moléculaire entraîne la création d'un phthalhydrazide et conduit à la libération de l'amine ^{aire} **18-22** (**Figure 77**).

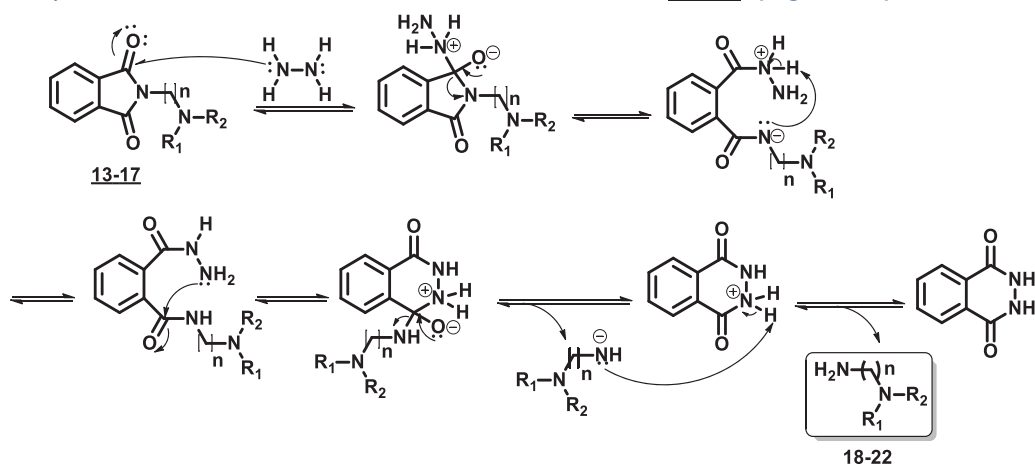


Figure 77: Mécanisme d'obtention des amines **18-22 par hydrazinolyse des phthalimides correspondants**

La première étape de traitement du brut réactionnel a consisté à séparer le sous-produit de l'hydrazinolyse, le phthalhydrazide. Pour cela, des conditions fortement acides ont été utilisées, à savoir une 1^{ère} acidification du brut réactionnel avec 6 équivalents d'une solution d'acide chlorhydrique concentrée (37%, m/m), permettant de faire précipiter la quasi-totalité de ce sous-produit sous forme d'un solide blanc cotonneux éliminé par filtration sous vide. Afin d'éliminer toute trace de ce sous-produit, le filtrat a été traité une nouvelle fois avec 3 équivalents supplémentaires de la solution d'acide chlorhydrique concentré, puis porté à 0 °C, d'où la précipitation du reste du phthalhydrazide. De telles conditions fortement acides permettent une précipitation sélective du phthalhydrazide, mais pas des diamines **18-22** qui, bien que présentes sous la forme de dichlorhydrate, gardent une bonne solubilité dans la phase éthanolique.

Après élimination des traces de phthalhydrazide, le filtrat a été concentré sous pression réduite, pour donner un résidu qui a été porté à pH alcalin ~ 14 à l'aide d'une solution aqueuse de potasse à 50% (m/m). Dans ces conditions de pH, l'amine est convertie en sa forme moléculaire puis extraite avec Et₂O. Après évaporation des phases organiques, un traitement différent a été réalisé pour les amines *N,N*-dialkylsubstituées **18-20** comparativement aux amines *N*-benzyl-*N*-méthyl ou *N*-pipéridinyl substituées **21a-c** et **22**.

➤ **Les amines *N,N*-dialkylsubstituées **18a-20**** (obtenues au départ de leurs précurseurs **13-15** non purifiés) : ces amines ont été purifiées par distillation fractionnée sous pression réduite, ayant permis d'isoler les amines **18a-20** (dont les points d'ébullition sont compris entre

90 et 100 °C à 28 Torr) d'une fraction impure distillant à une température de ~ 40 °C à 28 Torr. L'analyse RMN ^1H et ^{13}C de cette dernière fraction, isolée lors des 1^{ères} synthèses, a montré qu'il s'agissait d'un mélange d'EtOH (non éliminé en cours d'évaporation du filtrat à sec, car établissant probablement de fortes liaisons hydrogène avec l'amine) et d'un produit carbonyle (signal vers 153 ppm en ^{13}C). Lors d'une double précipitation acide sur le filtrat comme décrit ci-dessus, la dite-impureté n'a plus été retrouvée.

Les amines **18a-20** ont été obtenues avec des rendements relativement moyens (22 à 61%) probablement en raison des pertes inhérentes au procédé de distillation.

➤ **Les amines *N*-benzyl-*N*-méthyl ou *N*-pipéridinyl substituées **21a-c** et **22**** (obtenues au départ de leurs précurseurs **16a-c** et **17** purifiés par colonne chromatographique). L'hydrazinolyse de ces précurseurs a conduit aux diamines *N*-benzyl-*N*-méthyl substituées **21a-d** et *N*-pipéridinyl **22**, directement pures, avec des rendements bons à excellents pour la série benzylée (76 à 98%).

1.2.3.2 ELEMENTS D'ELUCIDATION STRUCTURALE

La structure et la pureté des diamines **18-22** ont été confirmées par les analyses spectrales IR, RMN ^1H et ^{13}C et concordent pour celles déjà décrites dans la littérature avec les données rapportées.

🔍 **La spectroscopie Infrarouge :** montre deux larges bandes vers 3300 et 3000 cm^{-1} correspondant aux vibrations d'élongation asymétrique et symétrique des liaisons N-H de l'amine libre, ainsi qu'une vibration de déformation de cette même fonction à 1580 cm^{-1} .

🔍 **L'analyse RMN ^1H et ^{13}C :** confirme la structure des diverses amines et les attributions complètes ont été réalisées sur la base d'expériences de type ^1H - ^1H COSY (*Correlation Spectroscopy*) et ^1H - ^{13}C HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*).

Compte tenu de la sensibilité à l'oxydation des amines (i.e. oxydation par mécanisme radicalaire, catalysée par la lumière, les impuretés métalliques et/ou la chaleur), des précautions ont été prises lors de leur conservation : flacons ambrés conservés sous atmosphère inerte, à +4 °C et à l'abri de la lumière.

1.3 SYNTHÈSE DES PRODRUGUES NON VECTORISEES **23-27**

1.3.1 SYNTHÈSE

La synthèse de 17 prodrugs non vectorisées **23-27** (**Tableau 4**) a été réalisée au départ des deux précurseurs communs **6** et **8** et des diamines **18-22** selon une réaction one-pot, sous atmosphère inerte et à -78 °C (**Figure 78**). Le mode opératoire mis en œuvre repose sur les travaux de Borch *et al.*, qui furent les 1^{ers} à concevoir des HAPs nitroaromatiques incorporant une moutarde alkylante de l'ADN (**222**, **318**) comme entité cytotoxique.

Tableau 4: Liste des prodrogues préparées 23-27

#	N	R ₁	R ₂	Rdt (%)
<u>23d</u>	2	Me	Me	38
<u>23c</u>	3	Me	Me	43
<u>23b</u>	4	Me	Me	37
<u>23a</u>	5	Me	Me	30
<u>24d</u>	2	Et	Et	53
<u>24c</u>	3	Et	Et	65
<u>24b</u>	4	Et	Et	44
<u>24a</u>	5	Et	Et	43
<u>25d</u>	2	<i>i</i> -Pr	<i>i</i> -Pr	39
<u>25c</u>	3	<i>i</i> -Pr	<i>i</i> -Pr	22
<u>25b</u>	4	<i>i</i> -Pr	<i>i</i> -Pr	29
<u>25a</u>	5	<i>i</i> -Pr	<i>i</i> -Pr	56
<u>26d</u>	2	Me	Bn	72
<u>26c</u>	3	Me	Bn	37
<u>26b</u>	4	Me	Bn	38
<u>26a</u>	5	Me	Bn	45
<u>27</u>	3	pipéridinyl		18

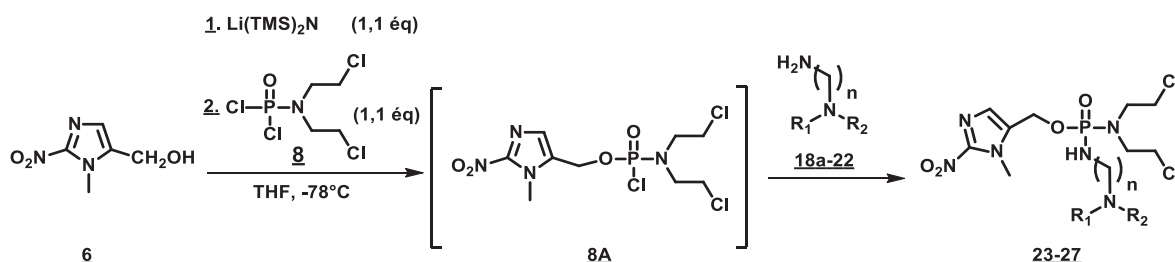


Figure 78: Séquence réactionnelle pour la préparation des composés 23-27 analogues du « lead » ICF05016

La réaction de couplage se déroule en trois étapes successives :



1^{ère} étape : Déprotonation de l'alcool 6

L'alcool **6** solubilisé dans le THF anhydre est déprotoné à -78 °C, par l'action d'une base forte, la bis(triméthysilyl)amidure de lithium (solution 1M dans le THF anhydre). La déprotonation est quasi-instantanée et s'accompagne d'un virage de la coloration du milieu réactionnel, initialement jaune, vers l'orangé. L'utilisation du NaH est également possible, mais requiert généralement un temps de contact plus long (une nuit).



2^{de} étape : Phosphorylation de l'alcoolate de lithium

L'alcoolate généré *in situ*, réagit avec le phosphore électrophile du composé **8** introduit légèrement en excès (1,1 équivalents), ce qui entraîne la substitution d'un 1^{er} atome de chlore du dérivé de phosphore **8**. Cette réaction est facilitée par le caractère fortement oxophile du phosphore, connu pour établir une forte liaison avec l'oxygène. Le temps de réaction T₁, définissant une conversion optimale de l'alcoolate en intermédiaire monosubstitué non isolable **8A**, est déterminé grâce à un suivi de l'évolution de la réaction par RMN ³¹P. Ce suivi est réalisé à partir du temps T₀, correspondant à l'ajout de la solution du composé **8** puis toutes les 10-15 min, sur des

prélèvements du milieu réactionnel dilués dans le THF anhydre (~50 μ L). Une estimation du ratio des espèces présentes dans le milieu réactionnel, basée sur les intégrales des pics correspondant au produit phosphoré de départ ($\delta \sim 15,5$ ppm) et à celui de l'intermédiaire **8A** ($\delta \sim 15,2$ ppm) permet d'évaluer l'avancement de la réaction de phosphorylation de l'alcool. Idéalement, un ratio de 0,1/1 signifie une conversion totale de l'alcoolate en intermédiaire phosphorylé, seul l'excès de départ du composé **8** demeurant dans le milieu réactionnel. Si le ratio n'est pas en faveur de la formation de l'intermédiaire **8A**, la réaction est maintenue sous agitation à froid, pour être contrôlée 10-15 min plus tard. Si aucune évolution significative en termes de ratio n'est notée au bout de ~ 60 min, la phosphorylation est arrêtée et la réaction est poursuivie par ajout de la diamine.

3^{ème} étape : Formation des podroques amines III^{aires} **23-27**

Une diamine *N,N*-disubstituée commerciale ou synthétisée **18a-22** est ajoutée en excès (2-2,2 équiv. en solution dans le THF anhydre) dans le milieu réactionnel, et un premier prélèvement (~50 μ L) pour suivi par RMN ^{31}P est réalisé puis répété si nécessaire toutes les 10-15 min jusqu'à disparition complète de l'intermédiaire monosubstitué de départ **8A**. Le profil RMN ^{31}P révèle généralement la disparition quasi-instantanée du pic relatif à cet intermédiaire, au profit d'un pic vers 17 ppm relatif au dérivé souhaité correspondant **23-27**. D'autres pics d'intensités variables, avec notamment un pic important vers 19 ppm, correspondant à des impuretés sont aussi présents lors du suivi *in situ* mais n'ont jamais été isolés et caractérisés. La réaction est arrêtée, au bout d'un temps T_2 , par addition d'eau dans le milieu réactionnel.

Le suivi de la cinétique de la réaction par RMN ^{31}P a été réalisé pour les 17 composés de la série. L'examen des différents profils obtenus révèle qu'ils sont peu reproductibles d'une réaction à l'autre en termes de cinétique. Plus particulièrement, l'étape commune de phosphorylation conduisant à l'intermédiaire monosubstitué **8A**, a manifesté le plus de variabilité, avec un temps T_1 variant de 5 à 80 min. Nous présentons ci-dessous à titre d'exemples deux profils de cinétique illustrant ce propos (**Figure 79** et **Figure 80**).

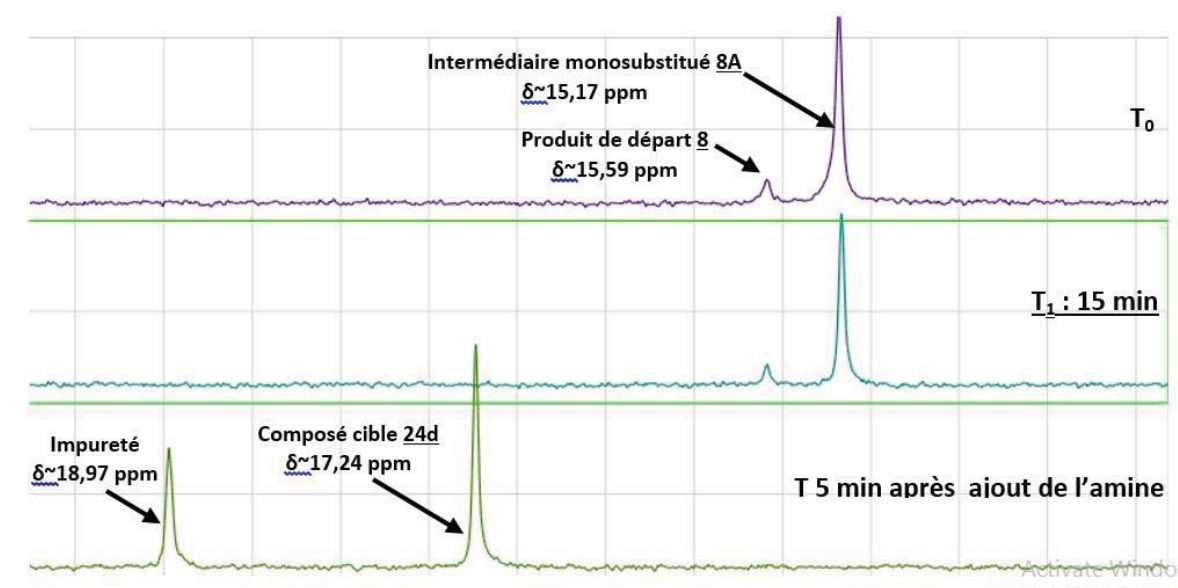


Figure 79: Suivi de la cinétique de formation composé **24d** par RMN ^{31}P

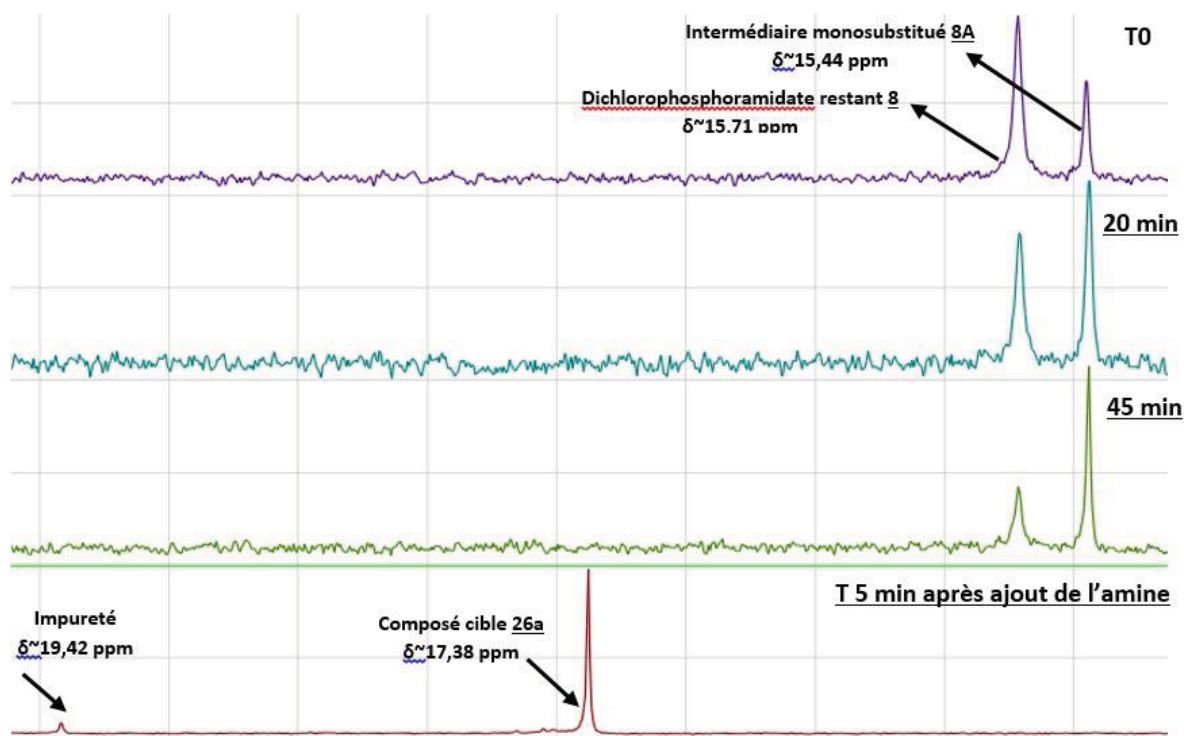


Figure 80: Suivi de la cinétique de formation composé **26a** par RMN ^{31}P

Comme nous pouvons l'observer sur la **Figure 79**, illustrant le suivi de la réaction par RMN ^{31}P , obtenu pour le composé **24d**, la première étape de phosphorylation de l'alcool **6** était rapide et presque totale. En effet, un ratio $\sim 1/0,1$ entre l'intermédiaire monosubstitué ($\delta \sim 15,17$ ppm) et le dérivé dichlorophosphoramidique **8** ($\delta \sim 15,59$ ppm) a été atteint dès le temps T_0 après addition de ce dernier, indiquant que seul l'excès du composé **8** demeure en solution. Dès l'ajout de l'amine commerciale, la *N,N*-diéthylaminoéthylamine, l'intermédiaire **8A** disparaît immédiatement pour générer le dérivé cible **24d** caractérisé par un signal à 17,24 ppm ainsi qu'une impureté donnant un signal à 18,97 ppm. Le maintien de l'agitation pendant encore 30 minutes n'a conduit à aucun changement du profil spectral. La formation du produit final de la réaction semble donc instantanée et la formation de l'impureté générée irréversible.

Un profil de cinétique différent a été obtenu lors de la préparation du dérivé benzylé **26a** (**Figure 80**). Contrairement à ce qui a été observé avec le composé **24d**, la phosphorylation de l'alcool n'était ni instantanée, ni totale. La prolongation de cette étape sur 80 min a montré une lente amélioration en termes de ratio intermédiaire **8A**/dichlorophosphoramidate **8**. L'amine **21a** a alors été additionnée à $T_1 = 80$ min, une conversion totale de l'intermédiaire a été observée dès 5 min, avec apparition d'un signal à 17,38 ppm correspondant à la prodrogue amine III^{aire} **26a**. L'impureté à 19 ppm était cette fois-ci très largement minoritaire (7,4%), comparativement à ce qui a été observé avec le composé **24d**.

L'examen de l'ensemble des profils de cinétique obtenus montre une variabilité intra-série et oriente vers une étroite corrélation avec les conditions opératoires de la première étape de phosphorylation de l'alcool. Celle-ci est cruciale et déterminante pour la réussite de la réaction car limitante en termes de rendement global d'obtention des dérivés **23-27**. Nous pouvons avancer,

compte tenu des différents essais réalisés, les paramètres critiques suivants ayant le plus d'impact sur la cinétique de la réaction:

➤ **La solubilité de l'alcool 6 dans le THF** : Une solubilisation partielle de l'alcool dans le THF (observée avec certains lots) corrèle vraisemblablement avec une cinétique de phosphorylation lente et/ou un faible taux de conversion en intermédiaire monosubstitué 8A. L'existence de différentes formes cristallines est probablement responsable d'une variation de solubilité inter-lots. Une solubilisation au préalable de l'alcool 6 dans le MeOH, suivie par une évaporation à sec a permis de remédier à ces différences de solubilité inter-lots car elle anéantit les différences de cristallinité et conduit à une forme probablement amorphe facilement soluble dans le THF. La solubilisation complète de l'alcool 6 dans le THF est donc primordiale afin de ne pas nuire au rendement global de la réaction.

➤ **La vitesse d'ajout du dichlorure d'acide phosphoramidique 8** : Le dérivé dichloré 8 a été utilisé avec un léger excès de 1,1 équivalent *versus* l'alcool 6 ; l'intégralité de cette quantité doit être ajoutée en une seule fois rapidement dans le milieu réactionnel après avoir été refroidie au préalable à -78 °C. L'intermédiaire monosubstitué 8A est alors rapidement formé et une conversion quasi-totale est observée dès les 15 premières min de la réaction. Le milieu réactionnel gardé dans ces conditions une teinte orangé à légèrement brunâtre, tandis qu'une teinte quasiment noire a été observée dans certains cas où le composé 8 a été ajouté progressivement. Cette addition rapide devrait limiter une double addition de l'alcool 6 par substitution des deux chlores, ce qui a pu être observé dans certains cas.

L'arrêt de la réaction de couplage par ajout d'eau a été suivi par une extraction du milieu réactionnel avec l'AcOEt. Une RMN ³¹P de contrôle de la phase aqueuse montre l'absence de signal vers 17 ppm et quelques impuretés phosphorées dont les signaux apparaissent dans la zone < 10 ppm, ce qui témoigne de l'absence de produit dans la phase aqueuse.

La purification des dérivés 23-27 sur colonne de gel de silice s'est révélée relativement fastidieuse compte tenu de la polarité de ces dérivés aminés, qui nécessitait l'utilisation d'éluant de forte polarité. Un mélange ternaire à base d'AcOEt, d'EtOH et d'une base, à savoir une solution aqueuse d'ammoniaque à 28% ou de la TEA, a été utilisé comme éluant en gradient de polarité croissante. Une double révélation des plaques de chromatographie sur couche mince a été réalisée sous UV et avec le système NBP/KOH.

Le gradient d'élution a été adaptée aux différents dérivés, dont les polarités varient au regard de la longueur de la chaîne et de la nature des substituants de la fonction amine III^{aire}. A titre d'exemple, le composé *N,N*-diméthyle substitué 23d à chaîne courte à deux atomes de carbone a été élué avec un mélange AcOEt/EtOH/TEA avec un gradient allant de 90/10/0,5 à 60/40/2 (v/v/v). Les composés benzylés ont été élués quant à eux, avec des mélanges moins polaires. Pour le composé à chaîne butyle 26b, un mélange AcOEt/EtOH/TEA avec des ratios 95/5/0,5 à 85/15/1 (v/v/v) a été utilisé, à titre d'exemple.

Le recours à une base dans la composition de l'éluant est justifié par la polarité de l'amine III^{aire}, qui peut se trouver également présente dans le brut réactionnel sous sa forme chlorhydrate. En

Malgré l'utilisation d'un éluant basique, une forme protonée a été observée pour certaines prodrogues amines III^{aires}, comme pour le composé **23a**, par exemple. La quantité de base présente dans la fraction éluee semble insuffisante par rapport à la quantité totale de produit **23a** élué (~420 mg). La distinction entre la forme protonée et sa base conjuguée est possible grâce à l'analyse du spectre de RMN ¹H qui montre un glissement vers les champs faibles des signaux relatifs aux protons du méthylène et des méthyles en α de l'atome d'azote de l'amine III^{aire} lorsqu'il est chargé positivement (**Tableau 5**).

Chemical structures of compounds 23a, 23b, 23c, and 23d are shown. The structures are color-coded: blue for 'b' and red for 'a'.

23a: [*]N(b)(c1ccc(cc1)CCc2ccc(cc2)CCc3ccc(cc3)CCc4ccc(cc4)CCc5ccc(cc5)CCc6ccc(cc6)CCc7ccc(cc7)CCc8ccc(cc8)CCc9ccc(cc9)CCc10ccc(cc10)CCc11ccc(cc11)CCc12ccc(cc12)CCc13ccc(cc13)CCc14ccc(cc14)CCc15ccc(cc15)CCc16ccc(cc16)CCc17ccc(cc17)CCc18ccc(cc18)CCc19ccc(cc19)CCc20ccc(cc20)CCc21ccc(cc21)CCc22ccc(cc22)CCc23ccc(cc23)CCc24ccc(cc24)CCc25ccc(cc25)CCc26ccc(cc26)CCc27ccc(cc27)CCc28ccc(cc28)CCc29ccc(cc29)CCc30ccc(cc30)CCc31ccc(cc31)CCc32ccc(cc32)CCc33ccc(cc33)CCc34ccc(cc34)CCc35ccc(cc35)CCc36ccc(cc36)CCc37ccc(cc37)CCc38ccc(cc38)CCc39ccc(cc39)CCc40ccc(cc40)CCc41ccc(cc41)CCc42ccc(cc42)CCc43ccc(cc43)CCc44ccc(cc44)CCc45ccc(cc45)CCc46ccc(cc46)CCc47ccc(cc47)CCc48ccc(cc48)CCc49ccc(cc49)CCc50ccc(cc50)CCc51ccc(cc51)CCc52ccc(cc52)CCc53ccc(cc53)CCc54ccc(cc54)CCc55ccc(cc55)CCc56ccc(cc56)CCc57ccc(cc57)CCc58ccc(cc58)CCc59ccc(cc59)CCc60ccc(cc60)CCc61ccc(cc61)CCc62ccc(cc62)CCc63ccc(cc63)CCc64ccc(cc64)CCc65ccc(cc65)CCc66ccc(cc66)CCc67ccc(cc67)CCc68ccc(cc68)CCc69ccc(cc69)CCc70ccc(cc70)CCc71ccc(cc71)CCc72ccc(cc72)CCc73ccc(cc73)CCc74ccc(cc74)CCc75ccc(cc75)CCc76ccc(cc76)CCc77ccc(cc77)CCc78ccc(cc78)CCc79ccc(cc79)CCc80ccc(cc80)CCc81ccc(cc81)CCc82ccc(cc82)CCc83ccc(cc83)CCc84ccc(cc84)CCc85ccc(cc85)CCc86ccc(cc86)CCc87ccc(cc87)CCc88ccc(cc88)CCc89ccc(cc89)CCc90ccc(cc90)CCc91ccc(cc91)CCc92ccc(cc92)CCc93ccc(cc93)CCc94ccc(cc94)CCc95ccc(cc95)CCc96ccc(cc96)CCc97ccc(cc97)CCc98ccc(cc98)CCc99ccc(cc99)CCc100ccc(cc100)CCc101ccc(cc101)CCc102ccc(cc102)CCc103ccc(cc103)CCc104ccc(cc104)CCc105ccc(cc105)CCc106ccc(cc106)CCc107ccc(cc107)CCc108ccc(cc108)CCc109ccc(cc109)CCc110ccc(cc110)CCc111ccc(cc111)CCc112ccc(cc112)CCc113ccc(cc113)CCc114ccc(cc114)CCc115ccc(cc115)CCc116ccc(cc116)CCc117ccc(cc117)CCc118ccc(cc118)CCc119ccc(cc119)CCc120ccc(cc120)CCc121ccc(cc121)CCc122ccc(cc122)CCc123ccc(cc123)CCc124ccc(cc124)CCc125ccc(cc125)CCc126ccc(cc126)CCc127ccc(cc127)CCc128ccc(cc128)CCc129ccc(cc129)CCc130ccc(cc130)CCc131ccc(cc131)CCc132ccc(cc132)CCc133ccc(cc133)CCc134ccc(cc134)CCc135ccc(cc135)CCc136ccc(cc136)CCc137ccc(cc137)CCc138ccc(cc138)CCc139ccc(cc139)CCc140ccc(cc140)CCc141ccc(cc141)CCc142ccc(cc142)CCc143ccc(cc143)CCc144ccc(cc144)CCc145ccc(cc145)CCc146ccc(cc146)CCc147ccc(cc147)CCc148ccc(cc148)CCc149ccc(cc149)CCc150ccc(cc150)CCc151ccc(cc151)CCc152ccc(cc152)CCc153ccc(cc153)CCc154ccc(cc154)CCc155ccc(cc155)CCc156ccc(cc156)CCc157ccc(cc157)CCc158ccc(cc158)CCc159ccc(cc159)CCc160ccc(cc160)CCc161ccc(cc161)CCc162ccc(cc162)CCc163ccc(cc163)CCc164ccc(cc164)CCc165ccc(cc165)CCc166ccc(cc166)CCc167ccc(cc167)CCc168ccc(cc168)CCc169ccc(cc169)CCc170ccc(cc170)CCc171ccc(cc171)CCc172ccc(cc172)CCc173ccc(cc173)CCc174ccc(cc174)CCc175ccc(cc175)CCc176ccc(cc176)CCc177ccc(cc177)CCc178ccc(cc178)CCc179ccc(cc179)CCc180ccc(cc180)CCc181ccc(cc181)CCc182ccc(cc182)CCc183ccc(cc183)CCc184ccc(cc184)CCc185ccc(cc185)CCc186ccc(cc186)CCc187ccc(cc187)CCc188ccc(cc188)CCc189ccc(cc189)CCc190ccc(cc190)CCc191ccc(cc191)CCc192ccc(cc192)CCc193ccc(cc193)CCc194ccc(cc194)CCc195ccc(cc195)CCc196ccc(cc196)CCc197ccc(cc197)CCc198ccc(cc198)CCc199ccc(cc199)CCc200ccc(cc200)CCc201ccc(cc201)CCc202ccc(cc202)CCc203ccc(cc203)CCc204ccc(cc204)CCc205ccc(cc205)CCc206ccc(cc206)CCc207ccc(cc207)CCc208ccc(cc208)CCc209ccc(cc209)CCc210ccc(cc210)CCc211ccc(cc211)CCc212ccc(cc212)CCc213ccc(cc213)CCc214ccc(cc214)CCc215ccc(cc215)CCc216ccc(cc216)CCc217ccc(cc217)CCc218ccc(cc218)CCc219ccc(cc219)CCc220ccc(cc220)CCc221ccc(cc221)CCc222ccc(cc222)CCc223ccc(cc223)CCc224ccc(cc224)CCc225ccc(cc225)CCc226ccc(cc226)CCc227ccc(cc227)CCc228ccc(cc228)CCc229ccc(cc229)CCc230ccc(cc230)CCc231ccc(cc231)CCc232ccc(cc232)CCc233ccc(cc233)CCc234ccc(cc234)CCc235ccc(cc235)CCc236ccc(cc236)CCc237ccc(cc237)CCc238ccc(cc238)CCc239ccc(cc239)CCc240ccc(cc240)CCc241ccc(cc241)CCc242ccc(cc242)CCc243ccc(cc243)CCc244ccc(cc244)CCc245ccc(cc245)CCc246ccc(cc246)CCc247ccc(cc247)CCc248ccc(cc248)CCc249ccc(cc249)CCc250ccc(cc250)CCc251ccc(cc251)CCc252ccc(cc252)CCc253ccc(cc253)CCc254ccc(cc254)CCc255ccc(cc255)CCc256ccc(cc256)CCc257ccc(cc257)CCc258ccc(cc258)CCc259ccc(cc259)CCc260ccc(cc260)CCc261ccc(cc261)CCc262ccc(cc262)CCc263ccc(cc263)CCc264ccc(cc264)CCc265ccc(cc265)CCc266ccc(cc266)CCc267ccc(cc267)CCc268ccc(cc268)CCc269ccc(cc269)CCc270ccc(cc270)CCc271ccc(cc271)CCc272ccc(cc272)CCc273ccc(cc273)CCc274ccc(cc274)CCc275ccc(cc275)CCc276ccc(cc276)CCc277ccc(cc277)CCc278ccc(cc278)CCc279ccc(cc279)CCc280ccc(cc280)CCc281ccc(cc281)CCc282ccc(cc282)CCc283ccc(cc283)CCc284ccc(cc284)CCc285ccc(cc285)CCc286ccc(cc286)CCc287ccc(cc287)CCc288ccc(cc288)CCc289ccc(cc289)CCc290ccc(cc290)CCc291ccc(cc291)CCc292ccc(cc292)CCc293ccc(cc293)CCc294ccc(cc294)CCc295ccc(cc295)CCc296ccc(cc296)CCc297ccc(cc297)CCc298ccc(cc298)CCc299ccc(cc299)CCc300ccc(cc300)CCc301ccc(cc301)CCc302ccc(cc302)CCc303ccc(cc303)CCc304ccc(cc304)CCc305ccc(cc305)CCc306ccc(cc306)CCc307ccc(cc307)CCc308ccc(cc308)CCc309ccc(cc309)CCc310ccc(cc310)CCc311ccc(cc311)CCc312ccc(cc312)CCc313ccc(cc313)CCc314ccc(cc314)CCc315ccc(cc315)CCc316ccc(cc316)CCc317ccc(cc317)CCc318ccc(cc318)CCc319ccc(cc319)CCc320ccc(cc320)CCc321ccc(cc321)CCc322ccc(cc322)CCc323ccc(cc323)CCc324ccc(cc324)CCc325ccc(cc325)CCc326ccc(cc326)CCc327ccc(cc327)CCc328ccc(cc328)CCc329ccc(cc329)CCc330ccc(cc330)CCc331ccc(cc331)CCc332ccc(cc332)CCc333ccc(cc333)CCc334ccc(cc334)CCc335ccc(cc335)CCc336ccc(cc336)CCc337ccc(cc337)CCc338ccc(cc338)CCc339ccc(cc339)CCc340ccc(cc340)CCc341ccc(cc341)CCc342ccc(cc342)CCc343ccc(cc343)CCc344ccc(cc344)CCc345ccc(cc345)CCc346ccc(cc346)CCc347ccc(cc347)CCc348ccc(cc348)CCc349ccc(cc349)CCc350ccc(cc350)CCc351ccc(cc351)CCc352ccc(cc352)CCc353ccc(cc353)CCc354ccc(cc354)CCc355ccc(cc355)CCc356ccc(cc356)CCc357ccc(cc357)CCc358ccc(cc358)CCc359ccc(cc359)CCc360ccc(cc360)CCc361ccc(cc361)CCc362ccc(cc362)CCc363ccc(cc363)CCc364ccc(cc364)CCc365ccc(cc365)CCc366ccc(cc366)CCc367ccc(cc367)CCc368ccc(cc368)CCc369ccc(cc369)CCc370ccc(cc370)CCc371ccc(cc371)CCc372ccc(cc372)CCc

122

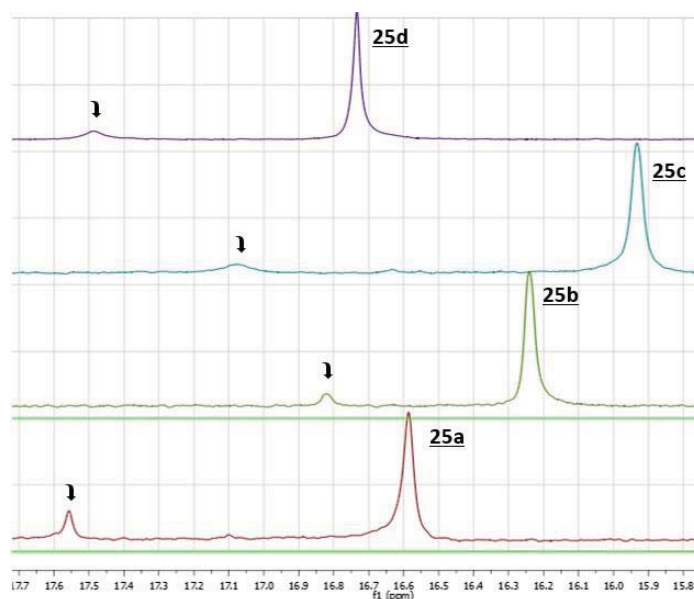


Figure 81: RMN ^{31}P des composés **25a-d** montrant la présence constante d'une impureté phosphorée (16,8 à 17,6 ppm)

L'examen du spectre RMN ^1H de ces mêmes fractions montre une certaine disproportionnalité entre les intégrations, d'une part des protons de la chaîne alkyle et du phosphorodiamidate, et d'autre part du proton H-4 imidazolique. Ce constat, illustré par la **Figure 82**, suggère une co-élution d'un sous-produit de la réaction, dont la structure comprend la partie moutarde et le partie amine, mais pas la partie imidazole. Cette observation pourrait s'expliquer par une double substitution de l'amine (ici l'amine **20**) sur le dichlorure d'acide phosphoramidique restant **8**, générant l'entité **25AA** dont la structure serait en accord avec les signaux supplémentaires observés en RMN ^1H .

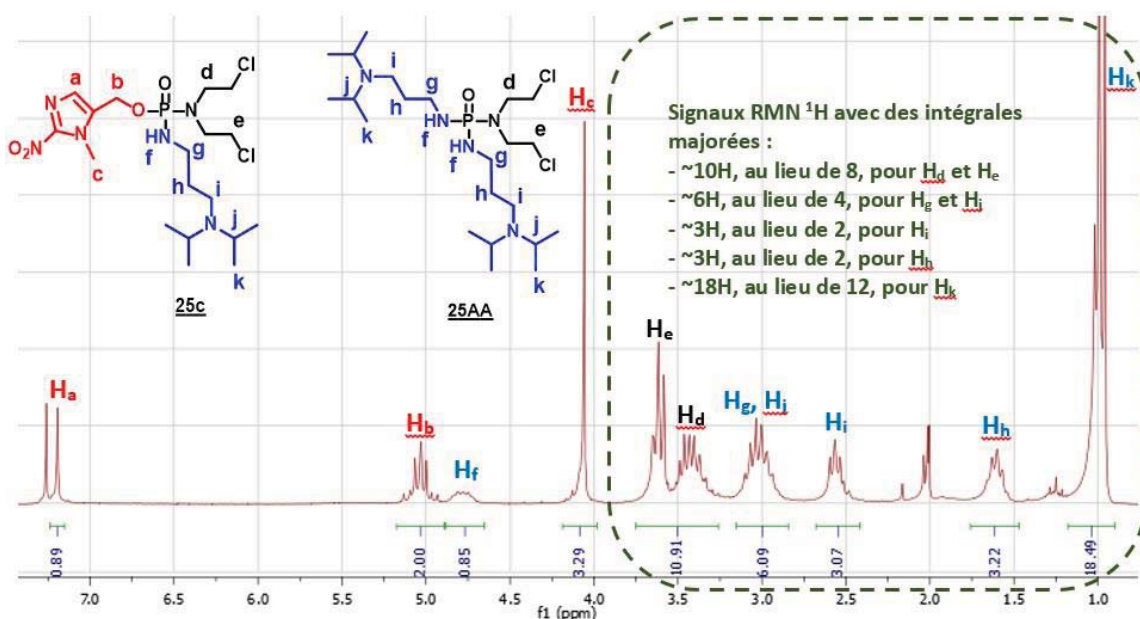


Figure 82: Spectre RMN ^1H (dans le CDCl_3) de la fraction majoritaire élue lors de la synthèse du composé **25c** (structures des composés **25c** et de l'impureté présumée **25AA**)

Cette réaction indésirable semble survenir le plus souvent avec les amines di-isopropyliques, probablement en rapport avec une réactivité modifiée par l'encombrement stérique de l'amine III^{aire}. En raison d'une polarité voisine avec les dérivés **25a-c** correspondants, les sous-produits de couplage présumés co-élueraient avec ceux-ci. En CCM, ces sous-produits ne révèlent pas sous irradiation UV (i.e. à 254 nm), mais apparaissent sous la forme d'une tâche violette avec le révélateur NBP/KOH avec un R_f très légèrement inférieur à celui des dérivés **25a-c**. De ce fait, la purification par chromatographie sur colonne des composés isopropyliques **25a-c** a nécessité une attention particulière avec une augmentation très progressive du gradient de polarité de l'éluant. Malgré cette précaution, une seconde purification de la fraction éluee s'est imposée afin d'atteindre des taux de pureté satisfaisants, ce qui a induit inévitablement une perte en termes de quantité de produit isolé.

En conclusion, le couplage entre l'alcool 6, le dichlorure 8 et les amines 18-22, conduit aux produits 23-27 à des rendements variant entre 18 et 78%. Cette réaction de phosphorylation est donc une des étapes limitantes de la séquence réactionnelle d'accès aux dérivés 28-32.

1.3.2 ELEMENTS D'ELUCIDATION STRUCTURALE

Les composés **23-27** ont été caractérisés par les différentes techniques spectrales classiques : IR, RMN ¹H, ¹³C et ³¹P et HRMS.

↳ **La spectroscopie Infrarouge** : L'ensemble des spectres montre des caractéristiques communes à tous les composés de la série :

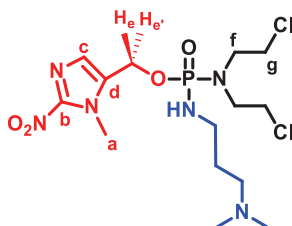
- 1) une bande large et peu intense vers 3200 cm⁻¹, identifiée comme la vibration d'élongation de la liaison NH ;
- 2) la liaison double P=O du phosphorodiamidate est mise en évidence par une bande intense vers 1220 cm⁻¹ correspondant à la vibration d'élongation alors que celle de la liaison simple P-O apparaît vers 1000 cm⁻¹ ;
- 3) la fonction nitro est identifiée *via* ses deux bandes d'absorption intenses correspondant à l'élongation asymétrique vers 1490 cm⁻¹ et symétrique vers 1350 cm⁻¹ ;
- 4) les dérivés benzylés montrent en plus des vibrations de déformation hors du plan des liaisons C-H du noyau benzénique monosubstitué vers 700 cm⁻¹.

↳ **Résonance Magnétique Nucléaire du ³¹P** : le signal du phosphore des structures **23-27** apparaît dans la zone comprise entre 16,4 à 16,9 ppm dans le CDCl₃ et ~ 18,3 ppm dans le CD₃OD, comparativement à la référence H₃PO₄ à 1% dans le D₂O placée dans un tube coaxial.

↳ **Résonance Magnétique Nucléaire ¹H et ¹³C** :

- 1) Les signaux des protons et carbones appartenant à la structure nitroimidazole et dichlorophosphorodiamidate possèdent des déplacements chimiques quasi identiques entre les composés de la série. Nous présentons dans le **Tableau 6** ceux du composé **23c**, à titre d'exemple.

Tableau 6: Déplacements chimiques (en ppm, dans le CDCl₃), multiplicités et constante de couplage des signaux RMN ¹H et ¹³C relatifs aux entités 2-nitroimidazole et dichlorophosphorodiamidate pour le composé **23c**



	RMN ¹ H	RMN ¹³ C
a	4,06 (s)	34,50
b	-	146,46
c	7,19 (s)	129,10
d	-	133,13 (d, ³ J _{C-P} = 7,9 Hz)
e, e'	5,07 (dd, ² J _{H-H} = 13,3 Hz, ³ J _{H-P} = 7,6 Hz) et 4,99 (dd, ² J _{H-H} = 13,3 Hz, ³ J _{H-P} = 7,2 Hz)	56,22 (d, ² J _{C-P} = 4,0 Hz)
f	3,49-3,32 (m)	49,44 (d, ² J _{C-P} = 4,7 Hz)
g	3,66-3,56 (m)	42,76

La proximité de l'atome de phosphore, qui est un centre asymétrique, induit une diastéréotopie au niveau des protons géminés **e** et **e'** du méthylène en 5 de l'imidazole. En effet, dans le cas des composés **23-37**, le phosphore est tétra-coordonné et asymétriquement substitué, ce qui en fait un centre chiral. Le couplage entre les protons géminés **e** et **e'** est visualisé par une constante de couplage ²J_{H-H} ~ 13 Hz, tandis que le couplage vicinal entre ces protons et le phosphore se traduit par une constante ³J_{H-P} ~ 7 Hz (**Figure 83**). L'apparition de ces deux protons magnétiquement non équivalents sous la forme de deux doublets dédoublés peut faire défaut, notamment en utilisant un spectromètre RMN de champs moyens (200 ou 300 MHz). Dans ce cas, δ_{He} et δ_{He'} se rapprochent et on évolue vers un système **A₂**, correspondant à deux protons isochrones résonnant à la même fréquence. On observe alors simplement un doublet comme le résultat du couplage avec le phosphore.

Un couplage carbone-phosphore est observé pour le carbone du méthylène en 5 de l'imidazole, avec une constante de couplage ²J_{C-P} de l'ordre de 4 Hz.

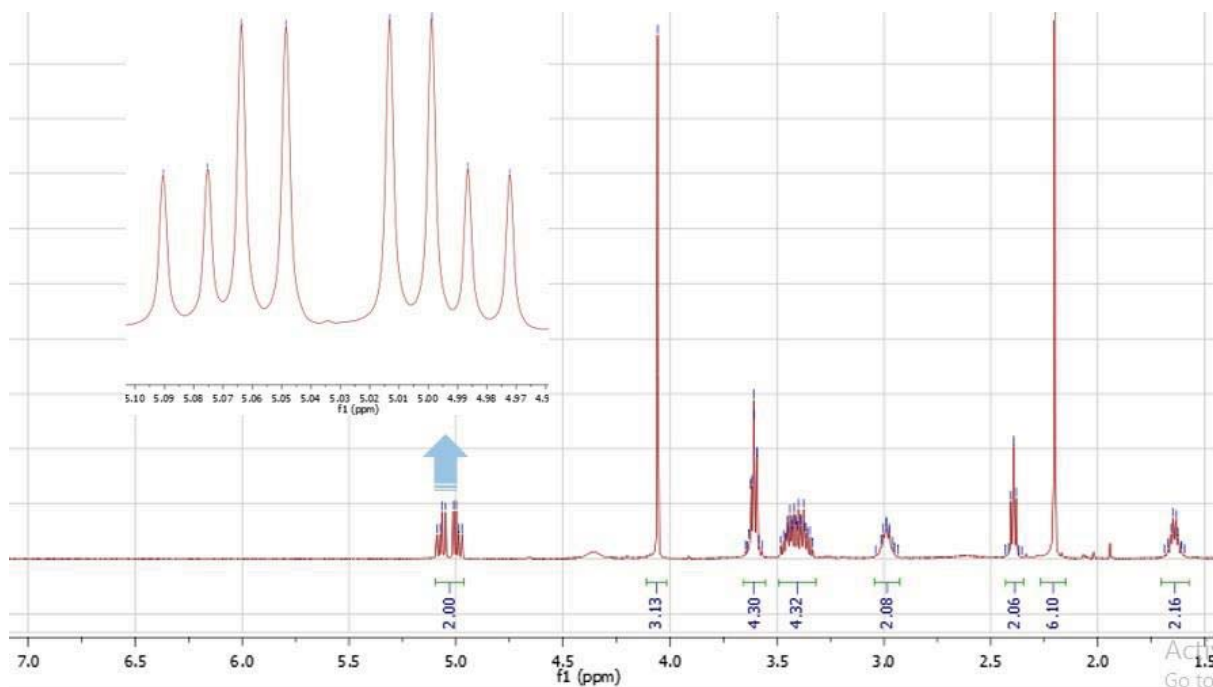


Figure 83: Mise en évidence du couplage H-H et H-P dans le cas des protons CH_2OP du composé **23c** (dans le CDCl_3 , 500 MHz)

Pour la partie bis(2-chloroéthyle), les protons du méthylène en α du chlore sont plus déblindés que ceux en position β (3,6 ppm *versus* 3,7 ppm, respectivement), tandis que l'inverse est observé pour les carbones correspondants (43 ppm *versus* 50 ppm, respectivement). Le signal du carbone en position β apparaît sous la forme d'un doublet avec une constante de couplage $^2J_{\text{C-P}}$ de l'ordre de 4-5 Hz, alors que celui en α est généralement un singulet.

2) Les données spectrales en RMN ^1H et ^{13}C relatives à la chaîne alkyle du vecteur sont homogènes au sein d'une série. Il en est de même pour les groupements alkyles des substituants R_1 et R_2 . En RMN ^{13}C , nous pouvons observer pour la très grande majorité des composés **23-27**, une constante de couplage $^3J_{\text{C-P}} = 6-7$ Hz entre le phosphore et le carbone en position γ du phosphore sur la chaîne alkyle. Par contre en RMN ^1H , les multiplicités parfois complexes des signaux des protons en position β et γ du phosphore ne permettent généralement pas de calculer de constantes de couplage phosphore-proton. Seul un couplage $^3J_{\text{H-P}} = 8-10$ Hz pour le méthylène du groupement CH_2NHP a pu être calculé pour deux composés **23b** et **23c**.

3) Concernant le proton échangeable NH de la fonction phosphoramidate, sa présence en RMN ^1H n'est pas constante. Il apparaît à des déplacements chimiques variables sous la forme d'un singulet ou d'un triplet élargi d'intégration 1, et dans de rares cas sous la forme d'un triplet dédoublé avec des constantes $^3J_{\text{H-H}} \sim 7$ Hz et $^2J_{\text{H-P}} = 11$ Hz dans le cas du composé **23a**, par exemple.

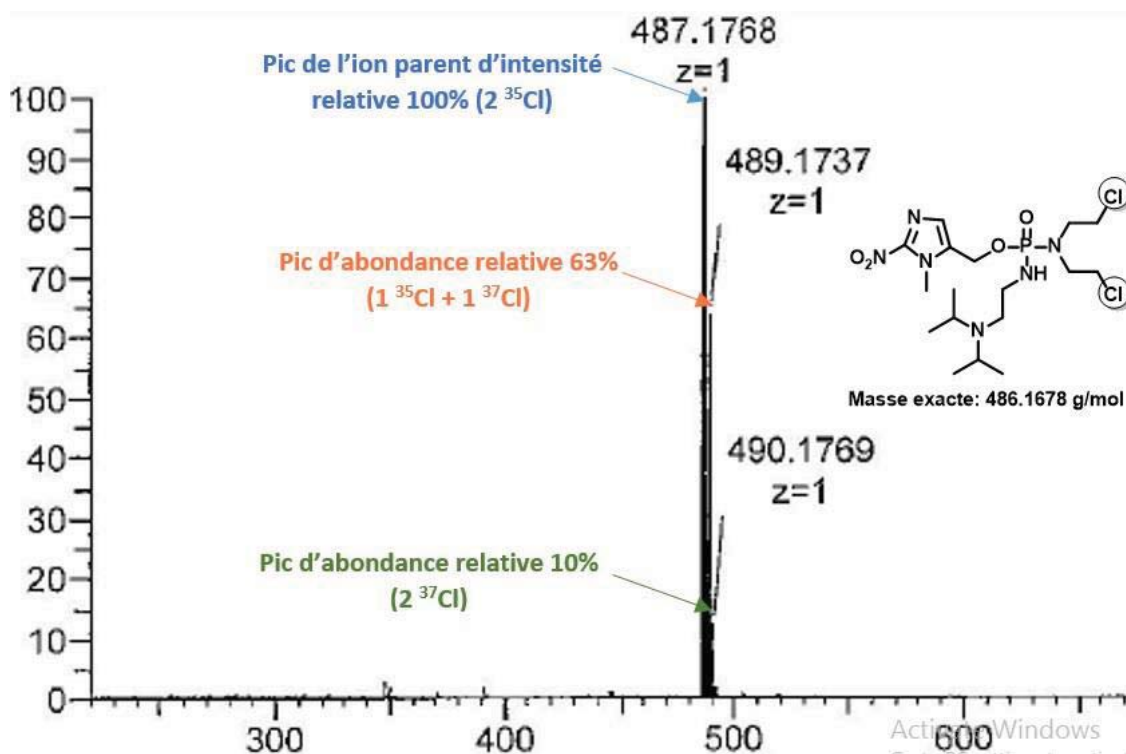


Spectrométrie de Masse Haute Résolution :

La structure des dérivés **23-27** a été confirmée par analyse par spectrométrie de masse à haute résolution (*High Resolution Mass Spectra, HRMS*), objectivant la présence d'un amas isotopique de l'ion moléculaire $[\text{M}+\text{H}]^+$. Peu de pics ou amas, correspondant à des produits issus de la

fragmentation de l'ion moléculaire sont observés, en raison de la technique d'ionisation utilisée, l'électrospray, qui génère une ionisation douce et donne naissance au cation $[M+H]^+$.

Pour l'ensemble des dérivés **23-27**, comme cela est exemplifié pour le composé **25d** (Figure 84), l'amas isotopique est caractéristique d'un composé possédant 2 atomes de chlore car il est constitué d'un massif de pics dont les valeurs de m/z sont séparées de 2 u.m.a et dont les abondances relatives sont 100, 63 et 10 respectivement. Cela est dû à l'existence de deux isotopes pour l'atome de chlore, le ^{35}Cl et le ^{37}Cl d'abondances naturelles respectives 75,7705 et 24,2295%, donc un rapport 1/3. Le pic de l'ion parent, d'intensité relative 100, n'est porteur que de l'isotope léger, alors que celui à $[M+H]^+ = + 2$ u.m.a est constitué d'un isotope lourd et un autre léger; celui à $[M+H]^+ = + 4$ u.m.a est constitué de deux isotopes lourds.



1.4 SYNTHÈSE DES COMPOSÉS VECTORISÉS AMMONIUMS QUATÉNAIRES

1.4.1 SYNTHÈSE

Les composés amines III^{aires} **23-27** ont été convertis en leurs dérivés ammoniums quaternaires (AQ) correspondants **28-32**, par l'action d'un iodure d'alkyle (de méthyle ou d'éthyle) (**Figure 85**).

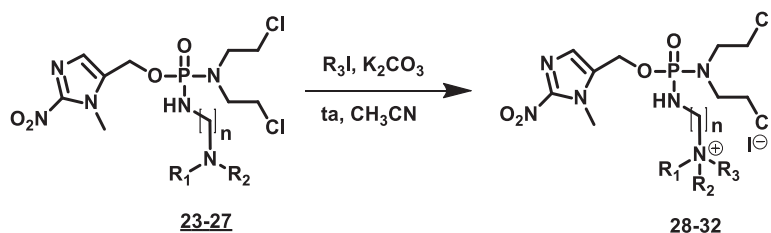


Figure 85: Réaction de quaternisation des précurseurs amines III^{aires} **23-27**

Pour la synthèse du « lead » **ICF05016**, deux conditions étaient utilisées pour la quaternisation :

- CH₃I en excès (6 équivalents) dans le THF, à température ambiante,
- CH₃I en excès (6 équivalents) dans l'acétonitrile en présence de carbonate de sodium, à température ambiante.

Les premières conditions permettent d'obtenir le produit quaternisé par simple évaporation, alors que les secondes nécessitent une filtration préalable, mais permettent de partir de la forme base comme chlorhydrate des dérivés **23-27**.

Nos premiers essais de quaternisation de la série d'amines III^{aires} ont été réalisés sur le dérivé **23a** et ont permis de définir les conditions de la réaction pour l'ensemble des composés de la série. Ce précurseur **23a** (205 mg) a été mis en présence de 6 équivalents d'iodure de méthyle, dans le THF anhydre à température ambiante. La réaction a été laissée sous agitation avec un contrôle régulier de son évolution par CCM sur plaque de silice, moyennant un éluant ternaire polaire de type AcOEt/EtOH/NH₄OH dans les proportions 70/30/1 (v/v/v). Une double révélation sous lumière UV et avec le système NBP/KOH a été réalisée. Au bout de trois jours d'agitation, la CCM montrait encore la présence de produit de départ et formation du sel AQ, reconnu *via* une tâche au point de dépôt de la plaque. Du carbonate de sodium a donc été ajouté dans le milieu réactionnel (6 équivalents) afin de favoriser la réaction de quaternisation. Toutefois, un reste de produit de départ était encore présent quelques heures après. Une solubilisation incomplète de l'amine **23a** dans le THF, traduite par l'aspect trouble initial du milieu réactionnel, a été mise en cause et nous a amené à changer le solvant de la réaction (de l'ACN au lieu du THF). L'agitation du milieu réactionnel pendant 4 h a enfin abouti à une conversion totale de l'amine **23a** en AQ correspondant.

S'appuyant sur cet essai, les conditions suivantes ont été adoptées pour la réalisation des réactions de quaternisation des amines III^{aires} **23-27** :

- L'ACN anhydre (de qualité ExtraDry® ou séchée sur tamis moléculaire 4A°) a été utilisée comme solvant de réaction ;
- La réaction a été réalisée à température ambiante ;

- Une base de type carbonate de potassium (plutôt que le carbonate de sodium car moins pulvérulente donc plus facile à éliminer par filtration) a été utilisée en excès (6 équivalents) ;
- De l'iodure d'alkyle a été initialement introduit en excès de 5 à 24 équivalents. Des ajouts peuvent ensuite être nécessaires, par fractions de 6 à 24 équivalents, selon l'évolution de la réaction contrôlée par CCM. L'agitation a été maintenue jusqu'à conversion totale du produit de départ. L'iodure de méthyle et d'éthyle ont été utilisés pour la réaction de quaternisation car ils se présentent à l'état liquide à température ambiante contrairement à leurs équivalents chlorure et bromure qui sont des gaz, excepté pour le bromure d'éthyle qui a une température d'ébullition de 38 °C.
- La réaction a été menée dans une verrerie de petite contenance et de fermeture étanche (de type ballon scellé ou pilulier) afin de permettre une saturation rapide de la phase gazeuse en vapeurs d'iodure d'alkyle et de limiter son évaporation (les iodures d'alkyles utilisés sont relativement volatils avec une température d'ébullition ~ 40 et 70 °C pour l'iodure de méthyle et l'iodure d'éthyle, respectivement).

Le brut réactionnel a été traité comme suit : une filtration préliminaire a été réalisée permettant d'éliminer le carbonate de potassium en suspension ; le précipité a été rincé avec de l'ACN et le filtrat concentré sous pression réduite, en maintenant le bain marie de l'évaporateur rotatif à une température ne dépassant pas 30 °C. Le résidu obtenu est ensuite remis en solution dans un minimum d'acétone pour faire précipiter le reste de carbonate de potassium (dissout partiellement dans l'acétonitrile). La suspension a été filtrée et le filtrat évaporé longuement à sec sous pression réduite, toujours avec les mêmes précautions de température.

Une série de 27 dérivés AQ **28-32** ont pu être préparés selon ces conditions de réaction et de traitement du brut réactionnel (**Tableau 7**). La plupart de ces composés (22 sur un total de 27) ont été obtenus avec d'excellents rendements (majoritairement > 80 %) et une pureté satisfaisante après simple évaporation de l'excès d'iodure de méthyle ou d'éthyle, tandis que les autres (**28c**, **28g**, **29g**, **29h** et **31g**) ont été purifiés par chromatographie liquide préparative à haute performance (colonne C18, gradient d'acétonitrile dans l'eau) suivie par une lyophilisation. La pureté analytique a été jugée satisfaisante devant l'absence d'impuretés révélées dans les spectres RMN ¹H et ¹³C, associée à un taux d'impuretés estimées en RMN ³¹P à moins de 5 % en intégrales globales.

Tableau 7: Liste des prodrogues AQ 28-32

#	n	R ₁	R ₂	R ₃	N _{eq} (iodure d'alkyle)	Temps de réaction (h)	Rdt (%)
28a	5	Me	Me	Me	6	4	96
28b	4	Me	Me	Me	12	4	92
ICF05016	3	Me	Me	Me	6	4	100
28c	2	Me	Me	Me	5	24	77
28d	5	Me	Me	Et	24	36	70
28e	4	Me	Me	Et	12	4	69
28f	3	Me	Me	Et	24	24	92
28g	2	Me	Me	Et	12	24	70
29a	5	Et	Et	Me	12	12	88
29b	4	Et	Et	Me	12	24	86
29c	3	Et	Et	Me	6	4	93
29d	2	Et	Et	Me	12	25	79
29e	5	Et	Et	Et	18	16	90
29f	4	Et	Et	Et	36	56	78
29g	3	Et	Et	Et	36	72	23
29h	2	Et	Et	Et	24	50	60
30a	5	<i>i</i> -Pr	<i>i</i> -Pr	Me	24	48	100
30b	4	<i>i</i> -Pr	<i>i</i> -Pr	Me	24	72	83
30c	3	<i>i</i> -Pr	<i>i</i> -Pr	Me	24	96	96
30d	2	<i>i</i> -Pr	<i>i</i> -Pr	Me	48	96	83
31a	5	Bn	Me	Me	6	20	96
31b	4	Bn	Me	Me	6	20	100
31c	3	Bn	Me	Me	6	20	93
31d	2	Bn	Me	Me	12	12	100
31e	5	Bn	Me	Et	54	72	100
31f	4	Bn	Me	Et	48	72	100
31g	3	Bn	Me	Et	72	72	32
31h	2	Bn	Me	Et	Non isolé pur		
32	3	pipéridinyl		Me	12	24	99

Comme nous pouvons le noter au travers du **Tableau 7**, la réaction de quaternisation montre une grande variabilité inter-composés, en termes du nombre d'équivalents d'iodure d'alkyle utilisés (6 à 72 équivalents), de temps réactionnel (4 à 96 h) et de pureté du brut réactionnel obtenu. L'examen de l'ensemble des données du tableau permet d'extraire certaines conclusions :



Introduction d'un méthyle ou d'un éthyle sur un azote *N,N*-diméthyle ou *N,N*-diéthyle substitué

Lors de l'introduction d'un méthyle sur un azote *N,N*-diméthyle ou *N,N*-diéthyle substitué, une conversion totale a été atteinte et ce parfois très rapidement (~4 h), ne nécessitant pas l'ajout répété d'iodure de méthyle. En revanche, l'introduction d'un éthyle notamment pour les amines *N,N*-diéthyliques a nécessité, quant-à-elle, un temps de réaction plus important allant jusqu'à 3 j et l'ajout répété d'un excès d'iodure d'éthyle (18 à 36 équ.). Pour ces dérivés, l'encombrement stérique au niveau de l'azote de l'amine III^{aire} est vraisemblablement responsable d'un ralentissement de la cinétique de la réaction d'alkylation.

Une particularité, exemplifiée par la **Figure 86**, est à noter lors de l'éthylation menant aux composés **28g**, **29g** et **29h** possédant une chaîne éthylique ou propylique : les spectres RMN ³¹P des différents bruts réactionnels montrent la présence d'un signal à ~24 ppm, alors que le pic principal correspondant aux dérivés **28g**, **29g** et **29h** apparaît à ~17 ppm dans le CD₃OD. Les taux d'impureté en termes d'intégrales en RMN ³¹P varient entre 6 et 15 % pour les différents composés.

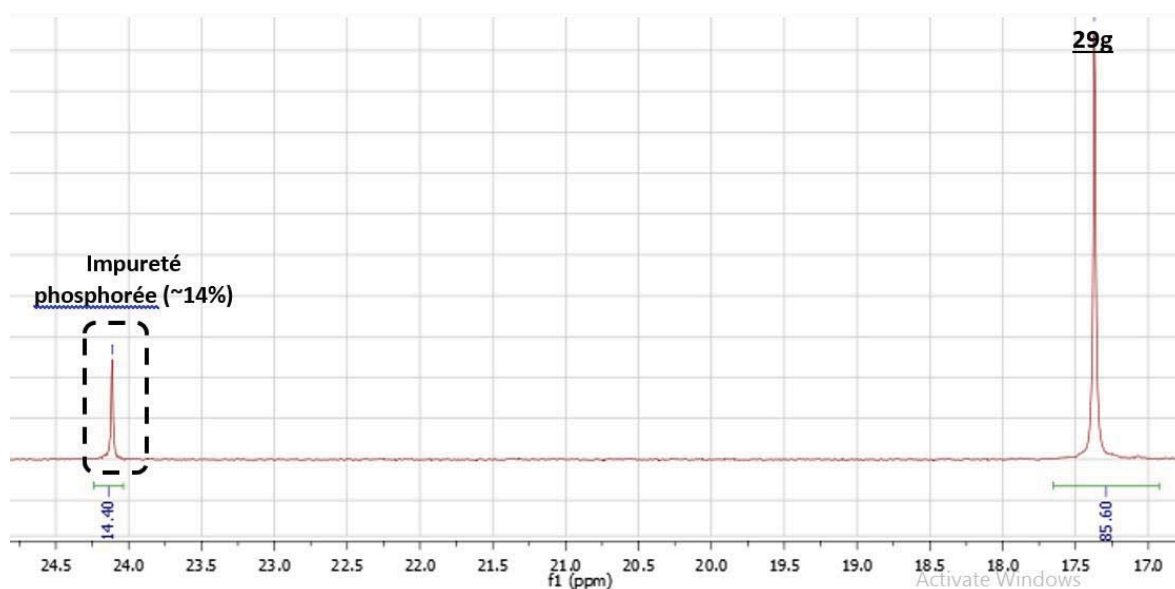


Figure 86: Spectre RMN ³¹P du brut réactionnel du composé **29g**

Parallèlement, l'analyse des spectres RMN ¹H des différents brut réactionnels montre la présence d'un signal supplémentaire dans la zone aromatique où ne devrait apparaître que le singulet relatif au proton de l'imidazole, comme cela est exemplifié sur la **Figure 87** pour le composé **29g**.

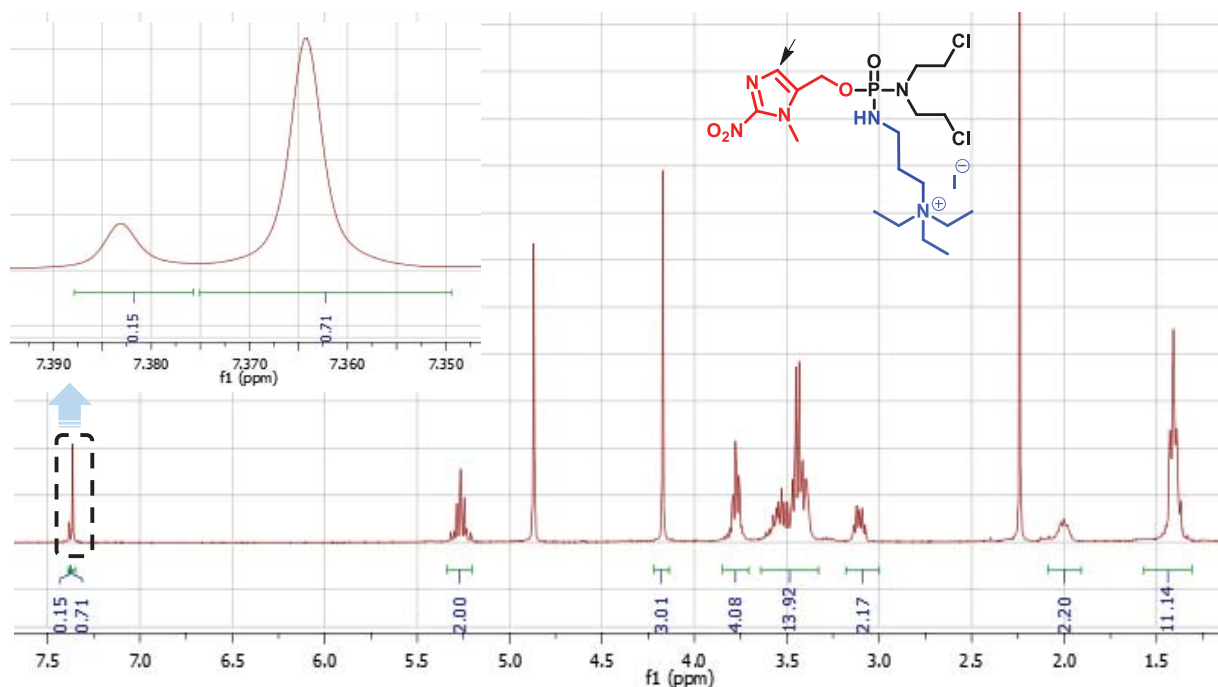


Figure 87: Spectre RMN ^1H du brut réactionnel du composé **29g**

En RMN ^{13}C , nous notons également la présence de petits signaux juxtaposés aux signaux relatifs au composé cible, comme cela est visible sur la **Figure 88**.

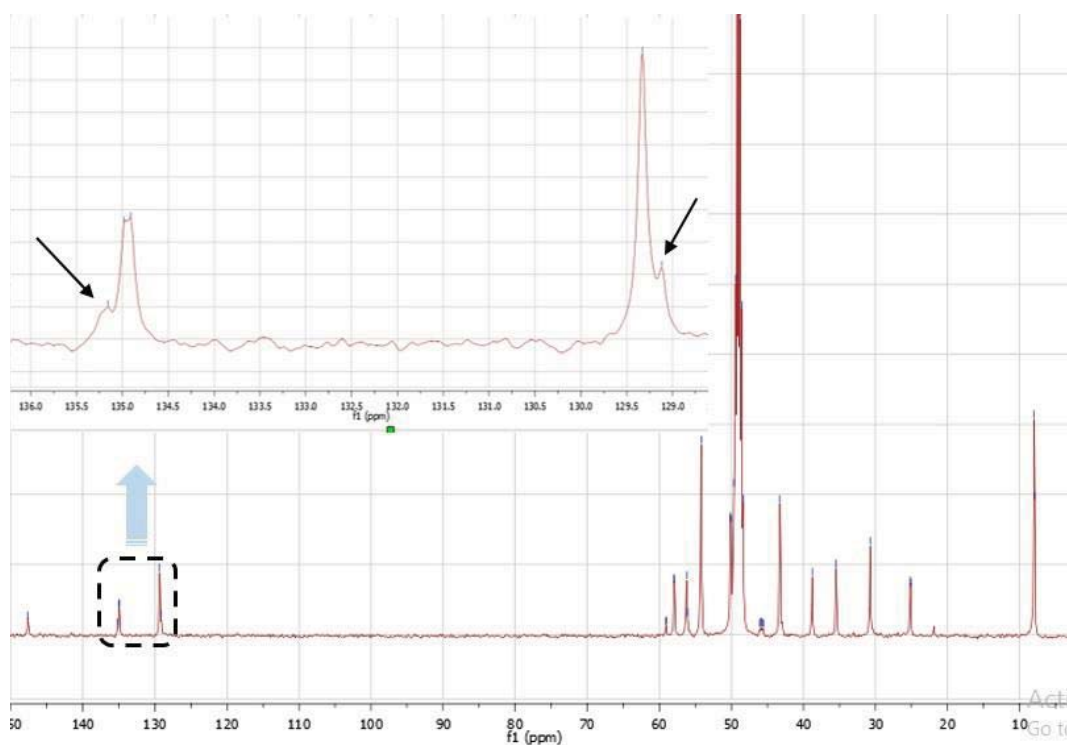


Figure 88: Spectre RMN ^{13}C (dans le CD_3OD , 500 MHz) du brut réactionnel du composé **29g**

Partant de ces observations, il semblerait que l'impureté formée ait une structure très proche de celle du composé AQ correspondant. Grâce à l'acquisition récente au laboratoire d'un système

CombiflashEZprep (Teledyne ISCO) permettant la réalisation d'une chromatographie liquide préparative à haute performance en phase inverse, nous avons finalement pu isoler le composé **29h** ainsi que son impureté (signal à 24,35 ppm sur le spectre RMN ^{31}P). La purification a été réalisée sur une colonne C18 en utilisant un gradient d'ACN dans l'eau puis les fractions ont été lyophilisées. Les données HRMS obtenues pour l'impureté montrent la présence d'un ion moléculaire à m/z 451.1984 u.m.a, qui pourrait correspondre à la perte d'une molécule d'HCl (36 u.m.a). Une analyse spectrale complète basée sur les données HRMS et RMN ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC, ^{31}P nous a permis de proposer une structure pour cette impureté : la 2-oxyde-diazaphospholidine obtenue par 1,5-*N*-alkylation intramoléculaire du composé **29h** (Figure 89).

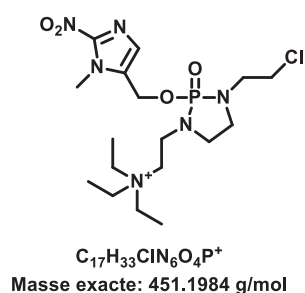


Figure 89: Structure présumée de l'impureté issue de la cyclisation intramoléculaire



Introduction d'un méthyle sur une amine *N,N*-diisopropylique

Des difficultés de quaternisation liées vraisemblablement à l'encombrement stérique ont également été rencontrées lors de la préparation de dérivés *N,N*-diisopropyle-*N*-méthyle **30a-d**. La synthèse de ces dérivés a nécessité des temps réactionnels supérieurs à 2 j et d'autant plus longs que la longueur de la chaîne alkyle était courte : 96 h pour le dérivé à chaîne éthyle et propyle **30c-d**, *versus* 48 h pour le dérivé à chaîne pentyle **30a**. Pour le dérivé **30d** à courte chaîne éthyle, l'ajout d'un excès plus important d'iodure de méthyle, a été nécessaire comparativement aux trois autres dérivés. L'introduction d'un méthyle sur l'azote de l'amine tertiaire *N,N*-diisopropylique se trouve donc davantage entravée par une courte chaîne alkyle, ce qui pourrait être lié à un agencement spatial non propice à l'attaque nucléophile de l'azote sur l'iodure d'éthyle.

Les quatre dérivés *N,N*-diisopropyle-*N*-méthyle **30a-d** ont été obtenus après évaporation avec une pureté analytique satisfaisant à nos exigences et avec de bons rendements allant de 83 à 100%.

L'impact négatif de l'encombrement stérique lors de l'étape de la quaternisation, s'est confirmé lorsque nous avons souhaité obtenir des AQ de type *N,N*-diméthyle-*N*-isopropyle en introduisant un isopropyle sur le dérivé *N,N*-diméthyle substitué **23a** *via* l'utilisation de l'iodure d'isopropyle. Ainsi, un large excès de ce dernier (~ 72 éq.) n'a pas permis de consommer l'intégralité du précurseur **23a** et ce après plus de 72 h d'agitation à température ambiante. Le milieu réactionnel a été alors porté à reflux durant une nuit. Bien que la CCM suggère une quaternisation totale, l'analyse du brut réactionnel par RMN ^{31}P a montré la présence de plusieurs pics dans la zone entre 24 et 29 ppm, synonyme d'une dégradation du produit lors du chauffage (Figure 90). Ces produits n'ont pas été identifiés, mais là encore un pic à 25 ppm semble indiquer une 1,5-*N*-alkylation intramoléculaire du composé **23a**.

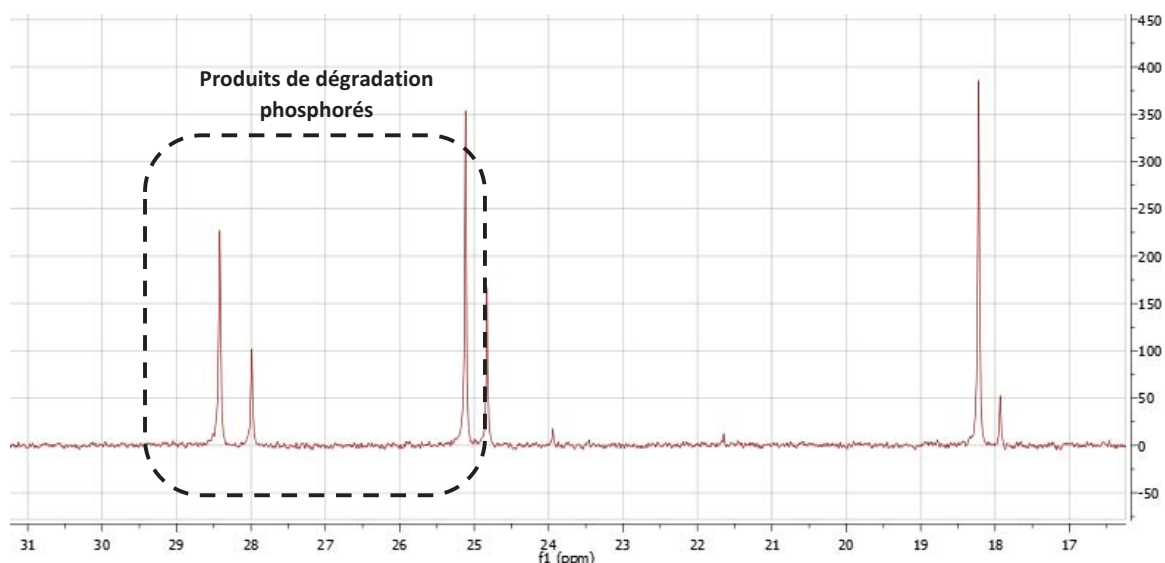


Figure 90: Spectre RMN ^{31}P du brut réactionnel issu de la réaction à reflux entre l'iodure d'isopropyle et le composé **23a**



Introduction d'un méthyle ou éthyle sur un azote *N*-benzyle-*N*-méthyle substitué

Au sein de la série des dérivés *N*-benzyle-*N*-méthyle substitués **31a-h**, l'introduction d'un méthyle s'est révélée plus aisée avec un temps réactionnel maximal de 20 h et l'utilisation d'un excès modéré d'iodure de méthyle (6 équivalents hormis pour le dérivé éthylique **31d**).

En revanche, l'introduction d'un éthyle sur ces structures fut là encore problématique pour les dérivés à courte chaîne éthyle et propyle **31g-h**, le dérivé éthylique **31h** n'ayant d'ailleurs pas pu être isolé. En effet, lors de la synthèse de ce composé **31h**, la conversion totale du précurseur **26d** a requis 5 j de réaction en présence d'un large excès d'iodure d'éthyle (100 équ.) et a conduit majoritairement à la formation d'impuretés à 25 ppm (> 80 % mis en évidence par spectre ^{31}P), soit vraisemblablement la 2-oxyde-diazaphospholidine correspondante (**Figure 91**). Ceci est également appuyé par l'analyse HRMS : un pic est observé à $m/z = 499,2001$ u.m.a, correspondant à une différence de 36 u.m.a par rapport au pic de l'AQ, en accord avec une 1,5-*N*-alkylation intramoléculaire.

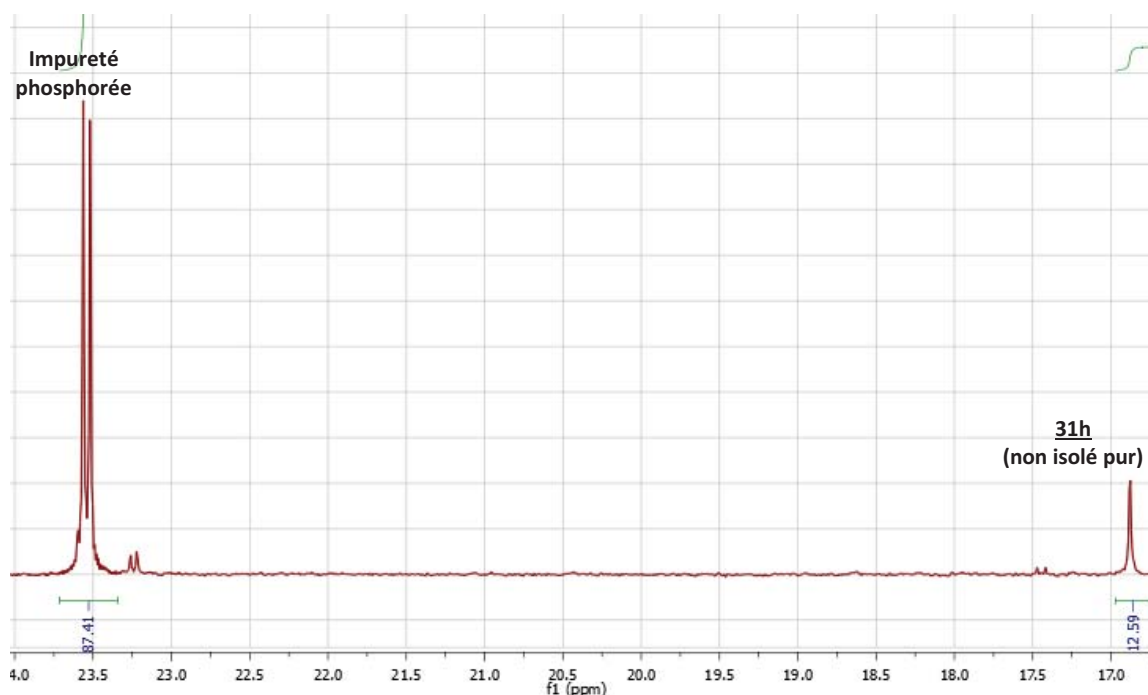


Figure 91: Spectre RMN ^{31}P du brut réactionnel du composé **31h**

En conclusion, cette réaction indésirable rencontrée pour les dérivés **28g**, **29g**, **29h**, **31g** et **31h** semble être en corrélation avec la longueur de la chaîne alkyle et/ou de l'encombrement stérique des substituants sur l'amine III^{aire}, entravant sa quaternisation par l'iodure d'éthyle. En effet, les temps de réactions accrus et l'utilisation de larges excès d'iodure d'éthyle, semblent favoriser une 1,5-N-alkylation intramoléculaire.

*En conclusion, l'ensemble des produits envisagés ont pu être obtenus (à l'exception du dérivé **31h**) et ce avec d'excellents rendements (majoritairement > 80 %) et une pureté analytique satisfaisante. En vue des études biologiques, nous nous étions fixés comme critères de pureté, l'absence d'impuretés révélées dans les spectres RMN ^1H et ^{13}C , associée à un taux d'impuretés estimées en RMN ^{31}P à moins de 5% en intégrales globales. Ces critères ont été atteints soit directement après simple évaporation de l'iodure d'éthyle en excès, soit moyennant une purification par HPLC préparative sur colonne C18 avec un éluant eau/ACN, pour les composés **28g**, **29g**, **29h** et **31g**. Pour ces derniers, ils sont obtenus sous la forme de lyophilisats hygroscopiques voire même déliquescents. Les autres se présentent sous la forme d'huiles de couleur jaune orangé. En vue des études biologiques, les composés sont conservés sous atmosphère inerte à -20 °C.*

1.4.2 ELEMENTS D'ELUCIDATION STRUCTURALE

Les structures et la pureté des dérivés AQ ont été confirmées par des techniques d'analyses spectrales et les principales caractéristiques sont rapportées ci-après, notamment celles prouvant la quaternisation :

 Résonance Magnétique Nucléaire :

En RMN ^1H et ^{13}C , l'analyse des spectres des différents composés **28-32** montre notamment un glissement des signaux relatifs aux protons et carbones des méthylène(s) ou méthyle(s) en α de l'azote de l'AQ, vers la zone des champs faibles comparativement à leurs précurseurs amines III^{aires} **23-27**, tel qu'illustré dans le pour le composé **31c** et son précurseur **26c** (**Tableau 8**).

Les analyses ont été principalement réalisées dans le méthanol deutéré (CD_3OD). Le diméthylsulfoxyde deutéré ($\text{DMSO}-d_6$) a également été utilisé et permet, en outre, de visualiser le seul proton échangeable de la structure, à savoir le **NH**.

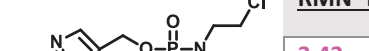
En RMN ^{31}P , le phosphore du phosphorodiamidate résonne vers $\sim 18 \pm 0,4$ ppm pour tous les composés de la série, comparativement à la référence H_3PO_4 .

Tableau 8: Déplacements en RMN ^1H (500 Mz) et ^{13}C (126 MHz) dans le CD_3OD des protons et carbones des méthylènes et méthyle(s) en α de l'azote du dérivé AQ 31c, comparativement à son précurseur 26c



26c

RMN ¹ H	RMN ¹³ C
2,53	56,39
2,21	42,01
3,42	62,75



31c

RMN ¹ H	RMN ¹³ C
3,43	63,67
3,07	50,67 et 50,65
4,58	69,31

 Spectrométrie de masse haute résolution :

La structure AQ a été confirmée par analyse HRMS, objectivant la présence d'un amas isotopique de l'ion moléculaire $[M]^+$.

L'analyse du spectre de masse de plusieurs composés de la série permet de détecter la présence d'un 2^{ème} amas isotopique, généralement de très faible intensité avec un $\Delta m/z \sim +92$ u.m.a. par rapport au signal $[M]^+$ (**Figure 92**). Cette différence correspond à la substitution d'un chlore par un iode. Pour les composés **28c** et **31d**, une di-iodation a même été observée, traduite sur les spectres HRMS par un pic de très faible intensité relative, d'une $\Delta m/z \sim +92$ u.m.a. par rapport à l'amas isotopique de l'impureté mono-iodée. Ces substitutions ont pu s'opérer lors de l'analyse HRMS ou éventuellement lors de la réaction de quaternisation. Notons toutefois que la présence de ces dérivés mono et di-iodés sur les spectres de masse de certains composés, ne s'accompagne pas de la détection de pics indésirables en RMN, notamment en RMN ^{31}P , ce qui confirmerait plutôt une substitution dans la source au moment de l'analyse et non lors de la quaternisation.

Enfin, un pic en amont de l'amas isotopique $[M]^+$ a été observé sur certains spectres HRMS avec une $\Delta m/z \sim -36$ u.m.a, correspondant probablement au départ d'une molécule d'acide

chlorhydrique (**Figure 92**). Il s'agit, en effet, d'une voie de fragmentation connue des composés organochlorés. La présence de ce pic n'est alors pas liée à la présence d'un signal à environ 25 ppm en RMN ^{31}P , comme cela fut le cas lors de la 1,5-*N*-alkylation intramoléculaire mise en évidence pour le composé **29h**.

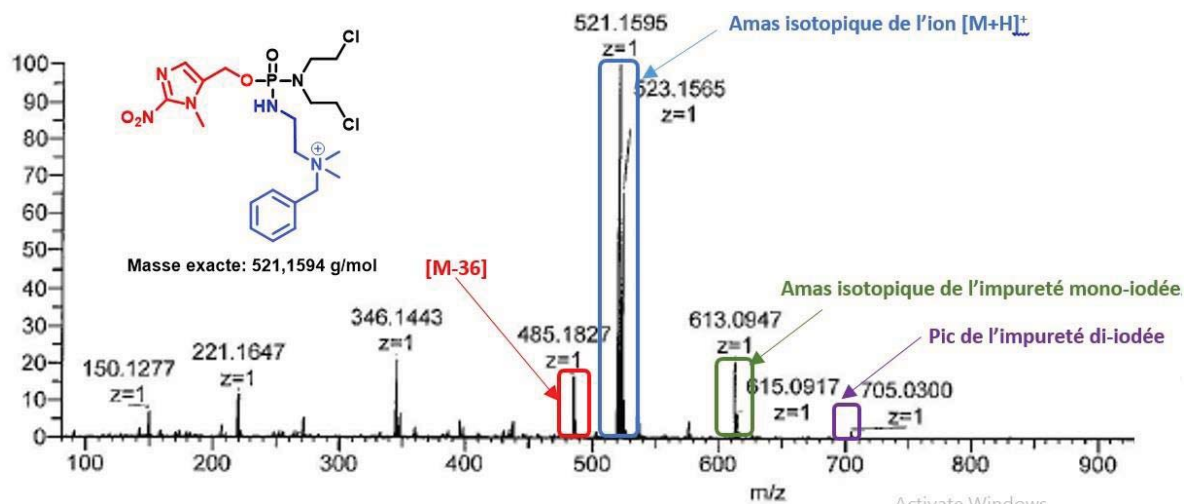


Figure 92: Spectre HRMS du composé **31d**

1.5 EVALUATION BIOLOGIQUE DES DERIVES AQ 28-32 : AFFINITE POUR L'AGGRECAN, DIFFERENTIEL DE CYTOTOXICITE EN NORMOXIE VERSUS HYPOXIE ET CLIVAGE EN MILIEU HYPOXIQUE

Une évaluation biologique des divers composés synthétisés 28-32, en termes d'affinité pour l'aggrécane, de différentiel de cytotoxicité en normoxie *versus* hypoxie et de clivage par réduction chimique ou enzymatique, mimant des conditions d'hypoxie, a été réalisée par les biologistes de l'unité IMoST.

Les résultats ont fait l'objet d'une récente publication dans *l'European Journal of Medicinal Chemistry*, qui est jointe à ce manuscrit à la fin de ce chapitre, et ne seront donc ici que brièvement résumés :

Ghedira, D.; Voissière, A.; Peyrode, C.; Kraiem, J.; Gerard, Y.; Maubert, E.; Vivier, M.; Miot-Noirault, E.; Chezal, J.-M.; Farhat, F.; et al. Structure-Activity Relationship Study of Hypoxia-Activated Prodrugs for Proteoglycan-Targeted Chemotherapy in Chondrosarcoma. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *158*, 51–67.

☞ Un screening préliminaire des dérivés AQ 28-32 a été d'abord réalisé sur la base de leur affinité à l'aggrécane, quantifiée par la technique de résonance plasmonique de surface (*Surface Plasmonic Resonance, SPR*).

La SPR est une technique basée sur l'exploitation d'un phénomène optique, à savoir la création, suite à l'interaction d'une onde électromagnétique à la surface d'un matériau, de plasmons se propageant ensuite au sein de ce dernier. Ces plasmons correspondent à l'oscillation d'un quantum de densité d'électrons, très délocalisés à l'interface entre deux milieux ayant des différences importantes de constantes diélectriques, l'un étant généralement un métal (Al, Ag, Au, Cu, ...). La résultante de ces oscillations est une onde électromagnétique évanescente se propageant à cette même interface, atteint son maximum à l'interface et régresse de façon évanescente dans les deux milieux. La fréquence de cette onde dépend de l'indice optique local du milieu diélectrique, c'est-à-dire de la quantité de matière présente à l'interface. Les ondes de plasmons de surface sont très sensibles aux changements de l'indice de réfraction du milieu diélectrique extérieur et ont donc été exploitées dans les techniques de réfractométrie fine, dont la résonance des plasmons de surface SPR. Ce phénomène optique constitue la base des biocapteurs SPR développés par la technologie BIAcore® pour l'étude et l'exploration des interactions réversibles protéine-protéine et protéine-petite molécule. Ces interactions inter-moléculaires sont de nature non covalente: des liaisons hydrogène, des interactions électrostatiques, hydrophobes et des forces de Van der Waals (**319, 320**).

Pour évaluer l'affinité des prodrogues vis-à-vis de l'aggrécane, la technologie BIAcore a été utilisée. Rappelons que l'aggrécane (~ 250 MDa) est le PG le plus abondant du cartilage hyalin, avec près de 150 chaînes de GAGs (essentiellement des chaînes de chondroïtine sulfate et de kératane sulfate). L'aggrécane est immobilisé sur une sensor chip et les différentes prodrogues sont injectées par un système microfluidique dans un flux continu de tampon à la surface de cette sensor chip. Les changements de masse induits par l'association ou la dissociation de complexe modifient la réfringence du milieu et décalent la position de l'angle de résonance. Cette variation de l'angle de résonance est suivie en temps réel et permet d'obtenir un sensorgramme sur lequel

sont très nettement visibles les phases d'association, de dissociation et de régénération (**Figure 93**).

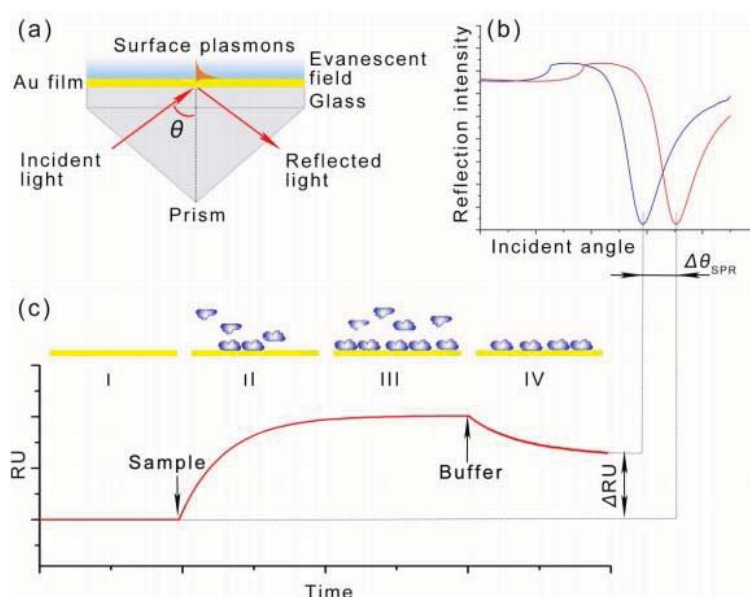


Figure 93: Principe de la SPR et illustration d'un sensorgramme de biodétection (321)

[a/Principe de la SPR. b/ Détection du changement de l'angle de résonance par SPR. c/ Sensorgramme de biodétection décrivant la cinétique d'association et de dissociation de l'analyte injecté sur l'élément de biorecognition immobilisé sur la surface métallique : (I) stabilisation de la sensor chip dans la solution tampon (II) adsorption de la biomolécule sur la sensor chip (III) équilibre d'adsorption et de dissociation (IV) élimination des biomolécules de la surface par rinçage

✎ Compte tenu des résultats de ce premier screening, 12 composés ont été sélectionnés sur la base d'une réponse supérieure ou égale à celle du composé **ICF05016** (**Figure 2 A de la publication**). Leurs constantes de dissociation ont été évaluées à partir des sensorgrammes obtenues à diverses concentrations et sont comprises entre $2,10 \pm 0,13$ et $5,03 \pm 0,21$ mM, traduisant une affinité à l'aggrécane similaire à celle du « lead » ($K_D = 1,29 \pm 0,92$ mM) (**Figure 2B et Tableau 1 de la publication**).

✎ L'activité cytotoxique *in vitro* (CI_{50}) de ces composés a ensuite été évaluée sur une lignée cellulaire de chondrosarcome humain (HEMC-SS), en normoxie *versus* hypoxie (**Figure 94**). Certains composés ont démontré une sélectivité pour l'hypoxie nettement améliorée par rapport au dérivé **ICF05016** (*Hypoxia Cytotoxicity Ratio* HCR = 7), et notamment les dérivés benzylés **31e** et **31f** avec des HCR de 16 et 24, respectivement. La sélectivité de ce dernier composé est tout à fait semblable à celle de l'évofosfamide sur cette lignée cellulaire, aussi ce composé a fait l'objet d'une étude de clivage par réduction chimique et bioréduction.

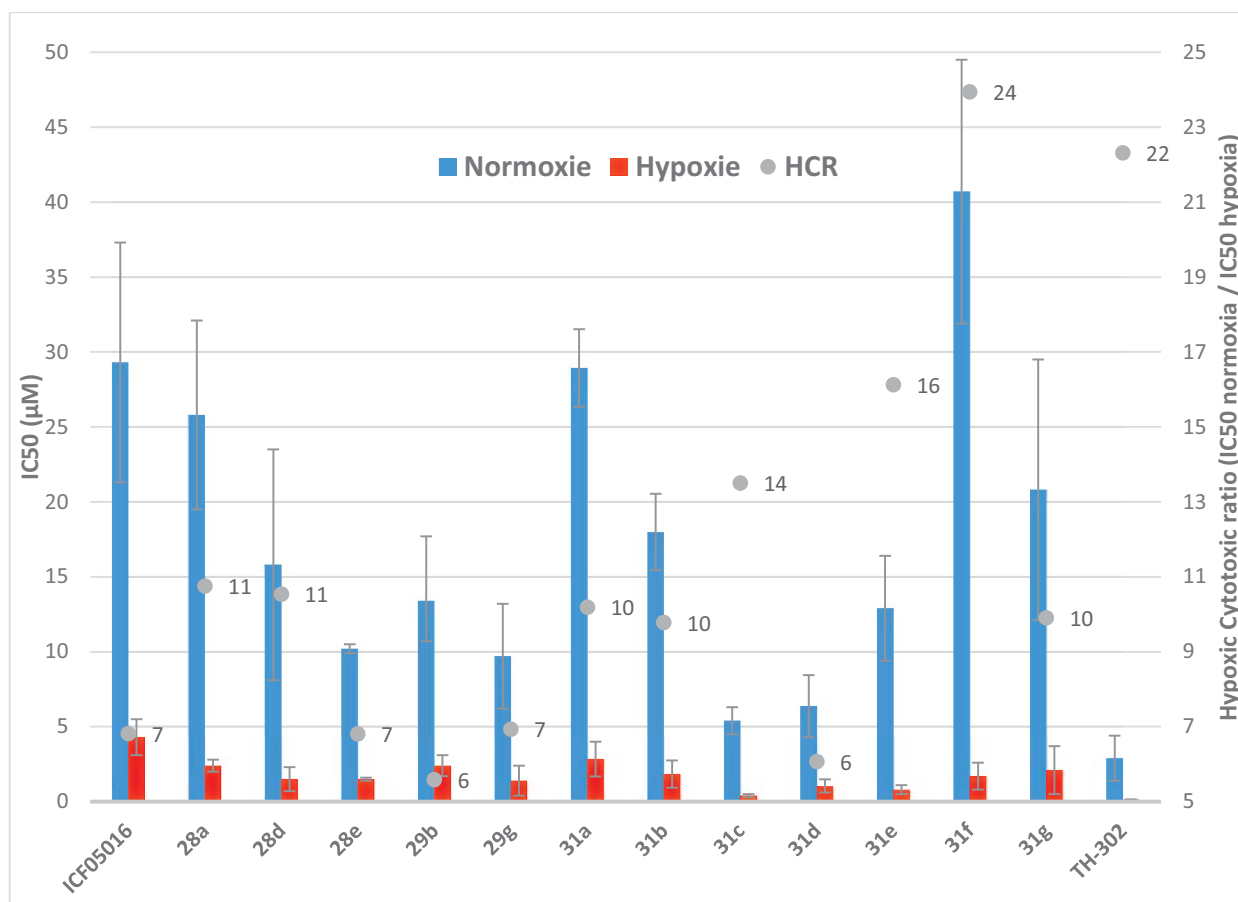


Figure 94: Cytotoxicités des 12 composés sélectionnés en SPR, sur la lignée HEMC-SS, exprimées en IC50 (μM) et différentiels de cytotoxicité en normoxie versus hypoxie

La stabilité du dérivé **31f** a d'abord été vérifiée dans un tampon phosphate à pH 7,4 et dans le plasma, à 37 °C par analyse RMN ³¹P. Les études de clivage, soit en présence d'un réducteur chimique et monitorée par RMN ³¹P, soit par bioréduction par une nitroréductase diélectronique, suivie par HPLC, ont permis de démontrer une conversion à plus de 90% de ce dérivé en moins de 10 min avec libération de la moutarde alkylante correspondante (**Figure 4 de la publication**).

*L'ensemble de ces données prouvent l'intérêt de cette nouvelle molécule **31f**, comme prodrogue activable en hypoxie pour le traitement du CHS.*



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Medicinal Chemistry

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ejmech>

Research paper

Structure-activity relationship study of hypoxia-activated prodrugs for proteoglycan-targeted chemotherapy in chondrosarcoma

Donia Ghedira ^{a, b}, Aurélien Voissière ^a, Caroline Peyrode ^a, Jamil Kraiem ^b, Yvain Gerard ^a, Elise Maubert ^a, Magali Vivier ^a, Elisabeth Miot-Noirault ^a, Jean-Michel Chezal ^a, Farhat Farhat ^b, Valérie Weber ^{a, *}

^a Université Clermont Auvergne, INSERM, U1240 Imagerie Moléculaire et Stratégies Théranostiques, 63000, Clermont-Ferrand, France

^b Laboratoire de Développement Chimique, Galénique et Pharmacologique des Médicaments, Faculté de Pharmacie de Monastir, Université de Monastir, 5000, Monastir, Tunisia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 May 2018

Received in revised form

20 August 2018

Accepted 22 August 2018

Available online 23 August 2018

Keywords:

Hypoxia-activated prodrug

Quaternary ammonium

Chondrosarcoma

Proteoglycan

ABSTRACT

Due to an abundant chondrogenic, poorly vascularized and particularly hypoxic extracellular matrix, chondrosarcoma, a malignant cartilaginous tumour, is chemo- and radio-resistant. Surgical resection with wide margins remains the mainstay of treatment. To address the lack of therapy, our strategy aims to increase anticancer drugs targeting and delivery in the tumour, by leveraging specific chondrosarcoma hallmarks: an extensive cartilaginous extracellular matrix, namely the high negative fixed charge density and severe chronic hypoxia. A dual targeted therapy for chondrosarcoma was investigated by conjugation of a hypoxia-activated prodrug (HAP) to quaternary ammonium (QA) functions which exhibit a high affinity for polyanionic sites of proteoglycans (PGs), the major components of the chondrosarcoma extracellular matrix. Based on preclinical results, an imidazole prodrug, **ICF05016**, was identified and provided the basis for a lead optimization study. A series of 27 QA-phosphoramidate mustard conjugates, differing by the type of QA function and the length of the alkyl linker, was yielded by a common multi-step sequence involving phosphorylation of a key 2-nitroimidazole alcohol. Then, a screening was realized by surface plasmon resonance technology to assess biomolecular interactions between QA derivatives and aggrecan, the most abundant PG in chondrosarcoma. Results revealed that affinity depends more on the type of QA function, than on the linker length. Moreover, the presence of a benzyl group enhanced affinity to aggrecan. Twelve compounds were shortlisted and evaluated for antiproliferative activity (*i.e.*, growth inhibiting concentration 50), under normoxic and hypoxic conditions using the human extraskeletal myeloid chondrosarcoma cell line (HEMC-SS). For all prodrugs, hypoxic selectivity was maintained and even increased, compared with the lead. From this study, compound **31f** emerged as the most effective PG-targeted HAPs with a dissociation constant of 2.10 μ M in the SPR experiment, a hypoxia cytotoxicity ratio of 24 and an efficient reductive cleavage under chemical and enzymatic conditions.

© 2018 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Chondrosarcomas represent a heterogeneous group of rare and slowly-growing types of bone sarcomas sharing common features such as their mesenchymal origin and the presence of a cartilaginous extracellular matrix. Among all primary malignant bone sarcomas, chondrosarcoma is the second most common after

osteosarcoma, but the first in adults [1]. To date, the therapeutic tools available for the management of the disease are very few [2,3]. Surgical resection with wide margins in surrounding non-tumour tissue is still considered the mainstay of treatment and the only recommended therapy for non-metastatic chondrosarcoma, all grades and subtypes included. Well-conducted surgery has been reported to correlate with better control of the disease, *i.e.* lower frequency of local recurrence, and improved overall survival. Nevertheless, wide margin excision is not always possible (in some anatomic locations) or could entail a significant morbidity for the patient [2,4–6]. Also, the current clinical challenge is to prevent

* Corresponding author.

E-mail address: valerie.weber@uca.fr (V. Weber).

recurrences and to offer new treatment options for patients with inoperable primary, recurrent disease, and/or metastases. As regards to radiotherapy and conventional chemotherapy, chondrosarcoma is known as a resistant lesion [7–9] due to tumour's specific hallmarks. Like hyaline cartilage, tumour tissue is marked by a dense and extensive extracellular matrix with poor blood and lymph vascularity, on which a low percentage of dividing cells is embedded. The extracellular matrix creates a physical semi-permeable barrier, which prevents cytotoxic agents reaching their target, *i.e.* tumour chondrocytes, while reduced blood circulation creates severe chronic hypoxia [10]. The latter is also well known to be associated with radio- and chemo-resistance in cancer [11–13].

Given the lack of significant improvement in terms of patient survival over the past three decades, new therapeutic targets, such as isocitrate dehydrogenase, m-TOR and Hedgehog pathway inhibitors have been investigated and are currently used in rational drug design for the development of new targeted therapies [14]. The challenges of translating these drugs into clinical use unfortunately failed and no substance has been approved so far [15,16].

In clinic, commonly used chemotherapies currently target either the highly proliferative nature of cancer cells, or specific receptors that are upregulated in cancer, but often result in side effects leading to potential toxicity and/or causing treatment failure in resistant populations. A new promising option for improving cancer therapies appeared, based on targeting the tumour micro-environment [17,18]. For chondrosarcoma, two physical and chemical hallmarks of the tumour could also be considered as therapeutic opportunities rather than barriers, namely hypoxia and the hyaline extracellular matrix, more precisely, its high proteoglycan (PG) content.

For more than five decades, hypoxia is well recognized as a key feature in cancer progression [11]. Hypoxia leads to low oxygen concentration areas and then to the emergence of tumour cell subpopulations with highly aggressive phenotypes, including increased drug-resistance and amplified anti-apoptotic and metastatic potential. The differences between cells in well-oxygenated normal tissue and hypoxic neoplastic cells were put to use in the development of bioreductive prodrugs activated preferentially in hypoxic regions to specifically release active cytotoxic species [19–23]. This approach emerged more than three decades ago, with tirapazamine being the first hypoxia-activated prodrug (HAP) to undergo clinical trial. However, while multiple different bioreductive prodrugs demonstrating antitumour cytotoxicity against hypoxic cells, like AQ4N, apaziquone, SN30000, evofosfamide (TH-302), PR-104, etc. have been described in literature, none are so far available in the clinical setting. HAPs have in common chemical moieties used as a “trigger” or “oxygen concentration sensor” ensuring activation of the prodrug through a bioreduction process *via* one or two electrons cellular oxidoreductases. Five different chemical groups, *i.e.* nitroaromatics, aromatic *N*-oxides, aliphatic *N*-oxides, quinones and transition metals, are reported in literature as triggers [19–21]. After the reduction step, the link between the trigger and the anti-cancer entity is cleaved and converts the non-toxic prodrug into a toxic molecule achieving hypoxia-selective killing associated with a bystander effect. By means of HAP, the therapeutic window could be extended and higher doses could be administered, providing therefore greater therapeutic potential.

In chondrosarcoma, HAP activity could be hampered by inefficient physical distribution to tumour chondrocytes due to the cartilaginous matrix barrier. Using the physical and chemical properties of the extensive cartilaginous extracellular matrix of chondrosarcoma, namely the high negative fixed charge density created by the presence of PGs, may be an attractive way of adding to these HAP therapies targeted-drug delivery. In effect, PGs are glycoproteins highly expressed in the chondrosarcoma

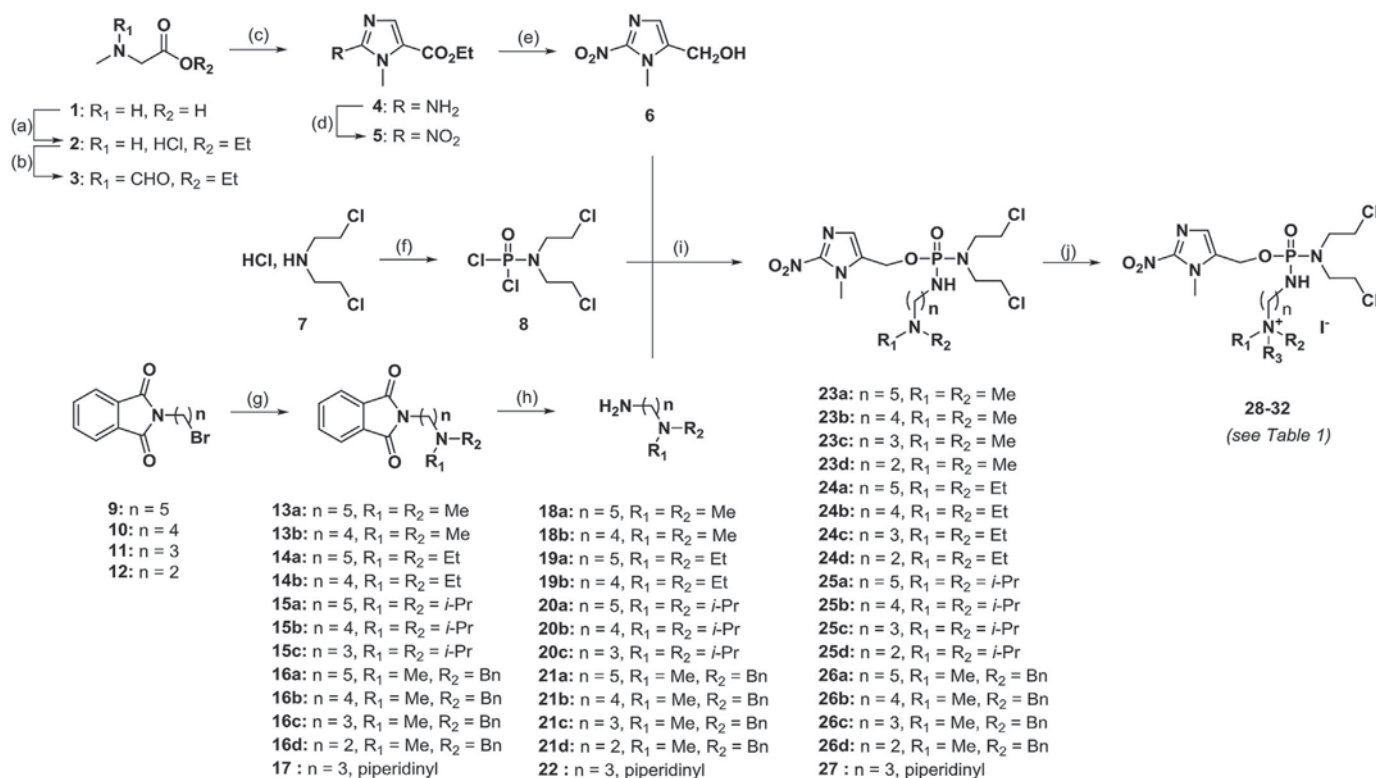
extracellular matrix [24], with numerous sulphate and carboxylate groups on their glycosaminoglycan moieties. This extracellular PG-targeting approach using a quaternary ammonium (QA) function was previously validated in chondrosarcoma preclinical models, with radiotracers for scintigraphic imaging [25,26] or DNA-alkylating agents for therapy [27,28]. More recently, this dual targeting therapy for chondrosarcoma was investigated and led to the identification of the first PG-targeting HAP, 3-({[bis(2-chloroethyl)amino][(1-methyl-2-nitro-1*H*-imidazol-5-yl)methoxy]phosphoryl]amino)-*N,N,N*-trimethyl-propane-1-ammonium iodide, named **ICF05016** [29]. The latter is a nitroheteroaryl-based compound designed as follows: a phosphoramidic mustard functionalized with a QA function, and a 2-nitroimidazole group tethered to the phosphorous atom to trigger fragmentation and then release the bis-alkylating mustard anion by bioreduction in hypoxic tissues. Aggrecan binding of **ICF05016** was confirmed from the dissociation constant determined by surface plasmon resonance (SPR), as well as hypoxic-cytotoxicity ratio (HCR) on the HEMC-SS cell line. In a HEMC-SS tumour-bearing mice model, treatment with **ICF05016** provides a significant inhibition of tumour growth with no associated haematological side effects, a decrease in the mitotic index and increased DNA damage predominantly found in pimonidazole-positive hypoxic areas [29].

Based on these results, we intend to begin a lead optimization study of **ICF05016**. Herein, we report the synthesis and characterization of a series of QA-targeted phosphoramidic mustard conjugates **28–32** differing by the nature of the QA function and the length of the alkyl linker binding the QA to the mustard (Scheme 1). Then, we screened by SPR their direct binding ability to aggrecan. Short-listed compounds were evaluated in terms of HCR in the HEMC-SS cell line to provide more knowledge on the structure-activity relationships existing between the nature of the linker and the *in vitro* cytotoxicity of these QA-targeted HAPs. Finally, stability in both phosphate buffer and plasma, activation and phosphoramidic mustard release under reductive chemical conditions, and nitroreductase-based activation were demonstrated for the most potent derivative.

2. Results and discussion

2.1. Chemistry

Target compounds **28–32** were obtained by quaternization of the tertiary amine function of compounds **23–27** *via* a two-step reaction sequence: phosphorylation of the key hydroxymethyl 2-nitroimidazole intermediate **6** by phosphoramidic dichloride **8**, followed by the introduction of the QA alkyl chain by substitution of the remaining chloride by a series of diamines **18–22** (Scheme 1). The latter were prepared according to a Gabriel synthesis protocol starting from the appropriate alkyl halide. Briefly, *N*-bromoalkylphthalimides **9–12** with alkyl chain ranging from two to five carbons were produced in moderate to excellent yields (43–98%) by alkylation of commercial potassium phthalimide with the corresponding dibromoalkane following a slightly modified procedure of the method described by Hu et al. [30]. Nucleophilic substitution of derivatives **9–12** in acetonitrile with dimethyl-, diethyl-, diisopropyl- or benzylmethanamines afforded intermediates **13–17** [31,32]. Hydrazinolysis of the latter under reflux afforded directly *N*-benzyl-*N*-alkyldiamines **21a–d** and 3-(piperidin-1-yl)propanamine **22** in good to excellent yields (76–98%), whereas short-path distillation was required for *N,N*-dialkyldiamines **18–20** leading to moderate yields (22–61%). To note, elimination of the Gabriel phthalhydrazide by-product was insured by a slightly modified work up protocol compared to the literature [31], namely a twice acidic precipitation at low



Scheme 1. Reagents and conditions: (a) EtOH, $SOCl_2$, $-10^\circ C$, then $55^\circ C$, overnight, **97%**; (b) ethyl formate, K_2CO_3 , EtOH, rt, overnight, **85%**; (c) (1) ethylformate, NaH, anh THF, $0^\circ C$, rt, overnight, (2) HCl 37%, EtOH, $110^\circ C$, 2 h, (3) NH_2CN , EtOH/ H_2O , pH 3, reflux, 1.5 h, **61%**; (d) $NaNO_2$, AcOH, $-5^\circ C$, then rt, overnight, **75%**; (e) $NaBH_4$, LiBr, THF/MeOH/ H_2O , $<10^\circ C$, rt, 19 h, **68%**; (f) $POCl_3$, $130-140^\circ C$, 80 h, **57%**; (g) HNR_1R_2 , K_2CO_3 , ACN or THF, reflux, 24 h, **35-93%**; (h) hydrazine hydrate (60% aqueous solution), EtOH, reflux, 12 h, **22-99%**; (i) (1) $LiN(TMS)_2$, anh THF, **8**, $-78^\circ C$, 15–80 min (duration determined by ^{31}P NMR monitoring); (2) amines **18-22** or commercial amines, anh THF, $-78^\circ C$, 5–75 min (duration determined by ^{31}P NMR monitoring), **22-78%**; (j) alkyl iodide, K_2CO_3 , anh ACN, rt, 4–96 h, **60-100%**.

temperature. Following this general three-steps procedure, the twelve diamines **18a-b**, **19a-b**, **20a-c**, **21a-d** and **22** were obtained from potassium phthalimide in overall yields ranging from 15 to 77%.

The (1-methyl-2-nitro-1H-imidazol-5-yl)methanol (**6**) is the key intermediate for synthesis of our QA-targeted HAPs. The 1-methyl-2-nitroimidazole group was chosen as common trigger for the designed molecules. Among bioreductive nitroaryl-triggers used in HAPs, like the 4-nitrobenzyl group, nitro-imidazole-, nitro-furan- and nitrothiophene-based groups, the 1-methyl-2-nitroimidazole group has been used the most widely, generally showing the best tendency to undergo bioreduction and, consecutively selective cleavage at low oxygen concentrations. Hence, a 1-methyl-2-nitroimidazole group was embedded in the well-investigated evofosfamide, a HAP of bromo-isophosphoramidate mustard reaching phase III clinical trials against soft tissue sarcoma [33] and pancreatic cancer (MAESTRO study) [34,35]. Evofosfamide appeared for the first time in a series of nitroaromatics including nitrothiophenes and nitrofurans, developed by Duan *et al.* in 2008 [36] and emerged as the most potent HAP of the series.

The synthesis of (1-methyl-2-nitro-1H-imidazol-5-yl)methanol (**6**) was built on the work published by Cavalleri *et al.* [37] and patented by Matteucci *et al.* [38], starting from *N*-methylglycine (**1**) and improved later by O'Connor *et al.* [39,40]. Synthesis of 1-methyl-2-nitroimidazole derivatives appears as a challenging and fastidious task, as recently reviewed. O'Connor *et al.* published in 2016 [40] a careful and detailed description of the experimental protocol with emphasis on critical steps, precautions to be taken and the optimal reaction times for each step. More precisely, it

turned out that the synthesis of the intermediate amino ester **4** represents the most critical step, associated with the lowest yields (ranging from 10 to 25% according to the Matteucci *et al.* patent to 50% in the O'Connor protocol).

According to the procedure outlined in Scheme 1, *N*-methylglycine was first converted to the corresponding ethyl ester hydrochloride salt, which in turn was *N*-formylated by ethyl formate in the presence of potassium carbonate. Then, a one-pot three-steps procedure was applied to yield the 2-aminoimidazole **4**: (i) C-formylation of the amino ester **3** at the α -carbon by treatment with sodium hydride and ethylformate, (ii) removal of the unwanted *N*-formyl group under acidic conditions at reflux, and (iii) subsequent Marckwald cyclisation with cyanamide under reflux at pH 3 as suggested by O'Connor *et al.* [39] to minimise ester hydrolysis. This sequence finally provided the desired 2-aminoimidazole **4** in good yields (53–61% compared to the previous 50% yield in the O'Connor protocol [39,40]). Then, diazotization of the amino group in the presence of excess sodium nitrite afforded nitroester **5** in a 75% yield. Finally, reduction of the ester function with $LiBH_4$ formed *in situ* via the metathesis reaction between $NaBH_4$ and LiBr, allowed to obtain compound **6** in 68% yield. $LiBH_4$ was reported as a selective reducing agent for esters, with reducing power greatly enhanced by utilizing ether-type solvents containing methanol [41]. In our procedure, a mixture of $LiBH_4$ -THF-MeOH was used with a strict control of the reaction medium temperature (below $10^\circ C$) in order to avoid the reduction of the nitro function.

Tertiary amine derivatives **23-27** were synthesized via a one-pot reaction according to a modified procedure of Hernick *et al.* [42] Synthesis began with the phosphorylation of the 2-nitroimidazole key intermediate **6** at $-78^\circ C$ by sequential

treatment with lithium bis(trimethylsilyl)amide and the electrophile phosphorylating agent **8** (prepared according to a literature procedure [43], on a 10 g scale from commercially available *N,N*-bis(2-chloroethyl)amine hydrochloride salt (**7**)). Then, addition of the appropriate diamine **18–22** ensured the formation of the corresponding phosphoramidate **23–27**. For accurate management of this one-pot procedure, the progress of the reaction was monitored using ^{31}P NMR, initiated at addition of the *N,N*-bis(2-chloroethyl) phosphoramidic dichloride (**8**). When nearly complete disappearance of dichloride **8** (used in slight excess) concurrent with the formation of the phosphoramidic monochloride intermediate was observed, the appropriate amine was added to obtain the desired compounds **23–27**. For example, ^{31}P NMR monitoring for compound **24d** is depicted in Fig. 1: (1) at T_0 , two signals at 15.59 and 15.17 ppm appeared, relative to dichloride **8** and monochloride intermediate formed respectively; (2) after 15 min, the signal at 15.59 ppm had almost disappeared and 2-(*N,N*-diethylamino)ethylamine was added; (3) only 10 min later, the intermediate was consumed giving rise to compound **24d** with a signal at 17.24 ppm and an impurity at 18.97 ppm. It should be noted that this phosphorylation step was unpredictable and not always reliable, requiring a ^{31}P NMR monitoring to control the time of consumption of dichloride **8**, ranging from 5 to 80 min in different experiments. We also observed that the best results, in terms of kinetic and conversion rate, were obtained when the solution of dichlorophosphoramidate **8** in THF was pre-cooled at -78°C and added at once in order to avoid the undesired bis-addition of alcohol **6**. We finally noted that the solubility of 2-nitroimidazole **6** in THF at -78°C was a critical factor, partial solubility correlating with longer times and lower-yielding phosphorylation.

Quaternization of the series of tertiary amines **23–25**, **27** was achieved using alkyl iodide (methyl or ethyl iodide), leading to the corresponding ammonium derivatives **28–30**, **32**. For compounds **31a–h**, two synthesis pathways have been considered, *i.e.* direct methylation or ethylation of benzyl compounds **26** or benzylation of dialkyl derivatives **23** and **24**. In order to establish the best route, QA derivative **31c** was synthesized from **26c** by treatment with

methyl iodide or from **23c** by alkylation with freshly prepared benzyl iodide [44]. In the latter case, a supplementary work-up of the crude product was necessary in order to remove excess benzyle iodide, affording the desired product in a lower yield compared with the methyl iodide route (30% from **23c** versus 93% from **26c**). Thus, alkyl iodides (methyl or ethyl) were used for the preparation of all ammonium derivatives bearing a benzyl group within the series. It should be emphasized that the reaction took place in different ways within the series, in terms of reaction time, number of alkyl iodide equivalents required and purity status of the obtained crude product. Most QA compounds were obtained in excellent yields (mostly $>80\%$), with a satisfactory purity, only after evaporation of the excess methyl or ethyl iodide. Analytical purity was evaluated by the absence of impurities revealed in the ^1H and ^{13}C spectra combined with ^{31}P impurities estimated at less than 5% in global integrals. However, for five compounds (*i.e.* **28g**, **29g**, **29h**, **31g** and **31h**) belonging to the $n = 2$ or 3 series, ^{31}P spectra analyses revealed the presence of an impurity after ethylation emphasized by a signal at 24–25 ppm (in CD_3OD), and ranging from 6 to 15% for **28g**, **29g**, **29h**, **31g**, and 87% for **31h**. Purification of these QA compounds by preparative high performance liquid chromatography (C_{18} column, gradient acetonitrile in water) with subsequent lyophilisation was thus required to afford analytically pure compounds **28g**, **29g**, **29h** and **31g**. To better understand this side reaction, the impurity from the synthesis of compound **29h** (signal at 24.35 ppm in ^{31}P spectrum) was isolated for structure elucidation. HRMS data showed molecular ion at m/z 451.1984, which could correspond to the loss of a neutral HCl (36 amu). A comprehensive spectral analysis based on HRMS and RMN (^1H , ^{13}C , COSY, HSQC, ^{31}P) was in favour of the formation of the corresponding 2-oxide-diazaphospholidine obtained by intramolecular 1,5-*N*-alkylation of compound **29h**. For synthesis of compound **31h**, total conversion of **21d** required 5 days' reaction in the presence of a considerable excess of ethyl iodide (100 eq.) and led to the 2-oxide-diazaphospholidine impurity as the major product ($>80\%$ highlighted by ^{31}P spectrum) preventing obtention of **31h** in sufficient yield to allow biological assessment. This unwanted intramolecular 1,5-*N*-alkylation seems to be correlated with the length of the alkyl chain and/or steric hindrance of the tertiary amine substituents which hampered quaternization with ethyl iodide, requiring longer reaction time and greater excess of ethyl iodide.

2.2. Biology

The interaction between synthesized QA-targeted prodrugs **28–32** and aggrecan was evaluated by Surface plasmon resonance (SPR) analyses. SPR technology has emerged as a powerful technique to investigate the interaction between low-molecular-weight molecules and target proteins and also as an effective tool for drug screening [45–47]. Aggrecan (≈ 250 MDa), with approximately 150 glycosaminoglycan side chains of chondroitin sulphate and keratan sulphate, is the most abundant PG in chondrosarcoma [24,48]. A preliminary screening of the different prodrugs was performed by binding level analysis (Fig. 2A). Compound **ICF05016** was used as positive control and its non-QA equivalent (*O*-[(1-methyl-2-nitro-1*H*-imidazol-5-yl)methyl]-*N,N*-bis(2-chloroethyl)-*N'*-propylphosphorodiamidate named **ICF05017** [29]) as negative control for aggrecan binding measurements. The hit selection by initial screening of all synthesized QA-HAP was based on at least equivalent relative binding to aggrecan (Response Units) compared with **ICF05016**.

Some structure-activity relationships appeared in terms of interaction with aggrecan: affinity seemed to be related more to the type of the QA function, rather than the length of the alkyl chain between the QA function and the nitrogen mustard, since the

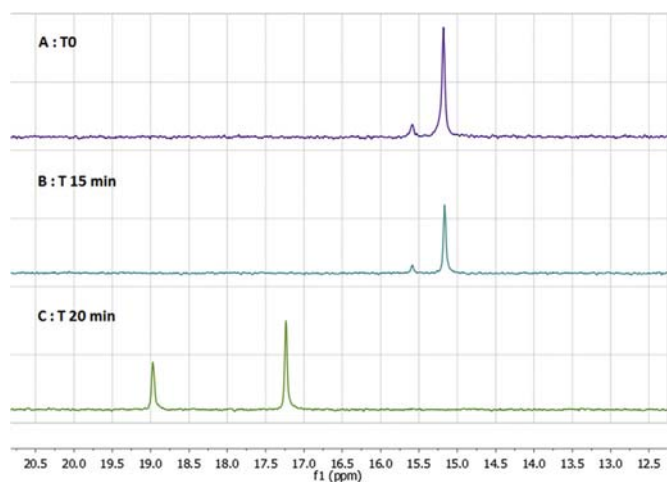


Fig. 1. Example of ^{31}P NMR monitoring obtained for the synthesis of compound **24d**.

A. Promptly after addition of dichlorophosphoramidate **8**, two signals at 15.59 and 15.17 ppm appeared, relative respectively to dichloride **8** and monochloride intermediate formed;

B. After 15 min, phosphorylation reached an optimal ratio $\sim 0.1/1$ between the remaining dichlorophosphoramidate **8** and the formed intermediate.

C. After the addition of 2-(*N,N*-diethylamino)ethylamine, the two signals at 15.59 and 15.17 disappeared immediately, generating the corresponding tertiary amine prodrug **24d** with a signal at 17.24 ppm and an impurity at 18.97 ppm.

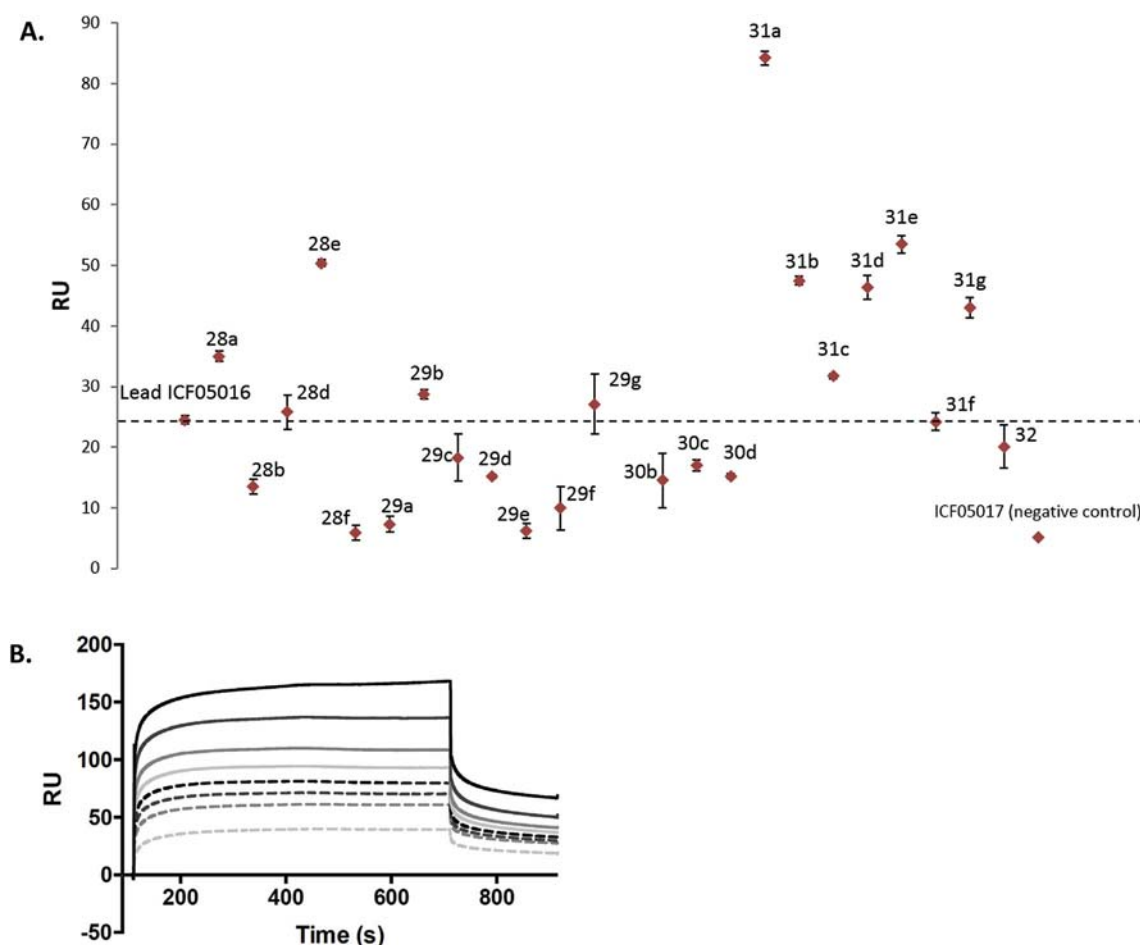


Fig. 2. SPR response of compounds 28–32.

A. The SPR responses of the all QA-compounds from the first round of screening. **ICF05016** was used as positive control and its non PG-targeted equivalent **ICF05017** as negative control. Twelve compounds were selected, based on a Response Unit (RU) greater than or equal to the **ICF05016** value (dotted line).

B. Representative sensorgrams showing binding of compound **31a** to immobilized aggrecan at height concentrations (0.2, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8, 1, 1.5 and 2 mM from bottom to top) is presented ($K_D = 2.3$ mM; $\chi^2 = 0.76$).

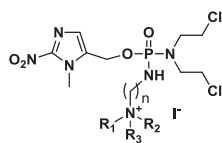
twelve short-listed compounds were of various chain lengths ($n = 2, 3, 4, 5$). Concerning QA substituents, the first emerging conclusion was that the presence of a benzyl group enhanced the affinity to aggrecan. In fact, all synthesized compounds bearing a benzyl moiety showed a higher binding affinity than the lead compound (almost two-fold difference in relative binding, except for compounds **31f** and **31c**) with the best affinity obtained for analogue **31a**, characterized by a pentyl chain and a benzyl-dimethyl QA function. Improved binding affinity to aggrecan was also observed with derivatives with ethyl substituents on the QA function. None isopropyl derivatives were short-listed, suggesting that steric hindrance perhaps hampers the inter-molecular recognition process between the isopropyl QA function and aggrecan.

Based on this selection criterion, twelve hits with Response Units over 24 were further evaluated to determine their dissociation constants (K_D) in a concentration-dependent secondary experiment (Fig. 2B). This analysis yielded K_D values ranging from 2.10 ± 0.13 to 5.03 ± 0.21 mM (Table 1) for all selected prodrugs, which demonstrates fairly similar affinity for aggrecan as **ICF05016**.

The selected prodrugs were evaluated for antiproliferative activity (i.e., Growth Inhibiting Concentration 50: IC_{50}) respectively to

ICF05016 and evofosfamide, under normoxic and hypoxic conditions using the human extraskeletal myeloid chondrosarcoma cell line (HEMC-SS). The IC_{50} values for all tested compounds are given in Table 2 and confirmed their relevance as hypoxia-activated prodrugs. Based on the inhibition of proliferation, almost all compounds were more potent than **ICF05016**, with a higher activity observed in hypoxia compared to normoxia. Hypoxic-cytotoxic ratio (HCR, IC_{50} under normoxia vs. IC_{50} under hypoxia) was maintained and even increased, compared with the HCR of 7 obtained for **ICF05016**. Substitution of methyl groups by ethyl on the QA function or modification of the alkyl chain length did not lead to significant change in potency or in hypoxic selectivity of the prodrugs, as compared with **ICF05016**. However, substitution of one methyl by a benzyl group appears more effective in terms of hypoxic selectivity, as for all benzylated prodrugs (**31a–g**) selectivity was maintained and even increased of 2- to 3-fold for three compounds, mainly for compound **31f**, emerging as the most effective (HCR = 24). Compound **31f** exhibited selectivity for hypoxia similar to evofosfamide with a HCR of 23 in HEMC-SS cells. However, the potency of evofosfamide on HEMC-SS cells in normoxia was higher ($IC_{50} = 2.9 \pm 1.5$ μ M) compared to compound **31f**

Table 1
Binding to immobilized aggrecan by SPR. Dissociation constants (K_D) and χ^2 were determined for each derivative by “steady-state affinity analysis”. All experiments were carried out in duplicate. ND: Not Determined. * no evaluation due to low degree of purity.



28-32

Compd	n	R ₁	R ₂	R ₃	KD (mM)	Chi ²
ICF05016	3	Me	Me	Me	1.29 ± 0.92	0.56 ± 0.41
28a	5	Me	Me	Me	4.22 ± 1.25	0.39 ± 0.02
28b	4	Me	Me	Me	—	—
28c	2	Me	Me	Me	—	—
28d	5	Me	Me	Et	3.56 ± 0.78	0.36 ± 0.42
28e	4	Me	Me	Et	2.02 ± 0.49	0.24 ± 0.18
28f	3	Me	Me	Et	—	—
28g	2	Me	Me	Et	—	—
29a	5	Et	Et	Me	—	—
29b	4	Et	Et	Me	4.97 ± 1.41	0.40 ± 0.08
29c	3	Et	Et	Me	—	—
29d	2	Et	Et	Me	—	—
29e	5	Et	Et	Et	—	—
29f	4	Et	Et	Et	—	—
29g	3	Et	Et	Et	3.49 ± 0.45	0.35 ± 0.32
29h	2	Et	Et	Et	—	—
30a	5	<i>i</i> -Pr	<i>i</i> -Pr	Me	—	—
30b	4	<i>i</i> -Pr	<i>i</i> -Pr	Me	—	—
30c	3	<i>i</i> -Pr	<i>i</i> -Pr	Me	—	—
30d	2	<i>i</i> -Pr	<i>i</i> -Pr	Me	—	—
31a	5	Bn	Me	Me	2.55 ± 0.35	0.7 ± 0.09
31b	4	Bn	Me	Me	5.27 ± 0.21	1.50 ± 1.33
31c	3	Bn	Me	Me	2.99 ± 0.57	0.18 ± 0.06
31d	2	Bn	Me	Me	2.90 ± 0.28	1.30 ± 0.51
31e	5	Bn	Me	Et	3.47 ± 1.14	4.85 ± 2.92
31f	4	Bn	Me	Et	2.10 ± 0.13	0.62 ± 0.52
31g	3	Bn	Me	Et	ND	—
31h	2	Bn	Me	Et	ND*	—
32	3	piperidiny	Me	Me	—	—

Table 2
Cytotoxicity of HAP derivatives on HEMC-SS cells in normoxic (21% O₂) and hypoxic (N₂, O₂ < 0.3%) conditions. Cultures were exposed to drugs for 24 h followed by incubation for 48 h in normoxia. Notes:** Significant difference vs. normoxic condition, $p < 0.01$. Abbreviations: IC₅₀: Growth Inhibiting Concentration 50; HCR: Hypoxic-Cytotoxic Ratio = IC₅₀ in normoxia/IC₅₀ in hypoxia.

Compd	n	R ₁	R ₂	R ₃	IC ₅₀ (μM)		
					Normoxia	Hypoxia	HCR
ICF05016	3	Me	Me	Me	29.3 ± 8.0	4.3 ± 1.2**	7
28a	5	Me	Me	Me	25.8 ± 6.3	2.4 ± 0.4**	11
28d	5	Me	Me	Et	15.8 ± 7.7	1.5 ± 0.8**	11
28e	4	Me	Me	Et	10.2 ± 0.3	1.5 ± 0.1**	7
29b	4	Et	Et	Me	13.4 ± 4.3	2.4 ± 0.7**	6
29g	3	Et	Et	Et	9.7 ± 3.5	1.4 ± 1.0**	7
31a	5	Bn	Me	Me	28.9 ± 2.6	2.8 ± 1.2**	10
31b	4	Bn	Me	Me	18.0 ± 2.6	1.8 ± 0.9**	10
31c	3	Bn	Me	Me	5.4 ± 0.9	0.4 ± 0.1**	14
31d	2	Bn	Me	Me	6.4 ± 2.1	1.1 ± 0.4**	6
31e	5	Bn	Me	Et	12.9 ± 3.5	0.8 ± 0.3**	16
31f	4	Bn	Me	Et	40.7 ± 8.8	1.7 ± 0.9**	24
31g	3	Bn	Me	Et	20.8 ± 8.7	2.1 ± 1.6**	10
Evofosfamide (TH-302)					2.9 ± 1.5	0.13 ± 0.02**	23

(IC₅₀ = 40.7 ± 8.8 μM). This cytotoxicity could be attributed to the superoxide species, generated under normoxia and is time-dependent with longer drug exposures as previously reported [49]. This may lead to toxicity in healthy cells, which could be expected to occur to a lesser extent with compound **31f**.

2.3. Chemical stability in PBS and plasma

A stability evaluation, carried out in phosphate buffer solution (10 mM, pH 7.4, 0.13% DMSO) on compound **31f** at 37 °C and monitored by reversed-phase HPLC, demonstrated promising results. Compound **31f** remains structurally intact under these conditions with no significant changes over a 24 h period (<5%). Stability in rabbit plasma at 37 °C was also demonstrated by ³¹P NMR experiments, as no cleavage or degradation over a 24 h period was observed (Fig. 3B).

2.4. Reductive chemical activation

A ³¹P NMR experiment was carried out on compound **31f** under model physiological conditions (pH 7.4, 37 °C) to ascertain that initial reductive activation of the phosphoramidate prodrug **31f** leads to the rapid formation of the corresponding phosphoramidate anion, hypothesized as being the active cytotoxic species. Prodrug **31f** was proved to be stable in these conditions over a period of 24 h. The phosphoramidate prodrug **31f** was chemically reduced with 3 equivalents of sodium dithionite (0.1 M cacodylate buffer, pH 7.4), a reductant system used to mimic bioreduction in hypoxic tissue. Fig. 3A is an example of a ³¹P NMR stack plot showing the results from the dithionite reduction of **31f**. As expected, the resonance corresponding to prodrug **31f** at 17.99 ppm rapidly disappears (half-life < 2 min) with the concurrent appearance of the resonance at 12.39 ppm, which corresponds to the ³¹P signal of the substituted bis(2-chloroethyl)phosphoramidate anion. The phosphoramidate anion is a highly reactive species and give raised to the formation of a variety of by-products arising both from subsequent solvolysis reactions (bisulfite and water substitution) and cleavages of P–N bonds [50,51]. At least 90% conversion of prodrug **31f** occurred in less than 8 min at 37 °C under chemical reductive conditions, efficiently leading to the release of the bis-alkylating mustard anion under hypoxia mimic conditions (Fig. 3B).

2.5. Bioreductive activation via nitroreductase

Prodrug **31f** was evaluated as substrate of an oxygen-insensitive nitroreductase from *E. coli*, to verify activation following an enzymatic reduction. This enzyme, which involves a two electrons reduction process, provides an experimental setting not affected by the environmental oxygen level. This offers the great advantage to bypass the oxygen-sensitive prodrug radical, which is reoxidised to the original prodrug in the presence of oxygen and thus hampered the phosphoramidate anion release, as observed for nitroaromatic HAPs. The activation was evaluated by incubating compound **31f** in phosphate buffer solution (10 mM, pH 7.4) at 37 °C with nitroreductase in the presence of NADPH as the cofactor. This latter doesn't induce enzyme-free reaction, as demonstrated by HPLC analysis. Aliquots were withdrawn at various time points and analyzed by reversed-phase HPLC. The half-lives were estimated on the basis of the disappearance of the prodrug at two nitroreductase concentrations (25 and 15 μg/mL) (Fig. 4). For compound **31f**, the both estimated half-lives were below 1 min vs 5 and 15 min respectively for the lead ICF05016, used as a control in our experiment. Prodrugs **31f** was substrate for nitroreductase and was readily reduced with at least 90% conversion after 3–5 min, showing proof of principle for this HAP strategy.

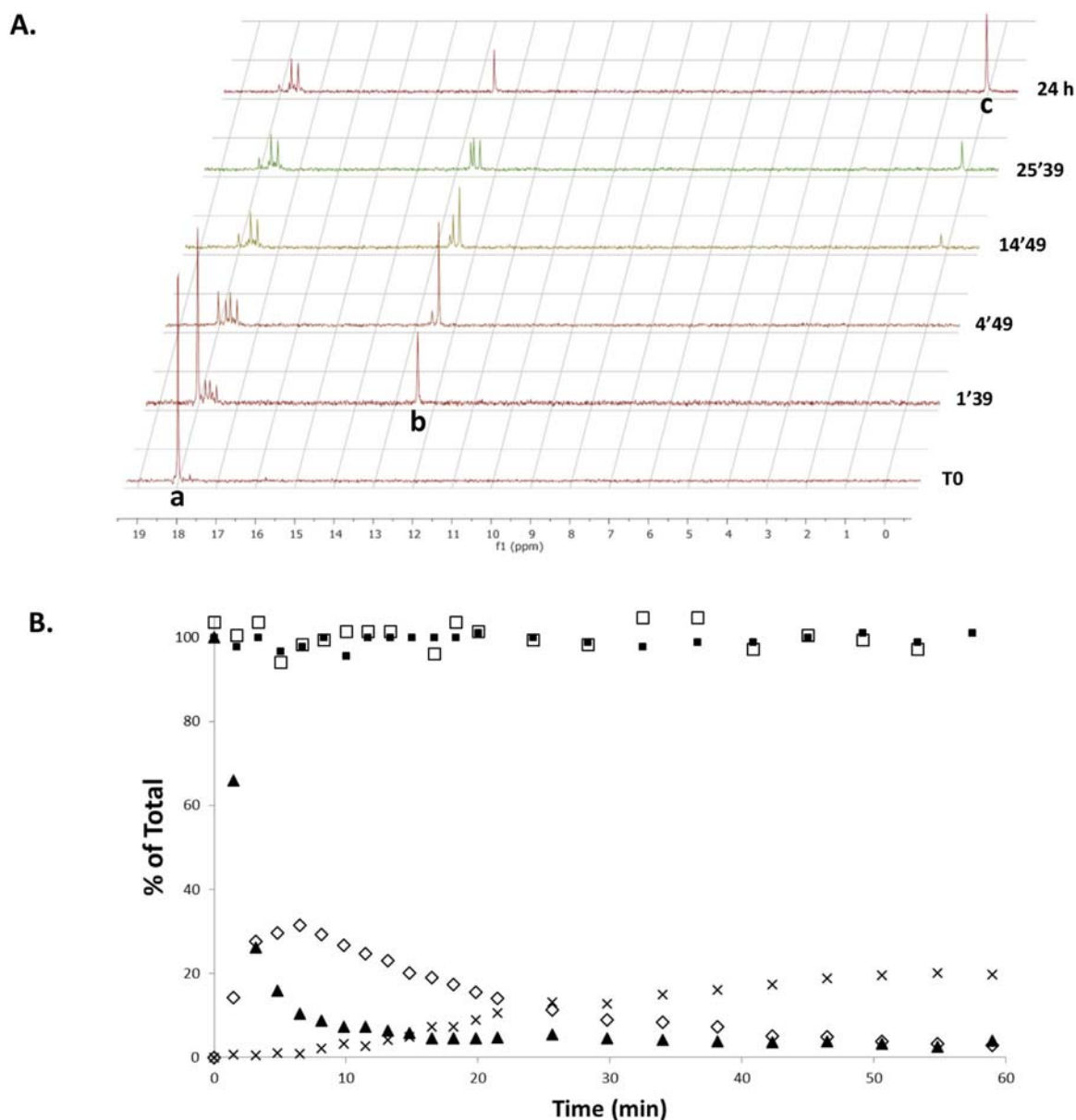


Fig. 3. Drug release in reductive conditions (3 equiv. sodium dithionite, $\text{CH}_3\text{CN}/0.1\text{ M}$ cacodylate buffer, pH 7.4, 37°C) and stability in plasma assessed by NMR ^{31}P : A. Stacked NMR ^{31}P spectra; a. prodrug **31f**, 17.99 ppm; b. phosphoramidate anion, 12.39 ppm (proven by MS-HPLC, data not shown); c. inorganic phosphate, 0 ppm. Other signals are relatives to solvolysis, buffer and reductive adducts or transient unknown by-products. Chemical shifts are reported relative to the Ph_3PO reference. B. Representative time course of phosphoramidate **31f** cleavage ($\blacktriangle$), substituted bis(2-chloroethyl)phosphoramidate anion formation ($\diamond$) and inorganic phosphate formation ($\times$) upon incubation of the prodrug with sodium dithionite in cacodylate buffer; Stability of phosphoramidate **31f** in cacodylate buffer ($\blacksquare$) and in rabbit plasma ($\square$). Data points were measured from ^{31}P NMR areas (average of two runs).

3. Conclusions

The aim of this work was to synthesize a series of QA-HAP conjugates differing by the nature of the PG-targeted QA function for effective chemotherapy of chondrosarcoma, a hypoxic and PG-rich tumour. The present study revealed that all prodrugs led to overall improvement in hypoxic selectivity compared with **ICF05016** and highlights the positive impact of a benzyl QA function on affinity to aggrecan, the most abundant PG in chondrosarcoma. Because of its attractive hypoxic selectivity ($\text{HCR} = 24$) and cytotoxicity in hypoxia compared to that of lead **ICF05016**, coupled with rapid *in vitro* reductive activation, compound **31f** emerged as the most effective HAP and will undergo further preclinical studies, including *in vivo* efficacy on the HEMC-SS xenograft model on mice.

4. Experimental protocols

4.1. Synthesis

All commercially available reagents and solvents were purchased at the following commercial suppliers: Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France), Acros Organics (Geel, Belgium), Fisher Scientific (Illkirch, France), Carlo Erba Reagents (Val de Reuil, France), VWR (Fontenay-sous-Bois, France) and Alfa Aesar (Karlsruhe, Germany) and were used without further purification. All solvents were dried using common techniques. Air and moisture sensitive reactions were carried out under anhydrous argon atmosphere. Analytical thin-layer chromatography (TLC) was performed on precoated silica gel aluminium plates (60 F₂₅₄, 0.2 mm

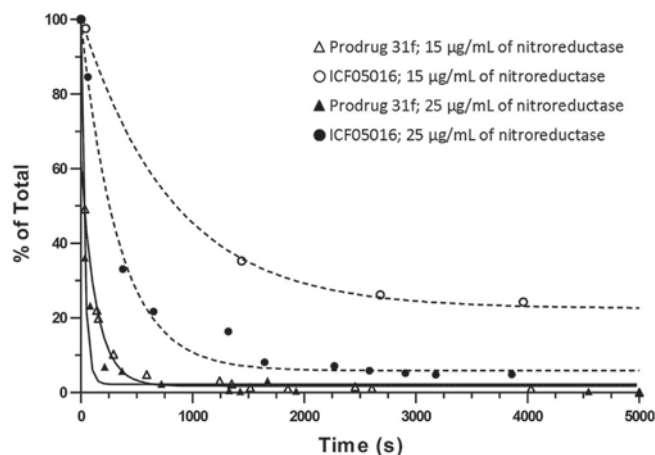


Fig. 4. Percent of prodrugs **31f** and **ICF05016** remaining after incubation in phosphate buffer (pH 7.4, 37 °C) with nitroreductase in the presence of NADPH. Reactions were followed by RP-HPLC at 322 nm. The lines represent the best-fit values calculated from GraphPadPrism.

thick, Macherey or SDS) using the indicated solvent mixture expressed as volume/volume ratios. The plates were visualized with ultraviolet light (254 nm) and (or) by development with ninhydrine ethanolic solution (0.2%) or a 4-(4'-nitrobenzyl)pyridine (NBP)/potassium hydroxide dyeing reagent used for the determination of alkylating agents (the chromatography plate was immersed in the NBP solution (2.5% in acetone), heated for few min and then immersed in potassium hydroxide solution (10% in methanol)). Column chromatography was performed on silica gel 60 Å normal phase, 35–70 µm (Merck or SDS or Carlo Erba). Uncorrected melting points (mp) were measured on an electrothermal capillary Digital Melting Point Apparatus (IA9100, Bibby Scientific, Roissy, France). Infrared spectra (IR) were recorded in the range 4000–600 cm^{-1} on a IS10 with attenuated total reflectance (ATR) accessory Nicolet (Fisher Scientific). Nuclear magnetic resonance spectra (^1H NMR and ^{13}C NMR) were performed on a Bruker AM 200 spectrometer (200 MHz for ^1H , 50 MHz for ^{13}C), a Bruker Avance DPX300 spectrometer (300 MHz for ^1H , 75 MHz for ^{13}C) or a Bruker DRX 500 spectrometer (500 MHz for ^1H , 125 MHz for ^{13}C) (Bruker Biospin SAS, Wissembourg, France). Chemical shift values (δ) are quoted in parts per million (ppm) and calibrated to the deuterated solvent reference peak for ^1H and ^{13}C spectra. ^{31}P NMR spectra (202 MHz) were recorded on a Bruker Avance 500 apparatus with broadband ^1H decoupling and chemical shifts were reported relative to a 1% phosphoric acid solution in deuterium oxide as a coaxial reference (0 ppm). Coupling constants (J) are quoted in Hz. To describe spin multiplicity, standard abbreviations such as s, d, dd, t, q, qt, hept, td, tdd, m, br.s referring to singlet, doublet, doublet of doublet, triplet, quartet, quintet, heptuplet, doublet of triplet, doublet of doublet of triplet, multiplet, broad singlet respectively, are used. When necessary, chemical shifts assignments in ^1H and ^{13}C spectra were supported by two dimensional NMR experiments (COSY and HSQC). Compounds were analyzed by High-Resolution Mass Spectrometry in positive mode (HRMS, Waters® Micromass® Q-ToF micro™ Mass Spectrometer, UCA-Partner, Clermont Auvergne University, Clermont-Ferrand, France). Preparative high performance liquid chromatography was performed on a CombiflashEZprep (Teledyne ISCO). The purification of QA-derivatives was carried out on a C_{18} column (Teledyne, Redisep Prep C18, 100 Å, 20×2.5 µm) using the following conditions: total experiment time: 30 min, flow rate = 15 mL/min, eluent mixture: $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ (v/v), gradient: 95/5 for 2 min, then 95/5 → 70/30 for 6 min, then 70/30 for 2 min, then 70/30 → 60/40 for

6 min, then 60/40 for 3 min, and 60/40 min → 10/90 for 11 min, $\lambda = 254$ and 323 nm.

Abbreviations: ACN, acetonitrile; DCM, dichloromethane; NBP, 4-(4'-nitrobenzyl)pyridine; TEA, triethylamine; THF, tetrahydrofuran; rt, room temperature.

4.1.1. Preparation of the common required 5-hydroxymethyl-1-N-methyl-2-nitro-1H-imidazole (**6**)

4.1.1.1. *Ethyl N-methylglycinate hydrochloride salt (2)*. Thionyl chloride (65 mL, 900 mmol) was added dropwise under stirring to a solution of sarcosine (**1**) (20.0 g, 224 mmol) in EtOH (250 mL) cooled in an ice-water bath, while maintaining temperature around -10 °C. Then the reaction mixture was gently heated at 55 °C overnight until the mixture became clear. Solvent and traces of thionyl chloride were removed by evaporation under reduced pressure and the solid residue was washed with Et₂O (3×50 mL). The remaining solid was well dried under vacuum to afford compound **2** (33.5 g, 218 mmol) as a white powder, which was used in the next step without further purification. **Yield** 97%; **mp** 126 °C (Lit [52], mp 125–127 °C); **IR** (ATR) ν cm^{-1} 2970–2440, 1742, 1229; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 9.64 (br.s, 2H, NH_2^+), 4.24 (q, 2H, $^3J = 7.1$ Hz, CH_2CH_3), 3.84 (t, 2H, $^3J = 5.7$ Hz, NH_2^+CH_2), 2.80 (t, 3H, $^3J = 5.2$ Hz, NH_2^+CH_3), 1.26 (t, 3H, $^3J = 7.1$ Hz, CH_2CH_3); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 101 MHz) δ 166.18 (CO_2), 62.62 (CH_2CH_3), 48.94 (NH_2^+CH_2), 33.34 (NH_2^+CH_3), 14.03 (CH_2CH_3).

4.1.1.2. *Ethyl N-formyl-N-methylglycinate (3)*. Ethyl N-methylglycinate hydrochloride salt (**2**) (30.0 g, 195 mmol) was suspended in a mixture of EtOH (200 mL) and ethyl formate (126 mL). Potassium carbonate (40.6 g, 294 mmol) was added under vigorous stirring and the suspension was stirred at rt overnight. The reaction mixture was then filtered and the precipitate was washed with EtOH (150 mL). The filtrate was concentrated and dissolved in a minimum amount of water (10 mL), followed by extraction with EtOAc (4×200 mL). The combined organic layers were dried over MgSO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure to afford compound **3** (24.3 g, 167 mmol) as a pale yellow liquid. **Yield** 85%; ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ (two rotamers) 7.93 and 7.86 (s, 1H, CHO), 4.04 and 4.02 (q, 2H, $^3J = 7.2$ Hz, CH_2CH_3), 3.91 and 3.85 (s, 2H, NCH_2), 2.87 and 2.74 (s, 3H, NCH_3), 1.12 and 1.10 (t, 3H, $^3J = 7.1$ Hz, CH_2CH_3); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ (two rotamers) 168.76, 168.31 (CO_2), 163.09, 162.85 (CHO), 61.62, 61.29 (OCH_2CH_3), 50.93, 45.72 (NCH_2), 35.10, 30.76 (NCH_3), 14.09 (OCH_2CH_3).

4.1.1.3. *Ethyl 2-amino-1-N-methyl-1H-imidazole-5-carboxylate (4)*. To a solution of N-formyl sarcosine ethyl ester (**3**) (29.6 g, 204 mmol) in an equal mixture of ethyl formate and THF (190 mL) with cyclohexane (12 mL), was added slowly NaH (60% wt in mineral oil, 12.5 g, 313 mmol) at room temperature. After the addition was completed and hydrogen release stopped, the reaction mixture was allowed to stirred during 3.5 h. The reaction mixture was concentrated under vacuum. The obtained solid was suspended in a solution of EtOH (250 mL) containing concentrated aq. HCl 32% (61 mL) and refluxed for 2 h. The hot reaction mixture was filtered and the resulting colourless solid was washed with boiling EtOH (2×150 mL). The filtrate was concentrated under vacuum and diluted with a mixture of EtOH/water (500 mL, 70/30, v/v). The pH of the solution was adjusted to 3, using an aqueous 5 M solution of NaOH and cyanamide (17.5 g, 416 mmol) was added. The resulting mixture was refluxed for 1.5 h, then cooled to rt and concentrated under reduced pressure to approximately 1/8 of the initial volume. The pH of the remaining solution was adjusted to 9–10 with a saturated aqueous solution of potassium carbonate, after cooling in an ice-water bath. The precipitate formed was removed by filtration, washed with water (2×10 mL) and dried

under vacuum at 40 °C overnight to afford compound **4** (16.9 g, 99.9 mmol) as a pale yellow to orange solid. A supplementary fraction can be yielded after extraction of the remaining filtrate with ethyl acetate (3 × 100 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and evaporated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography on silica gel using ethyl acetate/ethanol (95/5, v/v with 1% NH₄OH) as eluent to yield compound **4** (3.78 g, 22.3 mmol). **Yield** 61%; **Rf** 0.33 (SiO₂, EtOAc/EtOH, 9/1, v/v); **mp** 131 °C (Lit [40], mp 130–133 °C); **IR** (ATR) ν cm⁻¹ 3390, 3119, 1647, 1542, 1168, 750, 737; **¹H NMR** (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.39 (s, 1H, CH_{Ar}), 4.66 (br.s, 2H, NH₂), 4.25 (q, 2H, ³J = 7.1 Hz, CH₂CH₃), 3.65 (s, 3H, NCH₃), 1.32 (t, 3H, ³J = 7.1 Hz, CH₂CH₃); **¹³C NMR** (DMSO-*d*₆, 126 MHz) δ 159.68 (CO), 154.27 (C_{Ar}NH₂), 136.02 (CH_{Ar}), 116.88 (C_{Ar}CO), 58.82 (OCH₂), 30.17 (NCH₃), 14.30 (CH₂CH₃).

4.1.1.4. Ethyl 1-N-methyl-2-nitro-1H-imidazole-5-carboxylate (5). To a solution of sodium nitrite (18.3 g, 266 mmol) in water (55 mL) cooled around -5 °C in an ice-salt bath, was added dropwise a solution of the amino ester **4** (6.42 g, 38.0 mmol) in acetic acid (42 mL). The temperature was allowed to rise gradually to rt and the reaction mixture was stirred overnight. The reaction mixture was extracted with dichloromethane (3 × 50 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and evaporated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography on silica gel using cyclohexane/ethyl acetate (7/3, v/v) as eluent. After concentration under vacuum, the residue was washed with water (2 × 50 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and evaporated under reduced pressure to yield nitro ester **5** as yellow crystals (5.67 g, 28.5 mmol). **Yield** 75%; **mp** 56–58 °C (Lit. 56–58 °C [40] and 65–66 °C [37]); **Rf** 0.40 (SiO₂, cyclohexane/ethyl acetate, 7/3, v/v); **IR** (ATR) ν cm⁻¹ 1723, 1552, 1486, 1519, 1364, 1233, 767; **¹H NMR** (CDCl₃, 300 MHz) δ 7.70 (s, 1H, CH_{Ar}), 4.39 (q, 2H, ³J = 7.1 Hz, OCH₂CH₃), 4.31 (s, 3H, NCH₃), 1.39 (t, 3H, ³J = 7.1 Hz, OCH₂CH₃); **¹³C NMR** (DMSO-*d*₆, 126 MHz) δ 158.71 (CO), 147.61 (C_{Ar}NO₂), 133.70 (CH_{Ar}), 126.07 (C_{Ar}CO), 61.34 (OCH₂), 35.14 (NCH₃), 13.91 (CH₂CH₃).

4.1.1.5. (1-methyl-2-nitro-1H-imidazol-5-yl)methanol (6). The ester **5** (11.0 g, 55.2 mmol) was dissolved in a mixture of anhydrous THF/MeOH (200 mL, 8/2, v/v) in a 1 L three-necked flask fitted with a mechanical stirrer, a 500 mL dropping funnel, a bubbler and maintained in an ice-water bath. A suspension of NaBH₄ (6.33 g, 167 mmol) in THF (50 mL) and a solution of LiBr (14.6 g, 168 mmol) in THF (50 mL) were cooled at 0 °C, introduced in the same dropping funnel with water (50 mL) and added dropwise to the nitro-imidazole solution, at such a rate that the internal temperature did not exceed 10 °C. The reaction mixture was stirred at rt until total conversion of the starting nitroester **5**, according to TLC monitoring (19 h). Ammonium chloride (3 g) was then added at 0 °C and stirring was prolonged for 30 min. The precipitate was filtrated and washed with THF (3 × 50 mL). After concentration under vacuum, the yellow solid was taken up in a mixture of EtOAc/MeOH (98/2, v/v) and the resulting solution was passed through a pad of silica gel surmounted by a pad of Celite® 545 to afford pure alcohol **6** as pale yellow to orange crystals (5.91 g, 37.7 mmol). **Yield** 68%; **Rf** 0.50 (SiO₂, EtOAc); **mp** 140 °C (lit [40], 141–143 °C); **IR** (ATR) ν cm⁻¹ 3231, 1491, 1358, 1186, 1040, 832; **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ 7.10 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.40 (t, 1H, ³J = 5.3 Hz, OH), 4.55 (d, 2H, ³J = 5.3 Hz, CH₂OH), 3.93 (s, 3H, NCH₃); **¹³C NMR** (DMSO-*d*₆, 126 MHz) δ 145.63 (C_{Ar}NO₂), 138.60 (C_{Ar}CH₂), 126.50 (CH_{Ar}), 52.96 (CH₂), 34.03 (NCH₃).

4.1.2. N,N-bis(2-chloroethyl)phosphoramidic acid dichloride (8)

N,N-bis(2-chloroethyl)amine HCl (**7**) (10.0 g, 56.0 mmol) was

refluxed at 130–140 °C in the presence of an excess of POCl₃ (21 mL, 224 mmol) during a period of 80 h, until a clear and brown mixture was obtained. The excess of POCl₃ was removed under reduced pressure and the remaining brown residue purified by column chromatography on silica gel (EtOAc/cyclohexane, 20/80, v/v). The obtained solid was thoroughly washed with cyclohexane and dried under vacuum to afford pure compound **8** as white crystals (8.0 g, 31 mmol). **Yield** 55%; **Rf** 0.39 (SiO₂, cyclohexane/EtOAc, 8/2, v/v); **mp** 57 °C (Lit [43], 57–59 °C); **IR** (ATR) ν cm⁻¹ 1272, 1264, 1116, 1102; **¹H NMR** (CDCl₃, 200 MHz) δ 3.841–3.51 (m, 8H); **¹³C NMR** (CDCl₃, 50 MHz) δ 49.61 (d, 2C, ²J_{C-P} = 4.1 Hz, NCH₂CH₂Cl), 40.91 (d, 2C, ³J_{C-P} = 2.7 Hz, NCH₂CH₂Cl); **³¹P NMR** (CDCl₃, 202 MHz) δ 17.42.

4.1.3. General procedure for the synthesis of non-targeted prodrugs **23** to **27**

To a solution of (1-methyl-2-nitro-1H-imidazol-5-yl)methanol (**6**) (1 eq.) in freshly distilled anhydrous THF (10 mL for 3 mmol of alcohol **6**) was added dropwise lithium bis(trimethylsilyl)amide (1 M in THF, 1.1 eq.) at -78 °C under an inert atmosphere. The reaction mixture was stirred around 5 min at -78 °C, and a solution of bis(2-chloroethyl)phosphoramidic dichloride (**8**) (1.1 eq.) in THF (3.3 mmol in 10 mL), previously cooled at -78 °C, was added all at once at the same temperature (T₀). The reaction mixture was stirred for 15–80 min, before the addition of a solution of the appropriate amine **18–22** (2–2.2 eq.) in THF (3 mL for 5 mmol of amine) and stirring was maintained at -78 °C for 5 min to 75 min. These reaction times were determined by ³¹P NMR monitoring for each compound. The reaction was stopped by addition of water (20 mL for 3 mmol of alcohol **6**), concentrated in vacuum and then extracted with EtOAc (3 × 50 mL for 3 mmol of alcohol **6**). The combined organic extracts were dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography on silica gel using an eluent gradient (EtOAc/EtOH with TEA or NH₄OH) to afford compounds **23–27** as yellow to orange oils.

(1-methyl-2-nitro-1H-imidazol-5-yl)methyl N,N-bis(2-chloroethyl)-N'-[5-(dimethylamino)pentyl]phosphorodiamidate (**23a**)

Starting from 500 mg (3.18 mmol) of alcohol **6**, the coupling reaction with bis(2-chloroethyl)phosphoramidic dichloride (**8**) was performed for 60 min before the addition of the prepared amine **18a** (826 mg, 6.34 mmol). The reaction was then stopped after 10 min of stirring. The crude product was purified by silica gel chromatography (EtOAc/EtOH/NH₄OH ranging from 90/10/1 to 50/50/3, v/v/v) to afford **23a** (457 mg, 0.965 mmol) as a yellow-orange oil. **Yield** 30%; **Rf** 0.35 (SiO₂, EtOAc/EtOH/TEA, 70/30/3, v/v/v); **IR** (ATR) ν cm⁻¹ 3389, 3223, 1537, 1490, 1351, 1216, 1191, 1007, 979, 960, 834, 744; **¹H NMR** (200 MHz, CDCl₃) δ 7.19 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.19 (dd, 1H, ²J_{H-H} = 13.3 Hz, ³J_{H-P} = 7.5 Hz, CH'O), 4.98 (dd, 1H, ²J_{H-H} = 13.3 Hz, ³J_{H-P} = 9.0 Hz, CH''O), 4.07 (s, 3H, NCH₃), 3.95 (td, 1H, ³J_{H-H} = 6.8 Hz, ²J_{H-P} = 11.3 Hz, NHP), 3.64–3.51 (m, 4H, N(CH₂CH₂Cl)₂), 3.53–3.25 (m, 4H, N(CH₂CH₂Cl)₂), 3.04–2.89 (m, 4H, CH₂NHP, CH₂N(CH₃)₂), 2.79 (s, 6H, N(CH₃)₂), 1.90–1.53 (m, 6H, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂); **¹³C NMR** (50 MHz, CDCl₃) δ 146.41 (C_{Ar}NO₂), 133.43 (d, ³J_{C-P} = 7.1 Hz, C_{Ar}CH₂), 129.11 (CH_{Ar}), 57.62 (CH₂N(CH₃)₂), 56.44 (d, ²J_{C-P} = 4.4 Hz, CH₂O), 49.33 (d, 2C, ²J_{C-P} = 3.9 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂), 43.18 (2C, N(CH₃)₂), 42.81 (2C, N(CH₂CH₂Cl)₂), 40.17 (CH₂NHP), 34.78 (NCH₃), 30.12 (d, ³J_{C-P} = 6.4 Hz, CH₂CH₂NHP), 23.92, 23.34 (CH₂CH₂CH₂CH₂N(CH₃)₂); **³¹P NMR** (202 MHz, CD₃OD) δ 18.33; **HRMS** (ESI) *m/z* 473.1607 [M+H]⁺ (calculated for [C₁₆H₃₂Cl₂N₆O₄P]⁺ 473.1594).

4.1.4. General procedure for the synthesis of targeted prodrugs **28** to **32**

To a solution of amine **23–27** (1 eq.) in anhydrous ACN (5 mL for

50–100 mg of amine) under an inert atmosphere, was added potassium carbonate (2.5 eq) and appropriate alkyl iodide (5–24 eq.). Stirring was maintained at rt in a sealed flask for several hours until TLC monitoring showed total conversion of the initial product (further addition of alkyl iodide was sometimes necessary). The suspension was filtered and the precipitate was thoroughly washed with ACN. After evaporation of the filtrate, the residue was dissolved in acetone (10 mL for 50 mg of amine) and the mixture was filtered to remove the remaining potassium carbonate. After evaporation to dryness under reduced pressure, the corresponding quaternary ammoniums **28–32** were obtained analytically pure or purified by preparative high performance liquid chromatography and lyophilised.

4.1.4.1. 5-((bis(2-chloroethyl)amino)((1-methyl-2-nitro-1H-imidazol-5-yl)methoxy)phosphoryl)amino)-N,N,N-trimethylpentane-1-aminium iodide (28a**).** Alkylation of amine **23a** (34 mg, 71.8 μ mol) with methyl iodide (24 eq.) using the standard procedure (reaction time: 4 h) afforded compound **28a** analytically pure, as a yellow hygroscopic solid (43 mg, 69.2 μ mol). **Yield** 96%; **IR (ATR)** ν cm^{-1} 3426, 3230, 1537, 1489, 1349, 1219, 1190, 1007, 960, 835, 743; **^1H NMR (500 MHz, CD_3OD)** δ 7.25 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.16 (dd, 2H, $^2J_{\text{H-H}} = 13.3$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 8.2$ Hz, $\text{CH}'\text{O}$), 5.12 (dd, 2H, $^2J_{\text{H-H}} = 13.3$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 8.8$ Hz, $\text{CH}''\text{O}$), 4.07 (s, 3H, NCH_3), 3.67 (td, 4H, $^3J_{\text{H-H}} = 7.0$ Hz, $^4J_{\text{H-P}} = 2.3$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 3.54–3.32 (m, 6H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$, CH_2N^+), 3.19 (s, 9H, $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$), 2.96–2.84 (m, 2H, CH_2NHP), 1.84–1.77 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+$), 1.59 (qt, 2H, $^3J_{\text{H-H}} = 7.2$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHP}$), 1.41 (qt, 2H, $^3J_{\text{H-H}} = 7.5$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHP}$); **^{13}C NMR (126 MHz, CD_3OD)** δ 147.64 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{NO}_2$), 135.10 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 6.8$ Hz, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{CH}_2$), 129.27 (CH_{Ar}), 67.81 (CH_2N^+), 57.73 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 4.7$ Hz, OCH_2), 53.75, 53.72, 53.68 ($\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$), 50.30 (d, 2C, $^2J_{\text{C-P}} = 4.6$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 43.24 (2C, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 41.37 (CH_2NHP), 35.23 (NCH_3), 32.19 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 5.5$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHP}$), 24.37 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHP}$), 23.58 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+$); **^{31}P NMR (202 MHz, CD_3OD)** δ 18.28; **HRMS (ESI)** m/z 487.1744 $[\text{M}]^+$ (calculated for $[\text{C}_{17}\text{H}_{34}\text{Cl}_2\text{N}_6\text{O}_4\text{P}]^+$ 487.1751).

4.1.4.2. 4-((bis(2-chloroethyl)amino)((1-methyl-2-nitro-1H-imidazol-5-yl)methoxy)phosphoryl)amino)-N,N,N-trimethylbutane-1-aminium iodide (28b**).** Alkylation of amine **23b** (78 mg, 0.171 mmol) with methyl iodide (12 eq.) using the standard procedure (reaction time: 4 h), afforded compound **28b** analytically pure, as a yellow hygroscopic solid (95 mg, 0.158 mmol). **Yield** 92%; **IR (ATR)** ν cm^{-1} 3404, 3223, 1537, 1488, 1349, 1217, 1190, 1009, 960, 835, 743; **^1H NMR (500 MHz, CD_3OD)** δ 7.25 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.21–5.07 (m, 2H, OCH_2), 4.07 (s, 3H, NCH_3), 3.74–3.61 (m, 4H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 3.55–3.34 (m, 6H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$, CH_2N^+), 3.15 (s, 9H, $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$), 3.01–2.88 (m, 2H, CH_2NHP), 1.89–1.77 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+$), 1.63–1.50 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHP}$); **^{13}C NMR (126 MHz, CD_3OD)** δ 147.64 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{NO}_2$), 135.06 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 7.2$ Hz, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{CH}_2$), 129.26 (CH_{Ar}), 67.50 (CH_2N^+), 57.78 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 4.8$ Hz, OCH_2), 53.78, 53.76, 53.72 ($\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$), 50.23 (d, 2C, $^2J_{\text{C-P}} = 4.7$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 43.23 (2C, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 41.05 (CH_2NHP), 35.25 (NCH_3), 29.41 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 4.6$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHP}$), 21.36 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+$); **^{31}P NMR (202 MHz, CD_3OD)** δ 18.25; **HRMS (ESI)** m/z 473.1603 $[\text{M}]^+$ (calculated for $[\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{Cl}_2\text{N}_6\text{O}_4\text{P}]^+$ 473.1594).

4.1.4.3. 2-((bis(2-chloroethyl)amino)((1-methyl-2-nitro-1H-imidazol-5-yl)methoxy)phosphoryl)amino)-N,N,N-trimethylethane-1-aminium iodide (28c**).** Alkylation of amine **23d** (114 mg, 0.264 mmol) with methyl iodide (5 eq.) using the standard procedure (reaction time: 24 h) and purification by preparative high performance liquid chromatography (gradient ACN in water) afforded compound **28c** as a hygroscopic lyophilisate (116 mg, 0.202 mmol). **Yield** 77%; **IR (ATR)** ν cm^{-1} 3436, 3196, 1537, 1488,

1350, 1222, 1190, 1005, 959, 835, 744; **^1H NMR (500 MHz, CD_3OD)** 7.27 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.20 (dd, 2H, $^2J_{\text{H-H}} = 13.4$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 8.4$ Hz, $\text{CH}'\text{O}$), 5.17 (dd, 2H, $^2J_{\text{H-H}} = 13.4$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 8.3$ Hz, $\text{CH}''\text{O}$), 4.08 (s, 3H, NCH_3), 3.75–3.66 (m, 4H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 3.55–3.35 (m, 8H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+$), 3.22 (s, 9H, $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$); **^{13}C NMR (126 MHz, CD_3OD)** δ 147.73 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{NO}_2$), 134.64 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 7.3$ Hz, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{CH}_2$), 129.37 (CH_{Ar}), 67.47 (CH_2N^+), 58.08 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 4.7$ Hz, OCH_2), 54.35, 54.38, 54.41 ($\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$), 50.23 (d, 2C, $^2J_{\text{C-P}} = 4.7$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 43.23 (2C, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 41.05 (CH_2NHP), 35.25 (NCH_3), 29.41 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 4.6$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHP}$), 21.36 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+$); **^{31}P NMR (202 MHz, CD_3OD)** δ 17.72; **HRMS (ESI)** m/z 445.1279 $[\text{M}]^+$ (calculated for $[\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{Cl}_2\text{N}_6\text{O}_4\text{P}]^+$ 445.1281).

4.1.4.4. 5-((bis(2-chloroethyl)amino)((1-methyl-2-nitro-1H-imidazol-5-yl)methoxy)phosphoryl)amino)-N-ethyl-N,N-dimethylpentane-1-aminium iodide (28d**).** Alkylation of amine **23c** (38 mg, 81.5 μ mol) with ethyl iodide (12 eq. initially followed by 12 eq after 24 h) using the standard procedure (reaction time: 36 h) afforded compound **28d** analytically pure, as a yellow hygroscopic solid (36 mg, 56.7 μ mol). **Yield** 70%; **IR (ATR)** ν cm^{-1} 3420, 3235, 1537, 1489, 1350, 1216, 1190, 1007, 976, 960, 835, 770, 744; **^1H NMR (500 MHz, CD_3OD)** δ 7.25 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.16 (dd, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 13.5$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 8.3$ Hz, OCH'), 5.12 (dd, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 13.5$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 8.7$ Hz, OCH''), 4.08 (s, 3H, NCH_3), 3.71–3.62 (m, 4H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 3.51–3.33 (m, 6H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$, CH_2CH_3), 3.34–3.28 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3.08 (s, 6H, $\text{N}^+(\text{CH}_3)_2$), 2.98–2.85 (m, 2H, CH_2NHP), 1.83–1.72 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+$), 1.59 (qt, 2H, $^3J_{\text{H-H}} = 7.0$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHP}$), 1.46–1.34 (m, 5H, CH_2CH_3 , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHP}$); **^{13}C NMR (126 MHz, CD_3OD)** δ 147.64 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{NO}_2$), 135.11 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 7.0$ Hz, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{CH}_2$), 129.28 (CH_{Ar}), 64.87 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+$), 60.92 ($\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 57.73 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 4.6$ Hz, OCH_2), 50.80 (2C, $\text{N}^+(\text{CH}_3)_2$), 50.31 (d, 2C, $^2J_{\text{C-P}} = 4.6$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 43.25 (2C, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 41.39 (CH_2NHP), 35.24 (NCH_3), 32.20 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 5.4$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHP}$), 24.45 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHP}$), 23.17 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+$), 8.51 (CH_2CH_3); **^{31}P NMR (202 MHz, CD_3OD)** δ 18.26; **HRMS (ESI)** m/z 501.1908 $[\text{M}]^+$ (calculated for $[\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{Cl}_2\text{N}_6\text{O}_4\text{P}]^+$ 501.1907).

4.1.4.5. 4-((bis(2-chloroethyl)amino)((1-methyl-2-nitro-1H-imidazol-5-yl)methoxy)phosphoryl)amino)-N-ethyl-N,N-dimethylbutane-1-aminium iodide (28e**).** Alkylation of amine **23b** (107 mg, 233 μ mol) with ethyl iodide (12 eq.) using the standard procedure (reaction time: 4 h) and purification by preparative high performance liquid chromatography (gradient ACN in water) afforded compound **28e** as a hygroscopic lyophilisate (99 mg, 161 μ mol). **Yield** 69%; **IR (ATR)** ν cm^{-1} 3383, 3255, 1537, 1489, 1350, 1216, 1191, 1011, 980, 960, 835, 744; **^1H NMR (500 MHz, CD_3OD)** δ 7.26 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.16 (dd, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 13.4$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 8.3$ Hz, OCH'), 5.12 (dd, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 13.4$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 8.5$ Hz, OCH''), 4.07 (s, 3H, NCH_3), 3.72–3.63 (m, 4H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 3.52–3.35 (m, 6H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$, CH_2CH_3), 3.34–3.29 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3.07 (s, 6H, $\text{N}^+(\text{CH}_3)_2$), 2.95 (td, 2H, $^3J_{\text{H-P}} = 11.4$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 6.8$ Hz, CH_2NHP), 1.85–1.76 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+$), 1.56 (qt, 2H, $^3J_{\text{H-H}} = 7.0$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHP}$), 1.40–1.35 (m, 3H, CH_2CH_3); **^{13}C NMR (126 MHz, CD_3OD)** δ 147.65 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{NO}_2$), 135.00 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 7.1$ Hz, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{CH}_2$), 129.19 (CH_{Ar}), 64.46 (CH_2N^+), 60.88 (CH_2CH_3), 57.72 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 4.7$ Hz, OCH_2), 50.72 (2C, $\text{N}^+(\text{CH}_3)_2$), 50.17 (d, 2C, $^2J_{\text{C-P}} = 4.7$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 43.17 (2C, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 41.06 (CH_2NHP), 35.21 (NCH_3), 29.50 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 5.0$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHP}$), 20.90 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHP}$), 8.46 (CH_2CH_3); **^{31}P NMR (202 MHz, CD_3OD)** δ 18.25; **HRMS (ESI)** m/z 487.1747 $[\text{M}]^+$ (calculated for $[\text{C}_{17}\text{H}_{34}\text{Cl}_2\text{N}_6\text{O}_4\text{P}]^+$ 487.1751).

4.1.4.6. 3-((bis(2-chloroethyl)amino)((1-methyl-2-nitro-1H-imidazol-5-yl)methoxy)phosphoryl)amino)-N-ethyl-N,N-dimethylpropane-

1-aminium iodide (28f). Alkylation of amine **23c** (55 mg, 123 μmol) with ethyl iodide (24 eq.) using the standard procedure (reaction time: 24 h) afforded compound **28f** analytically pure, as a yellow hygroscopic solid (68.0 mg, 113 μmol). **Yield** 92%; **IR (ATR)** $\nu \text{ cm}^{-1}$ 3359, 1490, 1351, 1215, 1192, 1008, 961, 836, 744; **^1H NMR (500 MHz, CD_3OD)** δ 7.28 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.20 (dd, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 13.5 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H-P}} = 8.6 \text{ Hz}$, OCH'), 5.15 (dd, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 13.5 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H-P}} = 8.6 \text{ Hz}$, OCH'), 4.08 (s, 3H, NCH_3), 3.74–3.64 (m, 4H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 3.53–3.36 (m, 8H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), $\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3.10 (s, 6H, $\text{N}^+(\text{CH}_3)_2$), 3.02 (td, 2H, $^3J_{\text{H-P}} = 12.4 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H-P}} = 6.4 \text{ Hz}$, CH_2NHP), 2.05–1.94 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.46–1.34 (m, 3H, CH_2CH_3); **^{13}C NMR (126 MHz, CD_3OD)** δ 147.66 (C_{ArNO_2}), 134.99 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 7.3 \text{ Hz}$, C_{ArCH_2}), 129.34 (CH_{Ar}), 62.83 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+$), 61.15 (CH_2CH_3), 57.93 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 4.7 \text{ Hz}$, OCH₂), 51.03 (2C, $\text{N}^+(\text{CH}_3)_2$), 50.11 (d, 2C, $^2J_{\text{C-P}} = 4.6 \text{ Hz}$, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 43.24 (2C, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 38.83 (CH_2NHP), 35.36 (NCH_3), 25.89 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 4.8 \text{ Hz}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 8.58 (CH_2CH_3); **^{31}P NMR (202 MHz, CD_3OD)** δ (ppm) 17.26; **HRMS** (ESI) m/z 473.1595 $[\text{M}]^+$ (calculated for $[\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{Cl}_2\text{N}_6\text{O}_4\text{P}]^+$ 473.1594).

4.1.4.7. 2-((bis(2-chloroethyl)amino)((1-methyl-2-nitro-1H-imidazol-5-yl)methoxy)phosphoryl)amino)-N-ethyl-N,N-dimethylethane-1-aminium iodide (28g). Alkylation of amine **23d** (114 mg, 0.264 mmol) with ethyl iodide (12 eq.) using the standard procedure (reaction time: 24 h) and purification by preparative high performance liquid chromatography (gradient ACN in water) afforded compound **28g** as a hygroscopic lyophilisate (102 mg, 0.174 mmol). **Yield** 70%; **IR (ATR)** $\nu \text{ cm}^{-1}$ 3400, 3192, 1537, 1488, 1350, 1223, 1191, 1005, 974, 959, 835, 744; **^1H NMR (500 MHz, CD_3OD)** δ 7.28 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.20 (dd, 2H, $^2J_{\text{H-H}} = 13.4 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H-P}} = 8.4 \text{ Hz}$, CH'O), 5.17 (dd, 2H, $^2J_{\text{H-H}} = 13.4 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H-P}} = 8.4 \text{ Hz}$, CH'O), 4.08 (s, 3H, NCH_3), 3.74–3.68 (m, 4H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 3.53–3.33 (m, 10H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{CH}_2$), 3.14 (s, 6H, $\text{N}^+(\text{CH}_3)_2$), 1.42–1.36 (m, 3H, CH_2CH_3); **^{13}C NMR (126 MHz, CD_3OD)** δ 147.73 (C_{ArNO_2}), 134.66 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 7.2 \text{ Hz}$, C_{ArCH_2}), 129.39 (CH_{Ar}), 64.36 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+$), 61.65 (CH_2CH_3), 58.10 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 4.9 \text{ Hz}$, OCH₂), 51.46, 51.44 ($\text{N}^+(\text{CH}_3)_2$), 49.95 (d, 2C, $^2J_{\text{C-P}} = 4.8 \text{ Hz}$, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 43.15 (2C, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 35.74 (CH_2NHP), 35.29 (NCH_3), 8.53 (CH_2CH_3); **^{31}P NMR (202 MHz, CD_3OD)** δ 17.73; **HRMS** (ESI) m/z 459.1427 $[\text{M}]^+$ (calculated for $[\text{C}_{15}\text{H}_{30}\text{Cl}_2\text{N}_6\text{O}_4\text{P}]^+$ 459.1438).

4.1.4.8. 5-((bis(2-chloroethyl)amino)((1-methyl-2-nitro-1H-imidazol-5-yl)methoxy)phosphoryl)amino)-N,N-diethyl-N-methylpentane-1-aminium iodide (29a). Alkylation of amine **24a** (148 mg, 295 μmol) with methyl iodide (12 eq.) using the standard procedure (reaction time: 12 h) afforded compound **29a** analytically pure, as a yellow hygroscopic solid (168 mg, 261 μmol). **Yield** 88%; **IR (ATR)** $\nu \text{ cm}^{-1}$ 3410, 3216, 1537, 1489, 1349, 1216, 1190, 1008, 978, 959, 834, 769, 743; **^1H NMR (500 MHz, CD_3OD)** δ 7.25 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.16 (dd, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 13.4 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H-P}} = 8.3 \text{ Hz}$, CH'O), 5.12 (dd, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 13.4 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H-P}} = 8.7 \text{ Hz}$, CH'O), 4.08 (s, 3H, NCH_3), 3.71–3.62 (m, 4H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 3.50–3.35 (m, 5H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$, NHP), 3.39 (q, 4H, $^3J_{\text{H-H}} = 7.3 \text{ Hz}$, $\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 3.30–3.24 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+$), 3.00 (s, 3H, N^+CH_3), 2.91 (tdd, 2H, $^3J_{\text{H-P}} = 11.2 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H-H}} = 6.8 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H-H}} = 1.5 \text{ Hz}$, CH_2NHP), 1.80–1.70 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+$), 1.59 (qt, 2H, $^3J_{\text{H-H}} = 7.2 \text{ Hz}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHP}$), 1.47–1.38 (m, 8H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHP}$), 1.38–1.32 (m, 6H, $\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$); **^{13}C NMR (126 MHz, CD_3OD)** δ 147.65 (C_{ArNO_2}), 135.11 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 7.0 \text{ Hz}$, C_{ArCH_2}), 129.28 (CH_{Ar}), 61.78 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+$), 57.67 (2C, $\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 57.72 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 5.0 \text{ Hz}$, OCH₂), 50.31 (d, 2C, $^2J_{\text{C-P}} = 4.7 \text{ Hz}$, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 47.83 (N^+CH_3), 43.25 (2C, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 41.40 (CH_2NHP), 35.25 (NCH_3), 32.21 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 5.5 \text{ Hz}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHP}$), 24.51 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHP}$), 22.80 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+$), 8.18 (2C, $\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$); **^{31}P NMR (202 MHz, CD_3OD)** δ 18.28; **HRMS** (ESI) m/z 515.2073 $[\text{M}]^+$ (calculated for $[\text{C}_{19}\text{H}_{38}\text{Cl}_2\text{N}_6\text{O}_4\text{P}]^+$ 515.2064).

4.1.4.9. 4-((bis(2-chloroethyl)amino)((1-methyl-2-nitro-1H-imidazol-5-yl)methoxy)phosphoryl)amino)-N,N-diethyl-N-methylbutane-1-aminium iodide (29b). Alkylation of amine **24b** (27 mg, 55.4 μmol) with methyl iodide (12 eq.) using the standard procedure (reaction time: 24 h) afforded compound **29b** analytically pure, as a yellow hygroscopic solid (30 mg, 47.7 μmol). **Yield** 86%; **IR (ATR)** $\nu \text{ cm}^{-1}$ 3419, 3208, 1537, 1490, 1350, 1217, 1191, 1012, 836, 744; **^1H NMR (500 MHz, CD_3OD)** δ 7.25 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.16 (dd, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 13.3 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H-P}} = 8.3 \text{ Hz}$, CH'O), 5.12 (dd, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 13.3 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H-P}} = 8.6 \text{ Hz}$, CH'O), 4.07 (s, 3H, NCH_3), 3.68 (td, 4H, $^3J_{\text{H-H}} = 7.1 \text{ Hz}$, $^4J_{\text{H-P}} = 2.7 \text{ Hz}$, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 3.51–3.33 (m, 8H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$, $\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 3.29–3.22 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+$), 3.00 (s, 3H, N^+CH_3), 2.94 (td, 2H, $^3J_{\text{H-H}} = 6.8 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H-P}} = 11.6 \text{ Hz}$, CH_2NHP), 1.82–1.71 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+$), 1.55 (qt, 2H, $^3J_{\text{H-H}} = 7.8 \text{ Hz}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHP}$), 1.34 (t, 6H, $^3J_{\text{H-H}} = 7.2 \text{ Hz}$, $\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$); **^{13}C NMR (126 MHz, CD_3OD)** δ 147.67 (C_{ArNO_2}), 135.03 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 7.2 \text{ Hz}$, C_{ArCH_2}), 129.25 (CH_{Ar}), 61.53 (CH_2N^+), 57.76 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 4.9 \text{ Hz}$, OCH₂), 57.70 (2C, $\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 50.24 (d, 2C, $^2J_{\text{C-P}} = 4.7 \text{ Hz}$, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 47.81 (N^+CH_3), 43.22 (2C, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 41.12 (CH_2NHP), 35.22 (NCH_3), 29.54 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 4.6 \text{ Hz}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHP}$), 20.62 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+$), 8.15 (2C, $\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$); **^{31}P NMR (202 MHz, CD_3OD)** δ 18.32; **HRMS** (ESI) m/z 501.1906 $[\text{M}]^+$ (calculated for $[\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{Cl}_2\text{N}_6\text{O}_4\text{P}]^+$ 501.1907).

4.1.4.10. 5-((bis(2-chloroethyl)amino)((1-methyl-2-nitro-1H-imidazol-5-yl)methoxy)phosphoryl)amino)-N,N-diethyl-N-methylpropane-1-aminium iodide (29c). Alkylation of amine **24c** (52 mg, 109 μmol) with methyl iodide (6 eq.) using the standard procedure (reaction time: 4 h) afforded compound **29c** analytically pure, as a yellow hygroscopic solid (63 mg, 102 μmol). **Yield** 93%; **IR (ATR)** $\nu \text{ cm}^{-1}$ 3338, 3210, 1537, 1489, 1350, 1219, 1190, 1008, 978, 960, 835, 745; **^1H NMR (500 MHz, CD_3OD)** δ 7.28 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.19 (dd, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 13.4 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H-P}} = 8.2 \text{ Hz}$, CH'O), 5.15 (dd, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 13.4 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H-P}} = 8.4 \text{ Hz}$, CH'O), 4.08 (s, 3H, NCH_3), 3.73–3.66 (m, 4H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 3.50–3.35 (m, 10H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$, $\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 3.05–2.97 (m, 2H, CH_2NHP), 3.02 (s, 3H, N^+CH_3), 2.00–1.90 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.36 (t, 6H, $^3J_{\text{H-H}} = 7.2 \text{ Hz}$, $\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$); **^{13}C NMR (126 MHz, CD_3OD)** δ 147.65 (C_{ArNO_2}), 134.94 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 7.3 \text{ Hz}$, C_{ArCH_2}), 129.32 (CH_{Ar}), 59.75 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+$), 57.92 (2C, $\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 57.89 (OCH₂), 50.09 (d, 2C, $^2J_{\text{C-P}} = 4.7 \text{ Hz}$, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 47.99 (N^+CH_3), 43.22 (2C, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 38.84 (CH_2NHP), 35.32 (NCH_3), 25.51 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 5.0 \text{ Hz}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 8.22 (2C, $\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$); **^{31}P NMR (202 MHz, CD_3OD)** δ 18.03; **HRMS** (ESI) m/z 487.1750 $[\text{M}]^+$ (calculated for $[\text{C}_{17}\text{H}_{34}\text{Cl}_2\text{N}_6\text{O}_4\text{P}]^+$ 487.1751).

4.1.4.11. 2-((bis(2-chloroethyl)amino)((1-methyl-2-nitro-1H-imidazol-5-yl)methoxy)phosphoryl)amino)-N,N-diethyl-N-methylethane-1-aminium iodide (29d). Alkylation of amine **24d** (100 mg, 218 μmol) with methyl iodide (12 eq.) using the standard procedure (reaction time: 25 h) and purification by preparative high performance liquid chromatography (gradient ACN in water) afforded compound **29d** as a hygroscopic lyophilisate (104 mg, 173 μmol). **Yield** 79%; **IR (ATR)** $\nu \text{ cm}^{-1}$ 3433, 3195, 1537, 1489, 1350, 1223, 1190, 1006, 977, 960, 835, 772, 745; **^1H NMR (500 MHz, CD_3OD)** δ 7.29 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.20 (dd, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 13.4 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H-P}} = 8.4 \text{ Hz}$, CH'O), 5.17 (dd, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 13.4 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H-P}} = 8.4 \text{ Hz}$, CH'O), 4.08 (s, 3H, NCH_3), 3.75–3.65 (m, 4H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 3.52–3.32 (m, 12H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 3.06 (s, 3H, N^+CH_3), 1.36 (t, 6H, $^3J_{\text{H-H}} = 7.2 \text{ Hz}$, $\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$); **^{13}C NMR (126 MHz, CD_3OD)** δ 147.73 (C_{ArNO_2}), 134.70 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 6.8 \text{ Hz}$, C_{ArCH_2}), 129.40 (CH_{Ar}), 61.25 ($\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2\text{CH}_3$), 58.37 (2C, $\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 58.08 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 4.5 \text{ Hz}$, OCH₂), 49.86 (d, 2C, $^2J_{\text{C-P}} = 4.5 \text{ Hz}$, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 48.55 (N^+CH_3), 43.14 (2C, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 35.40 (CH_2NHP), 35.25 (NCH_3), 8.15 (2C, $\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$); **^{31}P NMR (202 MHz, CD_3OD)** δ 17.70; **HRMS** (ESI) m/z 473.1599 $[\text{M}]^+$ (calculated for $[\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{Cl}_2\text{N}_6\text{O}_4\text{P}]^+$ 473.1594).

4.1.4.12. 5-((bis(2-chloroethyl)amino)((1-methyl-2-nitro-1H-imidazol-5-yl)methoxy)phosphoryl)amino)-N,N,N-triethylpentane-1-aminium iodide (29e). Alkylation of amine **24a** (124 mg, 247 μmol) with ethyl iodide (6 eq. initially followed by 6 eq at T 4h and 6 eq at T 6h) using the standard procedure (reaction time: 16 h) afforded compound **29e** analytically pure, as a yellow hygroscopic solid (146 mg, 222 μmol). **Yield** 90%; **IR (ATR)** ν cm^{-1} 3416, 3210, 1537, 1488, 1349, 1217, 1189, 1004, 978, 959, 835, 772, 744; **^1H NMR (500 MHz, CD_3OD)** δ 7.26 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.17 (dd, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 13.4$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 8.3$ Hz, $\text{CH}'\text{O}$), 5.12 (dd, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 13.4$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 8.6$ Hz, $\text{CH}'\text{O}$), 4.08 (s, 3H, NCH_3), 3.70–3.62 (m, 4H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 3.50–3.32 (m, 4H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 3.35 (q, 6H, $^3J_{\text{H-H}} = 7.2$ Hz, $\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), 3.24–3.20 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+$), 2.91 (td, 2H, $^3J_{\text{H-P}} = 11.1$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 6.8$ Hz, CH_2NHP), 1.75–1.68 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+$), 1.60 (qt, 2H, $^3J_{\text{H-H}} = 7.1$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHP}$), 1.50–1.38 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHP}$), 1.31 (m, 9H, $\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$); **^{13}C NMR (126 MHz, CD_3OD)** δ 147.61 (C_{ArNO_2}), 135.12 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 7.2$ Hz, C_{ArCH_2}), 129.29 (CH_{Ar}), 58.15 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+$), 57.73 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 4.6$ Hz, OCH_2), 54.04 (3C, $\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), 50.31 (d, 2C, $^2J_{\text{C-P}} = 4.7$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 43.29 (2C, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 41.42 (CH_2NHP), 35.30 (NCH_3), 32.20 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 5.4$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHP}$), 24.55 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHP}$), 22.43 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+$), 7.89 (3C, $\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$); **^{31}P NMR (202 MHz, CD_3OD)** δ 18.40; **HRMS (ESI)** m/z 529.2231 $[\text{M}]^+$ (calculated for $[\text{C}_{20}\text{H}_{40}\text{Cl}_2\text{N}_6\text{O}_4\text{P}]^+$ 529.2220).

4.1.4.13. 4-((bis(2-chloroethyl)amino)((1-methyl-2-nitro-1H-imidazol-5-yl)methoxy)phosphoryl)amino)-N,N,N-triethylbutane-1-aminium iodide (29f). Alkylation of amine **24b** (28 mg, 57.8 μmol) with ethyl iodide (18 eq. initially followed by 18 eq after 15 h) using the standard procedure (reaction time: 56 h) afforded compound **29f** analytically pure, as a yellow hygroscopic solid (28 mg, 43.5 μmol). **Yield** 78%; **IR (ATR)** ν cm^{-1} 3414, 3255, 1537, 1488, 1350, 1221, 1190, 1007, 835, 744; **^1H NMR (500 MHz, CD_3OD)** δ 7.26 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.21–5.09 (m, 2H, CH_2O), 4.08 (s, 3H, NCH_3), 3.73–3.61 (m, 4H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 3.52–3.32 (m, 4H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 3.35 (q, 6H, $^3J_{\text{H-H}} = 7.3$ Hz, $\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), 3.24–3.19 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+$), 2.96 (td, 2H, $^3J_{\text{H-P}} = 11.4$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 6.7$ Hz, CH_2NHP), 1.79–1.72 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+$), 1.63–1.53 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHP}$), 1.36–1.28 (m, 9H, $\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$); **^{13}C NMR (126 MHz, CD_3OD)** δ 147.65 (C_{ArNO_2}), 135.04 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 7.3$ Hz, C_{ArCH_2}), 129.26 (CH_{Ar}), 57.92 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+$), 57.76 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 4.6$ Hz, OCH_2), 54.07 (3C, $\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), 50.24 (d, 2C, $^2J_{\text{C-P}} = 4.6$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 43.25 (2C, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 41.19 (CH_2NHP), 35.27 (NCH_3), 29.56 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 4.7$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHP}$), 20.29 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+$), 7.85 (3C, $\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$); **^{31}P NMR (202 MHz, CD_3OD)** δ 18.34; **HRMS (ESI)** m/z 515.2049 $[\text{M}]^+$ (calculated for $[\text{C}_{19}\text{H}_{38}\text{Cl}_2\text{N}_6\text{O}_4\text{P}]^+$ 515.2064).

4.1.4.14. 3-((bis(2-chloroethyl)amino)((1-methyl-2-nitro-1H-imidazol-5-yl)methoxy)phosphoryl)amino)-N,N,N-triethylpropane-1-aminium iodide (29g). Alkylation of amine **24c** (19 mg, 39.7 μmol) with ethyl iodide (12 eq. initially followed by 12 eq at T 24h and 12 eq at T 36h) using the standard procedure (reaction time: 72 h) and purification by preparative high performance liquid chromatography (gradient ACN in water) afforded compound **29g** as a hygroscopic lyophilisate. **Yield** 23%; **IR (ATR)** ν cm^{-1} 3431, 3229, 1537, 1489, 1351, 1215, 1190, 1008, 982, 960, 836, 745; **^1H NMR (500 MHz, CD_3OD)** δ 7.26 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.18 (dd, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 13.4$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 8.4$ Hz, $\text{CH}'\text{O}$), 5.14 (dd, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 13.4$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 8.5$ Hz, $\text{CH}'\text{O}$), 4.08 (s, 3H, NCH_3), 3.74–3.64 (m, 4H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 3.63–3.25 (m, 12H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$, $\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), 3.00 (td, 2H, $^3J_{\text{H-P}} = 12.2$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 6.4$ Hz, CH_2NHP), 1.98–1.80 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHP}$), 1.31 (t, 9H, $^3J_{\text{H-H}} = 6.2$ Hz, $\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$); **^{13}C NMR (126 MHz, CD_3OD)** δ 147.68 (C_{ArNO_2}), 134.89 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 7.3$ Hz, C_{ArCH_2}), 129.27 (CH_{Ar}), 57.85 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 4.6$ Hz, OCH_2), 56.14 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+$), 54.16 (3C, $\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), 50.07 (d, 2C, $^2J_{\text{C-P}} = 4.7$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 43.18 (2C,

$\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 38.81 (CH_2NHP), 35.23 (NCH_3), 25.15 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 5.5$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHP}$), 7.82 (3C, $\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$); **NMR ^{31}P (202 MHz, CD_3OD)** δ 18.03; **HRMS (ESI)** m/z 501.1895 $[\text{M}]^+$ (calculated for $[\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{Cl}_2\text{N}_6\text{O}_4\text{P}]^+$ 501.1907).

4.1.4.15. 2-((bis(2-chloroethyl)amino)((1-methyl-2-nitro-1H-imidazol-5-yl)methoxy)phosphoryl)amino)-N,N,N-triethylethane-1-aminium iodide (29h). Alkylation of amine **24d** (70 mg, 153 μmol) with ethyl iodide (12 eq. initially followed by 12 eq after 26 h) using the standard procedure (reaction time: 50 h) and purification by preparative high performance liquid chromatography (gradient ACN in water) afforded compound **29h** as a hygroscopic lyophilisate (57 mg, 92 μmol). **Yield** 60%; **IR (ATR)** ν cm^{-1} 3438, 3182, 1537, 1489, 1350, 1222, 1190, 1001, 958, 834, 770; **^1H NMR (500 MHz, CD_3OD)** δ 7.27 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.20 (dd, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 13.4$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 8.4$ Hz, $\text{CH}'\text{O}$), 5.17 (dd, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 13.4$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 8.4$ Hz, $\text{CH}'\text{O}$), 4.08 (s, 3H, NCH_3), 3.74–3.65 (m, 4H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 3.53–3.34 (m, 4H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 3.38 (q, 6H, $^3J_{\text{H-H}} = 7.3$ Hz, $\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), 3.33–3.25 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+$), 1.33 (t, 9H, $^3J_{\text{H-H}} = 7.2$ Hz, $\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$); **^{13}C NMR (126 MHz, CD_3OD)** δ 147.75 (C_{ArNO_2}), 134.67 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 7.3$ Hz, C_{ArCH_2}), 129.43 (CH_{Ar}), 58.11 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 4.6$ Hz, OCH_2), 57.79 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+$), 54.58 (3C, $\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), 49.95 (d, 2C, $^2J_{\text{C-P}} = 4.7$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 43.17 (d, 2C, $^3J_{\text{C-P}} = 1.6$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 35.02 (CH_2NHP), 35.21 (NCH_3), 7.82 (3C, $\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$); **NMR ^{31}P (202 MHz, CD_3OD)** δ 17.88; **HRMS (ESI)** m/z 487.1760 $[\text{M}]^+$ (calculated for $[\text{C}_{17}\text{H}_{34}\text{Cl}_2\text{N}_6\text{O}_4\text{P}]^+$ 487.1751).

4.1.4.16. 5-((bis(2-chloroethyl)amino)((1-methyl-2-nitro-1H-imidazol-5-yl)methoxy)phosphoryl)amino)-N,N-diisopropyl-N-methylpentane-1-aminium iodide (30a). Alkylation of amine **25a** (67 mg, 126 μmol) with methyl iodide (6 eq. initially followed by 6 eq at T 20h, 6 eq at T 24h and 6 eq at T 28h) using the standard procedure (reaction time: 48 h) afforded in quantitative yield, compound **30a** analytically pure, as a yellow hygroscopic solid (85 mg, 126 mmol). **IR (ATR)** ν cm^{-1} 3411, 1537, 1489, 1351, 1190, 1014, 961, 835, 743; **^1H NMR (500 MHz, CD_3OD)** δ 7.26 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.17 (dd, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 13.4$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 8.2$ Hz, $\text{CH}'\text{O}$), 5.13 (dd, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 13.4$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 8.6$ Hz, $\text{CH}'\text{O}$), 4.08 (s, 3H, NCH_3), 3.99 (hept, 2H, $^3J_{\text{H-H}} = 6.6$ Hz, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3.74–3.62 (m, 4H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 3.51–3.34 (m, 4H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 3.33–3.25 (m, 2H, CH_2N^+), 2.96–2.87 (m, 2H, CH_2NHP), 2.94 (s, 3H, N^+CH_3), 1.88–1.77 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+$), 1.60 (qt, 2H, $^3J_{\text{H-H}} = 7.1$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHP}$), 1.47 (d, 12H, $^3J_{\text{H-H}} = 6.3$ Hz, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.44–1.38 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHP}$); **^{13}C NMR (126 MHz, CD_3OD)** δ 147.60 (C_{ArNO_2}), 135.12 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 7.1$ Hz, C_{ArCH_2}), 129.29 (CH_{Ar}), 64.92 (2C, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 58.34 (CH_2N^+), 57.74 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 4.7$ Hz, OCH_2), 50.31 (d, 2C, $^2J_{\text{C-P}} = 4.7$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 44.17 (N^+CH_3), 43.30 (2C, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 41.45 (CH_2NHP), 35.32 (NCH_3), 32.13 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 5.6$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHP}$), 25.11 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHP}$), 24.79 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+$), 17.96, 17.69 (4C, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); **^{31}P NMR (202 MHz, CD_3OD)** δ 18.39; **HRMS (ESI)** m/z 543.2384 $[\text{M}]^+$ (calculated for $[\text{C}_{21}\text{H}_{42}\text{Cl}_2\text{N}_6\text{O}_4\text{P}]^+$ 543.2377).

4.1.4.17. 4-((bis(2-chloroethyl)amino)((1-methyl-2-nitro-1H-imidazol-5-yl)methoxy)phosphoryl)amino)-N,N-diisopropyl-N-methylbutane-1-aminium iodide (30b). Alkylation of amine **25b** (72 mg, 141 μmol) with methyl iodide (12 eq. initially followed by 12 eq after 3 h) using the standard procedure (reaction time: 72 h) afforded compound **30b** analytically pure, as a yellow hygroscopic solid (77 mg, 117 μmol). **Yield** 83%; **IR (ATR)** ν cm^{-1} 3424, 3202, 1537, 1489, 1350, 1219, 1190, 1007, 980, 960, 835, 743; **^1H NMR (200 MHz, CD_3OD)** δ (ppm) 7.26 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.25–5.04 (m, 2H, CH_2O), 4.08 (s, 3H, NCH_3), 4.02–3.92 (m, 2H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3.75–3.60 (m, 4H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 3.55–3.34 (m, 6H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$, CH_2N^+), 3.05–2.86 (m, 2H, CH_2NHP), 2.93 (s, 3H, N^+CH_3), 1.93–1.73 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+$), 1.64–1.40 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHP}$), 1.47 (d, 12H, $^3J_{\text{H-H}}$

$H = 6.5$ Hz, $CH(CH_3)_2$); ^{13}C NMR (126 MHz, CD_3OD) δ (ppm) 147.62 ($C_{Ar}NO_2$), 135.06 (d, $^3J_{C-P} = 7.2$ Hz, $C_{Ar}CH_2$), 129.27 (CH_{Ar}), 65.21, 64.97 ($CH(CH_3)_2$), 58.06 (CH_2N^+), 57.75 (d, $^2J_{C-P} = 4.7$ Hz, OCH_2), 50.24 (d, 2C, $^2J_{C-P} = 4.7$ Hz, $N(CH_2CH_2Cl)_2$), 44.19 (N^+CH_3), 43.26 (2C, $N(CH_2CH_2Cl)_2$), 41.12 (CH_2NHP), 35.30 (NCH_3), 30.06 (d, $^3J_{C-P} = 5.4$ Hz, CH_2CH_2NHP), 22.59 ($CH_2CH_2N^+$), 17.95, 17.67 (4C, $CH(CH_3)_2$); ^{31}P NMR (202 MHz, CD_3OD) δ (ppm) 18.26; HRMS (ESI) m/z 529.2222 $[M]^+$ (calculated for $[C_{20}H_{40}Cl_2N_6O_4P]^+$ 529.2220).

4.1.4.18. 3-((bis(2-chloroethyl)amino)((1-methyl-2-nitro-1H-imidazol-5-yl)methoxy)phosphoryl)amino)-N,N-diisopropyl-N-methylpropane-1-aminium iodide (**30c**). Alkylation of amine **25c** (50 mg, 100 μ mol) with methyl iodide (12 eq. initially followed by 12 eq after 72 h) using the standard procedure (reaction time: 96 h) afforded compound **30c** analytically pure, as a yellow hygroscopic solid (61 mg, 95.3 mmol). Yield 96%; IR (ATR) ν cm^{-1} 3413, 3209, 1537, 1490, 1350, 1217, 1190, 1007, 980, 960, 835, 743; 1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ (ppm) 7.27 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.20 (dd, 1H, $^2J_{H-H} = 13.4$ Hz, $^3J_{H-P} = 8.1$ Hz, $CH'O$), 5.15 (dd, 1H, $^2J_{H-H} = 13.4$ Hz, $^3J_{H-P} = 8.4$ Hz, $CH'O$), 4.08 (s, 3H, NCH_3), 3.98 (hept, 2H, $^3J_{H-H} = 6.5$ Hz, $CH(CH_3)_2$), 3.74–3.63 (m, 4H, $N(CH_2CH_2Cl)_2$), 3.54–3.33 (m, 6H, $N(CH_2CH_2Cl)_2$, CH_2N^+), 3.04–2.94 (m, 2H, CH_2NHP), 2.94 (s, 3H, N^+CH_3), 2.06–1.92 (m, 2H, $CH_2CH_2CH_2$), 1.47 (d, 12H, $^3J_{H-H} = 6.4$ Hz, $CH(CH_3)_2$); ^{13}C NMR (126 MHz, CD_3OD) δ 147.59 ($C_{Ar}NO_2$), 134.95 (d, $^3J_{C-P} = 7.4$ Hz, $C_{Ar}CH_2$), 129.31 (CH_{Ar}), 65.17, 65.11 ($CH(CH_3)_2$), 57.89 (d, $^2J_{C-P} = 4.8$ Hz, OCH_2), 56.32 (CH_2N^+), 50.07 (d, 2C, $^2J_{C-P} = 4.7$ Hz, $N(CH_2CH_2Cl)_2$), 44.37 (N^+CH_3), 43.24 (2C, $N(CH_2CH_2Cl)_2$), 39.14 (CH_2NHP), 35.37 (NCH_3), 27.26 (d, $^3J_{C-P} = 4.3$ Hz, $CH_2CH_2CH_2$), 17.96, 17.69 (4C, $CH(CH_3)_2$); ^{31}P NMR (202 MHz, CD_3OD) δ 17.94; HRMS (ESI) m/z 515.2067 $[M]^+$ (calculated for $[C_{19}H_{38}Cl_2N_6O_4P]^+$ 515.2064).

4.1.4.19. 2-((bis(2-chloroethyl)amino)((1-methyl-2-nitro-1H-imidazol-5-yl)methoxy)phosphoryl)amino)-N,N-diisopropyl-N-methylethane-1-aminium iodide (**30d**). Alkylation of amine **25d** (28 mg, 57.5 μ mol) with methyl iodide (24 eq. initially followed by 24 eq after 15 h) using the standard procedure (reaction time: 96 h) afforded compound **30d** analytically pure, as a yellow hygroscopic solid (30 mg, 47.7 mmol). Yield 83%; IR (ATR) ν cm^{-1} 3425, 3210, 1537, 1490, 1351, 1220, 1190, 1008, 960, 836, 743; 1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 7.29 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.21 (dd, 1H, $^2J_{H-H} = 13.4$ Hz, $^3J_{H-P} = 8.4$ Hz, $CH'O$), 5.12 (dd, 1H, $^2J_{H-H} = 13.4$ Hz, $^3J_{H-P} = 8.4$ Hz, $CH'O$), 4.08 (s, 3H, NCH_3), 4.03–3.89 (m, 3H, NHP , $CH(CH_3)_2$), 3.70 (td, 4H, $^3J_{H-H} = 6.5$ Hz, $^4J_{H-P} = 3.4$ Hz, $N(CH_2CH_2Cl)_2$), 3.52–3.26 (m, 8H, $N(CH_2CH_2Cl)_2$, CH_2CH_2NHP), 2.96 (s, 3H, N^+CH_3), 1.43–1.50 (m, 12H, $CH(CH_3)_2$); ^{13}C NMR (126 MHz, CD_3OD) δ 147.69 ($C_{Ar}NO_2$), 134.70 (d, $^3J_{C-P} = 7.2$ Hz, $C_{Ar}CH_2$), 129.45 (CH_{Ar}), 65.60, 65.54 ($CH(CH_3)_2$), 58.16 (d, $^2J_{C-P} = 4.7$ Hz, OCH_2), 57.85 (d, $^3J_{C-P} = 3.1$ Hz, CH_2N^+), 49.92 (d, 2C, $^2J_{C-P} = 4.7$ Hz, $N(CH_2CH_2Cl)_2$), 43.75 (N^+CH_3), 43.22 (2C, $N(CH_2CH_2Cl)_2$), 36.61 (CH_2NHP), 35.33 (NCH_3), 17.87, 17.50 (4C, $CH(CH_3)_2$); ^{31}P NMR (202 MHz, CD_3OD) δ 17.69; HRMS (ESI) m/z 501.1894 $[M]^+$ (calculated for $[C_{18}H_{36}Cl_2N_6O_4P]^+$ 501.1907).

4.1.4.20. 5-((bis(2-chloroethyl)amino)((1-methyl-2-nitro-1H-imidazol-5-yl)methoxy)phosphoryl)amino)-N-benzyl-N,N-dimethylpentane-1-aminium (**31a**). Alkylation of amine **26a** (33 mg, 61.3 μ mol) with methyl iodide (6 eq.) using the standard procedure (reaction time: 20 h) afforded compound **31a** analytically pure, as a yellow hygroscopic solid (40 mg, 57.9 μ mol). Yield 94%; IR (ATR) ν cm^{-1} 3421, 3220, 1652, 1537, 1488, 1350, 1219, 1190, 1005, 960, 834, 729, 703; 1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 7.65–7.50 (m, 5H, CH_{Ar}), 7.25 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.16 (dd, 1H, $^2J_{H-H} = 13.5$ Hz, $^3J_{H-P} = 8.4$ Hz, $CH'O$), 5.12 (dd, 1H, $^2J_{H-H} = 13.5$ Hz, $^3J_{H-P} = 8.9$ Hz, $CH'O$), 4.57 (s, 2H, CH_2Ph), 4.07 (s, 3H, NCH_3), 3.74–3.61 (m, 4H, $N(CH_2CH_2Cl)_2$),

3.51–3.33 (m, 7H, $N(CH_2CH_2Cl)_2$, $CH_2CH_2N^+$, NHP), 3.05 (s, 6H, $N^+(CH_3)_2$), 2.91 (tdd, 2H, $^3J_{H-P} = 11.1$ Hz, $^3J_{H-H} = 6.7$ Hz, $^3J_{H-H} = 2.0$ Hz, CH_2NHP), 1.94–1.87 (m, 2H, $CH_2CH_2N^+$), 1.60 (qt, 2H, $^3J_{H-H} = 7.1$ Hz, CH_2CH_2NHP), 1.47–1.37 (m, 2H, $CH_2CH_2CH_2NHP$); ^{13}C NMR (126 MHz, CD_3OD) δ 147.64 ($C_{Ar}NO_2$), 135.10 (d, $^3J_{C-P} = 6.9$ Hz, $C_{Ar}CH_2O$), 134.13 ($C_{Ar}CH_2N$), 131.95, 130.38, 129.27, 128.89 (6C, CH_{Ar}), 68.98 (CH_2Ph), 65.78 ($CH_2CH_2N^+$), 57.72 (d, $^2J_{C-P} = 4.7$ Hz, OCH_2), 50.50 (2C, $N^+(CH_3)_2$), 50.31 (d, 2C, $^2J_{C-P} = 4.7$ Hz, $N(CH_2CH_2Cl)_2$), 43.24 (2C, $N(CH_2CH_2Cl)_2$), 41.40 (CH_2NHP), 35.22 (NCH_3), 32.21 (d, $^3J_{C-P} = 5.5$ Hz, CH_2CH_2NHP), 24.50 ($CH_2CH_2CH_2NHP$), 23.35 ($CH_2CH_2N^+$); ^{31}P NMR (202 MHz, CD_3OD) δ 18.27; HRMS (ESI) m/z 563.2047 $[M]^+$ (calculated for $[C_{23}H_{38}Cl_2N_6O_4P]^+$ 563.2064).

4.1.4.21. 4-((bis(2-chloroethyl)amino)((1-methyl-2-nitro-1H-imidazol-5-yl)methoxy)phosphoryl)amino)-N-benzyl-N,N-dimethylbutane-1-aminium iodide (**31b**). Alkylation of amine **26b** (31 mg, 56.4 μ mol) with methyl iodide (6 eq.) using the standard procedure (reaction time: 20 h) afforded in quantitative yield, compound **31b** analytically pure, as a yellow hygroscopic solid (38 mg, 56.1 μ mol). IR (ATR) ν cm^{-1} 3419, 3231, 1537, 1489, 1350, 1216, 1190, 1003, 980, 960, 835, 729, 703; 1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 7.61–7.51 (m, 5H, CH_{Ar}), 7.25 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.18 (dd, 1H, $^2J_{H-H} = 13.7$ Hz, $^3J_{H-P} = 8.5$ Hz, $CH'O$), 5.13 (dd, 1H, $^2J_{H-H} = 13.7$ Hz, $^3J_{H-P} = 8.9$ Hz, $CH'O$), 4.57 (s, 2H, CH_2Ph), 4.07 (s, 3H, NCH_3), 3.70–3.66 (m, 4H, $N(CH_2CH_2Cl)_2$), 3.51–3.34 (m, 6H, $N(CH_2CH_2Cl)_2$, $CH_2CH_2N^+$), 3.06 (s, 6H, $N^+(CH_3)_2$), 2.97 (td, 2H, $^3J_{H-P} = 11.4$ Hz, $^3J_{H-H} = 6.8$ Hz, CH_2NHP), 1.99–1.91 (m, 2H, $CH_2CH_2N^+$), 1.58 (qt, 2H, $^3J_{C-P} = 7.0$ Hz, CH_2CH_2NHP); ^{13}C NMR (126 MHz, CD_3OD) δ 147.66 ($C_{Ar}NO_2$), 135.02 (d, $^3J_{C-P} = 7.3$ Hz, $C_{Ar}CH_2O$), 134.13 ($C_{Ar}CH_2N$), 131.97, 130.39, 129.26, 128.86 (6C, CH_{Ar}), 68.98 (CH_2Ph), 65.45 ($CH_2CH_2N^+$), 57.79 (d, $^2J_{C-P} = 4.7$ Hz, OCH_2), 50.53 (2C, $N^+(CH_3)_2$), 50.26 (d, 2C, $^2J_{C-P} = 4.7$ Hz, $N(CH_2CH_2Cl)_2$), 43.24 (2C, $N(CH_2CH_2Cl)_2$), 41.08 (CH_2NHP), 35.25 (NCH_3), 29.52 (d, $^3J_{C-P} = 5.5$ Hz, CH_2CH_2NHP), 21.18 ($CH_2CH_2N^+$); ^{31}P NMR (202 MHz, CD_3OD) δ 18.26; HRMS (ESI) m/z 549.1895 $[M]^+$ (calculated for $[C_{22}H_{36}Cl_2N_6O_4P]^+$ 549.1907).

4.1.4.22. 3-((bis(2-chloroethyl)amino)((1-methyl-2-nitro-1H-imidazol-5-yl)methoxy)phosphoryl)amino)-N-benzyl-N,N-dimethylpropane-1-aminium iodide (**31c**). Method A: Alkylation of amine **26c** (28 mg, 53.7 μ mol) with methyl iodide (6 eq) using the standard procedure (reaction time: 20 h) afforded compound **31c** analytically pure, as a yellow hygroscopic solid (33 mg, 49.7 μ mol). Yield 93%.

Method B: Alkylation of amine **23c** (52 mg, 117 μ mol) was carried out with 24 equivalents of benzyl iodide [44] (351 μ L, 2.82 mmol) in the presence of potassium carbonate (97 mg, 702 μ mol). The work up of the reaction mixture according to the general procedure allowed to obtain a crude product that was dissolved in a minimum amount of water and washed with DCM (10 mL). The aqueous layer was decanted and then lyophilised, to afford compound **31c**, analytically pure, as a yellow hygroscopic solid (23 mg, 34.7 mmol). Yield 30%. IR (ATR) ν cm^{-1} 3427, 3214, 1645, 1537, 1489, 1350, 1217, 1190, 1005, 977, 960, 835, 729, 702; 1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 7.61–7.51 (m, 5H, CH_{Ar}), 7.25 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.17 (dd, 1H, $^2J_{H-H} = 13.4$ Hz, $^3J_{H-P} = 8.3$ Hz, $CH'O$), 5.13 (dd, 1H, $^2J_{H-H} = 13.4$ Hz, $^3J_{H-P} = 8.4$ Hz, $CH'O$), 4.58 (s, 2H, CH_2Ph), 4.07 (s, 3H, NCH_3), 3.73–3.63 (m, 4H, $N(CH_2CH_2Cl)_2$), 3.52–3.35 (m, 6H, $N(CH_2CH_2Cl)_2$, $CH_2CH_2N^+$), 3.07 (s, 6H, $N^+(CH_3)_2$), 3.03 (td, 2H, $^3J_{H-P} = 12.5$ Hz, $^3J_{H-H} = 6.5$ Hz, CH_2NHP), 2.13–2.05 (m, 2H, $CH_2CH_2CH_2$); ^{13}C NMR (126 MHz, CD_3OD) δ 147.68 ($C_{Ar}NO_2$), 134.89 (d, $^3J_{C-P} = 7.3$ Hz, $C_{Ar}CH_2O$), 134.23 ($C_{Ar}CH_2N$), 131.99, 130.40, 129.33, 128.78 (6C, CH_{Ar}), 69.31 (CH_2Ph), 63.67 ($CH_2CH_2N^+$), 57.92 (d, $^2J_{C-P} = 4.8$ Hz, OCH_2), 50.67, 50.65 ($N^+(CH_3)_2$), 50.09 (d, 2C, $^2J_{C-P} = 4.7$ Hz, $N(CH_2CH_2Cl)_2$), 43.21 (2C, $N(CH_2CH_2Cl)_2$), 38.89

(CH₂NHP), 35.31 (NCH₃), 26.03 (CH₂CH₂CH₂); **³¹P NMR (202 MHz, CD₃OD)** δ 18.01; **HRMS** (ESI) *m/z* 535.1750 [M]⁺ (calculated for [C₂₁H₃₄Cl₂N₆O₄P]⁺ 535.1751).

4.1.4.23. 2-((bis(2-chloroethyl)amino)((1-methyl-2-nitro-1H-imidazol-5-yl)methoxy)phosphoryl)amino)-N-benzyl-N,N-dimethylethane-1-aminium iodide (**31d**). Alkylation of amine **26d** (24 mg, 47.3 μmol) with methyl iodide (12 eq.) using the standard procedure (reaction time: 12 h) afforded in quantitative yield, compound **31d** analytically pure, as a yellow hygroscopic solid (30 mg, 47.3 μmol). **IR (ATR)** *v* cm⁻¹ 3421, 3203, 1537, 1489, 1350, 1217, 1191, 1000, 980, 959, 835, 765, 744, 703; **¹H NMR (500 MHz, CD₃OD)** δ 7.63–7.51 (m, 5H, CH_{Ar}), 7.25 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.19 (m, 2H, OCH₂), 4.60 (s, 2H, CH₂Ph), 4.06 (s, 3H, NCH₃), 3.69 (td, 4H, ³J_{H-H} = 6.6 Hz, ³J_{H-P} = 3.1 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂), 3.52–3.34 (m, 8H, N(CH₂CH₂Cl)₂, CH₂CH₂NHP), 3.11 (s, 6H, N⁺(CH₃)₂); **¹³C NMR (126 MHz, CD₃OD)** δ 147.70 (C_{Ar}NO₂), 134.65 (d, ³J_{C-P} = 7.1 Hz, C_{Ar}CH₂O), 134.24 (C_{Ar}CH₂N), 132.11, 130.44, 129.39, 128.57 (6C, CH_{Ar}), 70.01 (CH₂Ph), 65.35 (CH₂CH₂N⁺), 58.08 (d, ²J_{C-P} = 4.9 Hz, OCH₂), 50.96, 50.94 (N⁺(CH₃)₂), 49.85 (d, 2C, ²J_{C-P} = 4.7 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂), 43.12 (2C, N(CH₂CH₂Cl)₂), 35.91 (CH₂NHP), 35.24 (NCH₃); **³¹P NMR (202 MHz, CD₃OD)** δ 17.80; **HRMS** (ESI) *m/z* 521.1595 [M]⁺ (calculated for [C₂₀H₃₂Cl₂N₆O₄P]⁺ 521.1594).

4.1.4.24. 5-((bis(2-chloroethyl)amino)((1-methyl-2-nitro-1H-imidazol-5-yl)methoxy)phosphoryl)amino)-N-benzyl-N-ethyl-N-methylpentane-1-aminium iodide (**31e**). Alkylation of amine **26a** (32 mg, 58.2 mmol) with ethyl iodide (18 eq. initially followed by 18 eq at T 16h and 18 eq at T 24h) using the standard procedure (reaction time: 72 h) afforded in quantitative yield, compound **31e** analytically pure, as a yellow hygroscopic solid (40 mg, 56.7 μmol). **IR (ATR)** *v* cm⁻¹ 3425, 3240, 1537, 1489, 1350, 1215, 1190, 1008, 960, 835, 765, 744, 702; **¹H NMR (500 MHz, CD₃OD)** δ 7.64–7.50 (m, 5H, CH_{Ar}), 7.24 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.15 (dd, 1H, ²J_{H-H} = 13.3 Hz, ³J_{H-P} = 8.3 Hz, CH'O), 5.11 (dd, 1H, ²J_{H-H} = 13.1 Hz, ³J_{H-P} = 8.1 Hz, CH'O), 4.54 (s, 2H, CH₂Ph), 4.07 (s, 3H, NCH₃), 3.74–3.61 (m, 4H, N(CH₂CH₂Cl)₂), 3.50–3.33 (m, 6H, N(CH₂CH₂Cl)₂, N⁺CH₂CH₃), 3.29–3.18 (m, 2H, CH₂CH₂N⁺), 2.96 (s, 3H, N⁺CH₃), 2.94–2.87 (m, 2H, CH₂NHP), 1.85–1.77 (m, 2H, CH₂CH₂N⁺), 1.60 (qt, 2H, ³J_{H-H} = 6.9 Hz, CH₂CH₂NHP), 1.48–1.30 (m, 5H, CH₂CH₂CH₂NHP, N⁺CH₂CH₃); **¹³C NMR (126 MHz, CD₃OD)** δ 147.65 (C_{Ar}NO₂), 135.09 (d, ³J_{C-P} = 7.0 Hz, C_{Ar}CH₂O), 134.09 (C_{Ar}CH₂N), 131.88, 130.40, 129.26, 128.78 (6C, CH_{Ar}), 66.42 (CH₂Ph), 61.75 (CH₂CH₂N⁺), 57.71 (d, ²J_{C-P} = 4.3 Hz, OCH₂), 57.70 (N⁺CH₂CH₃), 50.30 (d, 2C, ²J_{C-P} = 4.7 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂), 47.86 (N⁺CH₃), 43.24 (2C, N(CH₂CH₂Cl)₂), 41.43 (CH₂NHP), 35.20 (NCH₃), 32.23 (d, ³J_{C-P} = 5.5 Hz, CH₂CH₂NHP), 24.53 (CH₂CH₂CH₂NHP), 23.01 (CH₂CH₂N⁺), 8.47 (N⁺CH₂CH₃); **³¹P NMR (202 MHz, CD₃OD)** δ 18.40; **HRMS** (ESI) *m/z* 577.2204 [M]⁺ (calculated for [C₂₄H₄₀Cl₂N₆O₄P]⁺ 577.2220).

4.1.4.25. 4-((bis(2-chloroethyl)amino)((1-methyl-2-nitro-1H-imidazol-5-yl)methoxy)phosphoryl)amino)-N-benzyl-N-ethyl-N-methylbutane-1-aminium iodide (**31f**). Alkylation of amine **26b** (49 mg, 90.8 μmol) with ethyl iodide (25 eq.) using the standard procedure (reaction time: 48 h) and purification by preparative high performance liquid chromatography (gradient ACN in water) afforded compound **31f** as a hygroscopic lyophilisate (29 mg, 42.5 μmol). **Yield** 47%; **IR (ATR)** *v* cm⁻¹ 3412, 3214, 1537, 1489, 1350, 1215, 1190, 1005, 979, 959, 834, 767, 744, 702; **¹H NMR (500 MHz, CD₃OD)** δ 7.60–7.50 (m, 5H, CH_{Ar}), 7.25 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.17 (dd, 2H, ²J_{H-H} = 13.4 Hz, ³J_{H-P} = 8.5 Hz, CH'O), 5.13 (dd, 2H, ²J_{H-H} = 13.4 Hz, ³J_{H-P} = 8.5 Hz, CH'O), 4.55 (s, 2H, CH₂Ph), 4.07 (s, 3H, NCH₃), 3.72–3.64 (m, 4H, N(CH₂CH₂Cl)₂), 3.52–3.19 (m, 8H, N(CH₂CH₂Cl)₂,

CH₂N⁺CH₂CH₃), 3.01–2.93 (m, 2H, CH₂NHP), 2.97 (s, 3H, N⁺CH₃), 2.00–1.82 (m, 2H, CH₂CH₂N⁺), 1.57 (qt, 2H, ³J_{H-H} = 7.2 Hz, CH₂CH₂NHP), 1.44 (t, 3H, ³J_{H-H} = 7.3 Hz, N⁺CH₂CH₃); **¹³C NMR (126 MHz, CD₃OD)** δ 147.62 (C_{Ar}NO₂), 135.05 (d, ³J_{C-P} = 7.3 Hz, C_{Ar}CH₂O), 134.12 (C_{Ar}CH₂N), 131.83, 130.37, 129.29, 128.76 (6C, CH_{Ar}), 66.36 (CH₂Ph), 61.48 (CH₂CH₂N⁺), 57.81 (d, ²J_{C-P} = 4.6 Hz, OCH₂), 57.79 (N⁺CH₂CH₃), 50.27 (d, 2C, ²J_{C-P} = 4.7 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂), 47.94 (N⁺CH₃), 43.30 (2C, N(CH₂CH₂Cl)₂), 41.11 (CH₂NHP), 35.36 (NCH₃), 29.50 (d, ³J_{C-P} = 5.2 Hz, CH₂CH₂NHP), 20.97 (CH₂CH₂N⁺), 8.57 (N⁺CH₂CH₃); **³¹P NMR (202 MHz, CD₃OD)** δ 18.29; **HRMS** (ESI) *m/z* 563.2048 [M]⁺ (calculated for [C₂₃H₃₈Cl₂N₆O₄P]⁺ 563.2064).

4.1.4.26. 3-((bis(2-chloroethyl)amino)((1-methyl-2-nitro-1H-imidazol-5-yl)methoxy)phosphoryl)amino)-N-benzyl-N-ethyl-N-methylpropane-1-aminium iodide (**31g**). Alkylation of amine **26c** (32 mg, 60.7 μmol) with ethyl iodide (24 eq. initially followed by 24 eq at T 24h and 24 eq at T 48 h) using the standard procedure (reaction time: 72 h) and purification by preparative high performance liquid chromatography (gradient ACN in water) afforded compound **31g** as a hygroscopic lyophilisate. **Yield** 32%; **IR (ATR)** *v* cm⁻¹ 3397, 3213, 1537, 1488, 1350, 1214, 1190, 1006, 959, 835, 761, 702; **¹H NMR (500 MHz, CD₃OD)** δ 7.61–7.49 (m, 5H, CH_{Ar}), 7.25 (2s, 1H, CH_{Ar}), 5.19–5.09 (m, 2H, CH₂O), 4.54 (s, 2H, CH₂Ph), 4.06 (2s, 3H, NCH₃), 3.72–3.63 (m, 4H, N(CH₂CH₂Cl)₂), 3.51–3.33 (m, 8H, N(CH₂CH₂Cl)₂, CH₂N⁺CH₂CH₃), 3.06–2.96 (m, 2H, CH₂NHP), 2.97 (s, 3H, N⁺CH₃), 2.13–1.93 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂), 1.45 (t, 3H, ³J_{H-H} = 7.3 Hz, N⁺CH₂CH₃); **¹³C NMR (126 MHz, CD₃OD)** δ 147.69 (C_{Ar}NO₂), 134.85 (d, ³J_{C-P} = 7.3 Hz, C_{Ar}CH₂O), 134.16 (C_{Ar}CH₂N), 131.94, 130.43, 129.28, 128.64 (6C, CH_{Ar}), 66.67 (CH₂Ph), 59.69 (CH₂CH₂N⁺), 57.84 (d, ²J_{C-P} = 4.6 Hz, OCH₂), 50.05 (d, 2C, ²J_{C-P} = 4.7 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂), 47.99 (N⁺CH₃), 43.17 (2C, N(CH₂CH₂Cl)₂), 38.87 (CH₂NHP), 35.21 (NCH₃), 25.68 (d, ³J_{C-P} = 4.6 Hz, CH₂CH₂CH₂), 8.46 (N⁺CH₂CH₃); **³¹P NMR (202 MHz, CD₃OD)** δ 18.10, 18.09; **HRMS** (ESI) *m/z* 549.1893 [M]⁺ (calculated for [C₂₂H₃₆Cl₂N₆O₄P]⁺ 549.1907).

4.1.4.27. 3-((bis(2-chloroethyl)amino)((1-methyl-2-nitro-1H-imidazol-5-yl)methoxy)phosphoryl)amino)-N-methyl-N-piperidinypropane-1-aminium iodide (**32**). Alkylation of amine **27** (37 mg, 76.2 μmol) with methyl iodide (6 eq. initially followed by 6 eq after 20 h) using the standard procedure (reaction time: 24 h) afforded compound **32** analytically pure, as a yellow hygroscopic solid (47 mg, 75.0 μmol). **Yield** 99%; **IR (ATR)** *v* cm⁻¹ 3420, 3213, 1652, 1537, 1489, 1349, 1217, 1190, 1007, 980, 959, 835, 744; **¹H NMR (500 MHz, CDCl₃)** δ 7.28 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.20 (dd, 1H, ²J_{H-H} = 13.4 Hz, ³J_{H-P} = 8.3 Hz, CH'O), 5.16 (dd, 1H, ²J_{H-H} = 13.5 Hz, ³J_{H-P} = 8.7 Hz, CH'O), 4.09 (s, 3H, NCH₃), 3.74–3.64 (m, 4H, N(CH₂CH₂Cl)₂), 3.54–3.36 (m, 10H, N(CH₂CH₂Cl)₂, CH₂N⁺(CH₂CH₂)₂CH₂), 3.09 (s, 3H, N⁺CH₃), 3.02 (td, 2H, ³J_{H-P} = 12.2 Hz, ³J_{H-H} = 6.2 Hz, CH₂NHP), 2.04–1.87 (m, 6H, CH₂CH₂N⁺(CH₂CH₂)₂CH₂), 1.76–1.65 (m, 2H, N⁺(CH₂CH₂)₂CH₂); **¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃)** δ 146.67 (C_{Ar}NO₂), 134.94 (d, ³J_{C-P} = 7.0 Hz, C_{Ar}CH₂), 129.33 (CH_{Ar}), 62.51 (3C, CH₂N⁺(CH₂CH₂)₂CH₂), 57.96 (d, ²J_{C-P} = 4.9 Hz, OCH₂), 50.11 (d, 2C, ²J_{C-P} = 4.7 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂), 43.23 (2C, N(CH₂CH₂Cl)₂), 38.90 (CH₂NHP), 35.34 (NCH₃), 25.20 (CH₂CH₂NHP), 22.01, 21.02 (3C, N⁺(CH₂CH₂)₂CH₂); **³¹P NMR (202 MHz, CD₃OD)** δ 18.03; **HRMS** (ESI) *m/z* 499.1752 [M]⁺ (calculated for [C₁₈H₃₄Cl₂N₆O₄P]⁺ 499.1751).

4.2. Biology

4.2.1. Surface plasmon resonance (SPR) binding assay

SPR assay was carried out on a Biacore T200 instrument (GE

Healthcare) with a CM4 sensor chip (GE Healthcare). First flow cell was left empty for background signal subtraction and second flow cell was used for immobilization of aggrecan from bovine articular cartilage (Sigma-Aldrich). To immobilize aggrecan, the sensor chip was first activated using a 1:1 mixture of 0.2 M 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride and 0.5 M *N*-hydroxysuccinimide (amine coupling kit, GE Healthcare) at a flow rate of 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ for 10 min. Aggrecan was then coated on the sensor chip at 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in running buffer HBS- P^+ 1X (0.01 M HEPES, 0.15 M NaCl, 0.05% v/v surfactant p20, pH 7.4) with 6 mM hexadecyltrimethylammoniumbromide (CTAB) at 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ to a level of ~ 500 response units (RU). Unoccupied binding sites were blocked using 1 M ethanolamine (pH 8.5) (Amine coupling kit, GE Healthcare) at 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ for 10 min. The studied molecules (analytes) were diluted in running buffer HBS- P^+ 1X before application to the sensor chip at 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ with 600 s association time and 200 s dissociation time. Regeneration of the sensor chips was achieved using 2 M aqueous NaCl solution for 150 s. A primary screen of different compounds was performed by binding level analysis at 500 μM . The SPR responses were obtained by subtracting the responses measured in the aggrecan immobilized flow cell with the response measured on the negative control flow cell (without immobilized aggrecan) for potential non-specific binding. Dissociation constants (K_D) were determined for a shortlist of compounds after injection of eight different concentrations of analytes (0.2, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8, 1, 1.5, 2 mM) and using BioEvaluation software with a “steady-state affinity analysis”.

4.2.2. *In vitro* anti-proliferation assay

Human HEMC-SS chondrosarcoma cell line was obtained from the European Collection of Authenticated Cell Cultures and cultured in DMEM/F12 medium (Life Technologies) supplemented with 10% fetal calf serum (Dutscher) and 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gentamicin.

After trypsinization, HEMC-SS cells were seeded in 96-well plates at a density of 20.10^3 cells in 150 μL of the corresponding culture medium and allowed to adhere overnight. Increasing concentrations of drugs or evofosfamide (TH-302, Abmol) diluted in DMSO (maintaining final DMSO concentration at 0.5% (v/v)) were added. After plate incubation for 24 h in normoxic (21% O_2 , 5% CO_2 , 37 $^\circ\text{C}$) or hypoxic (N_2 , $\text{O}_2 < 0.3\%$, 37 $^\circ\text{C}$) conditions, the culture media were removed and cell layers were washed with PBS. Cells were then left to grow for 48 h in normoxic conditions. Viability of cells cultured was quantified by AlamarBlue assay. Cytotoxic activity was expressed as the drug concentration that inhibited cell growth by 50% (IC_{50}). Experiments were performed at least in triplicates. Data are presented as means $\pm$ SD. Statistical significance was determined using Student's *t*-Test. Results were considered significant at $p < 0.05$.

4.3. Stability measurements in aqueous buffer

Prodrug **31f** was dissolved in sodium phosphate buffer (10 mM, pH 7.4, 37 $^\circ\text{C}$) containing 0.13% DMSO at a concentration of 17 μM and incubated at 37 $^\circ\text{C}$. Aliquots were withdrawn at various time points over a 24 h period and directly subjected to RP-HPLC analysis. The HPLC chromatogram peak area at 322 nm was used to calculate the concentration of the remaining prodrug. Analytical RP-HPLC measurements were performed on a HP1100 (Agilent, Palo Alto, CA, USA). The separation was carried out on a C_{18} column (Phenomenex, Luna C18, 3.0×150 mm, 3 μm) using the following conditions: C_{18} guard column from Phenomenex (Le Pecq, France) total experiment time: 20 min, flow rate = 0.4 mL/min, eluent mixture: $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ (v:v) containing trifluoro acetic acid (15 mM), gradient: 80/20 at 0 min $\rightarrow$ 75/25 at 3 min, then 75/25 $\rightarrow$ 60/40 for 2 min, then 60/40 $\rightarrow$ 50/50 for 5 min, then 50/50 $\rightarrow$ 80/20 for

1 min, then 80/20 for 9 min.

4.4. ^{31}P NMR kinetics of chemical activation

The prodrug **31f** (≈ 10 mg) was dissolved in CH_3CN (90 μL) and cacodylate buffer (300 μL , 0.1 M, pH 7.4), and sodium dithionite was dissolved in cacodylate buffer. 30 μL of the solution containing 3 eq. of sodium dithionite were added to the prodrug solution, and the reaction mixture was transferred to a 5 mm NMR tube, and the data acquisition was started. Spectra were taken at different time intervals over a 24 h period, and time points for each spectrum were assigned from the initiation of the reaction. Chemical shifts were reported relative to a Ph_3PO solution (5% in $\text{DMSO}-d_6$) as a coaxial reference (26 ppm). The temperature of the probe was maintained at 37 $^\circ\text{C}$ using the Bruker variable temperature unit. The disappearance of the starting material as well as the appearance of the phosphoramidate anion and their relative concentrations were determined by measuring peak areas.

4.5. Stability measurements in plasma

Rabbit blood was collected in heparin anticoagulant. The blood was centrifuged at +4 $^\circ\text{C}$ (1300 g for 10 min) to collect the plasma. The prodrug **31f** (≈ 10 mg) was dissolved in CH_3CN (90 μL) and plasma (330 μL), the mixture was transferred to a 5 mm NMR tube, and the data acquisition was started as previously described for kinetics of chemical activation.

4.6. Nitroreductase assay

Recombinant *E. coli* nitroreductase and dihydronicotinamide adenine dinucleotide (NADPH, reduced form, tetrasodium salt) were purchased from Sigma–Aldrich. 10 μL of a prodrug stock solution (1.7 mM) in ultra pure water with 13% DMSO were added to sodium phosphate buffer (1000 μL , 10 mM, pH 7.4, 37 $^\circ\text{C}$) containing NADPH. The reaction was initiated by addition of *E. coli* nitroreductase (25 or 15 μL , 1.0 mg/mL in sodium phosphate buffer; final concentrations: prodrug: 17 μM ; NADPH: 0.9 mM; nitroreductase: 25 or 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Aliquots were withdrawn at various time points over a 2 h period and the reactions were followed by RP-HPLC as a function of time. The separation was carried out in the same conditions as previously described for phosphate buffer stability. The HPLC chromatogram peak area at 322 nm was used to calculate the concentration of the remaining prodrug. Between the time points, all solutions were incubated at 37 $^\circ\text{C}$. Reference solutions containing 10 μL of compound stock solution and 100 μL NADPH solution (9 mM) completed with phosphate buffer solution (1000 μL final volume), were prepared and analyzed under the same conditions in order to distinguish between nitroreductase-based activation and enzyme-free reaction.

Funding

This work was supported by the Ligue Contre le Cancer (2017–2018, projet reference R16146CC/RAB16025CCA) and PRT-K, Translational Cancer Research: INCa-DGOS, D-TECT (project reference R15066CC/RPT15003CCA).

Acknowledgements

The authors would like to thank Fernand Leal for his technical support on IR measurement, and Emna Benzarti for his technical support on NMR in Tunisia.

Appendix A. Supplementary data

Synthesis and characterization data of compounds **9–27** and **ICF05016**. ^1H NMR, ^{13}C NMR and ^{31}P NMR Spectroscopic Data for all synthesized compounds **1–32**.

Supplementary data related to this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.08.060>.

References

- [1] Bone Sarcomas, ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up, *Ann. Oncol.* 25 (suppl. 3) (2014) iii113–iii123.
- [2] H. Gelderblom, P.C.W. Hogendoorn, S.D. Dijkstra, C.S. van Rijswijk, A.D. Krol, A.H.M. Taminiau, J.V.M.G. Bovée, The clinical approach towards chondrosarcoma, *Oncol.* 13 (3) (2008) 320–329.
- [3] L.R. Leddy, R.E. Holmes, Chondrosarcoma of bone, *Canc. Treat. Res.* 162 (2014) 117–130.
- [4] S. Bindiganavile, I. Han, J.Y. Yun, H.-S. Kim, Long-term outcome of chondrosarcoma: a single institutional experience, *Cancer Res. Treat.* 47 (4) (2015) 897–903.
- [5] M.-J. Kim, K.-J. Cho, A.G. Ayala, J.Y. Ro, Chondrosarcoma: with updates on molecular genetics, *Sarcoma* 2011 (2011), e405437.
- [6] D. Donati, A.E. Ghoneimy, F. Bertoni, C. Di Bella, M. Mercuri, Surgical treatment and outcome of conventional pelvic chondrosarcoma, *J. Bone Joint Surg. Br.* 87-B (11) (2005) 1527–1530.
- [7] A.M. van Maldegem, H. Gelderblom, E. Palmerini, S.D. Dijkstra, M. Gambartoni, P. Ruggieri, R.A. Nout, M.A.J. van de Sande, C. Ferrari, S. Ferrari, et al., Outcome of advanced, unresectable conventional central chondrosarcoma, *Cancer* 120 (20) (2014) 3159–3164.
- [8] S. Provenzano, N. Hindi, C. Morosi, M. Ghilardi, P. Collini, P.G. Casali, S. Stacchiotti, Response of conventional chondrosarcoma to gemcitabine alone: a case report, *Clin. Sarcoma Res.* 5 (2015) 9–13.
- [9] J.V.M.G. Bovée, P.C.W. Hogendoorn, J.S. Wunder, B.A. Alman, Cartilage tumours and bone development: molecular pathology and possible therapeutic targets, *Nat. Rev. Canc.* 10 (7) (2010) 481–488.
- [10] E. David, F. Blanchard, M.F. Heymann, G. De Pinieux, F. Guoin, F. Rédini, D. Heymann, The bone niche of chondrosarcoma: a sanctuary for drug resistance, tumour growth and also a source of new therapeutic targets, *Sarcoma* 2011 (2011) 932451.
- [11] B. Muz, P. de la Puente, F. Azab, A.K. Azab, The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy, *Hypoxia* 3 (2015) 83–92.
- [12] S.V. Karakashev, M.J. Reginato, Progress toward overcoming hypoxia-induced resistance to solid tumor therapy, *Canc. Manag. Res.* 7 (2015) 253–264.
- [13] N. Rohwer, T. Cramer, Hypoxia-mediated drug resistance: novel insights on the functional interaction of HIFs and cell death pathways, *Drug Resist. Updates* 14 (3) (2011) 191–201.
- [14] G. Polychronidou, V. Karavasili, S.M. Pollack, P.H. Huang, A. Lee, R.L. Jones, Novel therapeutic approaches in chondrosarcoma, *Future Oncol.* 13 (7) (2017) 637–648.
- [15] A. Italiano, A. Le Cesne, C. Bellera, S. Piperno-Neumann, F. Duffaud, N. Penel, P. Cassier, J. Domont, N. Takebe, M. Kind, et al., GDC-0449 in patients with advanced chondrosarcomas: a French sarcoma group/US and French national cancer institute single-arm phase II collaborative study, *Ann. Oncol.* 24 (11) (2013) 2922–2926.
- [16] A.M. van Maldegem, J.V. Bovée, H. Gelderblom, Comprehensive analysis of published studies involving systemic treatment for chondrosarcoma of bone between 2000 and 2013, *Clin. Sarcoma Res.* 4 (2014) 11–18.
- [17] J.W. Ivey, M. Bonakdar, A. Kanihtkar, R.V. Davalos, S.S. Verbridge, Improving cancer therapies by targeting the physical and chemical hallmarks of the tumor microenvironment, *Canc. Lett.* 380 (1) (2016) 330–339.
- [18] F. Chen, X. Zhuang, L. Lin, P. Yu, Y. Wang, Y. Shi, G. Hu, Y. Sun, New horizons in tumor microenvironment biology: challenges and opportunities, *BMC Med.* 13 (2015) 45–57.
- [19] N. Baran, M. Konopleva, Molecular pathways: hypoxia-activated prodrugs in cancer therapy, *Clin. Canc. Res.* 23 (10) (2017) 2382–2390.
- [20] R.M. Phillips, Targeting the hypoxic fraction of tumours using hypoxia-activated prodrugs, *Canc. Chemother. Pharmacol.* 77 (3) (2016) 441–457.
- [21] F.W. Hunter, B.G. Wouters, W.R. Wilson, Hypoxia-activated prodrugs: paths forward in the era of personalised medicine, *Br. J. Canc.* 114 (10) (2016) 1071–1077.
- [22] J.M. Brown, W.R. Wilson, Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment, *Nat. Rev. Canc.* 4 (6) (2004) 437–447.
- [23] W.A. Denny, The role of hypoxia-activated prodrugs in cancer therapy, *Lancet Oncol.* 1 (1) (2000) 25–29.
- [24] S. Grässel, A. Aszodi, *Cartilage: Volume 1: Physiology and Development*, Springer, 2016.
- [25] E. Miot-Noirault, E. David, A. Vidal, C. Peyrode, S. Besse, M.-M. Dauplat, M.-F. Heymann, F. Guoin, J.-M. Chezal, D. Heymann, et al., $^{99\text{mTc}}$ -NTP 15-5 assessment of the early therapeutic response of chondrosarcoma to zoledronic acid in the swarm rat orthotopic model, *EJNMMI Res.* 3 (2013) 40–45.
- [26] E. Miot-Noirault, F. Guoin, A. Vidal, M. Rapp, J. Maublant, S. Askienazy, J.-M. Chezal, D. Heymann, F. Redini, N. Moins, First preclinical imaging of primary cartilage neoplasm and its local recurrence using $^{99\text{mTc}}$ -NTP 15-5 radiotracer, *J. Nucl. Med.* 50 (9) (2009) 1541–1547.
- [27] C. Peyrode, V. Weber, A. Voissière, A. Maisson-Beset, A. Vidal, P. Auzeloux, V. Gaumet, M. Borel, M.-M. Dauplat, M. Quintana, et al., Proteoglycans as target for an innovative therapeutic approach in chondrosarcoma: preclinical proof of concept, *Mol. Canc. Therapeut.* 15 (11) (2016) 2575–2585.
- [28] C. Peyrode, V. Weber, E. David, A. Vidal, P. Auzeloux, Y. Communal, M.M. Dauplat, S. Besse, F. Guoin, D. Heymann, et al., Quaternary ammonium-melphalan conjugate for anticancer therapy of chondrosarcoma: in vitro and in vivo preclinical studies, *Invest. N. Drugs* 30 (4) (2012) 1782–1790.
- [29] A. Voissière, V. Weber, Y. Gerard, F. Rédini, F. Raes, J.-M. Chezal, F. Degoul, C. Peyrode, E. Miot-Noirault, A. Voissière, et al., Proteoglycan-targeting applied to hypoxia-activated prodrug therapy in chondrosarcoma: first proof-of-concept, *Oncotarget* 8 (56) (2017) 95824–95840.
- [30] K. Hu, Y. Qi, J. Zhao, H. Jiang, X. Chen, J. Ren, Synthesis and biological evaluation of sulforaphane derivatives as potential antitumor agents, *Eur. J. Med. Chem.* 64 (2013) 529–539.
- [31] C. Ke, C. Yang, T. Mori, T. Wada, Y. Liu, Y. Inoue, Catalytic enantiodifferentiating photocyclodimerization of 2-anthracenecarboxylic acid mediated by a non-sensitizing chiral metallosupramolecular host, *Angew. Chem. Int. Ed.* 48 (36) (2009) 6675–6677.
- [32] M. Ignasik, M. Bajda, N. Guzik, M. Prinz, U. Holzgrabe, B. Malawska, Design, synthesis and evaluation of novel 2-(aminoalkyl)-isoindoline-1,3-dione derivatives as dual-binding site acetylcholinesterase inhibitors, *Arch. Pharm. (Weinheim)* 345 (7) (2012) 509–516.
- [33] W.D. Tap, Z. Papai, B.A.V. Tine, S. Attia, K.N. Ganjoo, R.L. Jones, S. Schuetze, D. Reed, S.P. Chawla, R.F. Riedel, et al., Doxorubicin plus evofosfamide versus doxorubicin alone in locally advanced, unresectable or metastatic soft-tissue sarcoma (TH CR-406/SARC021): an international, multicentre, open-label, randomised phase 3 trial, *Lancet Oncol.* 18 (8) (2017) 1089–1103.
- [34] E. Van Cutsem, H.-J. Lenz, J. Furuse, J. Tabernero, V. Heinemann, T. Ioka, I. Bazin, M. Ueno, T. Csösz, H. Wasan, et al., MAESTRO: a randomized, double-blind phase III study of evofosfamide (evo) in combination with gemcitabine (gem) in previously untreated patients (pts) with metastatic or locally advanced unresectable pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), *J. Clin. Oncol.* 34 (15_suppl) (2016) 4007.
- [35] M. Pourmorteza, Z.U. Rahman, M. Young, Evofosfamide, a new horizon in the treatment of pancreatic cancer, *Anti Canc. Drugs* 27 (8) (2016) 723–725.
- [36] J.-X. Duan, H. Jiao, J. Kaizerman, T. Stanton, J.W. Evans, L. Lan, G. Lorente, M. Banica, D. Jung, J. Wang, et al., Potent and highly selective hypoxia-activated achiral phosphoramidate mustards as anticancer drugs, *J. Med. Chem.* 51 (8) (2008) 2412–2420.
- [37] B. Cavalleri, R. Ballotta, G.C. Lancini, Synthesis of 1-alkyl-2-nitroimidazole-5-carboxaldehydes, *J. Heterocycl. Chem.* 9 (5) (1972) 979–984.
- [38] M. Matteucci, J.-X. Duan, H. Jiao, J. Kaizerman, S. Ammons, Phosphoramidate Alkylator Prodrugs, WO2007002931 (A2), January 4, 2007.
- [39] L.J. O'Connor, C. Cazares-Körner, J. Saha, C.N.G. Evans, M.R.L. Stratford, E.M. Hammond, S.J. Conway, Efficient synthesis of 2-nitroimidazole derivatives and the bioreductive clinical candidate evofosfamide (TH-302), *Org. Chem. Front.* 2 (9) (2015) 1026–1029.
- [40] L.J. O'Connor, C. Cazares-Körner, J. Saha, C.N.G. Evans, M.R.L. Stratford, E.M. Hammond, S.J. Conway, Design, synthesis and evaluation of molecularly targeted hypoxia-activated prodrugs, *Nat. Protoc.* 11 (4) (2016) 781–794.
- [41] K. Soai, A. Ookawa, Mixed solvents containing methanol as useful reaction media for unique chemoselective reductions within lithium borohydride, *J. Org. Chem.* 51 (21) (1986) 4000–4005.
- [42] M. Hernick, C. Flader, R.F. Borch, Design, synthesis, and biological evaluation of indolequinone phosphoramidate prodrugs targeted to DT-diaphorase, *J. Med. Chem.* 45 (16) (2002) 3540–3548.
- [43] R.F. Borch, G.W. Canute, Synthesis and antitumor properties of activated cyclophosphamide analogs, *J. Med. Chem.* 34 (10) (1991) 3044–3052.
- [44] C.T. Hoang, F. Bouillière, S. Johannesen, A. Zulauf, C. Panel, A. Pouilhès, D. Gori, V. Alezra, C. Kouklovsky, Amino acid homologation by the blaise reaction: a new entry into nitrogen heterocycles, *J. Org. Chem.* 74 (11) (2009) 4177–4187.
- [45] S. Perspicace, D. Banner, J. Benz, F. Müller, D. Schlatter, W. Huber, Fragment-based screening using surface plasmon resonance technology, *J. Biomol. Screen* 14 (4) (2009) 337–349.
- [46] H. Çelik, S.-H. Hong, D.D. Colón-López, J. Han, Y.S. Kont, T.Z. Minas, M. Swift, M. Paige, E. Glasgow, J.A. Toretzky, et al., Identification of novel ezrin inhibitors targeting metastatic osteosarcoma by screening open access malaria box, *Mol. Canc. Therapeut.* 14 (11) (2015) 2497–2507.
- [47] M. Liu, C.-Y. Lo, G. Wang, H.-F. Chow, J.C.-K. Ngo, D.C.-C. Wan, L.L.-M. Poon, P.-C. Shaw, Identification of influenza polymerase inhibitors targeting polymerase PB2 cap-binding domain through virtual screening, *Antivir. Res.* 144 (2017) 186–195.
- [48] R.V. Iozzo, L. Schaefer, Proteoglycan form and function: a comprehensive nomenclature of proteoglycans, *Matrix Biol.* 42 (2015) 11–55.
- [49] F. Meng, J.W. Evans, D. Bhupathi, M. Banica, L. Lan, G. Lorente, J.-X. Duan,

- X. Cai, A.M. Mowday, C.P. Guise, et al., Molecular and cellular pharmacology of the hypoxia-activated prodrug TH-302, *Mol. Canc. Therapeut.* 11 (3) (2012) 740–751.
- [50] C. Flader, J. Liu, R.F. Borch, Development of novel quinone phosphorodiamidate prodrugs targeted to DT-diaphorase, *J. Med. Chem.* 43 (16) (2000) 3157–3167.
- [51] E.M. Shulman-Roskes, D.A. Noe, M.P. Gamcsik, A.L. Marlow, J. Hilton, F.H. Hausheer, O.M. Colvin, S.M. Ludeman, The partitioning of phosphoramidate mustard and its aziridinium ions among alkylation and P–N bond hydrolysis reactions, *J. Med. Chem.* 41 (4) (1998) 515–529.
- [52] R.C. Pink, R. Spratt, C.J.M. Stirling, 1058. Long-range effects in nuclear magnetic resonance. Specific shielding by aryl groups in some flexible systems, *J. Chem. Soc. Resumed* 0 (0) (1965) 5714–5718.

2 SYNTHÈSE D'ANALOGUES BROMES

Au terme des travaux du 1^{er} chapitre, nous nous sommes orientés vers la pharmacomodulation de l'entité cytotoxique, en remplaçant les atomes de chlore par des bromes, comme retrouvé dans la structure de l'évofosfamide. Plus précisément, la synthèse de deux prodrogues bromées a été envisagée, d'une part l'équivalent bromé **36a** du « lead » **ICF05016** et d'autre part l'équivalent bromé **36b** du composé **31f**, identifié comme un nouveau « lead » avec une cytotoxicité plus dépendante de l'hypoxie (HCR de 24 *versus* 7 pour **ICF05016**) (**Figure 95**).

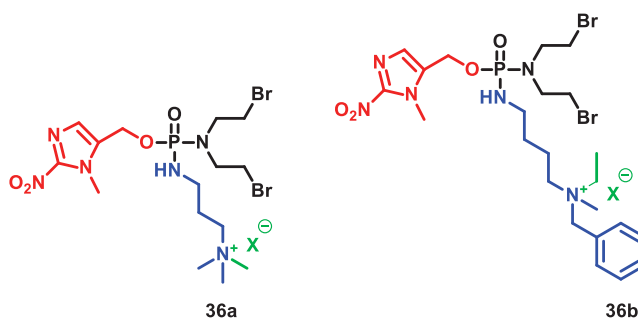


Figure 95: Structure des analogues bromés envisagés **36a** et **36b**

Pour ceci, le même schéma rétrosynthétique utilisé pour la synthèse des composés **28-32** a été adopté, mais partant d'un acide phosphorodiamidique dibromé **34** (**Figure 96**). L'alcool 2-nitroimidazole **5** et l'amine **21b** sont des synthons déjà décrits pour la préparation des composés de la série précédente ; seul le dérivé dibromé **34** doit être nouvellement synthétisé.

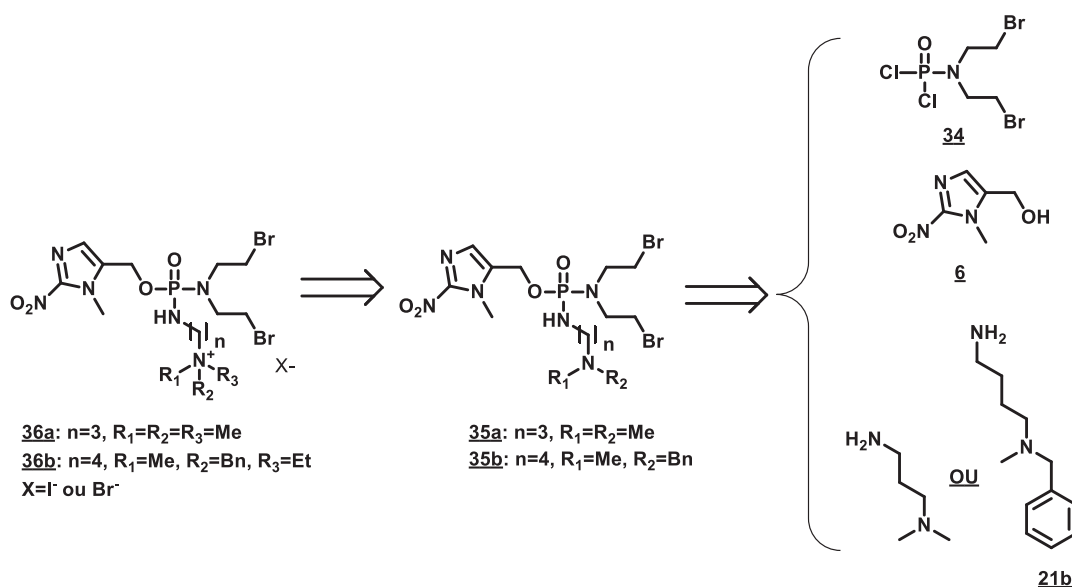


Figure 96: Approche rétrosynthétique pour la préparation des analogues dibromés **36a** et **36b**

Cet axe de pharmacomodulation puise son rationnel de plusieurs observations quant au rôle du brome dans la potentialisation de l'activité cytotoxique au sein de la classe des HAPs. D'abord, les travaux de Borch *et al.* (**222**) décrivant la préparation d'une série de HAPs à structure nitro(hétéro)phosphoramidate ont conclu à une meilleure cytotoxicité pour les dérivés bromés de

la série. En effet, la cytotoxicité diminuait dans l'ordre suivant : tétrakis(bromoéthyl) > bis(bromoéthyl) > tétrakis(chloroéthyl) > bis(chloroéthyl), suggérant une potentialisation de l'action cytotoxique corrélée d'une part, à l'augmentation du nombre de bras halogénoalkyles et d'autre part, à la nature de l'halogène (brome>chlore), probablement en lien avec le caractère nucléofuge de ce dernier. D'autre part, l'évofosfamide, la HAP nitroimidazole la plus étudiée en clinique jusqu'à présent, est une prodrogue de type moutarde dibromée. Sélectionnée parmi d'autres dans le cadre des travaux de Duan *et al.* (228), elle a manifesté la meilleure activité cytotoxique (multipliée par un facteur 10 par rapport à son analogue chloré) accompagnée d'une sélectivité pour les conditions hypoxiques, avec un HCR de 270 sur la lignée H460 de cancer des poumons non à petites cellules, exprimant la DT-diaphorase (Figure 97).

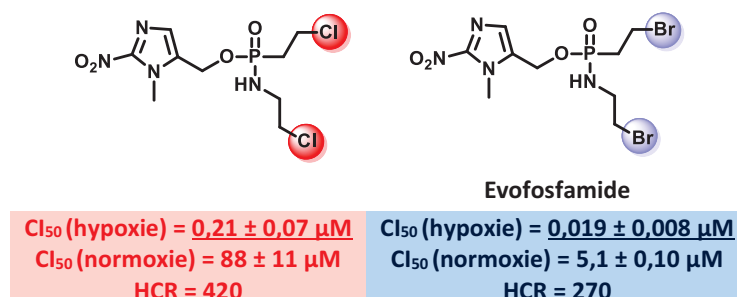


Figure 97: Différence d'activité cytotoxique entre l'évofosfamide et son analogue chloré sur la lignée H460

Dans une étude récente visant à élucider les différents métabolites de l'évofosfamide issus du processus de bioréduction monoélectronique, Hong *et al.* (322) ont conclu que la moutarde isophosphoramidate bromée était peu cytotoxique par elle-même dans le milieu extracellulaire et elle est rapidement convertie en d'autres produits plus hydrophiles, notamment l'isophosphoramidate chloré. L'incorporation du brome plutôt que du chlore dans la structure de l'évofosfamide aurait donc pour avantage d'augmenter la lipophilie et donc la cinétique de diffusion extravasculaire de la prodrogue.

Enfin, le PR-104, une HAP ayant fait l'objet de plusieurs études en pré-clinique et en clinique, est également une moutarde alkylante bromée, libérant après activation en milieu hypoxique une entité cytotoxique munie d'un bras bromoéthyle et d'un autre mésylate, tous deux meilleurs nucléofuges que le chlore.

D'une façon plus générale, les molécules bromées sont relativement peu abondantes sur le marché du médicament, comparativement à celles chlorées. La faible prévalence des molécules bromées approuvées par rapport à celles chlorées peut s'expliquer par une réactivité chimique augmentée et une faible stabilité métabolique. Les halogénures d'alkyle impliquant un halogène lourd sont hautement réactifs compte tenu de leur faible énergie de liaison, les halogénures d'aryle, quant à eux plus stables, sont typiquement perçus comme des intermédiaires réactifs dans les stratégies de synthèse, plutôt que des produits finaux (323, 324).

Quant à l'impact de l'incorporation d'un atome de brome dans une structure sur ses propriétés pharmacocinétiques, une augmentation modérée de la lipophilie est observée en passant d'un dérivé chloré vers un dérivé bromé. D'autre part, des gains d'affinité plus importants au sein des complexes protéine-ligand peuvent être atteints, notamment lorsqu'il s'agit de motifs aromatiques

(325). Enfin, les halogénures plus lourds (de type brome et iode) augmentent le poids de la molécule, qui est l'un des paramètres déterminants des propriétés pharmacocinétiques ADME d'un médicament. Avec un atome de brome ajoutant ~ 80 g/mol, le poids moléculaire augmente à équivalence de ~ 6 atomes de carbone. D'autres paramètres, tels que l'encombrement stérique, la formation de liaison halogène (σ hole), l'électronégativité peuvent avoir un effet notable sur les propriétés pharmacologiques des substances actives considérées (323).

2.1 SYNTHÈSE DU DICHLORURE DE L'ACIDE N,N-BIS(2-BROMOETHYL)-PHOSPHORAMIDIQUE (34)

La synthèse du dérivé bromé 34 a été décrite dans les travaux de Borch *et al.* (222) et Flader *et al.* (326), au départ du bromhydrate de la bis(2-bromoéthyl)amine (Figure 98). Cette amine n'étant pas commercialisée, elle a dû être synthétisée au préalable à partir de la diéthanolamine, ajoutée goutte à goutte à froid, à un excès d'acide bromhydrique avant chauffage à reflux du milieu réactionnel. Deux méthodes apparentées, faisant appel à ces réactifs, sont décrites dans la littérature et dérivent elles-mêmes de variantes plus anciennes (Tableau 9).

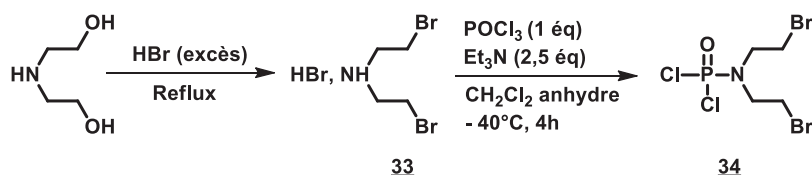


Figure 98: Synthèse du composé 34 au départ de la diéthanolamine

Tableau 9: Méthodes décrites dans la littérature pour la préparation du composé 33

	Méthode de Pettit <i>et al.</i> (1964) (327)	Méthode de Flader <i>et al.</i> (2000) (326)
Quantités initiales de réactifs	Diéthanolamine, 2,0 mol HBr (48%), 8 mol	Diéthanolamine, 0,1 mol HBr (48%), 0,45 + 0,15 mol
Conditions opératoires	- Ajout goutte à goutte à 0 °C de la diéthanolamine - Reflux pendant 6-7 h, avec élimination de l'eau par distillation ($T_{éb}$ distillat = 125°C) Un résidu orangé à brunâtre est obtenu.	- Ajout goutte à goutte à 0 °C de HBr - Reflux, avec élimination de l'eau par distillation ($T_{éb}$ distillat = 100 et 125°C) - Ajout de HBr - Reflux pendant la nuit Elimination d'un nouveau distillat.
Purification	Recristallisation du résidu orangé obtenu dans le système EtOH/Et ₂ O.	Filtration des cristaux obtenus dans l'acétone après refroidissement à -78 °C L'opération peut être répétée plusieurs fois.
Rdt (%)	52%	33% (dont 22% d'impureté diéthanolamine HBr)

Nous avons d'abord procédé par deux reprises, à la synthèse du composé 33, par la méthode de Pettit *et al.* (327). Les résultats en termes de rendement et de pureté des deux lots sont illustrés dans le Tableau 10.

Tableau 10: Résultats en termes de rendement et de pureté des synthèses des lots 1 et 2 du composé **33**

	Quantité de diéthanamine (mol)	Rendement (%)	Quantités obtenues (g)	Taux de pureté (%)
Lot 1	0,2	26	16	~44*
Lot 2	0,2	80	50	~61

*Recristallisations successives par le système EtOH/Et₂O car obtention d'un résidu brunâtre

Comme nous pouvons le noter, des recrystallisations successives ont résulté en une diminution du rendement dans le cas du lot 1 (26% *versus* 80% pour le lot 2) sans toutefois, améliorer la pureté (< 50%). Pour les deux lots, une recrystallisation par solubilisation du résidu obtenu dans le système EtOH/Et₂O à chaud suivie par sa précipitation à froid à 0 °C ne permet donc pas d'éliminer l'impureté présente qui, d'après les travaux de Flader *et al.* (**326**), correspondrait à la diéthanamine bromhydrate.

Les faibles rendements et taux de pureté obtenus avec la méthode de Pettit *et al.* nous ont amené à changer les conditions de synthèse du composé **33** et d'opter pour la variante de Flader *et al.* (**326**) basée sur un ajout multiple d'acide bromhydrique, suivie à chaque fois par un chauffage à reflux associé à une élimination d'une certaine quantité d'eau par distillation. Ce processus favorise la réaction S_N2 par le déplacement de l'équilibre de la réaction tout en enrichissant le milieu réactionnel en ions bromures. Une solubilisation du résidu obtenu dans l'acétone à l'issue de la dernière distillation d'eau suivi par son refroidissement à -78 °C et filtration des cristaux permet d'éliminer partiellement l'impureté. Afin d'aboutir à une pureté satisfaisante (84 % molaire), cette cristallisation a été répétée 6 fois, et ce au détriment du rendement de la réaction (20%) (**Figure 99**).

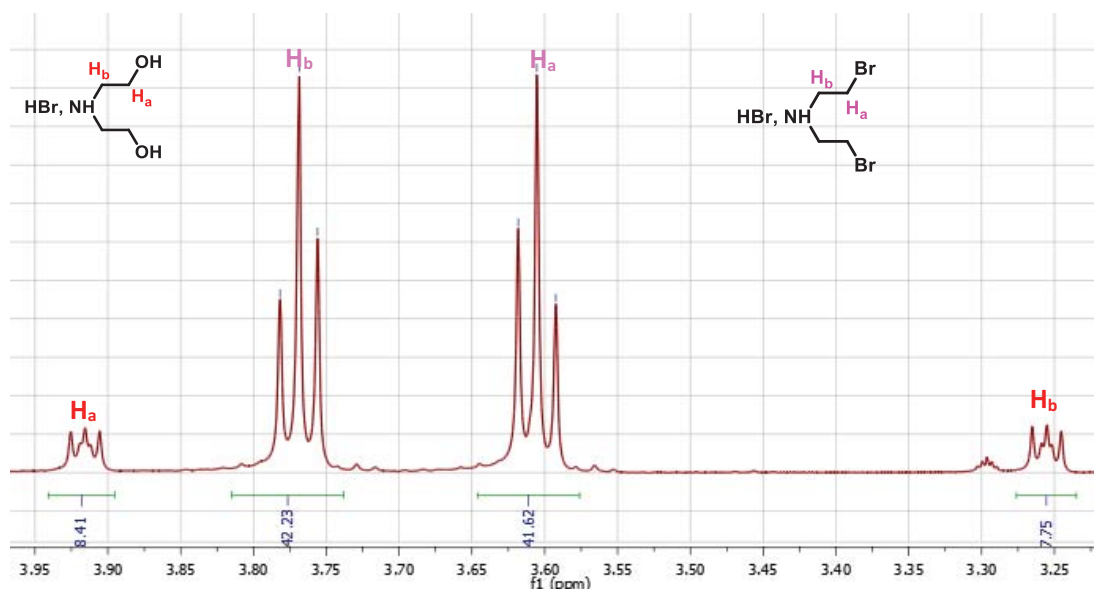


Figure 99: Spectre RMN ¹H (dans le CD₃OD, à 500 MHz) du composé **33 (obtenu selon la méthode de Flader *et al.*) indiquant la présence d'une impureté à une teneur ~ 16% molaire**

En analyse RMN ¹H dans le D₂O, cette impureté est visualisée par la présence de deux signaux vers 3,9 et 3,3 ppm, ce qui ne semble pas correspondre à de la diéthanamine bromhydrate (signaux à 3,76 et 3,01 ppm dans le D₂O), comme cela peut être observé sur la **Figure 100**. Un autre produit secondaire de la réaction peut, en effet, être envisagé : la diéthanamine soumise à un reflux en

présence d'un acide minéral (HCl, H₂SO₄...) est une voie directe d'accès à la morpholine protonnée par un mécanisme de cyclisation intra-moléculaire de type S_N2 (**328**, **329**). Le spectre RMN ¹H dans le D₂O de la morpholine bromhydrate a donc été réalisé : deux signaux à 3,91 et 3,22 ppm sont observés, ce qui semble en accord avec l'impureté obtenue. Contrairement à ce qu'énonce Flader *et al.* (**326**), l'impureté a été ici identifiée comme étant la morpholine bromhydrate, et non la diéthanolamine bromhydrate.

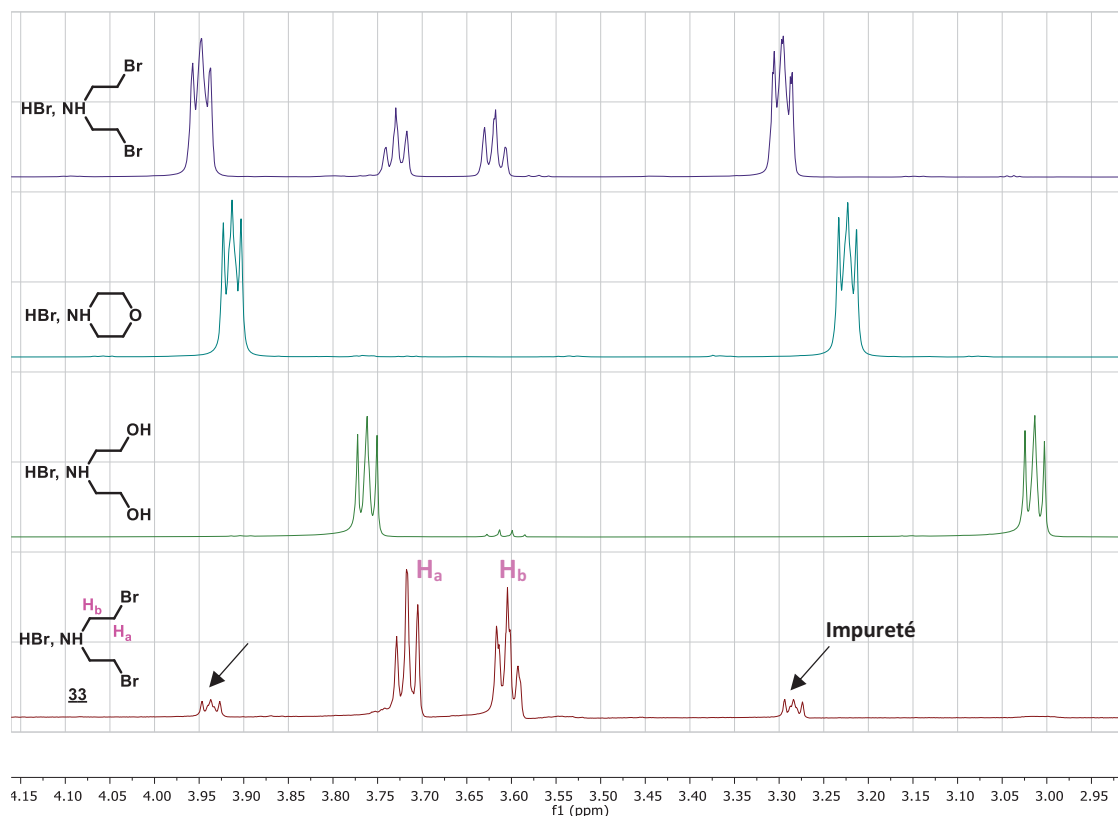


Figure 100: Spectre RMN ¹H (dans le D₂O, à 500 MHz) du composé **33**, indiquant la présence de l'impureté morpholine.HBr

En conclusion, le composé **33** a pu être obtenu avec une pureté satisfaisante pour entamer la réaction de phosphorylation ; il se présente sous la forme de cristaux blancs avec un point de fusion de 205 °C (Litt. (**327**) : 205°C). Il possède une bonne stabilité dans le temps (>2 ans), lors d'une conservation à +4 °C.

La préparation du composé phosphoramidique bromé **34** a été réalisée selon les conditions décrites par Flader *et al.* (**326**) et Borch *et al.* (**222**). La réaction a été menée dans le DCM anhydre sous atmosphère inerte, à froid (-20 °C) car les réactions avec l'oxychlorure de phosphore sont fortement exothermiques. Un excès de ce dernier (3 équivalents) a été utilisé afin d'éviter une disubstitution de l'amine sur le phosphore, ainsi qu'un excès (3 équivalents) de triéthylamine, pour déprotoner le bromhydrate **33**. La réaction a été relativement rapide, avec un contrôle CCM montrant la disparition du produit de départ au bout de 4 h. Après purification sur colonne de gel de silice, le produit **34** a été obtenu sous la forme d'un liquide huileux transparent cristallisant rapidement en un solide de couleur blanc sale.

Le composé **34** a été caractérisé par son point de fusion (43 °C) et ses données spectrales (RMN ^1H et ^{31}P) qui sont conformes à la littérature (**222**). L'analyse HRMS a permis de confirmer la structure, écartant ainsi une éventuelle substitution des bromes. Tout comme son précurseur, le composé **34** possède une bonne stabilité dans le temps (>2 ans), lors d'une conservation à +4 °C à l'abri de la lumière.

2.2 SYNTHÈSE DES PRODRUGUES AMINES III^{aires} **35a** et **35b**

2.2.1 SYNTHÈSE

La synthèse de ces précurseurs amines III^{aires} bromés repose sur la même méthode de couplage que leurs analogues chlorés, évoquée dans le chapitre I de ce manuscrit (**Figure 101**).

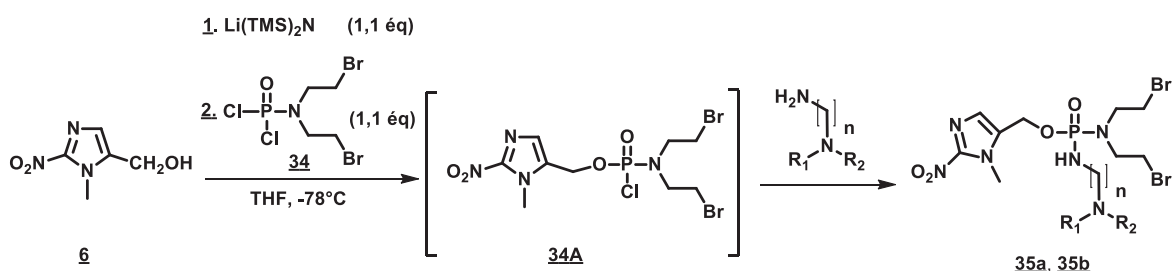


Figure 101: Séquence réactionnelle pour la préparation des composés bromés **35a** et **35b**

Les réactions ont été monitorées par RMN ^{31}P et ont montré des profils de cinétiques similaires à ceux observées pour les molécules chlorées. A titre d'exemple, la cinétique de formation du composé **35a**, analogue bromé du précurseur de **ICF05016**, montre le profil suivant: l'intermédiaire monosubstitué **34A** apparaît dès l'ajout du dérivé **34**, avec un optimum de formation au bout de 30 min (ratio ~ 58/42 pour **34A/34**). La *N,N*-diméthylpropanediamine est alors additionnée donnant lieu au phsphorodiamidate **35a** (~ 17 ppm) et à une impureté phosphorée (~ 18,5 ppm) (**Figure 102**).

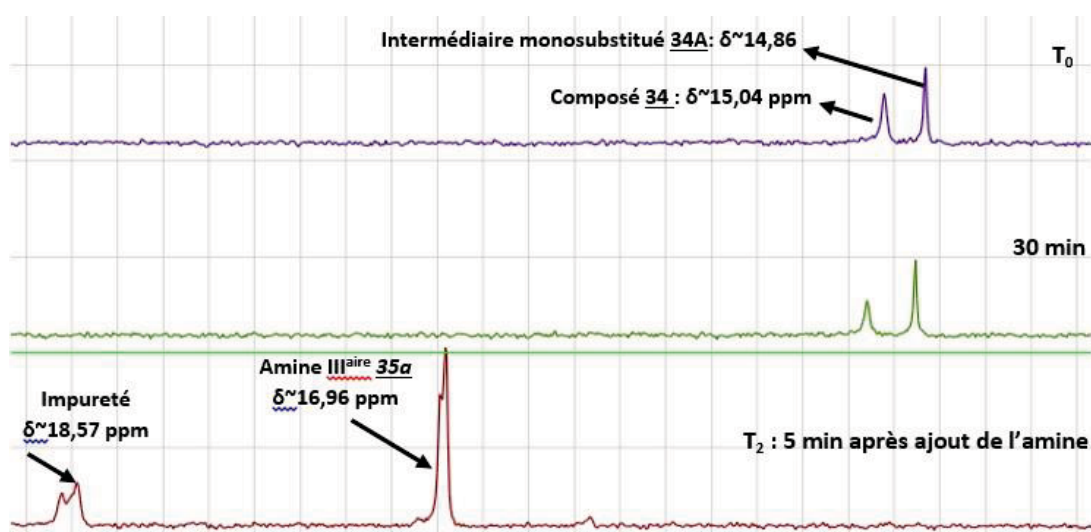


Figure 102: Suivi de la cinétique de formation du composé **35a** par monitoring RMN ^{31}P

2.2.1.1 SYNTHÈSE DU COMPOSÉ **35a**

Si la réaction semble s'opérer de façon similaire pour les analogues bromés et chlorés, l'étape de purification par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : AcOEt/EtOH/NH₄OH ou AcOEt/EtOH/TEA) s'est avérée ardue pour le composé **35a** : en effet, les fractions isolées ne satisfaisaient pas à nos spécifications en termes de pureté lors des analyses RMN ³¹P (< 5%). Des impuretés phosphorées ont constamment été détectées dans les fractions éluées de la colonne alors que ces dernières étaient présumées pures d'après le suivi par CCM avec une double révélation UV et NBP/KOH. Ces impuretés étaient caractérisées soit par un signal possédant un déplacement chimique proche de celui du pic principal ($\sim \pm 0,5$ ppm), soit par un signal vers 25 ppm (**Figure 103**).

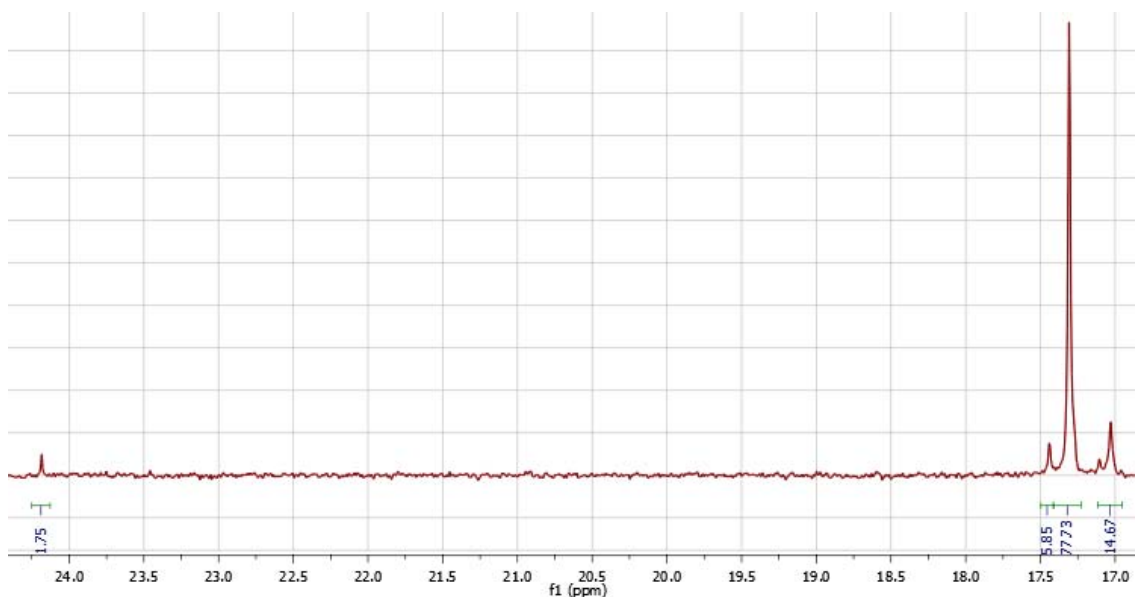


Figure 103: Profil en RMN ³¹P d'une fraction du composé **35a** à l'issue d'une purification sur colonne de gel de silice

La synthèse du composé **35a** a donc dû être réalisée à six reprises, afin d'obtenir une fraction d'une pureté suffisante pour envisager la réaction de quaternisation. L'ensemble des essais sont rapportés dans le **Tableau 11**, en précisant les conditions de purification, les rendements et les puretés obtenus.

Tableau 11: Résumé des essais réalisés pour l'obtention du composé 35a

	Qté de <u>6</u> (mg)	Chromatographie	Base éluant	Pureté des fractions éluées en RMN ³¹ P	Rdt (%)
Lot 1	102	Colonne de silice (éluant : AcOEt/EtOH/base)	TEA	Deux fractions de pureté ≤70% Re-purification des deux fractions réunies => même profil de pureté	-
Lot 2	155		NH ₄ OH	Une fraction pure en analyse RMN ¹ H et ³¹ P	24
Lot 3	206		TEA	Une fraction de pureté ~ 78% Re-purification => pureté ~ 60%	-
Lot 4	176		TEA	Une fraction de pureté ~ 86% Re-purification => pureté ~ 78%	-
Lot 5	199	C18/HPLC prép. (H ₂ O/CH ₃ CN)		Quatre fractions de pureté < 50% Re-purification des quatre fractions réunies sur gel de silice avec un éluant AcOEt/EtOH/TEA => pureté ~ 79%	-
Lot 6	269	Colonne de silice (éluant : AcOEt/EtOH/base)	NH ₄ OH	Deux fractions chlorhydrate et non chlorhydrate de puretés respectives ~ 86% et 77%	-

L'analyse de ces résultats démontre une dégradation du composé 35a en cours de purification et/ou d'évaporation (**Figure 104**).

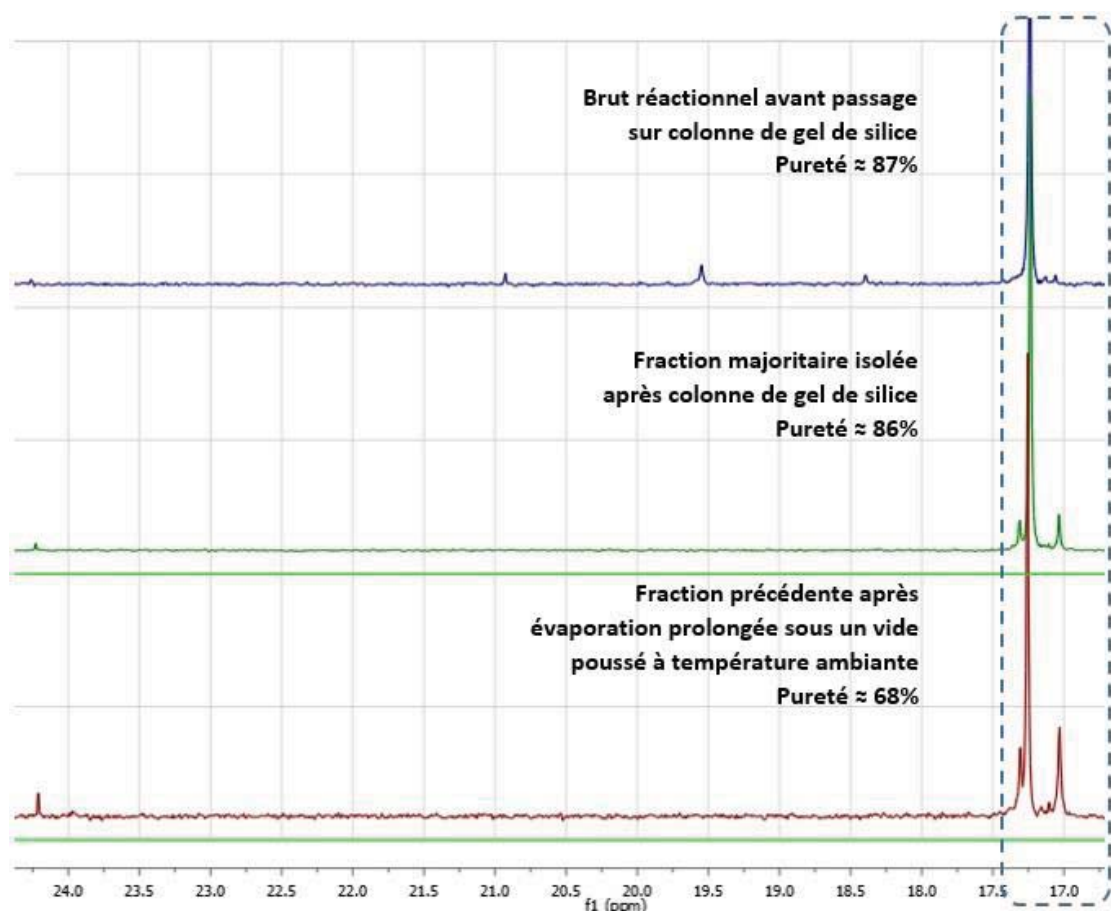


Figure 104: Dégradation du composé 35a observée par RMN ³¹P, montrant une augmentation des impuretés après passage sur colonne et évaporation prolongée

2.2.1.2 SYNTHÈSE DU COMPOSÉ **35b**

Contrairement à ce qui a été observé avec le composé **35a**, la synthèse et la purification du composé bromé **35b** ont été nettement plus aisées. Un seul lot a été préparé, avec un rendement de 50% et une pureté de 98% d'après l'analyse RMN ^{31}P . D'autre part, la comparaison du profil RMN ^{31}P du brut réactionnel et du produit purifié sur colonne de gel de silice ne montre pas de dégradation, contrairement à ce qui a été observé pour le composé **35a**.

Pour conclure, ces résultats débouchent sur une hypothèse selon laquelle une réaction indésirable, dépendante de la longueur de la chaîne alkyle du bras vecteur et/ou de la nature des substituants sur l'amine III^{aire}, s'opère. Une chaîne à quatre carbones et une substitution de l'amine de type benzyle, méthyle (donc stériquement encombrée) est vraisemblablement peu favorable à cette réaction indésirable.

2.2.2 ÉLÉMENTS D'ELUCIDATION STRUCTURALE

Les composés **35a** et **35b** se présentent sous la forme d'huiles de couleur jaune à brun clair. Leur caractérisation spectrale a été faite par IR, RMN ^{31}P , RMN ^1H et ^{13}C (dans le CD_3OD), appuyées par des expériences COSY et HSQC ainsi que par HRMS.

↳ Spectroscopie IR :

Les spectres révèlent des bandes caractéristiques des principales fonctions communes à tous les composés de cette famille : la vibration de valence de la liaison N-H du phosphorodiamidate vers 3200 cm^{-1} , la vibration de valence de la liaison P=O vers 1210 cm^{-1} et les vibrations de valence de la fonction nitro vers 1490 cm^{-1} ($\nu_{\text{as}}\text{NO}_2$) et 1350 cm^{-1} ($\nu_{\text{s}}\text{NO}_2$). Le spectre obtenu pour le composé **35b** indique, en plus, les vibrations de déformation hors du plan des liaisons C-H du noyau benzénique monosubstitué à 743 et 699 cm^{-1} .

↳ RMN ^{31}P :

Le phosphore des composés **35a** et **35b** résonne à $\sim 18\text{ ppm}$.

↳ RMN ^1H et ^{13}C :

Les protons du noyau nitroimidazole affichent des déplacements chimiques similaires à ceux de leurs analogues chlorés. Pour les huit protons des chaînes bromoéthyles, leurs multiplicités et déplacements chimiques sont différents de ceux de leur équivalent chloroéthyle : un massif peu résolu est observé entre $3,56$ et $3,39\text{ ppm}$ versus deux massifs bien distincts à $3,64$ - $3,57\text{ ppm}$ et $3,48$ - $3,33\text{ ppm}$ pour les dérivés chlorés.

Dans le cas du composé **35a**, les spectres RMN ^1H de deux fractions obtenues (lot 6) diffèrent par le déplacement chimique des protons en alpha de l'azote de l'amine III^{aire}, témoin de la présence des formes base et chlorhydrate. Pour cette dernière, un déblindage net de ces protons de $\sim 0,3\text{ ppm}$ est observé (**Figure 105**). La quantité d'ammoniaque utilisée lors de la purification détermine cet état d'ionisation.

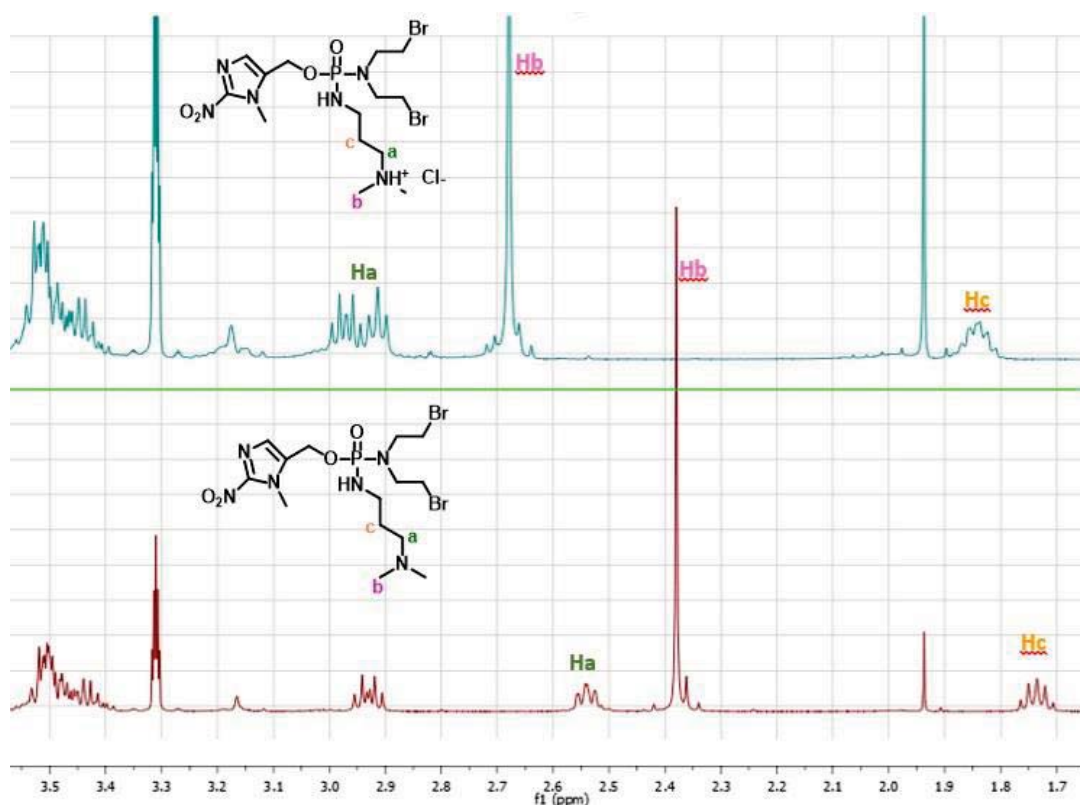


Figure 105: Extraits des spectres RMN ^1H (dans le CD_3OD) des formes base et chlorhydrate du composé **35a**

En RMN ^{13}C , la seule différence notable par rapport aux analogues chlorés concerne le signal relatif aux carbones en alpha du brome, qui résonnent à ~ 31 ppm sous la forme d'un doublet, avec une constante de couplage $^3J_{\text{C-P}} = 1,3$ Hz, alors que le signal relatif aux carbones en alpha du chlore apparaît à ~ 43 ppm pour les analogues **28-32**.

↳ **HRMS** : La structure des dérivés bromés **35a** et **35b** a été confirmée par analyse de masse, avec la présence des amas isotopiques des ions moléculaires $[\text{M}+\text{H}]^+$ recherchés.

2.3 SYNTHÈSE DES PRODRUGUES VECTORISÉES AMMONIUMS QUATÉRNAIRES

La dernière étape de la synthèse est la quaternisation de la fonction amine III^{aire}.

2.3.1 SYNTHÈSE DU COMPOSÉ **36a**

Nos premiers essais ont été réalisés pour la préparation de l'AQ triméthyle ammonium **36a** à partir de son précurseur **35a** (Figure 106). Ces essais ont été réalisés sur le lot 6, affichant une pureté inférieure à nos spécifications (environ 80%). Une purification ultérieure de l'AQ bromé par HPLC préparative sera alors nécessaire, à l'instar de ce qui a déjà été fait pour quelques analogues chlorés.

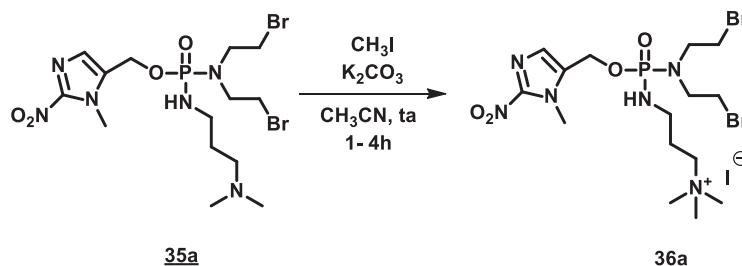


Figure 106: Séquence réactionnelle pour la préparation de l'analogue bromé **36a** du « lead » **ICF05016**

Un suivi par CCM montre la disparition du produit de départ **35a** après 4 h d'agitation à température ambiante, en présence d'un large excès d'iodométhane (24 équivalents) et de carbonate de potassium (6 équivalents) dans l'ACN. Une seule tâche est observée au point de dépôt (éluant polaire à base d'AcOEt/EtOH/NH₄OH), comme lors des quaternisations précédentes dans la série chlorée. Cependant, la RMN ³¹P du brut réactionnel filtré et évaporé à sec montre la présence de plusieurs produits : trois pics très proches à 17,64, 17,47 et 17,31 ppm, avec un rapport d'intégrales 48/41/11 (**Figure 107**).

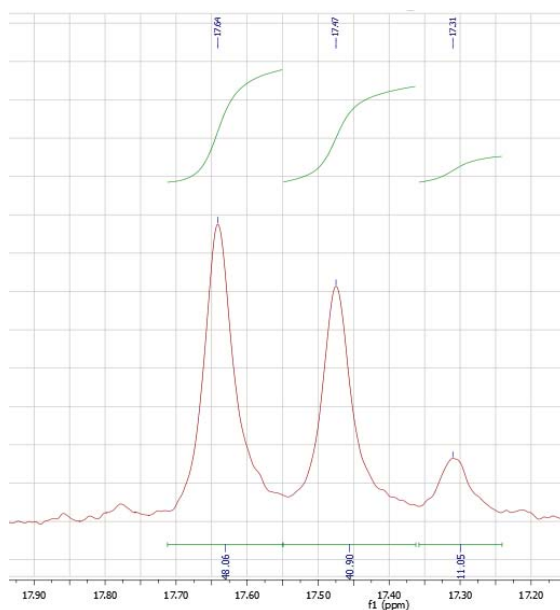


Figure 107: Profil RMN ³¹P du brut réactionnel de la quaternisation du composé **35a** avec l'iodure de méthyle

Compte tenu des faibles différences de déplacements chimiques, ces trois composés possèderaient donc des structures proches, le plus probable serait des structures iodées par substitution des bromes par l'iode, introduit *via* l'utilisation d'iodométhane. Afin de conforter ou réfuter cette hypothèse, nous avons analysé le brut réactionnel par RMN ¹³C et par HRMS. L'analyse RMN ¹³C révèle la présence d'un signal supplémentaire dans la zone des champs forts, avec un déplacement chimique de 3,18 ppm évocateur d'un méthylène substitué par un atome d'iode. Une substitution d'un ou des deux bromes présents, par un iodure a donc bien eu lieu, expliquant ainsi la présence de trois pics en RMN ³¹P. Le brut réactionnel est donc un mélange de composés dibromé, iodobromé et di-iodé. L'analyse HRMS confirme la présence simultanée de ces trois produits halogénés. N'étant pas une technique d'analyse quantitative, les abondances relatives des

différents amas isotopiques ne permettent pas de prévoir leurs proportions réelles au sein du brut réactionnel, mais permettent toutefois de montrer la présence majoritaire du composé diiodé, alors que le produit souhaité dibromé est très minoritaire (**Figure 108**). En rapprochant ces constatations des rapports d'intégrales en RMN ^{31}P 48/41/11, il apparaît que notre produit **36a** n'est présent qu'à hauteur de 10 % molaire.

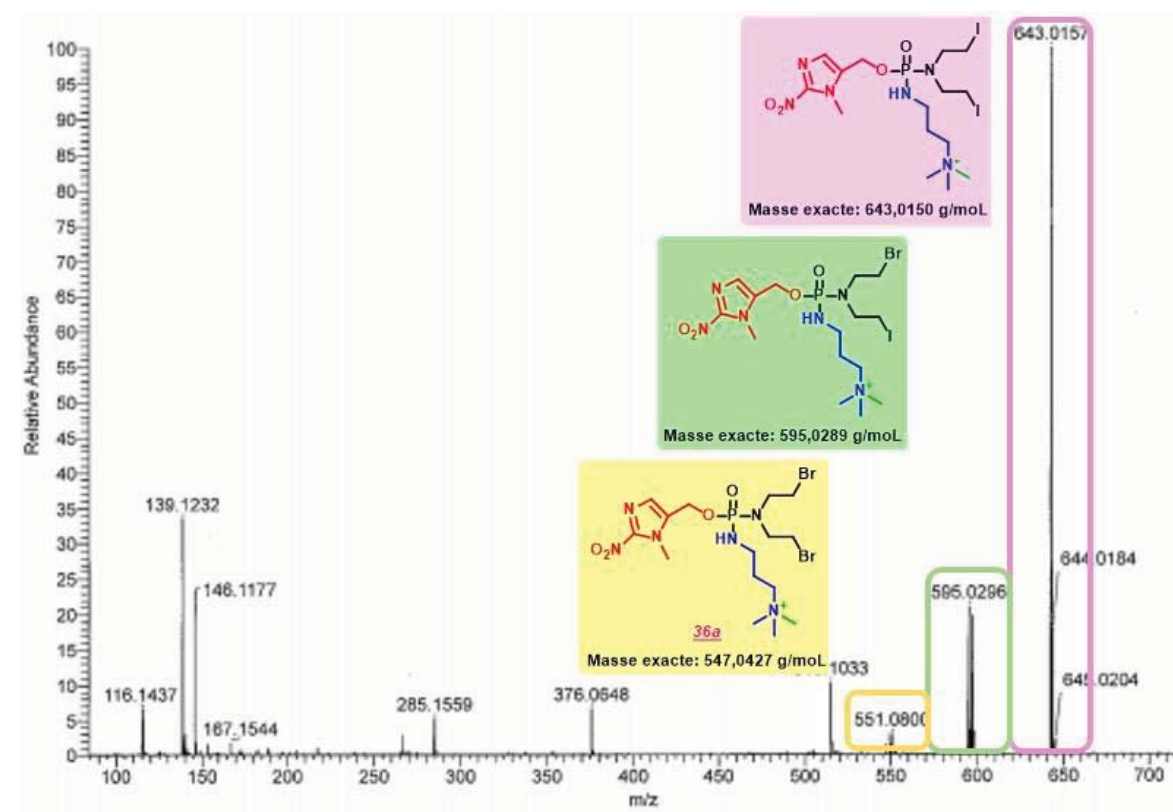


Figure 108: Profil HRMS du brut réactionnel de la réaction de quaternisation du **35a** avec un excès d'iodométhane

En outre, les proportions relatives de ces trois composés évoluent dans le temps, une analyse par HPLC couplée à un détecteur de type spectromètre de masse réalisée après 1 an de stockage à +4 °C a révélé la présence unique du composé di-iodé. Il semblerait donc que les contre-ions iodures de l'ammonium résiduels dans le produit se substituent aux bromes même en cours de conservation à sec. La cinétique de la $\text{S}_{\text{N}}2$ est probablement très rapide, le brome étant un excellent nucléofuge. La liaison $\text{CH}_2\text{-Br}$ en série aliphatique est nettement plus labile que la liaison $\text{CH}_2\text{-Cl}$, avec des énergies de dissociation respectives de l'ordre de 67 et 81 KJ.mol^{-1} (**330**).

L'utilisation d'iodométhane conduit à l'alkylation de l'amine mais également à la libération d'ions iodures qui sont donc préjudiciables à l'obtention du composé **36a**. Il semble alors indispensable de remplacer l'iodométhane par le bromométhane. Toutefois, il ne nous a pas été possible de disposer à temps de ce réactif, un gaz toxique dont l'approvisionnement est soumis à restriction. Nous avons alors choisi d'opérer en présence d'un large excès de NaBr dans le milieu réactionnel afin d'éviter la substitution des bromes par les iodures grâce à la formation progressive de NaI et sa précipitation dans le milieu. Ainsi, nous avons procédé selon deux conditions opératoires différentes, soit avec un large excès de NaBr solide (jusqu'à 72 équ.) dans le milieu

réactionnel, soit en saturant au préalable le milieu réactionnel méthanolique. Toutefois dans les deux cas, le spectre RMN ^{31}P du brut réactionnel montre, encore une fois, la présence de trois pics juxtaposés vers 17 ppm tandis que la RMN ^{13}C révèle la présence d'un méthylène substitué par un iode.

Au terme de ces essais, il semble qu'une substitution des bromes de la chaîne éthyle du phosphorodiamidate en présence d'ions iodures dans le milieu réactionnel soit inévitable. Confrontés à ces échecs et compte tenu des résultats obtenus dans la série des analogues chlorés, en termes d'affinité et de différentiel de cytotoxicité hypoxie *versus* normoxie, montrant peu de différence entre les dérivés triméthylammonium et les dérivés éthyldiméthylammonium, nous avons choisi d'abandonner la synthèse du composé **36a** et d'opter pour la synthèse de l'analogue **37** (Figure 109). Le bromure d'éthyle, disponible dans le commerce et ayant une température d'ébullition $\sim 38\text{ }^{\circ}\text{C}$, a donc été utilisé lors de l'étape de quaternisation.

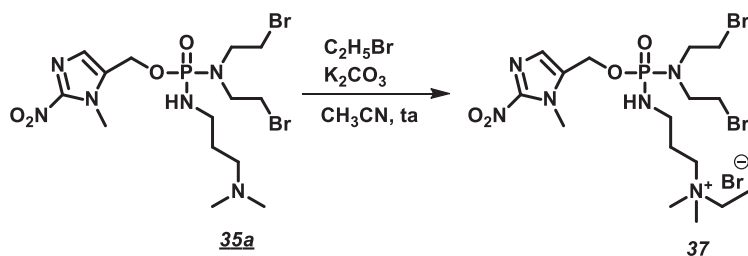


Figure 109: Synthèse du dérivé bromure d'éthyldiméthylammonium **37**

La réaction de quaternisation avec le bromoéthane a montré une cinétique moins rapide que celle observée pour les analogues phosphorodiamidates chlorés où l'iodoéthane été utilisé. Les conversions étaient en effet complètes au bout de 48 h pour le composé **37** *versus* 24 h pour son analogue chloré **28f**. Cette réactivité plus faible est liée à l'énergie de dissociation plus forte de la liaison $\text{CH}_3\text{-Br}$ comparativement à la liaison $\text{CH}_3\text{-I}$ (respectivement 67 et 54 KJ.mol^{-1}).

Deux essais ont été réalisés à partir du précurseur amine III^{aire} **35a**, avec utilisation d'un excès de carbonate de potassium. L'analyse RMN ^{31}P du brut réactionnel évaporé a montré la présence de l'impureté à $\sim 25\text{ ppm}$ à des taux de ~ 75 et 25% pour les deux essais. Les essais de purification de ce dernier lot par HPLC préparative en phase inverse n'ont pas été concluants. En effet, toutes les fractions isolées étaient non seulement contaminées par l'impureté à $\sim 25\text{ ppm}$ mais encore par d'autres impuretés apparaissant au voisinage du pic principal. Fait surprenant, la teneur de ces impuretés dans les fractions éluées était supérieure à celle initialement observée dans le brut réactionnel. Comme conclusion, une réaction indésirable, probablement de type cyclisation intramoléculaire générant l'impureté 2-oxidediazaphospholidine à l'instar de ce qui a été observé dans la série chlorée (**28g**, **29g**, **29h**, **31g** et **31h**), semble fortement compétitive à la réaction de quaternisation de l'amine III^{aire}. De surcroit, le dérivé quaternisé **37** est instable et se décompose assez rapidement, comme en témoigne les résultats de l'essai de purification.

2.3.2 SYNTHÈSE DU COMPOSÉ **36b**

La synthèse de ce composé est illustrée par la Figure 110.

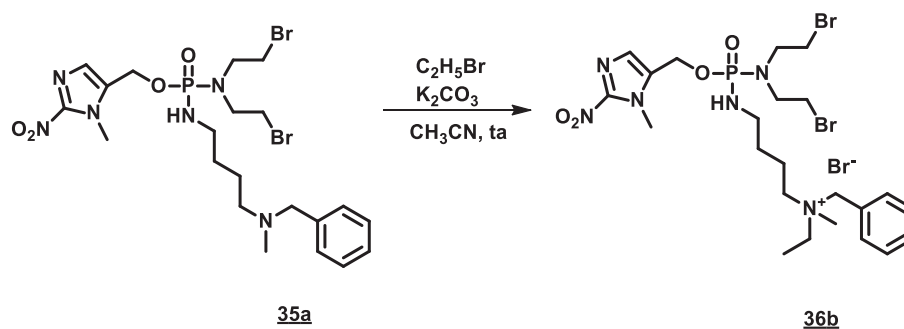


Figure 110: Synthèse du dérivé bromure d'éthyldiméthylammonium 36b

L'analyse RMN ^{31}P du brut réactionnel a montré un taux de pureté >75%, mais là encore, l'essai de purification par HPLC préparative n'a pas été concluant, avec un chromatogramme qui oriente vers une dégradation en cours de purification. Plusieurs fractions absorbant à 322 nm, le maximum d'absorption du nitroimidazole, ont été éluées mais aucune ne correspondait au composé 36b pur d'après l'analyse RMN ^1H et ^{31}P . L'impureté à ~ 25 ppm a pu être isolée, sa caractérisation spectrale par RMN ^1H , ^{13}C , COSY et HSQC a permis de confirmer la structure 2-oxidediazaphospholidine.

Comme conclusion de cet axe de pharmacomodulation, l'accès à des dérivés AQ possédant des moutardes bromées n'a pu être mené à son terme, notamment en raison de soucis non résolus de stabilité des composés finaux.

3 SYNTHÈSE D'ANALOGUES ISOMÈRES DE POSITION

L'objectif de cet axe de pharmacomodulation consiste à synthétiser des analogues du lead **ICF05016**, isomères de position de l'entité cytotoxique du phosphoramidate. Trois molécules sont candidates à cette pharmacomodulation : le composé **ICF05016**, le nouveau hit **31f** identifié à l'issue des travaux du 1^{er} chapitre, et le composé **31a** qui a manifesté la meilleure réponse en SPR en termes de RU (**Figure 111**).

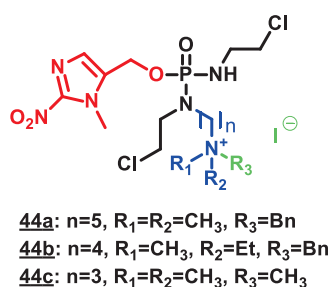


Figure 111: Structure générale des composés isomères de position **44a-c**

Afin d'accéder à ces structures, quatre schémas rétrosynthétiques A, B, C et D s'offraient à nous, différant par l'ordre d'introduction du phosphore sur l'oxygène du 2-nitroimidazole, et donc par la nature du réactif utilisé lors de l'étape de phosphorylation (**Figure 112**).

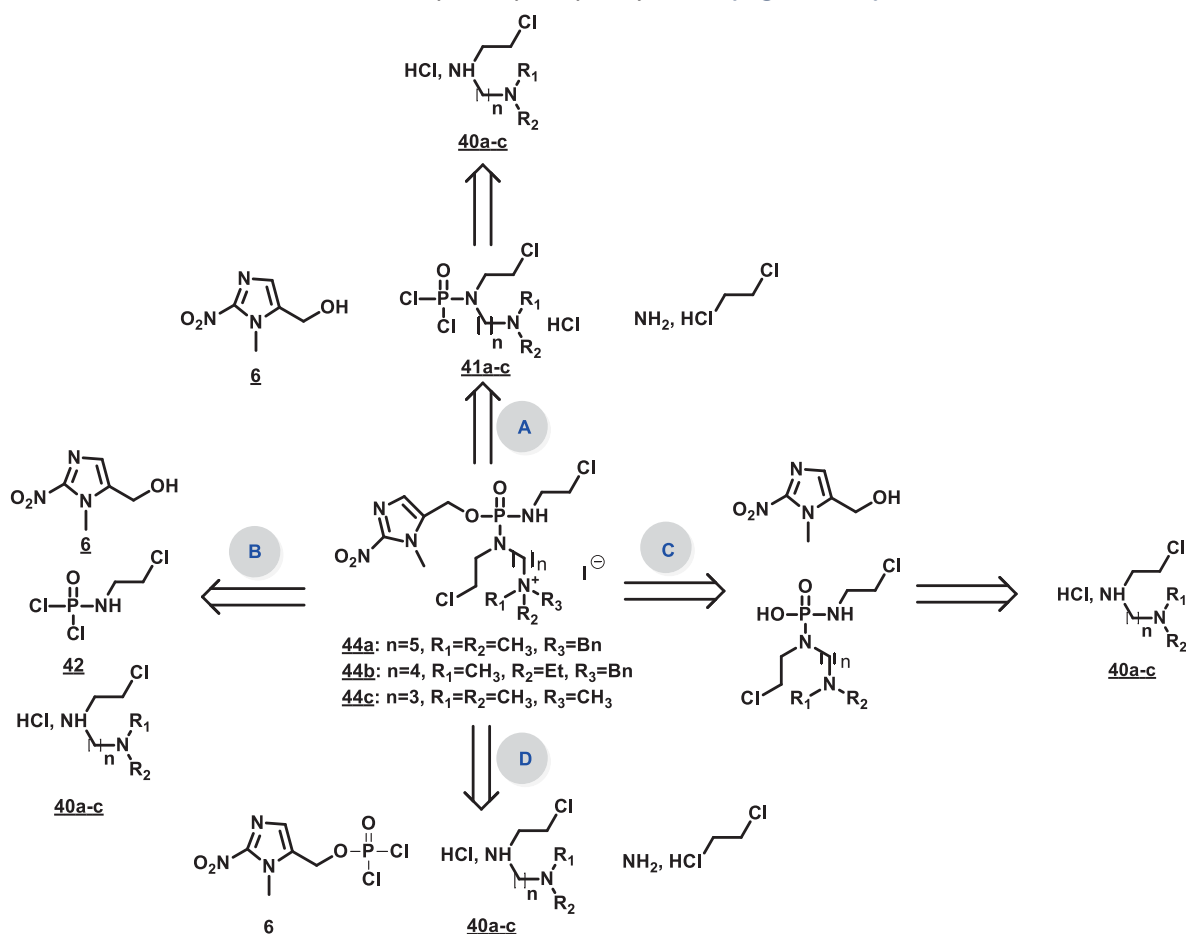
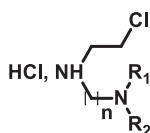


Figure 112: Schémas rétrosynthétiques possibles pour l'accès aux isomères de position 44a-c

Un bref aperçu sur chacune de ces voies est présenté ci-dessous :

- La voie **A** consiste en une phosphorylation s'appuyant sur la méthode décrite pour les séries chlorées et bromées, à savoir, réaction de l'alcool 6 avec les dichlorures d'acides phosphoramidiques 41a-c préalablement synthétisés à partir de diverses amines II^{aires} 40a-c, suivi par l'introduction d'une amine primaire, la 2-chloroéthylamine HCl ;
- La voie **B** utilise des conditions similaires à la voie A mais à partir d'un dichlorure d'acide phosphoramidique commun 42, l'introduction des diverses amines II^{aires} 40a-c se faisant ici en dernier lieu ;
- La voie **C**, quant à elle, porte sur l'introduction de l'alcool 6 en dernière étape *via* une réaction de Mitsunobu ;
- Enfin la voie **D** consiste à fonctionnaliser le POCl₃ par l'alcool 2-nitroimidazole 6 puis à introduire successivement les amines II^{aires} 40a-c et la 2-chloroéthylamine HCl. Toutefois, cette dernière voie a été écartée car le risque de chloration de la fonction alcool par le POCl₃ est très probable.

Un synthon est commun à l'ensemble de ces voies, il s'agit des diamines *N,N*-di-substituées 40a-c, toutes porteuses d'un bras *N*-(2-chloroéthyle) (**Figure 113**). Selon la voie envisagée, ces diamines seront introduites lors de la réaction de phosphorylation soit en dernière étape (voie B), soit plus en amont (voies A et C).



40a: n=5, R₁=CH₃, R₂=Bn

40b: n=4, R₁=CH₃, R₂=Bn

40c: n=3, R₁=R₂=CH₃

Figure 113: Structure générale des synthons diamines 40a-c

3.1 SYNTHÈSE DES DIAMINES *N,N*-DISUBSTITUÉES

La synthèse des amines cibles 40a-c n'a pas été rapportée dans la littérature. Également, peu d'analogues de même structure générale, mais avec des longueurs de chaîne et des substituants R₁ et R₂ différents, ont été décrits. Pour accéder à ces diamines, plusieurs voies rétrosynthétiques peuvent être envisagées selon des séquences en une, deux ou trois étapes (**Figure 114**).

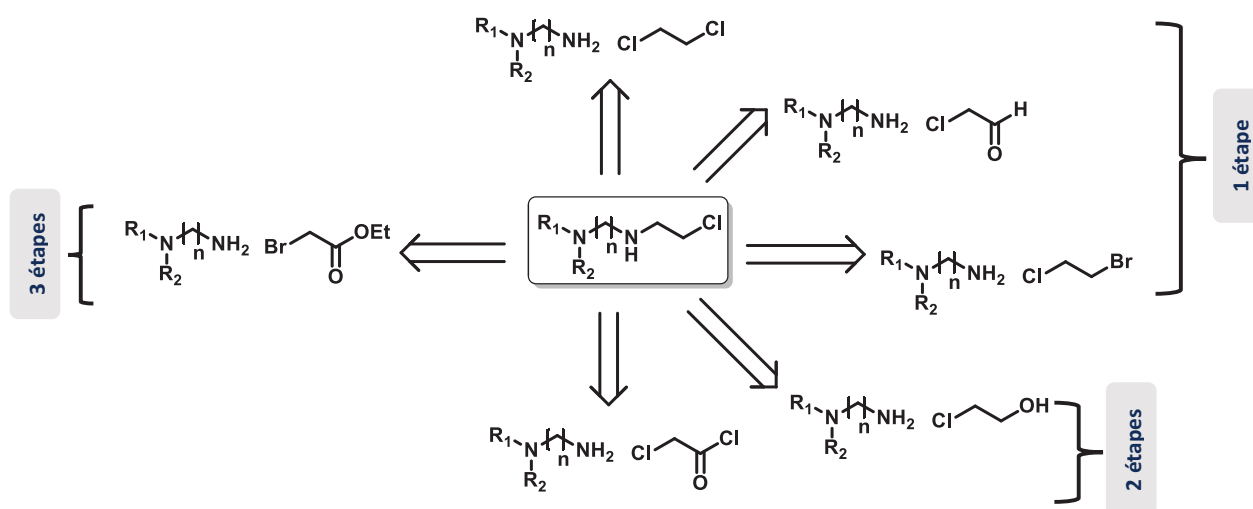
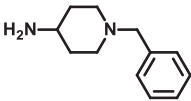
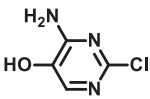
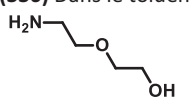
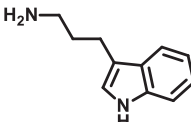


Figure 114: Différentes voies d'accès aux diamines **40a-c**

Toutes ces voies sont décrites dans la littérature pour des synthons de départ de type amines ^{lares} (aliphatiques ou aromatiques), plus rarement des diamines *N,N*-disubstituées. Afin de vérifier la validité de ces approches au sein de notre série, la *N,N*-diméthylaminopropylamine a été utilisée en première intention car il s'agit du réactif d'accès à la diamine **40c** nécessaire à la synthèse de l'isomère de position du hit **ICF05016**. En outre, sa disponibilité dans le commerce (contrairement à ses analogues **21a** et **21b**) facilite la mise en œuvre des essais.

En raison de soucis rencontrés tant en termes de réactivité et/ou de reproductibilité des résultats, nous avons progressé dans nos essais depuis les séquences en une étape vers celles en trois étapes. Les conditions opératoires, les substrats (de départ et d'arrivée) objet de la réaction décrite dans la littérature, ainsi que les résultats obtenus sont présentés succinctement dans le **Tableau 12**.

Tableau 12: Voies réactionnelles d'accès aux diamines : conditions opératoires, substrats utilisés dans la littérature et résultats obtenus

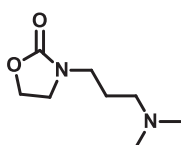
	Schéma réactionnel/ n, R ₁ , R ₂	Substrats utilisés dans la littérature/Rdt (Réf)
METHODES EN UNE ETAPE	METHODE 1 $R_1-N(R_2)-CH_2-CH_2-NH_2 + Cl-CH_2-CH_2-Cl \xrightarrow[\text{Sans solvant, 90°C, tube scellé, 4h}]{K_2CO_3 (2,5 \text{ éq})} R_1-N(R_2)-CH_2-CH_2-NH-CH_2-CH_2-Cl$ 1 éq 20 éq n=3, R₁=R₂=CH₃	Amines laires aromatiques (aniline et dérivés), base=pyridine ou TEA (Rdt : 10 à 100%) (331). 2,6-diamino-pyridine (conditions : base=CH ₃ ONa, solvant=DMF) (Rdt : 56%) (332).
	METHODE 2 $R_1-N(R_2)-CH_2-CH_2-NH_2 + Cl-CH_2-CHO \xrightarrow[\text{MeOH}]{NaBH_3CN (8 \text{ éq}), CH_3COOH (2 \text{ gouttes})} R_1-N(R_2)-CH_2-CH_2-NH-CH_2-CH_2-Cl$ 1 éq 1 éq n=3, R₁=R₂=CH₃	Amines de formule NH ₂ CH ₂ R, avec R= hétérocycles aromatiques diversement substitués (pyrazole, pyrimidine, etc). Une purification par chromatographie sur gel de silice est réalisée (Rdt : 38%, 69%) (333).
	METHODE 3 $R_1-N(R_2)-CH_2-CH_2-NH_2 + Cl-CH_2-CH_2-Br \xrightarrow[\text{K}_2\text{CO}_3 (2,5 \text{ éq})]{CH_3CN, 24 \text{ h, ta}, \text{OU}, 24 \text{ h, ta}} R_1-N(R_2)-CH_2-CH_2-NH-CH_2-CH_2-Cl$ 1 éq 20 éq n=3, R₁=R₂=CH₃	(334) ta, sans K ₂ CO ₃ , amines aliphatiques de type :  (335) ta, avec K ₂ CO ₃ , amines aromatiques de type :  (Rdt : 62%)
METHODE EN DEUX ETAPES	METHODE 4 $R_1-N(R_2)-CH_2-CH_2-NH_2 + Cl-CH_2-CH_2-OH \xrightarrow[\text{Toluène, 24 h, reflux}]{HCl} R_1-N(R_2)-CH_2-CH_2-NH-CH_2-CH_2-OH$ 2 éq 1 éq n=3, R₁=R₂=CH₃ $R_1-N(R_2)-CH_2-CH_2-NH_2 \xrightarrow[\text{CH}_2\text{Cl}_2]{SOCl_2} R_1-N(R_2)-CH_2-CH_2-NH-CH_2-CH_2-Cl$ 1 éq 2,5 éq n=3, R₁=R₂=CH₃	(336) Dans le toluène (Rdt : 40%):  (337) Dans le DMSO à 80 °C (Rdt : 38%): 
	METHODE 5 $R_1-N(R_2)-CH_2-CH_2-NH_2 + Cl-CH_2-CO-CH_2-Cl \xrightarrow[\text{AcOEt anh., 0°C, 1h}]{HCl} R_1-N(R_2)-CH_2-CH_2-NH-CO-CH_2-Cl$ 1 éq 2,5 éq n=3, R₁=R₂=CH₃ $R_1-N(R_2)-CH_2-CH_2-NH-CO-CH_2-Cl \xrightarrow[\text{THF, 0°C}]{LiAlH_4} R_1-N(R_2)-CH_2-CH_2-NH-CH_2-CH_2-Cl$ * n=2, R₁=R₂=Et * n=3, R₁=R₂=CH₃ * n=3, R₁=CH₃, R₂=Bn * n=5, R₁=R₂=CH₃	(338) n=2, R ₁ =R ₂ =Et (Rdt : 71%)
METHODE EN TROIS ETAPES	METHODE 6 $R_1-N(R_2)-CH_2-CH_2-NH_2 + Br-CH_2-CO-OEt \xrightarrow[\text{CH}_3\text{CN}]{0^\circ\text{C puis ta}} R_1-N(R_2)-CH_2-CH_2-NH-CO-OEt$ 1 éq 2,5 éq $R_1-N(R_2)-CH_2-CH_2-NH-CO-OEt \xrightarrow[\text{THF, 0°C}]{LiAlH_4} R_1-N(R_2)-CH_2-CH_2-NH-CH_2-CH_2-OH \xrightarrow[\text{CH}_2\text{Cl}_2 \text{ ahydre}]{SOCl_2, 0^\circ\text{C puis ta}} R_1-N(R_2)-CH_2-CH_2-NH-CH_2-CH_2-Cl$ * n=3, R₁=R₂=CH₃ * n=5, R₁=R₂=CH₃ * n=3, R₁=CH₃, R₂=Bn * n=5, R₁=CH₃, R₂=Bn	

Nous commenterons dans ce qui suit les résultats obtenus pour ces différentes méthodes.

3.1.1 METHODES UTILISANT UN 1,2-DIHALOGENOETHANE OU DU 2-HALOGENOETHANOL : METHODES 1, 3 ET 4

3.1.1.1 METHODE 1

Rapportée dans la littérature pour des amines principalement aromatiques (**331**), cette méthode en une étape assez ancienne n'a pas permis d'obtenir les diamines souhaitées. Les conditions opératoires utilisées dans notre cas en termes de chauffage, de pression (tube scellé) et de base (carbonate de potassium), favorisent vraisemblablement, comme le laisse suggérer l'analyse HRMS du brut réactionnel (amas isotopique majoritaire $[M+H]^+ = 173,1284$), une réaction secondaire conduisant à une structure hétérocyclique oxygénée de type oxazolidin-2-one (**Figure 115**).



Masse exacte : 172,1212 g/mol

Figure 115: Structure présumée du composé obtenu par la méthode 1

Par ailleurs, cet hétérocycle a été obtenu par Mei C *et al.* (**339**) dans des conditions similaires au départ du 1,2-dichloroéthane, de l'aniline et du CO₂ (pression atmosphérique, 80 °C, carbonate de césium). Une dialkylation de l'amine I^{aire} ainsi que la formation d'ammonium IV^{aire} sont aussi des réactions indésirables très probables dans ces conditions.

3.1.1.2 METHODE 3

L'analyse RMN ¹H des bruts réactionnels issus de la réaction sans carbonate de potassium (après extraction en milieu alcalin, pH=14) et avec carbonate de potassium ne permet pas de conclure sur la présence du produit désiré **40c**. La réaction aurait pu être portée à reflux mais au risque d'une dialkylation comme observé dans la série de Boens *et al.* (**340**) (23% d'amine III^{aire} *versus* 12% d'amine II^{aire} à l'issue d'un chauffage à 80 °C dans le DMF).

3.1.1.3 METHODE 4

L'analyse RMN ¹H des bruts réactionnels issus de la réaction portée à reflux pendant 24 heures montre la présence du produit souhaité à une teneur ~ 25%. Ce faible rendement de conversion, surajouté à une difficulté de séparation du produit aminoalcool de l'amine de départ, nous a amené à écarter cette méthode.

3.1.2 METHODE EN UNE ETAPE A PARTIR DU CHLOROACETALDEHYDE : METHODE 2

Il s'agit d'une méthode one-pot pour l'obtention d'amines II^{aires} portant un bras 2-chloroéthyle, utilisant le chloroacétaldéhyde comme substrat carbonyle de départ. Cette réaction consiste en une amination réductrice à savoir : formation d'une imine par réaction entre le chloroacétaldéhyde et l'amine I^{aire}, favorisée par une catalyse acide, suivie d'une réduction sélective par le cyanoborohydrure de sodium (NaBH₃CN), stable en milieu aqueux.

Se référant au mode opératoire de Burdi *et al.* (333), la réaction a été menée dans le MeOH en présence d'un excès de NaBH₃CN (4 équivalents). La RMN ¹H du brut réactionnel issu de l'extraction du milieu réactionnel par le DCM montre la présence de la diamine cible **40c** sous sa forme base, reconnaissable par la présence du signal du méthylène en alpha du chlore résonnant à ~ 3,6 ppm (dans le CDCl₃). Un essai de purification par colonne chromatographique utilisant l'alumine comme phase stationnaire et un éluant ternaire (AcOEt/EtOH/NH₄OH) a été réalisé, conduisant malheureusement à une dégradation du produit sur colonne.

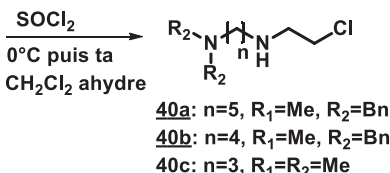
3.1.3 METHODE EN DEUX ETAPES A PARTIR DU CHLORURE DE CHLOROACETYLE : METHODE 5

La préparation d'un dérivé amidique suivie par la réduction de la fonction carbonylée est une alternative en deux étapes pour l'accès aux diamines désirées **40a-c**. Pour ceci, nous nous sommes référés au mode opératoire décrit dans la littérature pour la *N,N*-diéthylaminoéthylamine, où le chlorure de chloroacétyle était utilisé comme réactif de départ, en quantité équimolaire avec la diamine. A noter que la fonction amine III^{aire} sert de base en captant l'acide chlorhydrique libéré lors de la réaction. La réaction est démarrée à -10 °C, compte tenu de la haute réactivité du chlorure de chloroacétyle et la conversion est totale au bout d'une heure d'agitation à la même température (338). Cette méthode a été reproduite avec succès pour le même substrat de la littérature. De façon surprenante, ces conditions réactionnelles n'ont pas permis d'accéder à l'amide désiré à partir de la *N,N*-diméthylaminopropylamine. Afin de mieux élucider le déroulement de cette réaction, des essais ont été conduits sur deux nouvelles amines synthétiques variant par la longueur de chaîne *n* et les substrats R₁ et R₂: à savoir les amines **18a** (*n*=5, R₁=R₂=Me) et **21c** (*n*=3, R₁=Bn, R₂=Me). Le pic moléculaire de l'amide n'a pas été observé dans le brut issu de la réaction au départ de l'amine **18a**, alors qu'il a été observé pour l'amine benzylée **21c** ([M+H]⁺ = 255.1253 g mol⁻¹).

Compte tenu de cette variabilité de réactivité inter-amines et sachant que cette stratégie ne permet pas d'accéder à la diamine **40c** nécessaire pour la synthèse de l'isomère de position du hit **ICF05016**, cette voie en deux étapes a été abandonnée, au profit d'une dernière méthode en trois étapes.

3.1.4 METHODE EN TROIS ETAPES A PARTIR DU 2-BROMOACETATE D'ETHYLE : METHODE 6

La dernière séquence mise en jeu est une méthode en 3 étapes permettant d'introduire progressivement les fonctions réactives (Figure 116).



Appliquée d'abord à l'amine commerciale, la *N,N*-diméthylaminopropylamine, cette séquence réactionnelle s'est déroulée sans difficulté apparente. Elle a pu ensuite être extrapolée à l'amine **21a** permettant ainsi de disposer de deux diamines **40a** et **40c** en vue des essais de phosphorylation.

L'alkylation des amines *N,N*-diméthylaminopropylamine et **21a** a été réalisée par substitution nucléophile de l'atome de brome du bromoacétate d'éthyle, en présence de carbonate de potassium. L'amine est utilisée en excès (1,5 à 2 équivalents) afin d'éviter une *N*-dialkylation. Les bruts réactionnels ont été purifiés par chromatographie sur gel de silice utilisant un éluant polaire à base d'AcOEt/EtOH/NH₄OH ou TEA, pour conduire aux aminoesters **38a** et **38c** avec des rendements respectifs de 19% et 54%. Leur caractérisation par RMN ¹H (dans le CDCl₃) met en évidence les signaux caractéristiques de la fonction ester, à savoir un triplet vers 1,25 ppm (3H) et un quadruplet à ~ 4,16 ppm (2H). Un singulet correspondant à la résonance des deux protons du méthylène en alpha de l'ester est également visualisé à ~ 3,37 ppm. L'analyse RMN ¹³C permet, quant à elle, d'identifier le signal du carbonyle à ~ 172 ppm.

La réduction des esters **38a** et **38c** en alcools correspondants **39a** et **39c** par le LiAlH_4 est une réaction rapide avec une conversion totale en quelques heures (1-4 heures). Le traitement du brut réactionnel a été réalisé selon la méthode de Mihailovic (**341**), qui permet d'utiliser une quantité minimale d'eau afin d'hydrolyser les sels d'aluminium. L'étape d'extraction, susceptible de générer des pertes de l'aminoolcool dans la phase aqueuse, est ainsi évitée. Les rendements de la réaction sont bons (88 et 77% pour **39a** et **39c**, respectivement). L'analyse RMN ^1H des bruts réactionnels montre une pureté satisfaisante ; ils ne subissent de ce fait aucune purification et sont directement engagés dans l'étape suivante de chloration. Comparativement au spectre des esters **38a** et **38c**, la formation de l'alcool est appréciée à travers la disparition des signaux caractéristiques du groupement éthylique de la fonction ester et l'apparition d'un triplet intégrant pour deux protons $\sim 3,6$ ppm (dans le CDCl_3), relatif au méthylène en alpha de la fonction alcool. La structure de l'alcool **39c** a été confirmée par HRMS, montrant un pic moléculaire $[\text{M}+\text{H}]^+$ à $147,14990 \text{ g mol}^{-1}$.



3^{ème} étape : la chloration

Les alcools **39a** et **39c** ont ensuite été chlorés par le chlorure de thionyle. Un excès de 4 équivalents de ce réactif est utilisé de façon systématique. L'alcool et le produit chloré étant sous forme de chlorhydrate au sein du milieu réactionnel, le suivi de l'avancement de la réaction a été réalisé par RMN ^1H après évaporation de petites fractions. L'analyse RMN ^1H (dans le D_2O ou le CD_3OD) montre pour le composé désiré un léger déblindage du triplet du méthylène en alpha du chlore, comparé à son précurseur alcool (3,94 ppm *versus* 3,83 ppm, dans le CD_3OD). Notons que dans certains lots, une certaine quantité d'alcool non chloré a été observée d'après l'analyse RMN ^1H et ^{13}C , dans un ratio molaire maximum de 20%, et ce malgré l'utilisation d'un excès de chlorure de thionyle.

La structure de la diamine HCl **40c** a été vérifiée par analyse HRMS, objectivant la présence d'un amas isotopique caractéristique d'un composé monochloré (rapport 3:1 pour M:M+2) ($[\text{M}+\text{H}]^+ = 165,1151 \text{ g mol}^{-1}$).

La synthèse de ces deux précurseurs diamines HCl **40a** et **40c** a permis de valider cette méthode en 3 étapes quant à son intérêt et sa reproductibilité pour la préparation de diamines à différentes longueurs de chaîne et substituants. Disposant des deux précurseurs **40a** et **40c**, les essais des différentes voies de phosphorylation A, B et C précédemment décrites ont pu être mis en œuvre. La préparation de la diamine **40b** nécessaire pour la synthèse de l'isomère de position du nouveau hit **31f** a été ajournée dans l'attente d'une méthode de phosphorylation valide.

3.2 VOIE A : RESULTATS ET DISCUSSION

Cette voie s'appuie sur la séquence réactionnelle précédemment utilisée (cf chapitre I) pour les dérivés **23-27**. Toutefois, elle n'est pas convergente pour l'ensemble des isomères de position souhaités, un synthon phosphorylé **41** issu de la réaction entre chaque diamine **40** et le POCl_3 devant être préparé indépendamment pour chaque dérivé envisagé. L'obtention de ces composés **41** a été envisagée selon deux modes opératoires : à basse température en présence d'une base, ou encore à reflux, comme évoqué précédemment pour le dérivé **8** (Figure 117).

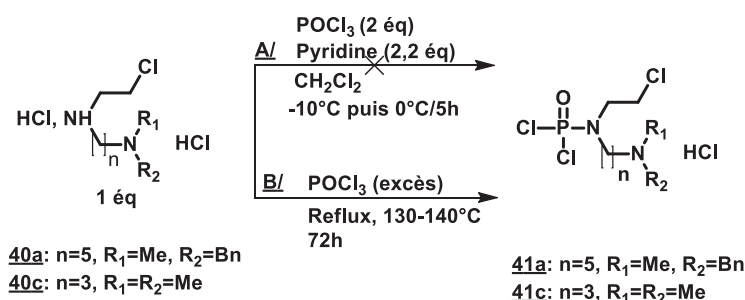


Figure 117: Voies réactionnelles A et B d'accès aux phosphoramides **41a-c**

D'après le suivi de la cinétique de la réaction par RMN ^{31}P pour la diamine **40c**, seule la méthode à reflux permet d'accéder au composé phosphorylé désiré. En effet, lors de l'essai à basse température en présence de base (pyridine), aucune formation du composé **41c** n'a été observée. Toutefois, en portant le milieu réactionnel à reflux dans le DCM pendant une nuit, une formation lente du composé **41c** a été constatée, laissant suggérer qu'une plus forte température permettrait

d'accélérer la réaction. Aussi avons-nous opté pour un chauffage à reflux du milieu réactionnel en l'absence de DCM, le POCl₃ en large excès (10 équivalents) jouera à la fois le rôle de réactif et de solvant. Dans ces conditions, le dérivé phosphoramidique **41c**, nécessaire pour la synthèse de l'isomère de position du hit **ICF05016**, a été obtenu.

L'analyse RMN ¹H du brut réactionnel évaporé à sec a permis de s'assurer de la conversion quasi-totale de l'amine de départ et de confirmer la formation du dérivé phosphorylé **41c**, notamment par la présence des signaux des deux méthylènes en alpha de l'azote du phosphoramide présentant des couplages caractéristiques avec le phosphore (e.g. doublet de triplets (³J_{H-P}=15 Hz) pour la multiplicité du signal relatif aux protons Ha) (**Figure 118**).

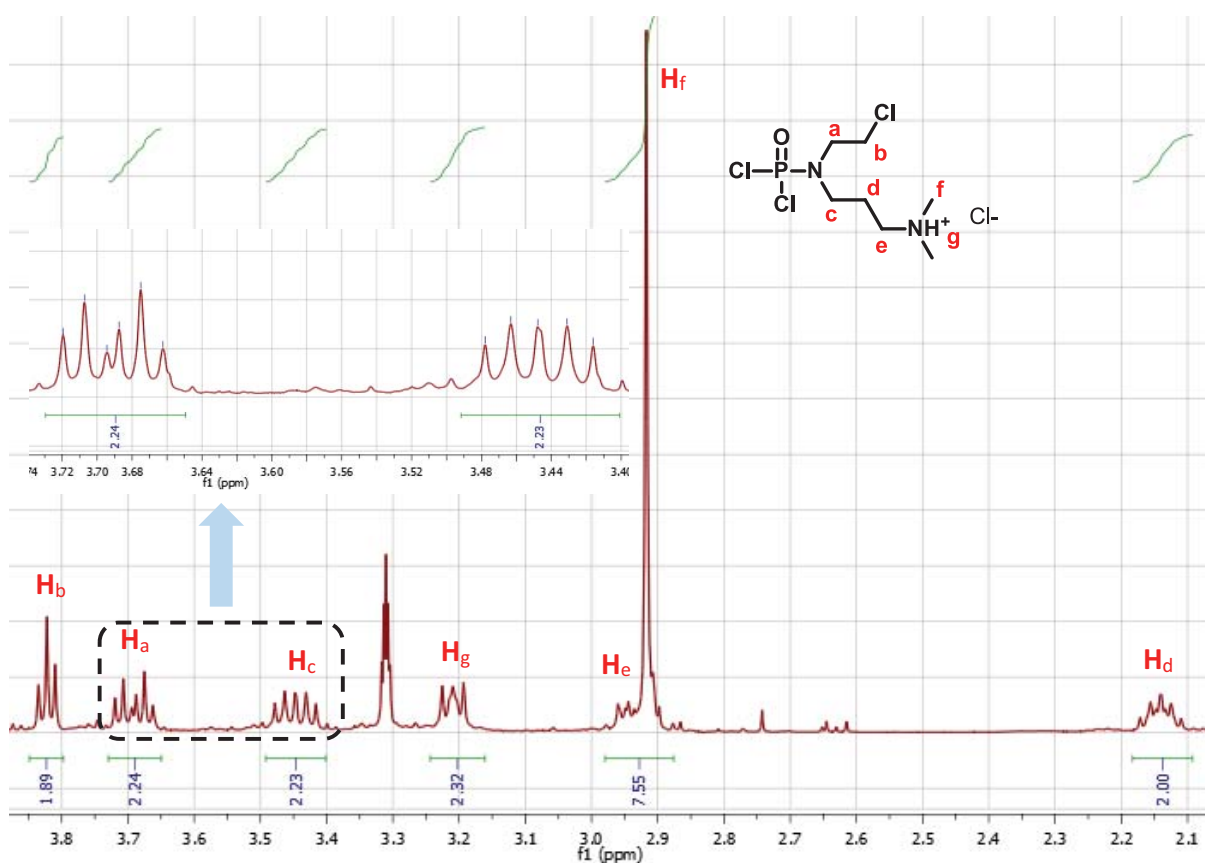


Figure 118: Spectre RMN ¹H du dérivé **41c** (CD₃OD, 500 MHz)

En RMN ³¹P, un signal à ~ 18 ppm (dans le CD₃OD) correspondant au produit **41c** a été identifié, associé à plusieurs pics dans la zone comprise entre 8 et -4 ppm (teneur globale ~ 65%). L'analyse HRMS confirme la présence du dérivé **41c** au sein du brut réactionnel (évaporé à sec), objectivant la présence de l'ion [M+H]⁺ (281,0139 u.m.a.).

Compte tenu de ces impuretés présentes en RMN ³¹P, nous devons envisager une purification. Sachant d'une part, que le dichlorure de l'acide phosphoramidique **41c** est obtenu sous forme de chlorhydrate en fin de réaction, une conversion en sa forme base correspondante a été envisagée avant purification sur colonne de gel de silice, mais nos essais (en présence de DIPEA ou le carbonate de césium) ont conduit à une dégradation du produit observée par RMN ³¹P. Sachant

d'autre part, que ces dérivés sont potentiellement instables et sujet à l'hydrolyse, il nous est apparu irraisonnable de tenter de purifier le brut réactionnel en phase inverse. De plus, un contrôle RMN ^{31}P du brut réactionnel une semaine après sa préparation et conservation à + 4 °C sous argon a montré la disparition du pic à ~ 18 ppm au profit d'un pic à ~ 12 ppm. Le même profil évocateur de dégradation a été retrouvé lors d'une analyse RMN ^1H et ^{31}P du produit **41c** conservé dans le solvant deutéré (CD_3OD) pendant quelques jours (~ 10).

En conclusion, bien qu'obtenu à l'issue de la réaction de phosphorylation par POCl_3 , le dérivé phosphorylé **41c** s'est révélé peu stable et son isolement soit sous forme de chlorhydrate soit de base a été écartée, ce qui nous a contraint à envisager une nouvelle voie de synthèse.

3.3 VOIE B : RESULTATS ET DISCUSSION

Cette voie réactionnelle présente l'avantage d'être plus convergente car elle nécessite la préparation d'un synthon phosphoramidique commun **42** issu de la réaction entre le chlorhydrate de 2-chloroéthylamine et le POCl_3 (**Figure 119**).

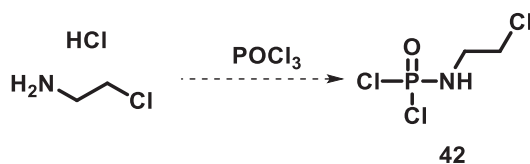


Figure 119: Préparation du dérivé phosphorylé **42**

Toutefois trois points limitant à cette stratégie peuvent être évoqués :

✎ La synthèse de ce composé **42** pourrait s'avérer problématique compte tenu des travaux récents de Zhang W *et al.* (**342**) qui montrent que la 2-bromoéthylamine peut réagir avec le POCl_3 à froid et en présence de TEA pour conduire à un bisphosphoramide résultant d'une double addition de POCl_3 sur la fonction amine *laire* (**Figure 120**), et non au dichlorure de l'acide 2-bromoéthylphosphoramidique attendu, comme cela était précédemment décrit dans la littérature pour l'obtention du dérivé **42** (**343**, **344**).

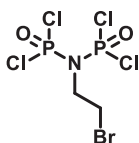


Figure 120: Structure du bisphosphoramide identifié comme le sous-produit majoritaire de la réaction entre le POCl_3 et le chlorhydrate du 2-bromoéthylamine à froid (**342**)

✎ Le proton N-H de la fonction phosphoramidique du composé **42** est suffisamment acide d'après les données de la littérature (**345**) pour être arraché par la base lithiée ou encore par l'alcoolate formé lors de l'étape de phosphorylation de l'alcool **6**.

✎ Un autre point limitant de cette stratégie pourrait être la faible réactivité des amines *laire* **40a-c**, relativement encombrées, pour les substrats phosphoramidates monochlorés. Cette supposition s'appuie sur la bibliographie (**283**) et sur des essais réalisés au laboratoire, l'attaque

nucléophile d'une amine II^{aire} HCl sur un dérivé phosphoramidate monochloré n'ayant pu être mise en évidence qu'à des températures élevées.

Afin de confirmer cette dernière hypothèse, un essai « témoin » a été réalisé avec un analogue *N*-méthylé du dérivé **42**, le composé **43b**, permettant également de s'abstraire de l'acidité du composé **42** (Figure 121).

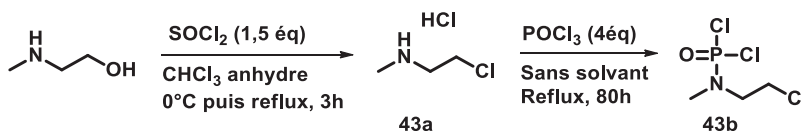


Figure 121: Préparation du dérivé phosphoramidique *N*-méthyle **43b**

Le phosphoramide **43b** a été obtenu en 2 étapes au départ de la 2-(méthylamino)éthanol commerciale, qui subit une chloration par le chlorure de thionyle pour aboutir, après recristallisation dans le système EtOH/acétone, au composé chloré **43a** pur. Ce dernier a été ensuite phosphorylé par le POCl₃ (en excès) à reflux, pour donner, après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice, au phosphoramide *N*-méthyle **43b** pur (d'après les analyses RMN ³¹P, ¹H et ¹³C).

L'étape de couplage a ensuite été réalisée avec l'alcool benzylique en présence de la base lithiée (Figure 122) et a été confirmée par RMN ³¹P avec la présence d'un signal à ~ 16 ppm dès T₀, témoin vraisemblable de la formation de l'intermédiaire benzylé **43c**. Une amine II^{aire} HCl commerciale, la bis(2-chloroéthylamine) HCl a ensuite été additionnée au milieu réactionnel à -78 °C, sans conduire à la modification du spectre RMN ³¹P, signe de la non réactivité de l'amine II^{aire}. Après retour à température ambiante et quatre heures agitation, une dégradation de l'intermédiaire **43c** est observée.

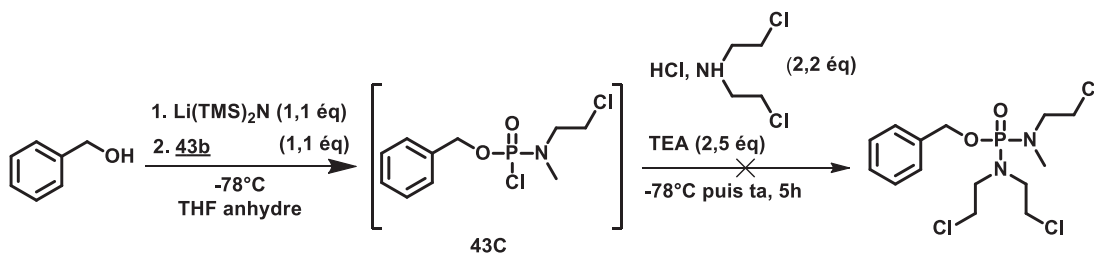


Figure 122: Réaction de couplage "témoin"

Cette étude témoin confirmant notre dernière hypothèse, la voie B n'a pas été jugée opportune pour l'obtention des dérivés isomères de position envisagés **44a-c**.

3.4 VOIE C : RESULTATS ET DISCUSSION

Cette voie repose sur la réaction de Mitsunobu entre la fonction alcool du 2-nitroimidazole (**6**) et un acide phosphorodiamidique. Cette voie de synthèse présente l'avantage de s'abstraire des conditions basiques précédemment utilisées lors du couplage, et elle a été décrite dans la synthèse brevetée de l'évofosfamide (**228**). Toutefois, compte-tenu d'essais réalisés en parallèle

au laboratoire sur des analogues des prodrogues envisagées **44a-c**, qui se sont révélés infructueux notamment en raison de l'instabilité des acides phosphoramidiques, nous avons choisi d'écarter également cette voie de synthèse et de réorienter notre stratégie de fonctionnalisation.

3.5 ALTERNATIVES AUX ISOMERES DE POSITION

Parmi les quatre voies précédemment décrites, la voie A semblait la plus prometteuse. Les échecs précédemment rapportés étaient vraisemblablement liés à la pureté et à l'instabilité du dichlorure d'acide phosphoramidique **41c**, probablement en lien avec la présence de la fonction amine III^{aire}. Nous avons alors opté pour une alternative basée sur l'approche de « chimie click » permettant d'introduire cette fonction amine III^{aire} indépendamment de l'étape de phosphorylation. Deux composés **52** et **55**, analogues du lead **ICF05016** et de son isomère de position, mais possédant un motif triazole au niveau du bras espaceur ont été conçus (**Figure 123**).

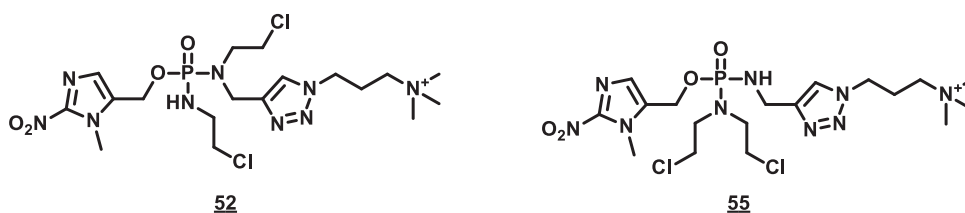


Figure 123: Structures des composés envisagés **52** et **55**, issus de l'approche de chimie click

3.5.1 SYNTHESE DU COMPOSE **52**

Une séquence réactionnelle en quatre étapes a été envisagée pour aboutir au composé **52**, équivalent de l'isomère de position du hit **ICF05016**. Cette stratégie met en jeu successivement des réactions de phosphorylation avec le dichlorure d'acide (2-chloroéthyl)(prop-2-yn-1-yl)phosphoramidique **48** puis la 2-chloroéthylamine HCl, une étape de chimie click avec l'azoture **50** et enfin une réaction de quaternisation de l'amine III^{aire} (**Figure 124**).

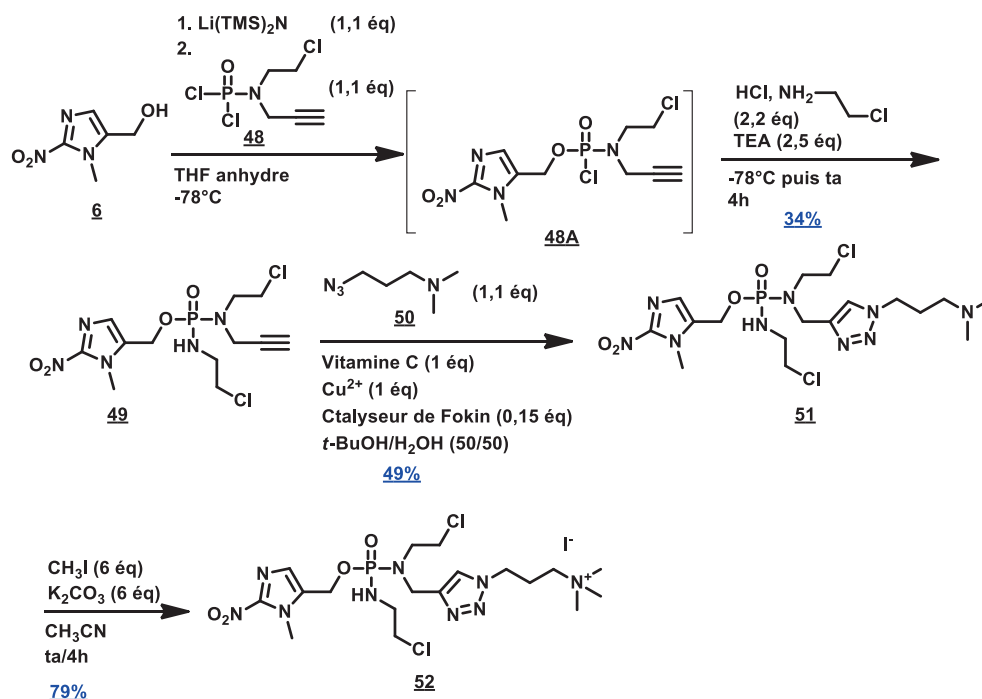


Figure 124: Voie de synthèse du composé **52**, équivalent de l'isomère de position du lead **ICF05016**, portant un noyau triazole

Cette séquence réactionnelle nécessite donc la synthèse préalable de l'alcyne vrai **48** et de la 3-azido-*N,N*-diméthylpropan-1-amine **50**.

3.5.1.1 SYNTHÈSE DU DICHLORURE D'ACIDE (2-CHLOROETHYL)(PROP-2-YN-1-YL)PHOSPHORAMIDIQUE **48**

Ce composé a été obtenu selon une séquence réactionnelle multi-étapes au départ de la propargylamine commerciale (**Figure 125**).

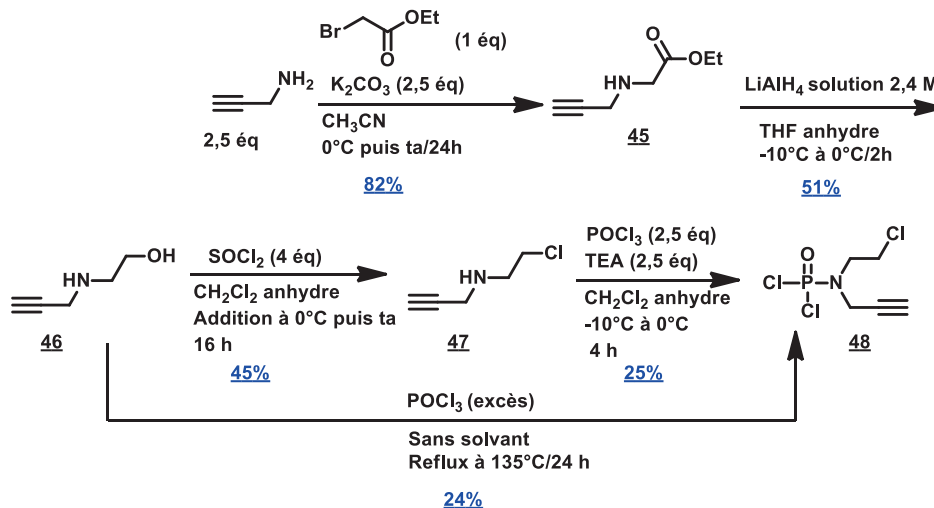


Figure 125 : Schéma réactionnel pour la synthèse du dérivé phosphoramidique alcyne **48**

A. 1^{ère} étape : N-alkylation de la propargylamine par le bromoacétate d'éthyle

Cette étape a été réalisée selon les conditions précédemment décrites pour la synthèse des composés **38a-c** et a permis d'obtenir l'aminoester **45**, après une purification par chromatographie sur colonne de gel de silice, avec un bon rendement de 82%.

Les analyses RMN ^1H et ^{13}C ont permis de confirmer la structure et la pureté du produit, notamment par la présence du triplet et du quadruplet relatifs à la fonction ester éthylique et des signaux propres au groupement propargylique, à savoir un doublet à 3,43 ppm ($^3J = 2,5$ Hz) et un triplet à 2,19 ppm ($^3J = 2,5$ Hz), correspondant respectivement aux 2 protons du méthylène du propargyle et au proton de l'alcyne vrai.

B. 2^{nde} étape : réduction

L'utilisation du LiAlH_4 a permis une réduction sélective de l'ester, sans affecter l'insaturation de l'alcyne. Le suivi de la réaction par CCM a montré une conversion totale au bout de 2 heures. Le brut réactionnel, traité par la méthode de Mihailovoc (**341**) à l'instar des aminoalccols **39a-c**, peut s'avérer suffisamment pur pour l'engager directement dans l'étape suivante (d'après la RMN ^1H et ^{13}C), ou encore nécessiter une colonne de purification sur gel de silice (un rendement de 51% est obtenu).

La structure de l'alcool **46** est mise en évidence en RMN ^1H par la disparition des signaux de l'ester et l'apparition d'un multiplet à 3,67 ppm intégrant pour deux protons, relatif au méthylène en alpha de l'alcool.

C. 3^{ème} étape : chloration et phosphorylation

Le dérivé phosphoramidique **48** a pu être obtenu soit en deux étapes distinctes de chloration et de phosphorylation utilisant successivement SOCl_2 et POCl_3 , soit en une unique étape utilisant POCl_3 :

✎ La 1^{ère} étape de chloration de l'alcool **46** par le chlorure de thionyle s'est avérée problématique, car en vue d'atteindre une conversion totale de l'alcool, un chauffage doux a dû être réalisé pendant 5 heures, mais une dégradation est probablement survenue (objectivée par l'analyse RMN ^1H). La manipulation a été donc refaite à froid puis à ta, sans recours au chauffage, suivie par un lavage du solide obtenu par $\text{Et}_2\text{O}/\text{HCl}$, chose qui a permis d'éliminer en partie les impuretés (mises en évidence par analyse RMN ^1H), mais conduisant toutefois à un rendement modeste de 45%. Le produit chloré **47** a ensuite subi une phosphorylation par le POCl_3 à 0 °C en présence de TEA, ce qui a permis d'isoler le dérivé **48** à l'issue d'une colonne chromatographique sur gel de silice avec un rendement de 25%. Le rendement global de ces deux réactions successives était donc de 11%.

✎ Une chloration/phosphorylation simultanées de l'alcool **46** par le POCl_3 en excès à reflux s'est avérée plus avantageuse en termes de gain de temps et de rendement (24% *versus* 11%). Quoiqu'amélioré, le rendement demeure bas et peut s'expliquer par des réactions secondaires, avec notamment la formation d'un hétérocycle à cinq chaînons de type oxyde d'oxazaphospholidine, obtenu par substitution intra-moléculaire de la fonction alcool, suite à une

phosphorylation précoce de l'amine du composé **46**. La présence d'un pic à ~ 25 ppm dans le brut réactionnel oriente vers la formation de cet hétérocycle.

La pureté du composé **48** après colonne chromatographique sur gel de silice a été confirmée par les techniques spectrales RMN ^1H , ^{31}P et ^{13}C . On notera notamment le signal en RMN ^{31}P à 17,34 ppm caractéristique d'un dichlorure d'acide phosphoramidique.

3.5.1.2 SYNTHÈSE DE LA 3-AZIDO-*N,N*-DIMETHYLPROPAN-1-AMINE **50**

L'azoture **50** a été synthétisé au départ de la 3-chloro-*N,N*-diméthylpropanamine HCl commerciale par réaction avec l'azoture de sodium à 80 °C en milieu aqueux, suivie par une alcalinisation du milieu par la potasse puis extraction par Et₂O (**Figure 126**).

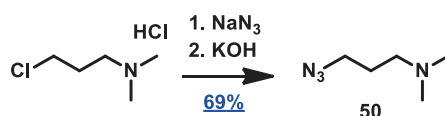


Figure 126: Méthode de synthèse de l'azoture **50**

3.5.1.3 REACTION DE COUPLAGE DE L'ALCOOL **6** AVEC LE DICHLORURE D'ACIDE (2-CHLOROETHYL)(PROP-2-YN-1-YL)PHOSPHORAMIDIQUE **48** POUR CONDUIRE AU DERIVE PHOSPHORODIAMIDATE **49** (**Figure 124**)

La phosphorylation de l'alcool **6** a été réalisée selon les conditions déjà établies de solvant, de température et de stœchiométrie, pour les séries chlorées et bromées. L'intermédiaire **48A** s'est formé instantanément dès T₀ avec un signal à 15,4 ppm sur le spectre RMN ^{31}P . En revanche, et contrairement à ce qui avait été généralement observé dans la série précédente, le couplage de l'amine, à savoir ici la 2-chloroéthylamine HCl, n'a pas été instantanée à -78 °C. La réaction a donc été poursuivie à température ambiante pendant 4 heures (sous monitoring RMN ^{31}P), temps pour lequel une conversion totale de l'intermédiaire a été observée : absence du signal à 15,4 au profit d'un pic à 16,3 ppm. Après colonne chromatographique sur gel de silice, le produit de couplage **49** a été obtenu avec un rendement de 34%.

3.5.1.4 REACTION DE CHIMIE CLICK, CYCLOADDITION 1,3-DIPOLAIRE

A partir du composé **49**, une réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire avec l'azoture **50**, catalysée par le Cu(I) et le catalyseur de Fokin stabilisant les ions cuivreux, a été conduite dans un mélange H₂O/*t*-BuOH, 50/50, v/v. Le Cu(I), dont l'utilisation permet de s'affranchir de l'activation thermique généralement nécessaire pour les réactions de chimie clic, a été généré *in situ* par une réaction rédox entre le Cu(II) et l'acide ascorbique introduits simultanément dans le milieu réactionnel en quantité stœchiométrique (1 équivalent) et non catalytique (conditions précédemment testés s'étant révélées infructueuses). Dans ces conditions, le suivi par CCM a montré une disparition rapide, en moins d'une heure, du produit de départ phosphorodiamidate **49**. Après purification par chromatographie sur gel de silice, le produit triazolé **51** a été obtenu avec un rendement de 44%. La formation du cycle 1,2,3-triazole est notamment confirmée en RMN ^1H par l'apparition d'un singulet correspondant au proton aromatique à ~ 7,8 ppm et d'un doublet relatif au signal de résonnance du méthylène sur le C5 du triazole ~ 4.37 ($^3J_{\text{H-P}}$ = 11,2 Hz). En ^{13}C , la formation du

cycloadduit est appréciée par l'apparition de deux nouveaux signaux dans la zone aromatique, relatifs aux carbones aromatiques du noyau triazole (C_{Ar} à $\sim 145,96$ ppm et CH_{Ar} à $\sim 125,17$ ppm).

3.5.1.5 QUATERNISATION DE LA FONCTION AMINE III^{AIRE}

Le composé triazolé **51** a été quaternisé dans les conditions classiques, à savoir ACN anhydre, 6 équivalents de carbonate de potassium et 6 équivalents de CH_3I . Un temps réactionnel de 4 heures a suffi pour conduire à une conversion totale, comme cela est visualisé par le suivi par CCM et l'analyse RMN ^{31}P du brut.

En conclusion, le produit final **52** a pu ainsi être obtenu directement pur à travers une séquence en trois étapes. Sa structure a été confirmée par analyses structurales IR, RMN 1H , ^{13}C , ^{31}P et HRMS. L'analyse du spectre RMN 1H démontre notamment la quaternisation par la présence d'un singulet intégrant pour 9H à 3,18 ppm, relatif au triméthylammonium, avec un glissement du signal vers les champs faibles de 0,43 ppm comparativement au singulet du groupement diméthylamino de son précurseur **51**.

3.5.2 SYNTHÈSE DU COMPOSÉ **55**

Une séquence réactionnelle identique a été envisagée pour aboutir au composé **55**, analogue du lead **ICF05016** possédant un espaceur triazolé (**Figure 127**).

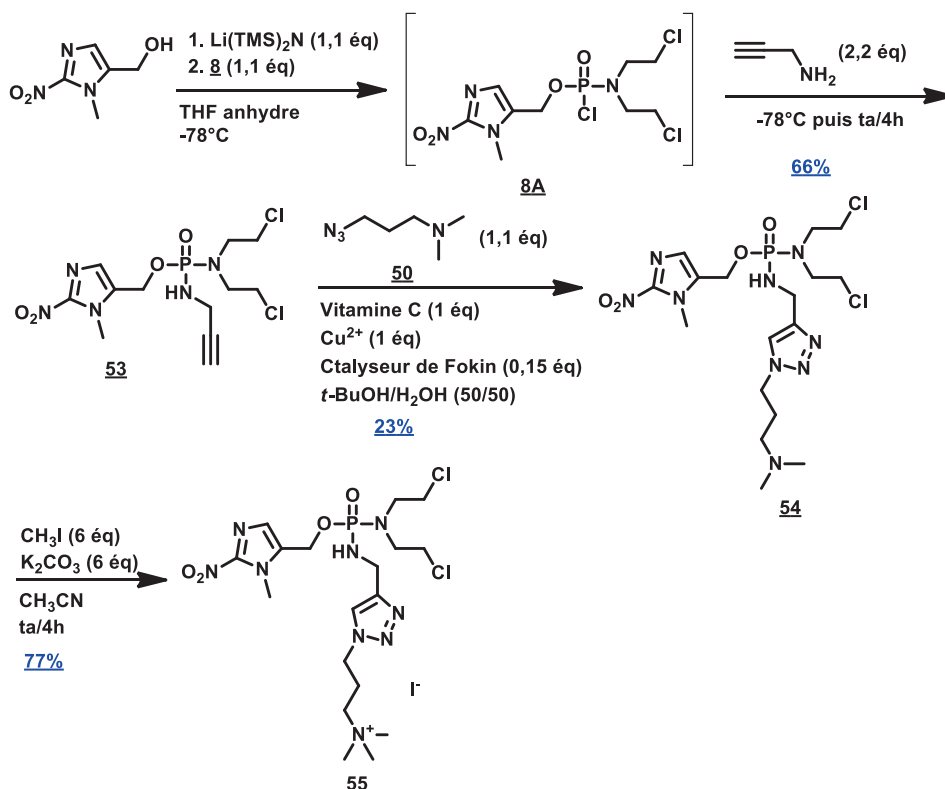


Figure 127: Voie de synthèse du composé **55**, équivalent du lead **ICF05016**

La première étape a été similaire à celle mise en œuvre pour obtenir le lead **ICF05016**, moyennant l'utilisation de propargylamine à la place de la *N,N*-diméthylaminopropylamine. Le

produit de couplage **53** a été isolé avec un rendement de 66 % à l'issu d'une colonne chromatographique, puis a été engagé dans une réaction de chimie click avec l'azoture **50** dans les mêmes conditions que pour le composé **51**. Toutefois, la purification par chromatographie sur gel de silice s'est avérée difficile et a dû être complétée par une chromatographie préparative en phase inverse (colonne C18, gradient d'ACN dans H₂O), qui a permis d'obtenir après lyophilisation le triazole **54** avec une pureté de 90% d'après l'analyse RMN ³¹P. La caractérisation complète de la structure a été faite par les analyses RMN ³¹P, ¹H, ¹³C appuyées par des expériences COSY et HSQC. Comme pour son analogue **51**, la formation du triazole est mise en évidence par un singulet dans la zone aromatique à 7,8 ppm et par les signaux relatifs aux carbones aromatiques (C_{Ar} à ~ 148,06 ppm et CH_{Ar} à ~124,11 ppm).

Enfin, la quaternisation de cette fraction a été réalisée selon les conditions précédemment décrites pour la quaternisation du composé **51**. L'analyse RMN du brut réactionnel a confirmé l'obtention de la prodrogue AQ **55**, mais avec une pureté de seulement 90%, qui nécessitera une purification supplémentaire en phase inverse (colonne C18, gradient d'ACN dans H₂O) avant la réalisation des tests biologiques.

En conclusion, les deux produits souhaités analogues triazolés du hit et de son isomère de position ont pu être synthétisés. Ils feront l'objet prochainement d'un screening biologique préliminaire en vue de pouvoir conclure sur l'impact de la présence du motif triazole au niveau du bras espaceur sur l'interaction avec l'aggrécane et l'activité cytotoxique.

CONCLUSION

Les stratégies de "*targeted drug delivery*" basées sur l'utilisation d'un vecteur établissant une liaison préférentielle avec une ou plusieurs cibles biologiques représentent de nos jours un champ de chimie médicinale en plein essor, notamment en oncologie. Plusieurs molécules fruits de cette approche ont été mises sur le marché du médicament, offrant à de nombreux patients souffrant de pathologies cancéreuses de nouvelles opportunités de thérapies efficaces et sélectives. Ce ciblage peut concerner des caractéristiques propres aux cellules néoplasiques mais également au microenvironnement tumoral. Concernant ce dernier point, nous pouvons citer l'inflammation, le système immunitaire, l'angiogenèse ou l'hypoxie, commun aux tumeurs solides et mis à profit depuis de nombreuses années pour le design de traitements ciblés.

Mes travaux de thèse se sont inscrits dans ce cadre, mais plus particulièrement pour le cancer du cartilage, et ont été articulés autour de la pharmacomodulation d'un composé « lead » **ICF05016**, déjà identifié dans le laboratoire IMoST. Grâce à la combinaison au sein de cette même structure d'une approche de vectorisation d'un agent cytotoxique alkylant vers les protéoglycanes de la matrice extracellulaire du chondrosarcome (par une fonction ammonium quaternaire) et d'une bioactivation sélective en milieu hypoxique tumoral, cette prodrogue bispécifique s'est révélée prometteuse en termes d'affinité pour l'aggrécane, de sélectivité d'action en milieu hypoxique, et de réponse antitumorale *in vivo*.

Comme axes de pharmacomodulation, nous nous sommes dans un premier temps intéressés à faire varier la nature des substituants de la fonction ammonium quaternaire ainsi que la longueur du bras espaceur séparant cette dernière de la prodrogue, puis nous avons choisi de moduler l'halogène et la position des bras alkylants portés par la moutarde phosphorodiamidique.

Concernant le 1^{er} axe de pharmacomodulation (longueur du bras espaceur et nature des substituants), nos efforts de recherche se sont avérés concluants : une série de 27 composés ammonium quaternaires ont pu être synthétisés, isolés purs et étudiés *in tubo*, d'abord par résonance plasmonique de surface pour évaluer leurs affinités pour l'aggrécane puis *in vitro* par une étude de la cytotoxicité en normoxie *versus* hypoxie sur une lignée cellulaire de chondrosarcome humain, HEMC-SS.

Dans un premier temps, le screening par résonance plasmonique de surface a permis de mettre en évidence 12 composés plus affins envers l'aggrécane que le composé de référence **ICF05016**. Cette étude a révélé une dépendance importante entre l'affinité à l'aggrécane et la nature de l'ammonium quaternaire. En effet, la reconnaissance ligand-aggrécane semble potentialisée par des substituants de l'ammonium quaternaire de type benzyle et au contraire réduite par des substituants aliphatiques encombrés, de type diisopropyle.

Dans un second temps, ces composés sélectionnés sur la base de leur affinité pour l'aggrécane ont été évalués sur cultures cellulaires et ont affichés des ratios de cytotoxicité normoxie vs hypoxie (HCR) supérieurs à celui du lead **ICF05016**, confirmant ainsi leur appartenance à la classe des prodrogues activables en hypoxie. Les structures porteuses d'une fonction ammonium quaternaire benzyle se sont avérées les plus puissantes en termes de sélectivité

d'action, le meilleur ratio HCR étant obtenu avec le composé **31f** (HCR = 24, soit sensiblement identique à celui de l'évofofamide et trois fois supérieur à celui du lead **ICF05016**). Outre son excellente stabilité sur 24 heures dans un tampon phosphate et dans le plasma à 37 °C, le composé **31f** s'est révélé être bioréduit par une nitroréductase, et ce avec une cinétique de clivage rapide (demi-vie < 1 min). Ce dernier a été ainsi identifié au terme de l'évaluation *in vitro* et de cet axe de recherche comme un nouveau « lead ».

Ces éléments ouvrent donc de nouvelles perspectives à ce projet, notamment les résultats prometteurs obtenus pour le composé **31f** devront être confirmés *in vivo* sur modèle animal de chondrosarcome. Cette étude permettra d'estimer son efficacité antitumorale et son profil de tolérance (notamment de toxicité hématologique) et pourrait s'accompagner d'une étude pharmacocinétique (distribution, métabolisme et élimination).

Concernant le 2nd axe de pharmacomodulation, relatif aux analogues bromés, les prodrogues amines III^{aires} non vectorisées **35a-b** ont pu être obtenues, mais les différentes tentatives de quaternisation entreprises en vue d'aboutir aux produits ammoniums quaternaires finaux **36a-b** et **37** se sont heurtées à des soucis de stabilité. En effet les analogues bromés des composés **ICF05016** et **31f** n'ont pu être obtenus avec une pureté suffisante pour être engagés dans une évaluation biologique. Compte-tenu de la forte instabilité des composés finaux de la série bromée, comparée à la série chlorée, il semble peu judicieux de poursuivre dans cette voie.

Le dernier axe envisagé dans cette étude portait sur la préparation d'isomères de position de l'entité cytotoxique. Quatre voies d'accès aux structures souhaitées ont été envisagées, dont certaines ont été d'emblée écartées anticipant des soucis très vraisemblables de réactivité. Pour d'autres, les essais menés se sont montrés infructueux, notamment en raison de l'instabilité des précurseurs phosphoramidiques (probablement en lien avec la présence de la fonction amine tertiaire) ou encore de la difficulté d'introduction d'une fonction amine secondaire sur un chlorure de phosphoryle préalablement fonctionnalisé.

Afin de contourner ces différents obstacles, nous avons choisi de réorienter notre stratégie de synthèse vers une approche de « chimie click » permettant d'introduire le bras espaceur porteur de la fonction amine tertiaire indépendamment de l'étape de phosphorylation. Une séquence réactionnelle multi-étapes a alors été mise en œuvre et a permis d'isoler les deux composés souhaités **52** et **55**, analogues du composé **ICF05016** et de son isomère de position.

Ces deux prodrogues doivent maintenant être évaluées pour leur affinité à l'aggrécane et leur cytotoxicité *in vitro* en hypoxie et normoxie en vue d'appréhender d'une part l'impact de la présence du noyau triazole sur ces paramètres, et d'autre part l'influence de la position des bras 2-chloroéthyle sur l'efficacité de la moutarde. Au regard de ces résultats, il pourrait être envisagé de synthétiser l'équivalent triazolé du nouveau « lead » **31f** ou de son isomère de position.

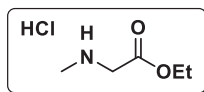
PARTIE EXPERIMENTALE

1. GENERAL INFORMATION

All commercially available reagents and solvents were purchased at the following commercial suppliers: Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France), Acros Organics (Geel, Belgium), Fisher Scientific (Illkirch, France), Carlo Erba Reagents (Val de Reuil, France), VWR (Fontenay-sous-Bois, France) and Alfa Aesar (Karlsruhe, Germany) and were used without further purification. All solvents were dried using common techniques. Air and moisture sensitive reactions were carried out under anhydrous argon atmosphere. Analytical thin-layer chromatography (TLC) was performed on precoated silica gel aluminium plates (60 F₂₅₄, 0.2 mm thick, Macherey or SDS) using the indicated solvent mixture expressed as volume/volume ratios. The plates were visualized with ultraviolet light (254 nm) and (or) by development with ninhydrine ethanolic solution (0.2%) or a 4-(4'-nitrobenzyl)pyridine (NBP)/potassium hydroxide dyeing reagent used for the determination of alkylating agents (the chromatography plate was immersed in the NBP solution (2.5% in acetone), heated for few min and then immersed in potassium hydroxide solution (10% in methanol)). Column chromatography was performed on silica gel 60A normal phase, 35-70 μ m (Merck or SDS or Carlo Erba). Uncorrected melting points (mp) were measured on an electrothermal capillary Digital Melting Point Apparatus (IA9100, Bibby Scientific, Roissy, France). Infrared spectra (IR) were recorded in the range 4000-600 cm^{-1} on a IS10 with attenuated total reflectance (ATR) accessory Nicolet (Fisher Scientific). Nuclear magnetic resonance spectra (^1H NMR and ^{13}C NMR) were performed on a Bruker AM 200 spectrometer (200 MHz for ^1H , 50 MHz for ^{13}C), a Broker Avance DPX300 spectrometer (300 MHz for ^1H , 75 MHz for ^{13}C) or a Bruker DRX 500 spectrometer (500 MHz for ^1H , 125 MHz for ^{13}C) (Bruker Biospin SAS, Wissembourg, France). Chemical shift values (δ) are quoted in parts per million (ppm) and calibrated to the deuterated solvent reference peak for ^1H and ^{13}C spectra. ^{31}P NMR spectra (202 MHz) were recorded on a Bruker Avance 500 apparatus with broadband ^1H decoupling and chemical shifts were reported relative to a 1% phosphoric acid solution in deuterium oxide as a coaxial reference (0 ppm). Coupling constants (J) are quoted in Hz. To describe spin multiplicity, standard abbreviations such as s, d, dd, t, q, qt, hept, td, m, br.s referring to singlet, doublet, doublet of doublet, triplet, quartet, quintet, heptuplet, doublet of triplet, multiplet, broad singlet respectively, are used. When necessary, chemical shifts assignments in ^1H and ^{13}C spectra were supported by two dimensional NMR experiments (COSY and HSQC). Compounds were analyzed by High-Resolution Mass Spectrometry in positive mode (HRMS, Waters® Micromass® Q-Tof micro™ Mass Spectrometer, UCA-Partner, Clermont Auvergne University, Clermont-Ferrand, France). Preparative high performance liquid chromatography was performed on a CombiflashEZprep (Teledyne ISCO). The purification of QA-derivatives was carried out on a C₁₈ column using the following conditions: total experiment time: 30 min, flow rate = 15 mL/min, eluent mixture: H₂O/MeCN (v/v), gradient: 95/5 for 2 min, then 95/5 $\rightarrow$ 70/30 for 6 min, then 70/30 for 2 min, then 70/30 $\rightarrow$ 60/40 for 6 min, then 60/40 for 3 min, and 60/40 min $\rightarrow$ 10/90 for 11 min, λ = 254 and 323 nm. Abbreviations: ACN, acetonitrile; DCM, dichloromethane; NBP, 4-(4'-nitrobenzyl)pyridine; TEA, triethylamine; THF, tetrahydrofuran; rt, room temperature.

2. EXPERIMENTAL PROTOCOLS

Ethyl *N*-methylglycinate hydrochloride salt (**2**)



Thionyl chloride (65 mL, 900 mmol) was added dropwise under stirring to a solution of sarcosine (**1**) (20.0 g, 224 mmol) in EtOH (250 mL) cooled in an ice-water bath, while maintaining temperature around -10 °C. Then the reaction mixture was gently heated at 55 °C overnight until the mixture became clear. Solvent and traces of thionyl chloride were removed by evaporation under reduced pressure and the solid residue was washed with Et₂O (3 × 50 mL). The remaining solid was well dried under vacuum to afford compound **2** (33.5 g, 218 mmol) as a white powder, which was used in the next step without further purification.

Yield 97%;

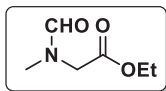
mp 126 °C (Lit. (**346**) mp 125-127 °C);

IR (ATR) ν cm⁻¹ 2970-2440, 1742, 1229;

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 9.64 (br.s, 2H, NH₂⁺), 4.24 (q, 2H, ³*J* = 7.1 Hz, CH₂CH₃), 3.84 (t, 2H, ³*J* = 5.7 Hz, NH₂⁺CH₂), 2.80 (t, 3H, ³*J* = 5.2 Hz, NH₂⁺CH₃), 1.26 (t, 3H, ³*J* = 7.1 Hz, CH₂CH₃);

¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz) δ 166.18 (CO₂), 62.62 (CH₂CH₃), 48.94 (NH₂⁺CH₂), 33.34 (NH₂⁺CH₃), 14.03 (CH₂CH₃).

Ethyl *N*-formyl-*N*-methylglycinate (**3**)



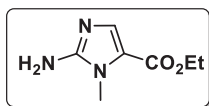
Ethyl *N*-methylglycinate hydrochloride salt (**2**) (30.0 g, 195 mmol) was suspended in a mixture of EtOH (200 mL) and ethyl formate (126 mL). Potassium carbonate (40.6 g, 294 mmol) was added under vigorous stirring and the suspension was stirred at rt overnight. The reaction mixture was then filtered and the precipitate was washed with EtOH (150 mL). The filtrate was concentrated and dissolved in a minimum amount of water (10 mL), followed by extraction with EtOAc (4 × 200 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to afford compound **3** (24.3 g, 167 mmol) as a pale yellow liquid.

Yield 85%;

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ (two rotamers) 7.93 and 7.86 (s, 1H, CHO), 4.04 and 4.02 (q, 2H, ³*J* = 7.2 Hz, CH₂CH₃), 3.91 and 3.85 (s, 2H, NCH₂), 2.87 and 2.74 (s, 3H, NCH₃), 1.12 and 1.10 (t, 3H, ³*J* = 7.1 Hz, CH₂CH₃);

¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (two rotamers) 168.76, 168.31 (CO₂), 163.09, 162.85 (CHO), 61.62, 61.29 (OCH₂CH₃), 50.93, 45.72 (NCH₂), 35.10, 30.76 (NCH₃), 14.09 (OCH₂CH₃).

Ethyl 2-amino-1-*N*-methyl-1*H*-imidazole-5-carboxylate (**4**)



To a solution of *N*-formyl sarcosine ethyl ester (**3**) (29.6 g, 204 mmol) in an equal mixture of ethyl formate and THF (190 mL) with cyclohexane (12 mL), was added slowly NaH (60% wt in mineral oil, 12.5 g, 313 mmol) at room temperature. After the addition was completed and hydrogen release stopped, the reaction mixture was allowed to stirred during 3.5 h. The reaction mixture was concentrated under vacuum. The obtained solid was suspended in a solution of EtOH (250 mL) containing concentrated aq. HCl 32 % (61 mL) and refluxed for 2 h. The hot reaction mixture was filtered and the resulting colourless solid was washed with boiling EtOH (2 × 150 mL). The filtrate was concentrated under vacuum and diluted with a mixture of EtOH/water (500 mL, 70/30, v/v). The pH of the solution was adjusted to 3, using an aqueous 5M solution of NaOH and cyanamide (17.5 g, 416 mmol) was added. The resulting mixture was refluxed for 1.5 h, then cooled to rt and concentrated under reduced pressure to approximately 1/8 of the initial volume. The pH of the remaining solution was adjusted to 9-10 with a saturated aqueous solution of potassium carbonate, after cooling in an ice-water bath. The precipitate formed was removed by filtration, washed with water (2 × 10 mL) and dried under vacuum at 40 °C overnight to afford compound **4** (16.9 g, 99.9 mmol) as a pale yellow to orange solid. A supplementary fraction can be yielded after extraction of the remaining filtrate with ethyl acetate (3 × 100 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and evaporated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography on silica gel using ethyl acetate/ethanol (95/5, v/v with 1% NH₄OH) as eluent to yield compound **4** (3.78 g, 22.3 mmol).

Yield 61%;

Rf 0.33 (SiO₂, EtOAc/EtOH, 9/1, v/v);

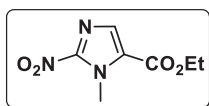
mp 131 °C (Lit. (**285**) mp 130-133 °C);

IR (ATR) ν cm⁻¹ 3390, 3119, 1647, 1542, 1168, 750, 737;

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.39 (s, 1H, CH_{Ar}), 4.66 (br.s, 2H, NH₂), 4.25 (q, 2H, ³*J* = 7.1 Hz, CH₂CH₃), 3.65 (s, 3H, NCH₃), 1.32 (t, 3H, ³*J* = 7.1 Hz, CH₂CH₃);

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 126 MHz) δ 159.68 (CO), 154.27 (C_{Ar}NH₂), 136.02 (CH_{Ar}), 116.88 (C_{Ar}CO), 58.82 (OCH₂), 30.17 (NCH₃), 14.30 (CH₂CH₃).

4.1.1.4. Ethyl 1-*N*-methyl-2-nitro-1*H*-imidazole-5-carboxylate (**5**)



To a solution of sodium nitrite (18.3 g, 266 mmol) in water (55 mL) cooled around -5 °C in an ice-salt bath, was added dropwise a solution of the amino ester **4** (6.42 g, 38.0 mmol) in acetic acid (42 mL). The temperature was allowed to rise gradually to rt and the reaction mixture was stirred overnight. The reaction mixture was extracted with dichloromethane (3 × 50 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and evaporated under reduced pressure. The

residue was purified by column chromatography on silica gel using cyclohexane/ethyl acetate (7/3, v/v) as eluent. After concentration under vacuum, the residue was washed with water (2 × 50 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and evaporated under reduced pressure to yield nitro ester **5** as yellow crystals (5.67 g, 28.5 mmol).

Yield 75%;

mp 56-58 °C (Lit. 56-58 °C (**285**) and 65-66 °C (**282**));

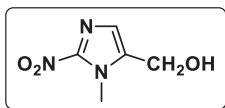
Rf 0.40 (SiO₂, cyclohexane/ethyl acetate, **7/3**, v/v);

IR (ATR) ν cm⁻¹ 1723, 1552, 1486, 1519, 1364, 1233, 767;

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 7.70 (s, 1H, CH_{Ar}), 4.39 (q, 2H, ³J = 7.1 Hz, OCH₂CH₃), 4.31 (s, 3H, NCH₃), 1.39 (t, 3H, ³J = 7.1 Hz, OCH₂CH₃);

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 126 MHz) δ 158.71 (CO), 147.61 (C_{Ar}NO₂), 133.70 (CH_{Ar}), 126.07 (C_{Ar}CO), 61.34 (OCH₂), 35.14 (NCH₃), 13.91 (CH₂CH₃).

4.1.1.5. (1-methyl-2-nitro-1*H*-imidazol-5-yl)methanol (**6**)



The ester **5** (11.0 g, 55.2 mmol) was dissolved in a mixture of anhydrous THF/MeOH (200 mL, 8/2, v/v) in a 1 L three-necked flask fitted with a mechanical stirrer, a 500 mL dropping funnel, a bubbler and maintained in an ice-water bath. A suspension of NaBH₄ (6.33 g, 167 mmol) in THF (50 mL) and a solution of LiBr (14.6 g, 168 mmol) in THF (50 mL) were cooled at 0 °C, introduced in the same dropping funnel with water (50 mL) and added dropwise to the nitroimidazole solution, at such a rate that the internal temperature did not exceed 10 °C. The reaction mixture was stirred at rt until total conversion of the starting nitroester **5**, according to TLC monitoring (19 h). Ammonium chloride (3 g) was then added at 0 °C and stirring was prolonged for 30 min. The precipitate was filtrated and washed with THF (3 × 50 mL). After concentration under vacuum, the yellow solid was taken up in a mixture of EtOAc/MeOH (98/2, v/v) and the resulting solution was passed through a pad of silica gel surmounted by a pad of Celite®545 to afford pure alcohol **6** as pale yellow to orange crystals (5.91 g, 37.7 mmol). **Yield** 68%;

Rf 0.50 (SiO₂, EtOAc);

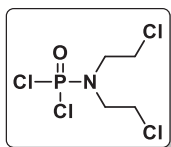
mp 140 °C (lit. (**285**) 141-143 °C);

IR (ATR) ν cm⁻¹ 3231, 1491, 1358, 1186, 1040, 832;

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ 7.10 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.40 (t, 1H, ³J = 5.3 Hz, OH), 4.55 (d, 2H, ³J = 5.3 Hz, CH₂OH), 3.93 (s, 3H, NCH₃);

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 126 MHz) δ 145.63 (C_{Ar}NO₂), 138.60 (C_{Ar}CH₂), 126.50 (CH_{Ar}), 52.96 (CH₂), 34.03 (NCH₃).

4.1.2. *N,N*-bis(2-chloroethyl)phosphoramidic acid dichloride (**8**)



N,N-bis(2-chloroethyl)amine HCl (**7**) (10.0 g, 56.0 mmol) was refluxed at 130-140 °C in the presence of an excess of POCl₃ (21 mL, 224 mmol) during a period of 80 h, until a clear and brown mixture was obtained. The excess of POCl₃ was removed under reduced pressure and the remaining brown residue purified by column chromatography on silica gel (EtOAc/cyclohexane, 20/80, v/v). The obtained solid was thoroughly washed with cyclohexane and dried under vacuum to afford pure compound **8** as white crystals (8.0 g, 31 mmol).

Yield 55%;

Rf 0.39 (SiO₂, cyclohexane/EtOAc, 8/2, v/v);

mp 57 °C (Lit. (**310**) 57-59 °C);

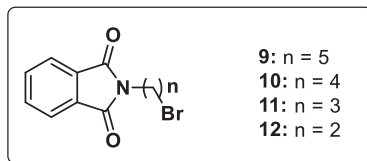
IR (ATR) ν cm⁻¹ 1272, 1264 ($\nu_{\text{P=O}}$, $\nu_{\text{C-N}}$), 1116, 1102 ($\nu_{\text{P-O}}$, $\nu_{\text{P-N}}$);

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 3.841-3.51 (m, 8H);

¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 49.61 (d, 2C, $^2J_{\text{C-P}}$ = 4.1 Hz, NCH₂CH₂Cl), 40.91 (d, 2C, $^3J_{\text{C-P}}$ = 2.7 Hz, NCH₂CH₂Cl);

³¹P NMR (CDCl₃, 202 MHz) δ 17.42.

Preparation of compounds 9-12



Compounds **9-12** were obtained according to the same following procedure. Potassium phthalimide (1 eq.) was added slowly to a solution of freshly distilled dibromoalkane (4 eq) in acetone and the reaction mixture was refluxed for 24 h. After cooling, the mixture was filtered, the precipitate was washed with acetone and the solvent was removed under reduced pressure. For compounds **9** and **10**, the excess of dibromoalkane was removed by distillation under reduced pressure and the obtained residue was dissolved, while hot, in a minimum amount of EtOAc. Cyclohexane was added slowly and the solution allowed to cool at -20 °C for 24 h. Obtained crystals were filtered and washed with cooled cyclohexane to afford **9-10** as white crystals. For compounds **11-12**, cyclohexane was added dropwise to the remaining concentrate until precipitation and the mixture was allowed to cool at -20 °C for 24 h. Obtained crystals were filtered and washed with a cooled mixture of EtOH/H₂O (1/1, v/v) to afford the corresponding phthalimides **11** and **12** as white crystals.

2-N-(5-Bromopentyl)phthalimide (**9**)

Potassium phthalimide (20.0 g, 108 mmol) was reacted with dibromopentane (58 mL, 426 mmol) in acetone (150 mL) during 24 h. The work up of the reaction mixture according to the standard procedure yielded compound **9** (21.5 g, 72.6 mmol).

Yield 67%;

Rf 0.55 (SiO₂, cyclohexane/EtOAc, 8/2, v/v);

mp 63 °C (Lit. (**317**) 61-63 °C);

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.83 (dd, 2H, ³J = 5.5 Hz, ⁴J = 3.0 Hz, CH_{Ar}), 7.70 (dd, 2H, ³J = 5.5 Hz, ⁴J = 3.0 Hz, CH_{Ar}), 3.68 (t, 2H, ³J = 7.2 Hz, NCH₂), 3.38 (t, 2H, ³J = 6.8 Hz, CH₂Br), 1.93-1.86 (m, 2H, CH₂CH₂Br), 1.77-1.67 (m, 2H, NCH₂CH₂), 1.52-1.44 (m, 2H, NCH₂CH₂CH₂);

¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 168.49 (2C, CO), 134.02 (2C, CH_{Ar}), 132.41 (2C, C_{Ar}), 123.35 (2C, CH_{Ar}), 37.85 (NCH₂), 33.29 (CH₂Br), 32.38 (CH₂CH₂Br), 27.88 (NCH₂CH₂), 25.59 (NCH₂CH₂CH₂)

2-N-(4-Bromobutyl)phthalimide (**10**)

Potassium phthalimide (25.0 g, 135 mmol) was reacted with dibromobutane (64 mL, 536 mmol) in acetone (150 mL) during 24 h. The work up of the reaction mixture according to the standard procedure yielded compound **10** (25.3 g, 89.6 mmol).

Yield 66%;

Rf 0.40 (SiO₂, cyclohexane/EtOAc, 8/2, v/v);

mp 80 °C (Lit. (**317**) 79-81 °C);

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.84 (dd, 2H, ³J = 5.4 Hz, ⁴J = 3.1 Hz, CH_{Ar}), 7.71 (dd, 2H, ³J = 5.4 Hz, ⁴J = 3.0 Hz, CH_{Ar}), 3.72 (t, 2H, ³J = 6.6 Hz, NCH₂), 3.44 (t, 2H, ³J = 6.3 Hz, CH₂Br), 1.93-1.81 (m, 4H, NCH₂CH₂CH₂);

¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz) δ 168.49 (2C, CO), 134.14 (2C, CH_{Ar}), 132.14 (2C, C_{Ar}), 123.38 (2C, CH_{Ar}), 37.06 (NCH₂), 32.93 (CH₂Br), 29.94, 27.35 (NCH₂CH₂CH₂Br).

2-*N*-(3-Bromopropyl)phthalimide (11)

Potassium phthalimide (14.0 g, 75.6 mmol) was reacted with dibromopropane (31 mL, 304 mmol) in acetone (150 mL). The work up of the reaction mixture according to the standard procedure yielded compound **11** (20.0 g, 74.4 mmol).

Yield 98%;

Rf 0.70 (SiO₂, cyclohexane/EtOAc, 7/3, v/v);

mp 74 °C (Lit. (**317**) 74-77 °C);

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 7.82 (dd, 2H, ³J = 5.4 Hz, ⁴J = 3.1 Hz, CH_{Ar}), 7.70 (dd, 2H, ³J = 5.5 Hz, ⁴J = 3.0 Hz, CH_{Ar}), 3.82 (t, 2H, ³J = 6.8 Hz, NCH₂), 3.40 (t, 2H, ³J = 6.8 Hz, CH₂Br), 2.25 (qt, 2H, ³J = 6.8 Hz, CH₂CH₂CH₂);

¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 168.27 (2C, CO), 134.11 (2C, CH_{Ar}), 132.22 (2C, C_{Ar}), 123.40 (2C, CH_{Ar}), 36.89 (NCH₂), 31.80 (CH₂CH₂CH₂), 29.80 (CH₂Br).

2-*N*-(2-Bromoethyl)phthalimide (12)

Potassium phthalimide (8.0 g, 43 mmol) was reacted with dibromoethane (13 mL, 151 mmol) in acetone (100 mL). The work up of the reaction mixture according to the standard procedure yielded compound **12** (4.78 g, 18.8 mmol).

Yield 43%;

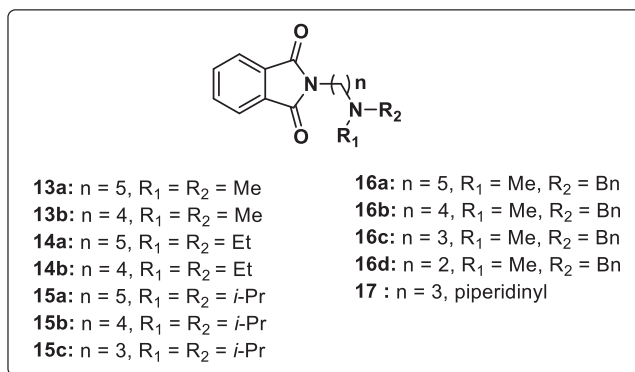
Rf 0.48 (SiO₂, cyclohexane/EtOAc, 8/2, v/v);

mp 85 °C (Lit. (**317**) 83-84 °C);

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 7.88 (dd, 2H, ³J = 5.5 Hz, ⁴J = 3.1 Hz, CH_{Ar}), 7.74 (dd, 2H, ³J = 5.5 Hz, ⁴J = 3.1 Hz, CH_{Ar}), 4.12 (t, 2H, ³J = 6.7 Hz, NCH₂CH₂Br), 3.62 (t, 2H, ³J = 6.7 Hz, NCH₂CH₂Br);

¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 167.95 (2C, CO), 134.36 (2C, CH_{Ar}), 132.13 (2C, C_{Ar}), 123.69 (2C, CH_{Ar}), 39.53 (NCH₂CH₂Br), 28.16 (NCH₂CH₂Br).

Preparation of compounds (13-17)



2-*N*-[5-(*N,N'*-dimethylamino)pentyl]phthalimide (**13a**)

To a suspension of compound **9** (12.0 g, 40.5 mmol) and potassium carbonate (14.0 g, 101 mmol) in THF (150 mL) was added dropwise an excess of a dimethylamine aqueous solution (26% wt) (39 mL, 202.5 mmol) and the reaction mixture was refluxed for 24 h. After cooling, the solution was filtered and the precipitate was washed with THF (200 mL). After concentration under reduced pressure, the filtrate afforded a biphasic residue that was decanted. The oily layer was separated to yield a first fraction of compound **13a**. The remaining aqueous layer was extracted with EtOAc (2 × 75 mL), the organic extracts were combined, dried over MgSO₄, filtered and evaporated under vacuum to afford a supplementary fraction of compound **13a**. The two fractions (6.95 g, 34.0 mmol) were combined and engaged directly in the next step without further purification. **Yield** 84%.

2-*N*-[4-(*N,N'*-dimethylamino)butyl]phthalimide (**13b**)

To a suspension of compound **10** (9.00 g, 32.0 mmol) in THF (100 mL) was added dropwise an excess of a dimethylamine aqueous solution (26% wt) (22 mL, 128 mmol) and the reaction mixture was refluxed for 24 h. After cooling, water (20 mL) and potassium carbonate (8.82 g, 63.8 mmol) were added and the reaction mixture was stirred for 20 min, before extraction with Et₂O (3 × 75 mL). Organic layers were combined, dried over MgSO₄, filtered and evaporated under reduced pressure to afford a yellow oil (5.93 g, 24.1 mmol) that was directly engaged in the next step without further purification. **Yield** 75%.

Compounds 14 and 15 were obtained according to the same following general procedure. To a suspension of compound **9-12** (20 mmol) and potassium carbonate (50 mmol) in ACN (150 mL) was added dropwise the secondary amine (4 eq.) and the reaction mixture was refluxed for 24 h. After cooling, the reaction mixture was filtered and the filtrate was concentrated to afford an oil that was directly engaged in the next step without further purification. Reactions were performed on a scale of 5 to 20 g of compounds **9-12** to afford amines **14** and **15** with the following yields: **14a**, Yield 90%; **14b**, Yield 93%; **15a**, Yield 89%; **15b**, quantitative yield; **15c**, Yield 35%.

Compounds 16 and 17 were obtained according to the same following procedure. To a suspension of compound **9-12** and potassium carbonate in ACN, was added dropwise *N*-methylbenzylamine or piperidine under stirring and the reaction mixture was refluxed for 24 h. The reaction mixture was cooled and filtered. After evaporation of the filtrate, purification by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc/TEA) yielded compounds **16** and **17**.

2-*N*-[5-(*N'*-benzyl-*N'*-methyamino)pentyl]phthalimide (16a**)**

Compound **9** (2.00 g, 6.75 mmol) was reacted with *N*-methylbenzylamine (0.875 mL, 6.78 mmol) in ACN (100 mL) in the presence of potassium carbonate (1.03 g, 7.42 mmol). Purification by silica gel chromatography (cyclohexane/EtOAc/TEA, 7/3/0.1, v/v/v) yielded compound **16a** (1.94 g, 5.77 mmol) as a slightly yellow oil.

Yield 86%;

Rf 0.76 (SiO₂, cyclohexane/EtOAc/TEA, 6/4/0.15, v/v/v);

IR (ATR) ν cm⁻¹ 2938, 2785, 1706, 1394, 1361, 1044, 717, 698;

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 7.83 (dd, 2H, ³*J* = 5.4 Hz, ⁴*J* = 3.1 Hz, CH_{Ar}), 7.70 (dd, 2H, ³*J* = 5.5 Hz, ⁴*J* = 3.0 Hz, CH_{Ar}), 7.32-7.19 (m, 5H, CH_{Ar}), 3.68 (t, 2H, ³*J* = 7.3 Hz, (CO)₂NCH₂), 3.46 (s, 2H, CH₂Ph), 2.35 (t, 2H, ³*J* = 7.3 Hz, CH₂N(CH₃)Bn), 2.17 (s, 3H, NCH₃), 1.69 (qt, 2H, ³*J* = 7.5 Hz, (CO)₂NCH₂CH₂), 1.56 (qt, 2H, ³*J* = 7.5 Hz, CH₂CH₂N(CH₃)Bn), 1.37 (qt, 2H, ³*J* = 7.5 Hz, CH₂CH₂CH₂N(CH₃)Bn);

¹³C NMR (CDCl₃, 126 MHz) δ 168.56 (2C, CO), 133.99, 133.96 (3C, C_{Ar}CH₂, CH_{Ar}), 132.35 (2C, C_{Ar}), 129.42, 128.45, 127.38 (5C, CH_{Ar}), 123.31 (2C, CH_{Ar}), 62.17 (CH₂Ph), 57.10 (CH₂N(CH₃)Bn), 41.99 (NCH₃), 38.06 ((CO)₂NCH₂), 28.58 ((CO)₂NCH₂CH₂), 26.65 (CH₂CH₂N(CH₃)Bn), 24.75 (CH₂CH₂CH₂N(CH₃)Bn).

2-*N*-[4-(*N'*-benzyl-*N'*-methyamino)butyl]phthalimide (16b**)**

Compound **10** (3.00 g, 10.7 mmol) was reacted with *N*-methylbenzylamine (1.65 mL, 12.8 mmol) in ACN (100 mL) in the presence of potassium carbonate (3.7 g, 26.8 mmol). Purification by silica gel chromatography (cyclohexane/EtOAc/TEA, 7/3/0.1, v/v/v) yielded compound **16b** (2.92 g, 9.07 mmol) as a slightly yellow oil.

Yield 85%;

Rf 0.57 (SiO₂, cyclohexane/EtOAc/TEA, 6/4/0.075, v/v/v);

IR (ATR) ν cm⁻¹ 2941, 2786, 1705, 1394, 1367, 1039, 717, 698;

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 7.82 (dd, 2H, ³*J* = 5.4 Hz, ⁴*J* = 3.1 Hz, CH_{Ar}), 7.69 (dd, 2H, ³*J* = 5.5 Hz, ⁴*J* = 3.0 Hz, CH_{Ar}), 7.32-7.18 (m, 5H, CH_{Ar}), 3.69 (t, 2H, ³*J* = 7.2 Hz, (CO)₂NCH₂), 3.46 (s, 2H, CH₂Ph), 2.40 (t, 2H, CH₂N(CH₃)Bn), 2.16 (s, 3H, NCH₃), 1.72 (qt, 2H, ³*J* = 7.2 Hz, (CO)₂NCH₂CH₂), 1.55 (qt, 2H, ³*J* = 7.2 Hz, CH₂CH₂N(CH₃)Bn);

¹³C NMR (CDCl₃, 126 MHz) δ 168.46 (2C, CO), 139.32 (C_{Ar}CH₂), 133.90 (2C, CH_{Ar}), 132.29 (2C, C_{Ar}), 129.05, 128.25, 126.93 (5C, CH_{Ar}), 123.22 (2C, CH_{Ar}), 62.52 (CH₂Ph), 56.93 (CH₂N(CH₃)Bn), 42.19 (NCH₃), 38.02 ((CO)₂NCH₂), 26.54 ((CO)₂NCH₂CH₂), 24.85 (CH₂CH₂N(CH₃)Bn).

2-*N*-[3-(*N'*-benzyl-*N'*-methylamino)propyl]phthalimide (16c)

Compound **11** (4.76 g, 17.7 mmol) was reacted with *N*-methylbenzylamine (3 mL, 23.2 mmol) in ACN (100 mL) in the presence of potassium carbonate (6.13 g, 44.3 mmol). Purification by silica gel chromatography (cyclohexane/EtOAc/TEA, 5/5/0.1, v/v/v) yielded compound **16c** (4.29 g, 13.9 mmol) as white crystals.

Yield 79%;

Rf 0.57 (SiO₂, cyclohexane/EtOAc/TEA, 6/4/0.075, v/v/v);

mp 49 °C;

IR (ATR) ν cm⁻¹ 2955, 2762, 1698, 1395, 1361, 1015, 747, 713, 702;

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 7.84 (dd, 2H, ³*J* = 5.4 Hz, ⁴*J* = 3.0 Hz, CH_{Ar}), 7.71 (dd, 2H, ³*J* = 5.4 Hz, ⁴*J* = 3.0 Hz, CH_{Ar}), 7.33-7.19 (m, 5H, CH_{Ar}), 3.80-3.75 (m, 2H, (CO)₂NCH₂), 3.49 (s, 2H, CH₂Ph), 2.48 (t, 2H, ³*J* = 7.0 Hz, CH₂N(CH₃)Bn), 2.19 (s, 3H, NCH₃), 1.91 (qt, 2H, ³*J* = 7.0 Hz, CH₂CH₂CH₂); **¹³C NMR (CDCl₃, 126 MHz) δ** 168.52 (2C, CO), 139.14 (C_{Ar}CH₂), 133.94 (2C, CH_{Ar}), 132.41 (2C, C_{Ar}), 129.14, 128.30, 127.03 (5C, CH_{Ar}), 123.69 (2C, CH_{Ar}), 62.43 (CH₂Ph), 54.91 (CH₂N(CH₃)Bn), 42.03 (NCH₃), 36.53 ((CO)₂NCH₂), 26.43 (CH₂CH₂CH₂).

2-*N*-[2-(*N'*-benzyl-*N'*-methylamino)ethyl]phthalimide (16d)

Compound **12** (2.50 g, 9.83 mmol) was reacted with *N*-methylbenzylamine (1.28 mL, 9.88 mmol) in ACN (100 mL) in the presence of potassium carbonate (1.5 g, 10.8 mmol). Purification by silica gel chromatography (cyclohexane/EtOAc/TEA, 5/5/1, v/v/v) yielded compound **16d** (2.04 g, 6.91 mmol) as an oil.

Yield 70%;

Rf 0.66 (SiO₂, cyclohexane/EtOAc/TEA, 6/4/0.075, v/v/v);

IR (ATR) ν cm⁻¹ 2949, 2793, 1699, 1397, 1015, 718, 701;

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 7.83 (dd, 2H, ³*J* = 5.4 Hz, ⁴*J* = 3.0 Hz, CH_{Ar}), 7.71 (dd, 2H, ³*J* = 5.4 Hz, ⁴*J* = 3.0 Hz, CH_{Ar}), 7.20-7.11 (m, 5H, CH_{Ar}), 3.83 (t, 2H, ³*J* = 6.4 Hz, (CO)₂NCH₂), 3.54 (s, 2H, CH₂Ph), 2.68 (t, 2H, ³*J* = 6.3 Hz, CH₂N(CH₃)Bn), 2.31 (s, 3H, NCH₃);

¹³C NMR (CDCl₃, 126 MHz) δ 168.42 (2C, CO), 138.89 (C_{Ar}CH₂), 133.89 (2C, CH_{Ar}), 132.40 (2C, C_{Ar}), 129.02, 128.23, 127.07 (5C, CH_{Ar}), 123.28 (2C, CH_{Ar}), 62.24 (CH₂Ph), 54.64 (CH₂N(CH₃)Bn), 42.34 (NCH₃), 36.05 ((CO)₂NCH₂).

2-[3-(piperidin-1-yl)propyl]phthalimide (17)

Compound **11** (3.00 g, 11.2 mmol) was reacted with piperidine (1.10 mL, 11.2 mmol) in ACN (150 mL) in the presence of potassium carbonate (3.00 g, 21.7 mmol). Purification by silica gel chromatography (cyclohexane/EtOAc/TEA, 5/5/0.1, v/v/v) yielded compound **17** (2.18 g, 8.00 mmol) as a slightly yellow oil.

Yield 71%;

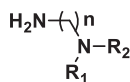
Rf 0.35 (SiO₂, cyclohexane/EtOAc/TEA, 6/4/0.075, v/v/v);

IR (ATR) ν cm⁻¹ 2932, 1698, 1393, 1023, 718, 712;

^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ 7.80 (dd, 2H, $^3J = 5.4$ Hz, $^4J = 3.0$ Hz, CH_{Ar}), 7.67 (dd, 2H, $^3J = 5.4$ Hz, $^4J = 3.0$ Hz, CH_{Ar}), 3.71 (t, 2H, $^3J = 7.0$ Hz, $(\text{CO})_2\text{NCH}_2$), 2.33 (t, 2H, $^3J = 7.1$ Hz, $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2$), 2.31-2.24 (m, 4H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2$), 1.84 (qt, 2H, $^3J = 7.1$ Hz, $(\text{CO})_2\text{NCH}_2\text{CH}_2$), 1.84 (qt, 4H, $^3J = 5.6$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2$), 1.34-1.30 (m, 2H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{CH}_2$);

^{13}C NMR (CDCl_3 , 126 MHz) δ 168.52 (2C, CO), 133.85 (2C, CH_{Ar}), 132.47 (2C, C_{Ar}), 123.18 (2C, CH_{Ar}), 56.91, 54.65 (3C, $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2$), 36.88 ($(\text{CO})_2\text{NCH}_2$), 25.98, 25.61, 24.51 (4C, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{CH}_2$).

General procedure for preparation of compounds 18 to 22



18a: $n = 5$, $\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{Me}$

18b: $n = 4$, $\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{Me}$

19a: $n = 5$, $\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{Et}$

19b: $n = 4$, $\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{Et}$

20a: $n = 5$, $\text{R}_1 = \text{R}_2 = i\text{-Pr}$

20b: $n = 4$, $\text{R}_1 = \text{R}_2 = i\text{-Pr}$

20c: $n = 3$, $\text{R}_1 = \text{R}_2 = i\text{-Pr}$

21a: $n = 5$, $\text{R}_1 = \text{Me}$, $\text{R}_2 = \text{Bn}$

21b: $n = 4$, $\text{R}_1 = \text{Me}$, $\text{R}_2 = \text{Bn}$

21c: $n = 3$, $\text{R}_1 = \text{Me}$, $\text{R}_2 = \text{Bn}$

21d: $n = 2$, $\text{R}_1 = \text{Me}$, $\text{R}_2 = \text{Bn}$

22: $n = 3$, piperidinyl

Compound **13-17** (1 eq.) was dissolved in EtOH (100 mL for 2.5 to 5 g of phthalimide) and hydrazine hydrate (aqueous solution, 60% wt, 4 eq.) was added dropwise under stirring. The mixture was refluxed for 12 h and then cooled down to rt. The obtained suspension was filtered and the precipitate was washed thoroughly with EtOH. The filtrate was cooled in an ice-water bath and treated dropwise with a concentrated aqueous HCl solution (6 eq.). The formed solid was removed by filtration and washed with EtOH (approximately 100 mL for 5 g of phthalimide). One supplementary fraction of solid was removed by reacidification of the filtrate (if precipitate didn't appear, the mixture was allowed to cool at 4 °C for 1 h). The filtrate was concentrated under reduced pressure, cooled in an ice-water bath and then gently dissolved in a minimum amount of an aqueous KOH solution (50% wt). The obtained solution was extracted with Et₂O (3 × 75 mL for 5 g of phthalimide). The combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to afford a transparent to pale yellow oily liquid. This crude product was used directly for the next step or purified by distillation under reduced pressure to yield pure amines.

N,N-dimethylpentane-1,5-diamine (**18a**)

Deprotection according to the general procedure starting from compound **13a** (9.14 g, 35.1 mmol) followed by distillation under reduced pressure afforded pure amine **18a** (1.92 g, 14.7 mmol).

Yield 42%;

bp 85 °C at 28 Torr (Lit. (**347**) 88-89 °C at 30 Torr);

IR (ATR) ν cm⁻¹ 3356, 3278, 2930, 2856, 2814, 2762, 1593, 1459, 1382, 1040, 844;

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 2.64 (t, 2H, ³J = 7.0 Hz, NH₂CH₂), 2.22-2.17 (m, 2H, CH₂N(CH₃)₂), 2.15 (s, 6H, N(CH₃)₂), 1.67 (br.s, 2H, NH₂), 1.46-1.37 (m, 4H, NH₂CH₂CH₂CH₂CH₂), 1.32-1.25 (m, 2H, NH₂CH₂CH₂);

¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 59.80 (CH₂N(CH₃)₂), 45.39 (2C, N(CH₃)₂), 42.11 (NH₂CH₂), 33.71 (NH₂CH₂CH₂), 27.53 (CH₂CH₂N(CH₃)₂), 24.75 (NH₂CH₂CH₂CH₂).

***N,N*-dimethylbutane-1,4-diamine (18b)**

Deprotection according to the general procedure starting from compound **13b** (5.93 g, 24.1 mmol) followed by distillation under reduced pressure afforded pure amine **18b** (0.606 g, 5.22 mmol).

Yield 22%;

bp 60 °C at 20 Torr (Lit. 62-64 °C at 22 Torr (**348**), 52 °C at 54 Torr (**349**));

IR (ATR) ν cm⁻¹ 3286, 2938, 2860, 2814, 2763, 1568, 1464, 1383, 1307, 1040;

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 2.69-2.64 (m, 2H, NH₂CH₂), 2.24-2.18 (m, 2H, CH₂N(CH₃)₂), 2.15 (2s, 6H, N(CH₃)₂), 2.05 (br.s, 2H, NH₂), 1.50-1.35 (m, 4H, NH₂CH₂CH₂CH₂);

¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz) δ 59.65 (CH₂N(CH₃)₂), 45.46 (2C, N(CH₃)₂), 42.03 (NH₂CH₂), 31.49 (NH₂CH₂CH₂), 27.53 (CH₂CH₂N(CH₃)₂).

***N,N*-diethylpentane-1,5-diamine (19a)**

Deprotection according to the general procedure starting from compound **14a** (7.00 g, 24.3 mmol) followed by distillation under reduced pressure afforded pure amine **19a** (1.50 g, 9.48 mmol).

Yield 39%;

bp 110 °C at 28 Torr (Lit. (**350**) 90-93 °C at 10 Torr);

IR (ATR) ν cm⁻¹ 3357, 3282, 2967, 2929, 2856, 2799, 1595, 1467, 1382, 1068, 800;

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 2.63 (t, 2H, ³J = 6.8 Hz, NH₂CH₂), 2.45 (q, 4H, ³J = 7.2 Hz, N(CH₂CH₃)₂), 2.40-2.36 (m, 2H, CH₂N(CH₂CH₃)₂), 1.52 (br.s, 2H, NH₂), 1.40 (qt, 4H, ³J = 7.2 Hz, NH₂CH₂CH₂CH₂CH₂), 1.31-1.20 (m, 2H, NH₂CH₂CH₂CH₂CH₂), 0.95 (t, 6H, ³J = 7.1 Hz, N(CH₂CH₃)₂);

¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 53.12 (CH₂N(CH₂CH₃)₂), 47.07 (2C, N(CH₂CH₃)₂), 42.24 (NH₂CH₂), 33.85 (NH₂CH₂CH₂), 27.11 (CH₂CH₂N(CH₂CH₃)₂), 25.02 (NH₂CH₂CH₂CH₂), 11.77 (2C, N(CH₂CH₃)₂).

***N,N*-diethylbutane-1,4-diamine (19b)**

Deprotection according to the general procedure starting from compound **14b** (7.24 g, 26.4 mmol) followed by distillation under reduced pressure afforded pure amine **19b** (2.31 g, 16.0 mmol).

Yield 61%;

bp 98 °C at 20 Torr (Li. (**351**) 95-100 °C at 30 Torr);

IR (ATR) ν cm⁻¹ 3302, 2966, 2931, 2870, 2787, 1578, 1467, 1382, 1305, 1068;

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 3.01 (br.s, 2H, NH₂), 2.71-2.59 (m, 2H, NH₂CH₂), 2.45 (q, 4H, ³J = 7.1 Hz, N(CH₂CH₃)₂), 2.39-2.28 (m, 2H, CH₂N(CH₂CH₃)₂), 1.51-1.31 (m, 4H, NH₂CH₂CH₂CH₂), 0.94 (t, 6H, ³J = 7.1 Hz, N(CH₂CH₃)₂);

¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 52.69 (CH₂N(CH₂CH₃)₂), 46.72 (2C, N(CH₂CH₃)₂), 41.78 (NH₂CH₂), 31.23 (NH₂CH₂CH₂), 24.35 (NH₂CH₂CH₂CH₂), 11.44 (2C, N(CH₂CH₃)₂).

***N,N*-diisopropylpentane-1,5-diamine (20a)**

Deprotection according to the general procedure starting from compound **15a** (11.9 g, 37.6 mmol) followed by distillation under reduced pressure afforded pure amine **20a** (1.95 g, 10.5 mmol).

Yield 28%;

bp 93 °C at 28 Torr;

IR (ATR) ν cm⁻¹ 3368, 3284, 2962, 2927, 2857, 1590, 1463, 1384, 1360, 1205, 1155, 803;

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 2.95 (hept, 2H, ³J = 6.6 Hz, CH(CH₃)₂), 2.64 (t, 2H, ³J = 6.9 Hz, NH₂CH₂), 2.9-2.32 (m, 2H, CH₂N(*i*-Pr)₂), 1.53-1.19 (m, 8H, NH₂CH₂CH₂CH₂CH₂), 0.96 (d, 12H, ³J = 6.6 Hz, CH(CH₃)₂);

¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 48.60 (2C, CH(CH₃)₂), 45.25 (CH₂N(*i*-Pr)₂), 42.39 (NH₂CH₂), 33.97 (NH₂CH₂CH₂), 31.35 (CH₂CH₂N(*i*-Pr)₂), 24.79 (NH₂CH₂CH₂CH₂), 20.82 (4C, CH(CH₃)₂).

***N,N*-diisopropylbutane-1,4-diamine (20b)**

Deprotection according to the general procedure starting from compound **15b** (5.40 g, 17.9 mmol) followed by distillation under reduced pressure afforded pure amine **20b** (1.31 g, 7.63 mmol).

Yield 42%;

bp 117 °C at 28 Torr (Lit. **(352)** 110-112 °C at 28 Torr);

IR (ATR) ν cm⁻¹ 2962, 2927, 2857, 1593, 1463, 1384, 1360, 1205, 1155, 814;

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 2.97 (hept, 2H, ³J = 6.5 Hz, CH(CH₃)₂), 2.86 (br.s, 2H, NH₂), 2.72-2.61 (m, 2H, NH₂CH₂), 2.35 (t, 2H, ³J = 6.5 Hz, CH₂N(*i*-Pr)₂), 1.49-1.31 (m, 4H, NH₂CH₂CH₂CH₂), 0.95 (d, 12H, ³J = 6.6 Hz, CH(CH₃)₂);

¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 48.50 (2C, CH(CH₃)₂), 45.16 (CH₂N(*i*-Pr)₂), 41.97 (NH₂CH₂), 31.09 (NH₂CH₂CH₂), 28.76 (CH₂CH₂N(*i*-Pr)₂), 20.70 (4C, CH(CH₃)₂).

***N,N*-diisopropylpropane-1,3-diamine (20c)**

Deprotection according to the general procedure starting from compound **15c** (7.60 g, 26.4 mmol) followed by distillation under reduced pressure afforded pure amine **20c** (2.05 g, 13.0 mmol).

Yield 50%;

bp 100 °C at 28 Torr (Lit. 57 °C at 3 Torr **(353)**, 98-99 °C à 15 Torr **(354)**);

IR (ATR) ν cm⁻¹ 3367, 3286, 2962, 2930, 2869, 1538, 1463, 1385, 1360, 1205, 1157, 813;

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 2.97 (hept, 2H, ³J = 6.6 Hz, CH(CH₃)₂), 2.67 (t, 2H, ³J = 6.8 Hz, NH₂CH₂), 2.44-2.39 (m, 2H, CH₂N(*i*-Pr)₂), 1.64 (br.s, 2H, NH₂), 1.50 (qt, 2H, ³J = 6.8 Hz, CH₂CH₂CH₂), 0.95 (d, 12H, ³J = 6.6 Hz, CH(CH₃)₂);

¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 48.18 (2C, CH(CH₃)₂), 42.79 (CH₂N(*i*-Pr)₂), 40.86 (NH₂CH₂), 34.46 (CH₂CH₂CH₂), 20.75 (4C, CH(CH₃)₂).

***N*-benzyl-*N*-methylpentane-1,5-diamine (21a)**

Deprotection of compound **16a** (2.30 g, 6.83 mmol) according to the general procedure yielded directly pure amine **21a** (1.18 g, 5.69 mmol).

Yield 83%;

Rf 0.23 (SiO₂, EtOAc/EtOH/NH₄OH, 5/5/0.5, v/v/v);

IR (ATR) ν cm⁻¹ 2930, 2856, 2787, 1582, 1452, 818, 735, 698;

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 7.32-7.20 (m, 5H, CH_{Ar}), 3.47 (s, 2H, CH₂Ph), 2.69 (t, 2H, ³J = 7.0 Hz, NH₂CH₂), 2.36 (t, 2H, ³J = 7.4 Hz, CH₂N(CH₃)Bn), 2.18 (s, 3H, NCH₃), 1.52 (qt, 2H, ³J = 7.4 Hz, CH₂CH₂N(CH₃)Bn), 1.43 (qt, 2H, ³J = 7.0 Hz, NH₂CH₂CH₂), 1.38-1.30 (m, 2H, NH₂CH₂CH₂CH₂), 1.24 (br.s, 2H, NH₂);

¹³C NMR (CDCl₃, 126 MHz) δ 139.47 (C_{Ar}CH₂), 129.17, 128.29, 126.98 (5C, CH_{Ar}), 62.54 (CH₂Ph), 57.60 (CH₂N(CH₃)Bn), 42.40 (NCH₃), 42.38 (NH₂CH₂), 33.94 (NH₂CH₂CH₂), 27.44 (CH₂CH₂N(CH₃)Bn), 24.84 (NH₂CH₂CH₂CH₂).

***N*-benzyl-*N*-methylbutane-1,4-diamine (21b)**

Deprotection of compound **16b** (2.92, 9.07 mmol) according to the general procedure yielded directly pure amine **21b** (1.50 g, 7.82 mmol).

Yield 86%;

Rf 0.32 (SiO₂, EtOAc/EtOH/NH₄OH, 5/5/0.5, v/v/v);

IR (ATR) ν cm⁻¹ 3364, 3280, 2933, 2838, 2785, 1684, 1452, 820, 734, 698;

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 7.35-7.22 (m, 5H, CH_{Ar}), 3.49 (s, 2H, CH₂Ph), 2.69 (t, 2H, ³J = 6.9 Hz, NH₂CH₂), 2.39 (t, 2H, ³J = 7.2 Hz, CH₂N(CH₃)Bn), 2.20 (s, 3H, NCH₃), 1.60-1.52 (m, 2H, CH₂CH₂N(CH₃)Bn), 1.52-1.42 (m, 2H, NH₂CH₂CH₂), 1.33 (br.s, 2H, NH₂);

¹³C NMR (CDCl₃, 126 MHz) δ 139.38 (C_{Ar}CH₂), 129.06, 128.23, 126.92 (5C, CH_{Ar}), 62.45 (CH₂Ph), 57.40 (CH₂N(CH₃)Bn), 42.27 (NCH₃), 42.25 (NH₂CH₂), 31.76 (NH₂CH₂CH₂), 24.88 (CH₂CH₂N(CH₃)Bn).

***N*-benzyl-*N*-methylpropane-1,3-diamine (21c)**

Deprotection of compound **16c** (2.89, 9.38 mmol) according to the general procedure yielded directly pure amine **21c** (1.65 g, 9.26 mmol).

Yield 98%;

Rf 0.36 (SiO₂, EtOAc/EtOH/NH₄OH, 5/5/0.5, v/v/v);

IR (ATR) ν cm⁻¹ 3364 (ν_{as}NH₂), 3292 (ν_sNH₂), 2944, 2838, 2787 (ν_{CH}), 1662 (δ_{NH2}), 1452 (ν_{C=C}), 823 (δ_{NH2}), 734, 697 (δ_{CH});

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 7.21-7.31 (m, 5H, CH), 3.47 (s, 2H, CH₂Ph), 2.74 (t, 2H, ³J = 6.8 Hz, NH₂CH₂), 2.41 (t, 2H, ³J = 7.0 Hz, CH₂N(CH₃)Bn), 2.19 (s, 3H, NCH₃), 1.64 (qt, 2H, ³J = 6.9 Hz, CH₂CH₂CH₂), 1.40 (br.s, 2H, NH₂);

¹³C NMR (CDCl₃, 126 MHz) δ 139.39 (C_{Ar}CH₂), 129.07, 128.31, 127.01 (5C, CH_{Ar}), 62.68 (CH₂Ph), 55.22 (CH₂N(CH₃)Bn), 42.38 (NCH₃), 40.69 (NH₂CH₂), 31.24 (CH₂CH₂CH₂).

***N*-benzyl-*N*-methylethane-1,2-diamine (21d)**

Deprotection of compound **16d** (1.93, 6.55 mmol) according to the general procedure yielded directly pure amine **21d** (0.812 g, 4.94 mmol).

Yield 76%;

Rf 0.34 (SiO₂, EtOAc/EtOH/NH₄OH, 5/5/0.5, v/v/v);

IR (ATR) ν cm^{-1} 3357 (ν_{asNH_2}), 3283 (ν_{sNH_2}), 2944, 2840, 2787 (ν_{CH}), 1568 (δ_{NH_2}), 1452 ($\nu_{\text{C}=\text{C}}$), 818 (δ_{NH_2}), 735, 698 (δ_{CH});

^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ 7.36-7.22 (m, 5H, CH_{Ar}), 3.53 (s, 2H, CH_2Ph), 2.81 (t, 2H, $^3J = 6.0$ Hz, NH_2CH_2), 2.48 (t, 2H, $^3J = 6.0$ Hz, $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{Bn}$), 2.22 (s, 3H, NCH_3), 1.45 (br.s, 2H, NH_2);

^{13}C NMR (CDCl_3 , 126 MHz) δ 139.36 (C_{ArCH_2}), 129.05, 128.32, 127.05 (5C, CH_{Ar}), 62.74 (CH_2Ph), 60.34 ($\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{Bn}$), 42.26 (NCH_3), 39.73 (NH_2CH_2).

3-(piperidin-1-yl)propan-1-amine (22)

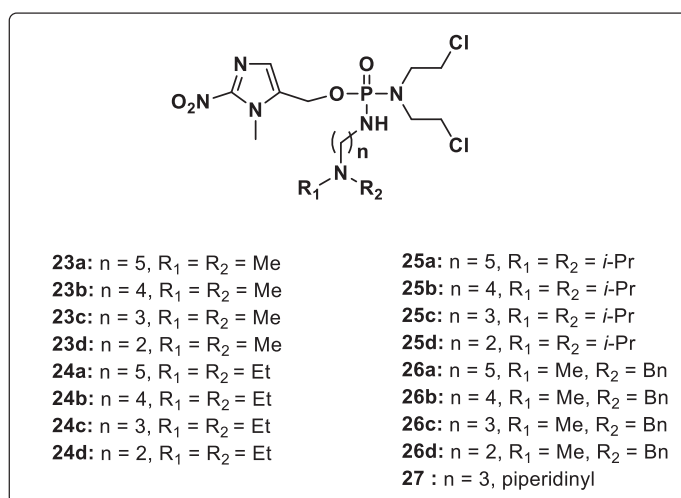
Deprotection according to the general procedure starting from compound **17c** (2.18 g, 7.99 mmol) afforded amine **22c** (0.377 g, 2.65 mmol).

Yield 33%;

IR (ATR) ν cm^{-1} 3358, 3290, 2930, 2852, 2800, 2763, 1663, 1573, 1468, 1442, 1154, 1122, 860; **^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ** 2.58 (t, 2H, $^3J = 6.8$ Hz, NH_2CH_2), 2.30-2.17 (m, 6H, $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2$), 2.03 (br.s, 2H, NH_2), 1.49 (qt, 2H, $^3J = 7.0$ Hz, $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.43 (qt, 4H, $^3J = 5.6$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2$), 1.33-1.24 (m, 2H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{CH}_2$);

^{13}C NMR (CDCl_3 , 126 MHz) δ 57.08, 54.55, 54.42 ($\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2$), 40.75 (NH_2CH_2), 30.43 ($\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 25.83, 24.34 (3C, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{CH}_2$).

General procedure for the synthesis of non-targeted prodrugs **23** to **27**



To a solution of (1-methyl-2-nitro-1*H*-imidazol-5-yl)methanol (**6**) (1 eq.) in freshly distilled anhydrous THF (10 mL for 3 mmol of alcohol **6**) was added dropwise lithium bis(trimethylsilyl)amide (1M in THF, 1.1 eq.) at -78°C under an inert atmosphere. The reaction mixture was stirred around 5 min at -78°C , and a solution of bis(2-chloroethyl)phosphoramidic dichloride (**8**) (1.1 eq.) in THF (3.3 mmol in 10 mL), previously cooled at -78°C , was added all at once at the same temperature (T_0). The reaction mixture was stirred for 15 to 80 min, before the addition of a solution of the appropriate amine **18-22** (2-2.2 eq.) in THF (3 mL for 5 mmol of amine) and stirring was maintained at -78°C for 5 min to 75 min. These reaction times were determined by ^{31}P NMR monitoring for each compound. The reaction was stopped by addition of water (20 mL for 3 mmol of alcohol **6**), concentrated in vacuum and then extracted with EtOAc (3 $\times$ 50 mL for 3 mmol of alcohol **6**). The combined organic extracts were dried over MgSO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography on silica gel using an eluent gradient (EtOAc/EtOH with TEA or NH_4OH) to afford compounds **23-27** as yellow to orange oils.

(1-methyl-2-nitro-1*H*-imidazol-5-yl)methyl pentyl]phosphorodiamidate (**23a**)

N,N-bis(2-chloroethyl)-*N'*-[5-(dimethylamino)

Starting from 500 mg (3.18 mmol) of alcohol **6**, the coupling reaction with bis(2-chloroethyl)phosphoramidic dichloride (**8**) was performed for 60 min before the addition of the prepared amine **18a** (826 mg, 6.34 mmol). The reaction was then stopped after 10 min of stirring. The crude product was purified by silica gel chromatography (EtOAc/EtOH/ NH_4OH ranging from 90/10/1 to 50/50/3, v/v/v) to afford **23a** (457 mg, 0.965 mmol) as a yellow-orange oil.

Yield 30%;

Rf 0.35 (SiO₂, EtOAc/EtOH/TEA, 70/30/3, v/v/v);

IR (ATR) ν cm⁻¹ 3389, 3223, 1537, 1490, 1351, 1216, 1191, 1007, 979, 960, 834, 744;

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 7.19 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.19 (dd, 1H, ²J_{H-H} = 13.3 Hz, ³J_{H-P} = 7.5 Hz, CH'O), 4.98 (dd, 1H, ²J_{H-H} = 13.3 Hz, ³J_{H-P} = 9.0 Hz, CH''O), 4.07 (s, 3H, NCH₃), 3.95 (td, 1H, ³J_{H-H} = 6.8 Hz, ²J_{H-P} = 11.3 Hz, NHP), 3.64-3.51 (m, 4H, N(CH₂CH₂Cl)₂), 3.53-3.25 (m, 4H, N(CH₂CH₂Cl)₂), 3.04-2.89 (m, 4H, CH₂NHP, CH₂N(CH₃)₂), 2.79 (s, 6H, N(CH₃)₂), 1.90-1.53 (m, 6H, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂);

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 146.41 (C_{Ar}NO₂), 133.43 (d, ³J_{C-P} = 7.1 Hz, C_{Ar}CH₂), 129.11 (CH_{Ar}), 57.62 (CH₂N(CH₃)₂), 56.44 (d, ²J_{C-P} = 4.4 Hz, CH₂O), 49.33 (d, 2C, ²J_{C-P} = 3.9 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂), 43.18 (2C, N(CH₃)₂), 42.81 (2C, N(CH₂CH₂Cl)₂), 40.17 (CH₂NHP), 34.78 (NCH₃), 30.12 (d, ³J_{C-P} = 6.4 Hz, CH₂CH₂NHP), 23.92, 23.34 (CH₂CH₂CH₂N(CH₃)₂);

³¹P NMR (202 MHz, CD₃OD) δ 18.33; **HRMS** (ESI) *m/z* 473.1607 [M+H]⁺ (calculated for [C₁₆H₃₂Cl₂N₆O₄P]⁺ 473.1594).

**(1-methyl-2-nitro-1*H*-imidazol-5-yl)methyl
butyl]phosphorodiamidate (23b)**

***N,N*-bis(2-chloroethyl)-*N'*-[4-(dimethylamino)**

Starting from 350 mg (2.23 mmol) of alcohol **6**, the coupling reaction with bis(2-chloroethyl)phosphoramidic dichloride (**8**) was performed for 60 min before the addition of the prepared amine **18b** (554 mg, 4.77 mmol). The reaction was then stopped after 5 min of stirring. The crude product was purified by silica gel chromatography (EtOAc/EtOH/NH₄OH ranging from 80/20/1 to 50/50/3, v/v/v) to afford **23b** (383 mg, 0.834 mmol) as a yellow-brown oil.

Yield 37%;

Rf 0.32 (SiO₂, EtOAc/EtOH/TEA, 70/30/3, v/v/v);

IR (ATR) ν cm⁻¹ 3385, 3231, 1537, 1489, 1351, 1215, 1191, 1006, 981, 960, 834, 744;

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 7.24 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.12 (d, 2H, ³J_{H-P} = 8.1 Hz, CH₂O), 4.06 (s, 3H, NCH₃), 3.68-3.59 (m, 4H, N(CH₂CH₂Cl)₂), 3.49-3.34 (m, 4H, N(CH₂CH₂Cl)₂), 2.90 (td, 2H, ³J_{H-H} = 6.5 Hz, ³J_{H-P} = 10.5 Hz, CH₂NHP), 2.52-2.49 (m, 2H, CH₂N(CH₃)₂), 2.39 (s, 6H, N(CH₃)₂), 1.66-1.47 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂CH₂);

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 146.42 (C_{Ar}NO₂), 133.15 (d, ³J_{C-P} = 7.5 Hz, C_{Ar}CH₂), 129.14 (CH_{Ar}), 58.46 (CH₂N(CH₃)₂), 56.28 (d, ²J_{C-P} = 3.7 Hz, CH₂O), 49.38 (d, 2C, ²J_{C-P} = 4.4 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂), 44.56 (2C, N(CH₃)₂), 42.81 (2C, N(CH₂CH₂Cl)₂), 40.38 (CH₂NHP), 34.61 (NCH₃), 29.29 (d, ³J_{C-P} = 6.1 Hz, CH₂CH₂NHP), 24.00 (CH₂CH₂N(CH₃)₂);

³¹P NMR (202 MHz, CD₃OD) δ 18.28;

HRMS (ESI) *m/z* 459.1436 [M+H]⁺ (calculated for [C₁₅H₃₀Cl₂N₆O₄P]⁺ 459.1438).

**(1-methyl-2-nitro-1*H*-imidazol-5-yl)methyl
propyl]phosphorodiamidate (23c)**

***N,N*-bis(2-chloroethyl)-*N'*-[3-(dimethylamino)**

Starting from 500 mg (3.18 mmol) of alcohol **6**, the coupling reaction with bis(2-chloroethyl)phosphoramidic dichloride (**8**) was performed for 40 min before the addition of a commercially available amine, 3-(*N,N*-dimethylamino)propylamine (800 μ L, 6.36 mmol). The reaction was then stopped after 20 min of stirring. The crude product was purified by silica gel

chromatography (EtOAc/EtOH/NH₄OH, 80/20/5, v/v/v) to afford **23c** (604 mg, 1.36 mmol) as a yellow-orange oil.

Yield 43%;

Rf 0.34 (SiO₂, EtOAc/EtOH/NH₄OH, 80/20/5, v/v/v);

IR (ATR) ν cm⁻¹ 3387, 3259, 1538, 1491, 1353, 1221, 1192, 1013, 981, 835;

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.19 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.07 (dd, 1H, ²J_{H-H} = 13.3 Hz, ³J_{H-P} = 7.6 Hz, CH'O), 4.99 (dd, 1H, ²J_{H-H} = 13.3 Hz, ³J_{H-P} = 7.2 Hz, CH''O), 4.36 (br.s, 1H, NH), 4.06 (s, 3H, NCH₃), 3.66-3.56 (m, 4H, N(CH₂CH₂Cl)₂), 3.49-3.32 (m, 4H, N(CH₂CH₂Cl)₂), 2.99 (qd, 2H, ³J_{H-H} = 5.9 Hz, ³J_{H-P} = 8.2 Hz, CH₂NHP), 2.39 (t, 2H, ³J_{H-H} = 6.2 Hz, CH₂N(CH₃)₂), 2.20 (s, 6H, N(CH₃)₂), 1.69-1.60 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂);

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 146.46 (C_{Ar}NO₂), 133.13 (d, ³J_{C-P} = 7.9 Hz, C_{Ar}CH₂), 129.10 (CH_{Ar}), 58.77 (CH₂N(CH₃)₂), 56.22 (d, ²J_{C-P} = 4.0 Hz, CH₂O), 49.44 (d, 2C, ²J_{C-P} = 4.7 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂), 45.46 (2C, N(CH₃)₂), 42.76 (2C, N(CH₂CH₂Cl)₂), 41.07 (CH₂NHP), 34.50 (NCH₃), 27.65 (d, ³J_{C-P} = 7.0 Hz, CH₂CH₂CH₂);

³¹P NMR (202 MHz, CD₃OD) δ 18.20;

HRMS (ESI) m/z 445.1287 [M+H]⁺ (calculated for [C₁₄H₂₈Cl₂N₆O₄P]⁺ 445.1281).

(1-methyl-2-nitro-1*H*-imidazol-5-yl)methyl ethyl]phosphorodiamidate (23d**)**

***N,N*-bis(2-chloroethyl)-*N'*-[2-(dimethylamino)**

Starting from 107 mg (680 mmol) of alcohol **6**, the coupling reaction with bis(2-chloroethyl)phosphoramidic dichloride **8** was performed for 20 min before the addition of a commercially available amine, 2-(*N,N*-dimethylamino)ethylamine (150 μ L, 1.37 mmol). The reaction was then stopped after 5 min of stirring. The crude product was purified by silica gel chromatography (EtOAc/EtOH/TEA with a gradient ranging from 90/10/0.5 to 60/40/2, v/v/v), to afford **23d** (112 mg, 0.260 mmol) as a yellow-brown oil.

Yield 38%;

Rf 0.33 (SiO₂, EtOAc/EtOH/TEA, 70/30/3, v/v/v);

IR (ATR) ν cm⁻¹ 3377, 3202, 1537, 1489, 1351, 1220, 1191, 1004, 977, 959, 834, 770, 744;

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.21 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.12 (dd, 1H, ²J_{H-H} = 13.3 Hz, ³J_{H-P} = 7.6 Hz, CH'O), 5.03 (dd, 1H, ²J_{H-P} = 13.3 Hz, ³J_{H-P} = 7.5 Hz, CH''O), 4.08 (s, 3H, NCH₃), 3.67-3.58 (m, 4H, N(CH₂CH₂Cl)₂), 3.55 (br.s, 1H, NHP), 3.52-3.35 (m, 4H, N(CH₂CH₂Cl)₂), 3.06-2.91 (m, 2H, CH₂NHP), 2.50-2.39 (m, 2H, CH₂N(CH₃)₂), 2.26 (s, 6H, N(CH₃)₂);

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 146.46 (C_{Ar}NO₂), 132.99 (d, ³J_{C-P} = 7.6 Hz, C_{Ar}CH₂), 129.23 (CH_{Ar}), 59.71 (d, ³J_{C-P} = 6.6 Hz, CH₂N(CH₃)₂), 56.57 (d, ²J_{C-P} = 3.9 Hz, CH₂O), 49.23 (d, 2C, ²J_{C-P} = 4.3 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂), 44.58 (2C, N(CH₃)₂), 42.69 (2C, N(CH₂CH₂Cl)₂), 37.38 (CH₂NHP), 34.65 (NCH₃);

³¹P NMR (202 MHz, CDCl₃) δ 16.31;

HRMS (ESI) m/z 431.1138 [M+H]⁺ (calculated for [C₁₃H₂₆Cl₂N₆O₄P]⁺ 431.1125).

**(1-methyl-2-nitro-1*H*-imidazol-5-yl)methyl
pentyl]phosphorodiamidate (24a)**

***N,N*-bis(2-chloroethyl)-*N'*-[5-(diethylamino)**

Starting from 500 mg (3.18 mmol) of alcohol **6**, the coupling reaction with bis(2-chloroethyl)phosphoramidic dichloride (**8**) was performed for 60 min before the addition of the prepared amine **19a** (1 g, 6.34 mmol). The reaction was then stopped after 60 min of stirring. The crude product was purified by silica gel chromatography (EtOAc/EtOH/NH₄OH ranging from 80/20/1 to 60/40/2, v/v/v) to afford **24a** (681 mg, 1.36 mmol) as a yellow-brown oil.

Yield 43%;

Rf 0.24 (SiO₂, EtOAc/EtOH/TEA, 90/10/1, v/v/v);

IR (ATR) ν cm⁻¹ 3208, 1538, 1490, 1351, 1219, 1192, 1007, 978, 959, 834, 745, 652;

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.20 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.10 (dd, 1H, ²J_{H-H} = 13.3 Hz, ³J_{H-P} = 7.7 Hz, CH'O), 5.01 (dd, 1H, ²J_{H-H} = 13.3 Hz, ³J_{H-P} = 7.4 Hz, CH''O), 4.06 (s, 3H, NCH₃), 3.62 (td, 4H, ³J_{H-H} = 6.5 Hz, ⁴J_{H-P} = 2.5 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂), 3.49-3.33 (m, 4H, N(CH₂CH₂Cl)₂), 2.95-2.82 (m, 3H, CH₂NHP), 2.60 (q, 4H, ³J_{H-H} = 7.2 Hz, N(CH₂CH₃)₂), 2.48 (t, 2H, ³J_{H-H} = 7.5 Hz, CH₂N(CH₂CH₃)₂), 1.56-1.46 (m, 4H, NHCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂N), 1.38-1.30 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂NHP), 1.06 (t, 6H, ³J_{H-H} = 7.2 Hz, N(CH₂CH₃)₂);

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 146.49 (C_{Ar}NO₂), 133.03 (d, ³J_{C-P} = 7.6 Hz, C_{Ar}CH₂), 129.19 (CH_{Ar}), 56.26 (d, ²J_{C-P} = 3.7 Hz, CH₂O), 52.68 (CH₂N(CH₂CH₃)₂), 49.37 (d, 2C, ²J_{C-P} = 4.6 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂), 46.93 (2C, N(CH₂CH₃)₂), 42.81 (2C, N(CH₂CH₂Cl)₂), 40.96 (CH₂NHP), 34.56 (NCH₃), 31.58 (d, ³J_{C-P} = 6.3 Hz, CH₂CH₂NHP), 26.28 (CH₂CH₂N), 24.68 (CH₂CH₂CH₂NHP), 11.11 (2C, N(CH₂CH₃)₂);

³¹P NMR (202 MHz, CD₃OD) δ 18.30;

HRMS (ESI) m/z 501.1911 [M+H]⁺ (calculated for [C₁₈H₃₆Cl₂N₆O₄P]⁺ 501.1907).

**(1-methyl-2-nitro-1*H*-imidazol-5-yl)methyl
butyl]phosphorodiamidate (24b)**

***N,N*-bis(2-chloroethyl)-*N'*-[4-(diethylamino)**

Starting from 129 mg (0.820 mmol) of alcohol **5**, the coupling reaction with bis(2-chloroethyl)phosphoramidic dichloride (**8**) was performed for 15 min before the addition of the prepared amine **19b** (236 mg, 1.64 mmol). The reaction was then stopped after 5 min of stirring. The crude product was purified by silica gel chromatography (EtOAc/EtOH/NH₄OH ranging from 90/10/1 to 75/25/2, v/v/v), to afford compound **24b** (174 mg, 0.358 mmol) as a yellow-brown oil.

Yield 44%;

Rf 0.34 (SiO₂, EtOAc/EtOH/TEA, 70/30/3, v/v/v);

IR (ATR) ν cm⁻¹ 3197, 1538, 1491, 1351, 1219, 1192, 1008, 979, 960, 835, 745;

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.13 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.04 (dd, 1H, ²J_{H-H} = 13.4 Hz, ³J_{H-P} = 7.6 Hz, CH'O), 4.97 (dd, 1H, ²J_{H-H} = 13.4 Hz, ³J_{H-P} = 7.4 Hz, CH''O), 4.00 (s, 3H, NCH₃), 3.55 (td, 4H, ³J_{H-H} = 6.5 Hz, ⁴J_{H-P} = 2.3 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂), 3.43-3.27 (m, 4H, NCH₂CH₂Cl), 2.90-2.77 (m, 2H, CH₂NHP), 2.52 (q, 4H, ³J_{H-H} = 7.2 Hz, N(CH₂CH₃)₂), 2.42 (t, 2H, ³J_{H-H} = 6.9 Hz, CH₂N(CH₂CH₃)₂), 1.51-1.41 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂CH₂), 0.98 (t, 6H, ³J_{H-H} = 7.1 Hz, N(CH₂CH₃)₂);

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 146.36 (C_{Ar}NO₂), 133.10 (d, ³J_{C-P} = 7.9 Hz, C_{Ar}CH₂), 129.12 (CH_{Ar}), 56.06 (d, ²J_{C-P} = 4.0 Hz, CH₂O), 52.39 (CH₂N(CH₂CH₃)₂), 49.38 (d, 2C, ²J_{C-P} = 4.8 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂),

46.49 (2C, N(CH₂CH₃)₂), 42.81 (2C, N(CH₂CH₂Cl)₂), 40.70 (CH₂NHP), 34.57 (NCH₃), 29.90 (d, ³J_{C-P} = 7.1 Hz, CH₂CH₂NHP), 24.24 (CH₂CH₂N(CH₃)₂), 10.90 (2C, N(CH₂CH₃)₂);

³¹P NMR (202 MHz, CDCl₃) δ 16.69;

HRMS (ESI) m/z 487.1750 [M+H]⁺ (calculated for [C₁₇H₃₄Cl₂N₆O₄P]⁺ 487.1751).

(1-methyl-2-nitro-1*H*-imidazol-5-yl)methyl propyl]phosphorodiamidate (24c)

***N,N*-bis(2-chloroethyl)-*N'*-[2-(diethylamino)**

Starting from 125 mg (0.796 mmol) of alcohol **5**, the coupling reaction with bis(2-chloroethyl)phosphoramidic dichloride (**8**) was performed for 30 min before the addition of a commercially available amine, 3-(*N,N*-diethylamino)propylamine (251 μL, 1.59 mmol). The reaction was then stopped after 15 min of stirring. The crude product was purified by silica gel chromatography (EtOAc/EtOH/TEA ranging from 85/15/1 to 60/40/2.5, v/v/v), to afford **24c** as a yellow-brown oil (243 mg, 0.513 mmol).

Yield 65%;

Rf 0.58 (SiO₂, EtOAc/EtOH/TEA, 70/30/3, v/v/v);

IR (ATR) ν cm⁻¹ 3389, 3220, 1538, 1490, 1351, 1216, 1192, 1007, 979, 959, 834, 745;

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.19 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.09 (dd, 1H, ²J_{H-H} = 13.3 Hz, ³J_{H-P} = 7.5 Hz, CH'O), 5.00 (dd, 1H, ²J_{H-H} = 13.3 Hz, ³J_{H-P} = 7.3 Hz, CH''O), 4.80 (br.s, 1H, NH), 4.06 (s, 3H, NCH₃), 3.61 (td, 4H, ³J_{H-H} = 6.5 Hz, ⁴J_{H-P} = 2.1 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂), 3.51-3.31 (m, 4H, N(CH₂CH₂Cl)₂), 3.07-2.94 (m, 2H, CH₂NHP), 2.62 (q, 2H, ³J_{H-H} = 6.5 Hz, CH₂N(CH₂CH₃)₂), 2.57 (q, 2H, ³J_{H-H} = 6.8 Hz, N(CH₂CH₃)₂), 1.73-1.63 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂), 1.03 (t, 6H, ³J_{H-H} = 7.2 Hz, N(CH₂CH₃)₂);

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 146.42 (C_{Ar}NO₂), 133.16 (d, ³J_{C-P} = 8.0 Hz, C_{Ar}CH₂), 129.10 (CH_{Ar}), 56.18 (d, ²J_{C-P} = 4.1 Hz, CH₂O), 52.18 (CH₂N(CH₂CH₃)₂), 49.51 (d, 2C, ²J_{C-P} = 4.7 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂), 46.64 (2C, N(CH₂CH₃)₂), 42.83 (2C, N(CH₂CH₂Cl)₂), 40.89 (CH₂NHP), 34.57 (NCH₃), 26.74 (d, ²J_{C-P} = 6.7 Hz, CH₂CH₂CH₂), 11.12 (2C, N(CH₂CH₃)₂);

³¹P NMR (202 MHz, CDCl₃) δ 16.40;

HRMS (ESI) m/z 473.1603 [M+H]⁺ (calculated for [C₁₆H₃₂Cl₂N₆O₄P]⁺ 473.1594).

(1-methyl-2-nitro-1*H*-imidazol-5-yl)methyl ethyl]phosphorodiamidate (24d)

***N,N*-bis(2-chloroethyl)-*N'*-[2-(diethylamino)**

Starting from 233 mg (1.48 mmol) of alcohol **5**, the coupling reaction with bis(2-chloroethyl)phosphoramidic dichloride (**8**) was performed for 15 min before the addition of a commercially available amine, 2-(*N,N*-diethylamino)ethylamine (450 μL, 3.20 mmol). The reaction was then stopped after 30 min of stirring. The crude product was purified by silica gel chromatography (EtOAc/EtOH/TEA ranging from 85/15/0.5 to 85/15/1, v/v/v), to afford **24d** as a yellow-brown oil (357 mg; 0.777 mmol).

Yield 53%;

Rf 0.53 (SiO₂, EtOAc/EtOH/TEA, 70/30/3, v/v/v);

IR (ATR) ν cm⁻¹ 3233, 1538, 1490, 1351, 1221, 1192, 1007, 976, 959, 834, 744;

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.19 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.10 (dd, 1H, ²J_{H-H} = 13.3 Hz, ³J_{H-P} = 7.3 Hz, CH'O), 5.01 (dd, 1H, ²J_{H-P} = 13.3 Hz, ³J_{H-P} = 7.3 Hz, CH''O), 4.06 (s, 3H, NCH₃), 3.75 (br.s, 1H, NHP), 3.61 (td, 4H, ³J_{H-H} = 6.4 Hz, ⁴J_{H-P} = 1.8 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂), 3.49-3.34 (m, 4H, N(CH₂CH₂Cl)₂), 3.01-2.87 (m, 2H, CH₂NHP), 2.66-2.47 (m, 6H, CH₂N(CH₂CH₃)₂), 1.01 (t, 6H, ³J_{H-H} = 7.1 Hz, N(CH₂CH₃)₂);

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 146.46 (C_{Ar}NO₂), 133.02 (d, ³J_{C-P} = 7.8 Hz, C_{Ar}CH₂), 129.17 (CH_{Ar}), 56.28 (d, ²J_{C-P} = 4.0 Hz, CH₂O), 53.37 (CH₂N(CH₂CH₃)₂), 49.36 (d, 2C, ²J_{C-P} = 4.7 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂), 46.77 (d, 2C, ²J_{C-P} = 7.5 Hz, N(CH₂CH₃)₂), 42.73 (2C, N(CH₂CH₂Cl)₂), 38.06 (CH₂NHP), 34.53 (NCH₃), 11.56 (2C, N(CH₂CH₃)₂);

³¹P NMR (202 MHz, CDCl₃) δ 16.64;

HRMS (ESI) m/z 459.1430 [M+H]⁺ (calculated for [C₁₅H₃₀Cl₂N₆O₄P]⁺ 459.1438).

**(1-methyl-2-nitro-1*H*-imidazol-5-yl)methyl
(diisopropylamino)pentyl]phosphorodiamidate (25a)**

***N,N*-bis(2-chloroethyl)-*N'*-[5-**

Starting from 500 mg (3.18 mmol) of alcohol **5**, the coupling reaction with bis(2-chloroethyl)phosphoramidic dichloride (**8**) was performed for 60 min before the addition of the prepared amine **20a** (1.18 g, 6.34 mmol). The reaction was then stopped after 75 min of stirring. The crude product was purified by silica gel chromatography (EtOAc/EtOH/TEA, 90/10/1, v/v/v) to afford compound **25a** as a yellow-brown oil (938 mg, 1.77 mmol).

Yield 56%; **Rf** 0.36 (SiO₂, EtOAc/EtOH/TEA, 90/10/1, v/v/v);

IR (ATR) ν cm⁻¹ 3395, 3208, 1671, 1538, 1490, 1353, 1208, 1192, 1009, 979, 959, 835, 745;

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.17 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.06 (dd, 1H, ²J_{H-H} = 13.3 Hz, ³J_{H-P} = 7.7 Hz, CH'O), 5.00 (dd, 1H, ²J_{H-H} = 13.3 Hz, ³J_{H-P} = 7.1 Hz, CH''O), 4.04 (s, 3H, NCH₃), 3.60 (td, 4H, ³J_{H-H} = 6.4 Hz, ⁴J_{H-P} = 2.9 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂), 3.48-3.32 (m, 4H, N(CH₂CH₂Cl)₂), 2.97 (hept, 2H, ³J_{H-H} = 6.5 Hz, CH(CH₃)₂), 2.89-2.82 (m, 2H, CH₂NHP), 2.69 (br.s, 1H, NHP), 2.35 (t, 2H, ³J_{H-H} = 7.5 Hz, CH₂N(*i*-Pr)₂), 1.49 (qt, 2H, ³J_{H-H} = 6.9 Hz, CH₂CH₂NHP), 1.37 (qt, 2H, ³J_{H-H} = 7.4 Hz, CH₂CH₂N(*i*-Pr)₂), 1.32-1.21 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂N(*i*-Pr)₂), 0.96 (d, 12H, ³J_{H-H} = 6.6 Hz, CH(CH₃)₂);

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 146.42 (C_{Ar}NO₂), 132.96 (d, ³J_{C-P} = 7.7 Hz, C_{Ar}CH₂), 129.12 (CH_{Ar}), 56.17 (d, ²J_{C-P} = 4.0 Hz, OCH₂), 49.30 (d, 2C, ²J_{C-P} = 4.9 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂), 48.65 (2C, CH(CH₃)₂), 45.14 (CH₂N(*i*-Pr)₂), 42.74 (2C, N(CH₂CH₂Cl)₂), 41.18 (CH₂NHP), 34.48 (NCH₃), 31.87 (d, ³J_{C-P} = 6.4 Hz, CH₂CH₂NHP), 30.87 (CH₂CH₂N(*i*-Pr)₂), 24.57 (CH₂CH₂CH₂N(*i*-Pr)₂), 20.71 (4C, CH(CH₃)₂); **³¹P NMR (202 MHz, DMSO-*d*6)** δ 17.65;

HRMS (ESI) m/z 529.2229 [M+H]⁺ (calculated for [C₂₀H₄₀Cl₂N₆O₄P]⁺ 529.2220).

**(1-methyl-2-nitro-1*H*-imidazol-5-yl)methyl
(diisopropylamino)butyl]phosphorodiamidate (25b)**

***N,N*-bis(2-chloroethyl)-*N'*-[4-**

Starting from 300 mg (1.91 mmol) of alcohol **5**, the coupling reaction with bis(2-chloroethyl)phosphoramidic dichloride (**8**) was performed for 60 min before the addition of the prepared amine **20b** (650 mg, 3.77 mmol). The reaction was then stopped after 60 min of stirring. The crude product was purified by silica gel chromatography (EtOAc/EtOH/NH₄OH ranging from 70/30/1 to 50/50/2, v/v/v) to afford compound **25b** (280 mg, 0.543 mmol) as a yellow-brown oil.

Yield 29%;

Rf 0.51 (SiO₂, EtOAc/EtOH/TEA, 70/30/3, v/v/v);

IR (ATR) ν cm⁻¹ 3231, 1538, 1490, 1353, 1219, 1193, 1008, 980, 960, 834, 746;

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.20 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.10 (dd, 1H, ²J_{H-H} = 13.3 Hz, ³J_{H-P} = 7.6 Hz, CH'O), 5.02 (dd, 1H, ²J_{H-H} = 13.3 Hz, ³J_{H-P} = 7.3 Hz, CH''O), 4.07 (s, 3H, NCH₃), 3.70-3.54 (m, 4H, N(CH₂CH₂Cl)₂), 3.50-3.33 (m, 4H, N(CH₂CH₂Cl)₂), 3.32-3.19 (se, 1H, NH), 3.17-3.01 (m, 2H, CH(CH₃)₂), 2.98-2.82 (m, 2H, CH₂NHP), 2.54-2.40 (m, 2H, CH₂N(*i*-Pr)₂), 1.60-1.41 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂CH₂), 1.05 (d, 12H, ³J_{H-H} = 6.2 Hz, CH(CH₃)₂);

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 146.48 (C_{Ar}NO₂), 133.04 (d, ³J_{C-P} = 7.8 Hz, C_{Ar}CH₂), 129.19 (CH_{Ar}), 56.24 (d, ²J_{C-P} = 4.1 Hz, CH₂O), 49.42 (d, 2C, ²J_{C-P} = 5.0 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂), 49.44 (2C, CH(CH₃)₂), 45.07 (CH₂N(*i*-Pr)₂), 42.82 (2C, N(CH₂CH₂Cl)₂), 40.91 (CH₂NHP), 34.58 (NCH₃), 29.64 (d, ³J_{C-P} = 6.8 Hz, CH₂CH₂NHP), 27.38 (CH₂CH₂N(*i*-Pr)₂), 20.35, 20.29 (4C, CH(CH₃)₂);

³¹P NMR (202 MHz, CD₃OD) δ 16.41;

HRMS (ESI) *m/z* 515.2067 [M+H]⁺ (calculated for [C₁₉H₃₈Cl₂N₆O₄P]⁺ 515.2064).

(1-methyl-2-nitro-1*H*-imidazol-5-yl)methyl

***N,N*-bis(2-chloroethyl)-*N'*-[3-**

(diisopropylamino)propyl]phosphorodiamidate (25c)

Starting from 500 mg (3.18 mmol) of alcohol **6**, the coupling reaction with bis(2-chloroethyl)phosphoramidic dichloride (**8**) was performed for 80 min before the addition of the prepared amine **20c** (1.00 g, 6.32 mmol). The reaction was then stopped after 60 min of stirring. The crude product was purified by silica gel chromatography (EtOAc/EtOH/NH₄OH ranging from 90/10/1 to 70/30/2, v/v/v). The concentrated eluted fraction was then repurified by silica gel chromatography (EtOAc/EtOH/NH₄OH, 85/15/1, v/v/v) to afford compound **25c** (343 mg, 0.684 mmol) as a yellow-brown oil.

Yield 22%;

Rf 0.57 (SiO₂, EtOAc/EtOH/TEA, 70/30/3, v/v/v);

IR (ATR) ν cm⁻¹ 3386, 3228, 1538, 1490, 1352, 1215, 1192, 1007, 979, 960, 834, 745;

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 7.19 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.08 (dd, 1H, ²J_{H-H} = 13.3 Hz, ³J_{H-P} = 7.3 Hz, CH'O), 4.98 (dd, 1H, ²J_{H-H} = 13.3 Hz, ³J_{H-P} = 7.0 Hz, CH''O), 4.86-4.65 (m, 1H, NHP), 4.05 (s, 3H, NCH₃), 3.66-3.56 (m, 4H, N(CH₂CH₂Cl)₂), 3.50-3.25 (m, 4H, N(CH₂CH₂Cl)₂), 3.11-2.97 (m, 4H, CH₂NHP, CH(CH₃)₂), 2.57 (t, 2H, ³J_{H-H} = 6.0 Hz, CH₂N(*i*-Pr)₂), 1.71-1.48 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂), 0.98 (d, 12H, ³J_{H-H} = 6.6 Hz, CH(CH₃)₂);

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 133.17 (d, ³J_{C-P} = 8.0 Hz, C_{Ar}CH₂), 129.14 (CH_{Ar}), 55.97 (d, ²J_{C-P} = 3.7 Hz, CH₂O), 49.65 (d, 2C, ²J_{C-P} = 4.7 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂), 47.93 (2C, CH(CH₃)₂), 44.01 (CH₂N(*i*-Pr)₂), 42.92 (2C, N(CH₂CH₂Cl)₂), 41.16 (CH₂NHP), 34.56 (NCH₃), 28.43 (d, ³J_{C-P} = 6.7 Hz, CH₂CH₂CH₂), 20.28, 20.18 (4C, CH(CH₃)₂);

³¹P NMR (202 MHz, CDCl₃) δ 15.88;

HRMS (ESI) *m/z* 501.1908 [M+H]⁺ (calculated for [C₁₈H₃₆Cl₂N₆O₄P]⁺ 501.1907).

(1-methyl-2-nitro-1*H*-imidazol-5-yl)methyl***N,N*-bis(2-chloroethyl)-*N'*-[2-****(diisopropylamino)ethyl]phosphorodiamidate (25d)**

Starting from 150 mg (0.955 mmol) of alcohol **6**, the coupling reaction with bis(2-chloroethyl)phosphoramidic dichloride (**8**) was performed for 15 min before the addition of a commercially available amine, 2-(*N,N*-diisopropylamino)ethylamine (340 μ L, 1.96 mmol). The reaction was then stopped after 15 min of stirring. The crude product was purified by silica gel chromatography (EtOAc/EtOH/TEA ranging from 95/5/0.5 to 90/10/0.75, v/v/v) to afford compound **25d** (180 mg, 0.369 mmol) as a yellow-brown oil.

Yield 39%;

Rf 0.58 (SiO₂, EtOAc/EtOH/TEA, 70/30/3, v/v/v);

IR (ATR) ν cm⁻¹ 3221, 1538, 1490, 1351, 1222, 1191, 1007, 979, 959, 834, 745;

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.19 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.10 (dd, 1H, ²*J*_{H-H} = 13.3 Hz, ³*J*_{H-P} = 7.4 Hz, CH'O), 5.01 (dd, 1H, ²*J*_{H-H} = 13.3 Hz, ³*J*_{H-P} = 7.1 Hz, CH''O), 4.06 (s, 3H, NCH₃), 3.61 (td, 4H, ³*J*_{H-H} = 6.4 Hz, ⁴*J*_{H-P} = 2.1 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂), 3.51-3.32 (m, 4H, N(CH₂CH₂Cl)₂), 3.16-3.02 (m, 2H, CH(CH₃)₂), 3.00-2.87 (m, 2H, CH₂NHP), 2.75-2.60 (m, 2H, CH₂N(*i*-Pr)₂), 1.07 (s, 12H, CH(CH₃)₂);

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 146.46 (C_{Ar}NO₂), 133.02 (d, ³*J*_{C-P} = 8.0 Hz, C_{Ar}CH₂), 129.16 (CH_{Ar}), 56.32 (d, ²*J*_{C-P} = 3.5 Hz, OCH₂), 49.37 (d, 2C, ²*J*_{C-P} = 4.7 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂), 48.99 (2C, CH(CH₃)₂), 45.54 (CH₂N(*i*-Pr)₂), 42.78 (2C, N(CH₂CH₂Cl)₂), 38.82 (CH₂NHP), 34.54 (NCH₃), 20.66, 20.22 (4C, CH(CH₃)₂);

³¹P NMR (202 MHz, CDCl₃) δ 16.92;

HRMS (ESI) *m/z* 487.1768 [M+H]⁺ (calculated for [C₁₇H₃₄Cl₂N₆O₄P]⁺ 487.1751).

(1-methyl-2-nitro-1*H*-imidazol-5-yl)methyl***N,N*-bis(2-chloroethyl)-*N'*-[5-(*N''*-benzyl-*N''*-****methylamino)pentyl]phosphorodiamidate (26a)**

Starting from 250 mg (1.59 mmol) of alcohol **6**, the coupling reaction with bis(2-chloroethyl)phosphoramidic dichloride (**8**) was performed for 80 min before the addition of the prepared amine **21a** (590 mg, 2.86 mmol). The reaction was then stopped after 5 min of stirring. The crude product was purified by silica gel chromatography (EtOAc/EtOH/TEA, 95/5/0.5, v/v/v) to afford **26a** as a yellow-brown oil (392 mg, 0.712 mmol).

Yield 45%;

Rf 0.41 (SiO₂, EtOAc/EtOH/TEA, 90/10/1, v/v/v);

IR (ATR) ν cm⁻¹ 3231, 1537, 1490, 1351, 1222, 1192, 1010, 979, 959, 834, 742, 700;

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.32-7.21 (m, 5H, CH_{Ar}), 7.20 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.08 (dd, 1H, ²*J*_{H-H} = 13.3 Hz, ³*J*_{H-P} = 7.8 Hz, CH'O), 5.02 (dd, 1H, ²*J*_{H-H} = 13.3 Hz, ³*J*_{H-P} = 7.2 Hz, CH''O), 4.06 (s, 3H, NCH₃), 3.62 (td, 4H, ³*J*_{H-H} = 6.4 Hz, ⁴*J*_{H-P} = 3.2 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂), 3.53-3.30 (m, 4H, N(CH₂CH₂Cl)₂), 3.48 (s, 2H, CH₂Ph), 2.98-2.83 (m, 2H, CH₂NHP), 2.65-2.58 (m, 1H, NH), 2.36 (t, 2H, ³*J*_{H-H} = 7.2 Hz, CH₂N(Bn)CH₃), 2.18 (s, 3H, N(Bn)CH₃), 1.59-1.41 (m, 4H, CH₂CH₂NHP, CH₂CH₂N(Bn)CH₃), 1.40-1.27 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂NHP);

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 146.50 (C_{Ar}NO₂), 138.43 (C_{Ar}CH₂N), 132.96 (d, ³*J*_{C-P} = 7.6 Hz, C_{Ar}CH₂O), 129.32, 129.20, 128.41, 127.31 (6C, CH_{Ar}), 62.32 (CH₂Ph), 57.06 (CH₂N(Bn)CH₃), 56.24 (d, ²*J*_{C-P} = 4.0 Hz, OCH₂), 49.34 (d, 2C, ²*J*_{C-P} = 4.5 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂), 42.81 (2C, N(CH₂CH₂Cl)₂), 42.15

(N(Bn)CH₃), 41.10 (CH₂NHP), 34.52 (NCH₃), 31.66 (d, ³J_{C-P} = 6.5 Hz, CH₂CH₂NHP), 26.86 (CH₂CH₂N(Bn)CH₃), 24.48 (CH₂CH₂CH₂NHP);

³¹P NMR (202 MHz, CD₃OD) δ 16.31;

HRMS (ESI) m/z 549.1927 [M+H]⁺ (calculated for [C₂₂H₃₆Cl₂N₆O₄P]⁺ 549.1907).

(1-methyl-2-nitro-1*H*-imidazol-5-yl)methyl *N,N*-bis(2-chloroethyl)-*N'*-[4-(*N''*-benzyl-*N''*-methylamino)butyl]phosphorodiamidate (26b)

Starting from 185 mg (1.18 mmol) of alcohol **6**, the coupling reaction with bis(2-chloroethyl)phosphoramidic dichloride (**8**) was performed for 30 min before the addition of the prepared amine **21b** (452 mg, 2.35 mmol). The reaction was then stopped after 5 min of stirring. The crude product was purified by silica gel chromatography (EtOAc/EtOH/TEA ranging from 95/5/0.5 to 85/15/1, v/v/v) to afford **26b** as a yellow-brown oil (239 mg, 0.446 mmol).

Yield 38%;

Rf 0.40 (SiO₂, AcOEt/EtOH/TEA, 90/10/1, v/v/v);

IR (ATR) ν cm⁻¹ 3440, 3231, 1537, 1491, 1351, 1222, 1192, 1008, 980, 960, 835, 739, 701;

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.34-7.21 (m, 5H, CH_{Ar}), 7.17 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.05 (dd, 1H, ²J_{H-H} = 13.3 Hz, ³J_{H-P} = 7.7 Hz, CH'O), 5.00 (dd, 1H, ²J_{H-H} = 13.3 Hz, ³J_{H-P} = 7.2 Hz, CH''O), 4.02 (s, 3H, NCH₃), 3.62 (td, 4H, ³J_{H-H} = 6.4 Hz, ⁴J_{H-P} = 2.8 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂), 3.55-3.34 (m, 7H, N(CH₂CH₂Cl)₂, CH₂Ph, NHP), 2.98-2.82 (m, 2H, CH₂NHP), 2.46-2.34 (m, 2H, CH₂N(Bn)CH₃), 2.18 (s, 3H, N(Bn)CH₃), 1.64-1.57 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂CH₂);

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 146.50 (C_{Ar}NO₂), 138.41 (C_{Ar}CH₂N), 132.98 (d, ³J_{C-P} = 7.8 Hz, C_{Ar}CH₂O), 129.29, 129.19, 128.46, 127.39 (6C, CH_{Ar}), 62.32 (CH₂Ph), 56.85 (CH₂N(Bn)CH₃), 56.16 (d, ²J_{C-P} = 3.9 Hz, CH₂O), 49.48 (d, ²J_{C-P} = 4.8 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂), 42.85 (N(CH₂CH₂Cl)₂), 42.05 (N(Bn)CH₃), 40.93 (CH₂NHP), 34.48 (NCH₃), 29.69 (d, ³J_{C-P} = 6.9 Hz, CH₂CH₂NHP), 24.78 (CH₂CH₂N(Bn)CH₃);

³¹P NMR (202 MHz, CD₃OD) δ 16.44;

HRMS (ESI) m/z 535.1763 [M+H]⁺ (calculated for [C₂₁H₃₄Cl₂N₆O₄P]⁺ 535.1751).

[(1-methyl-2-nitro-1*H*-imidazol-5-yl)methyl *N,N*-bis(2-chloroethyl)-*N'*-[3-(*N''*-benzyl-*N''*-methylamino)propyl]phosphorodiamidate (26c)

Starting from 198 mg (1.26 mmol) of alcohol **6**, the coupling reaction with bis(2-chloroethyl)phosphoramidic dichloride (**8**) was performed for 30 min before the addition of the prepared amine **21c** (448 mg, 2.51 mmol). The reaction was then stopped after 5 min of stirring. The crude product was purified by silica gel chromatography (EtOAc/EtOH/TEA ranging from 95/5/0.5 to 90/10/1, v/v/v), to afford **26c** as a yellow-brown oil (236 mg, 0.453 mmol).

Yield 36%;

Rf 0.44 (SiO₂, EtOAc/EtOH/TEA, 90/10/1, v/v/v);

IR (ATR) ν cm⁻¹ 3394, 3224, 1537, 1490, 1351, 1219, 1191, 1008, 978, 960, 834, 745, 700;

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.30-7.20 (m, 5H, CH_{Ar}), 7.17 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.02 (dd, 1H, ²J_{H-H} = 13.3 Hz, ³J_{H-P} = 7.3 Hz, CH'O), 4.98 (dd, 1H, ²J_{H-H} = 13.3 Hz, ³J_{H-P} = 6.9 Hz, CH''O), 4.26 (br.s, 1H, NHP), 3.98 (s, 3H, NCH₃), 3.66-3.57 (m, 4H, N(CH₂CH₂Cl)₂), 3.54-3.33 (m, 6H, CH₂Ph, N(CH₂CH₂Cl)₂), 3.12-2.92 (m,

2H, CH_2NHP), 2.53 (t, 2H, $^3J_{\text{H-H}} = 6.1$ Hz, $\text{CH}_2\text{N}(\text{Bn})\text{CH}_3$), 2.21 (s, 3H, $\text{N}(\text{Bn})\text{CH}_3$), 1.79-1.66 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$);

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 146.42 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{NO}_2$), 138.41 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{CH}_2\text{N}$), 133.01 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 8.2$ Hz, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{CH}_2\text{O}$), 129.14, 129.05, 128.44, 127.40 (6C, CH_{Ar}), 62.75 (CH_2Ph), 56.39 ($\text{CH}_2\text{N}(\text{Bn})\text{CH}_3$), 56.05 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 3.8$ Hz, CH_2O), 49.52 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 4.6$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 42.77 ($\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 42.01 ($\text{N}(\text{Bn})\text{CH}_3$), 40.79 (CH_2NHP), 34.39 (NCH_3), 27.52 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$);

^{31}P NMR (202 MHz, CD_3OD) δ 16.15; **HRMS** (ESI) m/z 521.1602 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ (calculated for $[\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{Cl}_2\text{N}_6\text{O}_4\text{P}]^+$ 521.1594).

(1-methyl-2-nitro-1*H*-imidazol-5-yl)methyl *N,N*-bis(2-chloroethyl)-*N'*-[2-(*N''*-benzyl-*N''*-methylamino)ethyl]phosphorodiamidate (26d)

Starting from 211 mg (1.34 mmol) of alcohol **6**, the coupling reaction with bis(2-chloroethyl)phosphoramidic dichloride (**8**) was performed for 40 min before the addition of the prepared amine **21d** (462 mg, 2.81 mmol). The reaction was then stopped after 5 min of stirring. The crude product was purified by silica gel chromatography ($\text{EtOAc}/\text{EtOH}/\text{TEA}$ ranging from 95/5/0.5 to 85/15/1, v/v/v), to afford **26d** as a yellow-brown oil (530 mg, 1.04 mmol).

Yield 78%;

Rf 0.36 (SiO_2 , $\text{EtOAc}/\text{EtOH}/\text{TEA}$, 90/10/1, v/v/v);

IR (ATR) ν cm^{-1} 3228, 1537, 1490, 1351, 1220, 1191, 1007, 978, 959, 834, 745, 700;

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.34-7.24 (m, 5H, CH_{Ar}), 7.19 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.03 (dd, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 13.3$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 7.6$ Hz, $\text{CH}'\text{O}$), 4.99 (dd, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 13.3$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 7.1$ Hz, $\text{CH}''\text{O}$), 4.05 (s, 3H, NCH_3), 3.61 (td, 4H, $^3J_{\text{H-H}} = 6.4$ Hz, $^4J_{\text{H-P}} = 2.4$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 3.54 (s, 2H, CH_2Ph), 3.48-3.31 (m, 4H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 3.03-2.94 (m, 2H, CH_2NHP), 2.59-2.46 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{N}(\text{Bn})\text{CH}_3$), 2.24 (s, 3H, $\text{N}(\text{Bn})\text{CH}_3$);

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 146.51 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{NO}_2$), 138.39 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{CH}_2\text{N}$), 132.97 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 7.9$ Hz, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{CH}_2\text{O}$), 129.21, 128.56, 127.55 (6C, CH_{Ar}), 62.43 (CH_2Ph), 56.95 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 7.6$ Hz, $\text{CH}_2\text{N}(\text{Bn})\text{CH}_3$), 56.22 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 4.1$ Hz, OCH_2), 49.34 (d, 2C, $^2J_{\text{C-P}} = 4.7$ Hz, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$), 42.78 (2C, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 41.90 ($\text{N}(\text{Bn})\text{CH}_3$), 38.03 (CH_2NHP), 34.50 (NCH_3);

^{31}P NMR (202 MHz, CD_3OD) δ 16.44;

HRMS (ESI) m/z 507.1439 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ (calculated for $[\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{Cl}_2\text{N}_6\text{O}_4\text{P}]^+$ 507.1438).

(1-methyl-2-nitro-1*H*-imidazol-5-yl)methyl *N,N*-bis(2-chloroethyl)-*N'*-[3-(piperidin-1-yl)propyl]phosphorodiamidate (27)

Starting from 141 mg (0.897 mmol) of alcohol **6**, the coupling reaction with bis(2-chloroethyl)phosphoramidic dichloride (**8**) was performed for 5 min before the addition of the prepared amine **22** (278 mg, 1.95 mmol). The reaction was then stopped after 25 min of stirring. The crude product was purified by silica gel chromatography ($\text{EtOAc}/\text{EtOH}/\text{TEA}$, 95/5/0.5, v/v/v) to afford **27** as a yellow-brown oil (82.4 mg; 0.169 mmol).

Yield 19%;

Rf 0.79 (SiO_2 , $\text{AcOEt}/\text{EtOH}/\text{TEA}$, 70/30/3, v/v/v);

IR (ATR) ν cm^{-1} 3202, 1669, 1537, 1490, 1351, 1220, 1191, 1008, 979, 959, 834, 745;

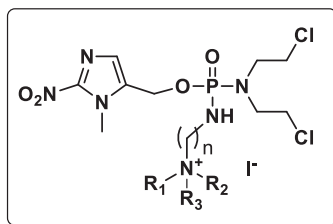
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.18 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.12 (dd, 2H, ²J_{H-H} = 13.3 Hz, ³J_{H-P} = 7.5 Hz, CH'O), 4.99 (dd, 2H, ²J_{H-H} = 13.3 Hz, ³J_{H-H} = 8.4 Hz, CH''O), 4.08 (s, 3H, NCH₃), 3.59 (td, 4H, ³J_{H-H} = 6.4 Hz, ⁴J_{H-P} = 2.5 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂), 3.48-3.28 (m, 4H, N(CH₂CH₂Cl)₂), 3.04-2.90 (m, 2H, CH₂NHP), 2.79-2.59 (m, 6H, CH₂N(CH₂CH₂)₂), 1.84-1.76 (m, 2H, CH₂CH₂NHP), 1.76-1.65 (m, 4H, (CH₂CH₂)₂CH₂), 1.55-1.49 (br m, 2H, N(CH₂CH₂)₂CH₂);

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 146.44 (C_{Ar}NO₂), 133.24 (d, ³J_{C-P} = 7.4 Hz, C_{Ar}CH₂), 129.05 (C_{Ar}), 56.41 (d, ²J_{C-P} = 4.1 Hz, CH₂O), 56.35 (CH₂N(CH₂CH₂)₂), 54.07 (2C, N(CH₂CH₂)₂), 49.46 (d, 2C, ²J_{C-P} = 4.8 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂), 42.75 (2C, N(CH₂CH₂Cl)₂), 39.46 (CH₂NHP), 34.60 (NCH₃), 26.03 (d, ³J_{C-P} = 5.9 Hz, CH₂CH₂NHP), 24.47 (2C, N(CH₂CH₂)₂CH₂), 23.26 (N(CH₂CH₂)₂CH₂);

³¹P NMR (202 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 16.15;

HRMS (ESI) m/z 485.1596 [M+H]⁺ (calculated for [C₁₇H₃₂Cl₂N₆O₄P]⁺ 485.1594).

General procedure for the synthesis of targeted prodrugs 28 to 32



To a solution of amine **23-27** (1 eq.) in anhydrous ACN (5 mL for 50-100 mg of amine) under an inert atmosphere, was added potassium carbonate (2.5 eq) and appropriate alkyl iodide (5-24 eq.). Stirring was maintained at rt in a sealed flask for several hours until TLC monitoring showed total conversion of the initial product (further addition of alkyl iodide was sometimes necessary). The suspension was filtered and the precipitate was thoroughly washed with ACN. After evaporation of the filtrate, the residue was dissolved in acetone (10 mL for 50 mg of amine) and the mixture was filtered to remove the remaining potassium carbonate. After evaporation to dryness under reduced pressure, the corresponding quaternary ammoniums **28-32** were obtained analytically pure or purified by preparative high performance liquid chromatography and lyophilised.

3-({[bis(2-chloroethyl)amino][(1-methyl-2-nitro-1H-imidazol-5-yl)methoxy]phosphoryl} amino)-*N,N,N*-trimethylpropane-1-aminium iodide (ICF05016)

Alkylation of amine **23c** (600 mg, 3.81 mmol) with methyl iodide (5 eq.) using the standard procedure (reaction time: 24 h) and purification by preparative high performance liquid chromatography (gradient ACN in water) afforded compound **ICF05016** as a hygroscopic lyophilisate (435 mg, 0.741 mmol).

Yield 78%;

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 7.27 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.19 (dd, 1H, ³J_{H-P} = 8.4 Hz, ²J_{H-H} = 13.4 Hz, CH'O), 5.15 (dd, 1H, ³J_{H-P} = 8.5 Hz, ²J_{H-H} = 13.4 Hz, CH''O), 3.08 (s, 3H, NCH₃), 3.74–3.65 (m, 4H, N(CH₂CH₂Cl)₂), 3.52–3.36 (m, 6H, N(CH₂CH₂Cl)₂, CH₂N⁺), 3.17 (s, 9H, N⁺(CH₃)₃), 3.01 (td, 2H, ³J_{H-P} = 12.5 Hz, ³J_{H-H} = 6.5 Hz, CH₂NHP), 2.06-1.93 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂);

¹³C NMR (CD₃OD, 50 MHz) δ 147.61 (C_{Ar}NO₂), 134.95 (d, ³J_{C-P} = 7.3 Hz, C_{Ar}CH₂), 129.34 (CH_{Ar}), 65.76 (CH₂N⁺), 57.96 (d, ²J_{C-P} = 4.7 Hz, OCH₂), 53.98, 53.90, 53.83 (N⁺(CH₃)₃), 50.04 (d, 2C, ²J_{C-P} = 4.7 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂), 43.24 (d, 2C, ³J_{C-P} = 1.3 Hz, (N(CH₂CH₂Cl)₂), 38.75 (NHCH₂), 35.50 (NCH₃), 26.25 (d, ³J_{C-P} = 5.1 Hz, CH₂CH₂CH₂);

³¹P NMR (CD₃OD, 202 MHz) δ 18.04 ppm;

HRMS (ESI) m/z 459.1443 [M]⁺ (calculated for [C₁₅H₃₀Cl₂N₆O₄P]⁺ 459.1443).

5-([bis(2-chloroethyl)amino][(1-methyl-2-nitro-1*H*-imidazol-5-yl)methoxy]phosphoryl)amino)-*N,N,N*-trimethylpentane-1-aminium iodide (28a)

Alkylation of amine **23a** (34 mg, 71.8 μ mol) with methyl iodide (24 eq.) using the standard procedure (reaction time: 4 h) afforded compound **28a** analytically pure, as a yellow hygroscopic solid (43 mg, 69.2 μ mol).

Yield 96%;

IR (ATR) ν cm⁻¹ 3426, 3230, 1537, 1489, 1349, 1219, 1190, 1007, 960, 835, 743;

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 7.25 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.16 (dd, 2H, ²*J*_{H-H} = 13.3 Hz, ³*J*_{H-P} = 8.2 Hz, CH'O), 5.12 (dd, 2H, ²*J*_{H-H} = 13.3 Hz, ³*J*_{H-H} = 8.8 Hz, CH''O), 4.07 (s, 3H, NCH₃), 3.67 (td, 4H, ³*J*_{H-H} = 7.0 Hz, ⁴*J*_{H-P} = 2.3 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂), 3.54-3.32 (m, 8H, N(CH₂CH₂Cl)₂, CH₂N⁺), 3.19 (s, 9H, N⁺(CH₃)₃), 2.96-2.84 (m, 2H, CH₂NHP), 1.84-1.77 (m, 2H, CH₂CH₂N⁺), 1.59 (qt, 2H, ³*J*_{H-H} = 7.2 Hz, CH₂CH₂NHP), 1.41 (qt, 2H, ³*J*_{H-H} = 7.5 Hz, CH₂CH₂CH₂NHP);

¹³C NMR (126 MHz, CD₃OD) δ 147.64 (C_{Ar}NO₂), 135.10 (d, ³*J*_{C-P} = 6.8 Hz, C_{Ar}CH₂), 129.27 (CH_{Ar}), 67.81 (CH₂N⁺), 57.73 (d, ²*J*_{C-P} = 4.7 Hz, OCH₂), 53.75, 53.72, 53.68 (N⁺(CH₃)₃), 50.30 (d, 2C, ²*J*_{C-P} = 4.6 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂), 43.24 (2C, N(CH₂CH₂Cl)₂), 41.37 (CH₂NHP), 35.23 (NCH₃), 32.19 (d, ³*J*_{C-P} = 5.5 Hz, CH₂CH₂NHP), 24.37 (CH₂CH₂CH₂NHP), 23.58 (CH₂CH₂N⁺);

³¹P NMR (202 MHz, CD₃OD) δ 18.28;

HRMS (ESI) *m/z* 487.1744 [M]⁺ (calculated for [C₁₇H₃₄Cl₂N₆O₄P]⁺ 487.1751).

4-([bis(2-chloroethyl)amino][(1-methyl-2-nitro-1*H*-imidazol-5-yl)methoxy]phosphoryl)amino)-*N,N,N*-trimethylbutane-1-aminium iodide (28b)

Alkylation of amine **23b** (78 mg, 0.171 mmol) with methyl iodide (12 eq.) using the standard procedure (reaction time: 4 h), afforded compound **28b** analytically pure, as a yellow hygroscopic solid (95 mg, 0.158 mmol).

Yield 92%;

IR (ATR) ν cm⁻¹ 3404, 3223, 1537, 1488, 1349, 1217, 1190, 1009, 960, 835, 743;

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 7.25 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.21-5.07 (m, 2H, OCH₂), 4.07 (s, 3H, NCH₃), 3.74-3.61 (m, 4H, N(CH₂CH₂Cl)₂), 3.55-3.34 (m, 6H, N(CH₂CH₂Cl)₂, CH₂N⁺), 3.15 (s, 9H, N⁺(CH₃)₃), 3.01-2.88 (m, 2H, CH₂NHP), 1.89-1.77 (m, 2H, CH₂CH₂N⁺), 1.63-1.50 (CH₂CH₂NHP);

¹³C NMR (126 MHz, CD₃OD) δ 147.64 (C_{Ar}NO₂), 135.06 (d, ³*J*_{C-P} = 7.2 Hz, C_{Ar}CH₂), 129.26 (CH_{Ar}), 67.50 (CH₂N⁺), 57.78 (d, ²*J*_{C-P} = 4.8 Hz, OCH₂), 53.78, 53.76, 53.72 (N⁺(CH₃)₃), 50.23 (d, 2C, ²*J*_{C-P} = 4.7 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂), 43.23 (2C, N(CH₂CH₂Cl)₂), 41.05 (CH₂NHP), 35.25 (NCH₃), 29.41 (d, ³*J*_{C-P} = 4.6 Hz, CH₂CH₂NHP), 21.36 (CH₂CH₂N⁺);

³¹P NMR (202 MHz, CD₃OD) δ 18.25;

HRMS (ESI) *m/z* 473.1603 [M]⁺ (calculated for [C₁₆H₃₂Cl₂N₆O₄P]⁺ 473.1594).

2-([bis(2-chloroethyl)amino][(1-methyl-2-nitro-1*H*-imidazol-5-yl)methoxy]phosphoryl)amino)-*N,N,N*-trimethylethane-1-aminium iodide (28c)

Alkylation of amine **23d** (114 mg, 0.264 mmol) with methyl iodide (5 eq.) using the standard procedure (reaction time: 24 h) and purification by preparative high performance liquid chromatography (gradient ACN in water) afforded compound **28c** as a hygroscopic lyophilisate (116 mg, 0.202 mmol).

Yield 77%;

IR (ATR) ν cm⁻¹ 3436, 3196, 1537, 1488, 1350, 1222, 1190, 1005, 959, 835, 744;

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 7.27 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.20 (dd, 2H, ²J_{H-H} = 13.4 Hz, ³J_{H-P} = 8.4 Hz, CH'O), 5.17 (dd, 2H, ²J_{H-H} = 13.4 Hz, ³J_{H-H} = 8.3 Hz, CH''O), 4.08 (s, 3H, NCH₃), 3.75-3.66 (m, 4H, N(CH₂CH₂Cl)₂), 3.55-3.35 (m, 8H, N(CH₂CH₂Cl)₂, CH₂CH₂N⁺), 3.22 (s, 9H, N⁺(CH₃)₃);

¹³C NMR (126 MHz, CD₃OD) δ 147.73 (C_{Ar}NO₂), 134.64 (d, ³J_{C-P} = 7.3 Hz, C_{Ar}CH₂), 129.37 (CH_{Ar}), 67.47 (CH₂N⁺), 58.08 (d, ²J_{C-P} = 4.7 Hz, OCH₂), 54.35, 54.38, 54.41 (N⁺(CH₃)₃), 50.23 (d, 2C, ²J_{C-P} = 4.7 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂), 43.23 (2C, N(CH₂CH₂Cl)₂), 41.05 (CH₂NHP), 35.25 (NCH₃), 29.41 (d, ³J_{C-P} = 4.6 Hz, CH₂CH₂NHP), 21.36 (CH₂CH₂N⁺);

³¹P NMR (202 MHz, CD₃OD) δ 17.72;

HRMS (ESI) *m/z* 445.1279 [M]⁺ (calculated for [C₁₄H₂₈Cl₂N₆O₄P]⁺ 445.1281).

5-([bis(2-chloroethyl)amino][(1-methyl-2-nitro-1*H*-imidazol-5-yl)methoxy]phosphoryl)amino)-*N*-ethyl-*N,N*-dimethylpentane-1-aminium iodide (28d)

Alkylation of amine **23c** (38 mg, 81.5 μ mol) with ethyl iodide (12 eq. initially followed by 12 eq after 24 h) using the standard procedure (reaction time: 36 h) afforded compound **28d** analytically pure, as a yellow hygroscopic solid (36 mg, 56.7 μ mol).

Yield 70%;

IR (ATR) ν cm⁻¹ 3420, 3235, 1537, 1489, 1350, 1216, 1190, 1007, 976, 960, 835, 770, 744;

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 7.25 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.16 (dd, 1H, ²J_{H-H} = 13.5 Hz, ³J_{H-P} = 8.3 Hz, OCH'), 5.12 (dd, 1H, ²J_{H-H} = 13.5 Hz, ³J_{H-P} = 8.7 Hz, OCH''), 4.08 (s, 3H, NCH₃), 3.71-3.62 (m, 4H, N(CH₂CH₂Cl)₂), 3.51-3.33 (m, 6H, N(CH₂CH₂Cl)₂, CH₂CH₃), 3.34-3.28 (m, 2H, CH₂N⁺(CH₃)₂CH₂CH₃), 3.08 (s, 6H, N⁺(CH₃)₂), 2.98-2.85 (m, 2H, CH₂NHP), 1.83-1.72 (m, 2H, CH₂CH₂N⁺), 1.59 (qt, 2H, ³J_{H-H} = 7.0 Hz, CH₂CH₂NHP), 1.46-1.34 (m, 5H, CH₂CH₃, CH₂CH₂CH₂NHP);

¹³C NMR (126 MHz, CD₃OD) δ 147.64 (C_{Ar}NO₂), 135.11 (d, ³J_{C-P} = 7.0 Hz, C_{Ar}CH₂), 129.28 (CH_{Ar}), 64.87 (CH₂CH₂N⁺), 60.92 (N⁺(CH₃)₂CH₂CH₃), 57.73 (d, ²J_{C-P} = 4.6 Hz, OCH₂), 50.80 (2C, N⁺(CH₃)₂), 50.31 (d, 2C, ²J_{C-P} = 4.6 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂), 43.25 (2C, N(CH₂CH₂Cl)₂), 41.39 (CH₂NHP), 35.24 (NCH₃), 32.20 (d, ³J_{C-P} = 5.4 Hz, CH₂CH₂NHP), 24.45 (CH₂CH₂CH₂NHP), 23.17 (CH₂CH₂N⁺), 8.51 (CH₂CH₃);

³¹P NMR (202 MHz, CD₃OD) δ 18.26;

HRMS (ESI) *m/z* 501.1908 [M]⁺ (calculated for [C₁₈H₃₆Cl₂N₆O₄P]⁺ 501.1907).

4.1.4.5.

4-([bis(2-chloroethyl)amino][(1-methyl-2-nitro-1*H*-imidazol-5-yl)methoxy]phosphoryl)amino)-*N*-ethyl-*N,N*-dimethylbutane-1-aminium iodide (28e)

Alkylation of amine **23b** (107 mg, 233 μmol) with ethyl iodide (12 eq.) using the standard procedure (reaction time: 4 h) and purification by preparative high performance liquid chromatography (gradient ACN in water) afforded compound **28e** as a hygroscopic lyophilisate (99 mg, 161 μmol).

Yield 69%;

IR (ATR) ν cm^{-1} 3383, 3255, 1537, 1489, 1350, 1216, 1191, 1011, 980, 960, 835, 744;

^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 7.26 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.16 (dd, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 13.4$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 8.3$ Hz, OCH'), 5.12 (dd, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 13.4$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 8.5$ Hz, OCH''), 4.07 (s, 3H, NCH_3), 3.72-3.63 (m, 4H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 3.52-3.35 (m, 6H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$, CH_2CH_3), 3.34-3.29 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3.07 (s, 6H, $\text{N}^+(\text{CH}_3)_2$), 2.95 (td, 2H, $^3J_{\text{H-P}} = 11.4$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 6.8$ Hz, CH_2NHP), 1.85-1.76 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+$), 1.56 (qt, 2H, $^3J_{\text{H-H}} = 7.0$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHP}$), 1.40-1.35 (m, 3H, CH_2CH_3);

^{13}C NMR (126 MHz, CD_3OD) δ 147.65 (C_{ArNO_2}), 135.00 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 7.1$ Hz, C_{ArCH_2}), 129.19 (CH_{Ar}), 64.46 (CH_2N^+), 60.88 (CH_2CH_3), 57.72 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 4.7$ Hz, OCH_2), 50.72 (2C, $\text{N}^+(\text{CH}_3)_2$), 50.17 (d, 2C, $^2J_{\text{C-P}} = 4.7$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 43.17 (2C, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 41.06 (CH_2NHP), 35.21 (NCH_3), 29.50 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 5.0$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHP}$), 20.90 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHP}$), 8.46 (CH_2CH_3);

^{31}P NMR (202 MHz, CD_3OD) δ 18.25;

HRMS (ESI) m/z 487.1747 $[\text{M}]^+$ (calculated for $[\text{C}_{17}\text{H}_{34}\text{Cl}_2\text{N}_6\text{O}_4\text{P}]^+$ 487.1751).

3-({[bis(2-chloroethyl)amino][(1-methyl-2-nitro-1*H*-imidazol-5-yl)methoxy]phosphoryl}amino)-*N*-ethyl-*N,N*-dimethylpropane-1-aminium iodide (**28f**)

Alkylation of amine **23c** (55 mg, 123 μmol) with ethyl iodide (24 eq.) using the standard procedure (reaction time: 24 h) afforded compound **28f** analytically pure, as a yellow hygroscopic solid (68.0 mg, 113 μmol).

Yield 92%; IR (ATR) ν cm^{-1} 3359, 1490, 1351, 1215, 1192, 1008, 961, 836, 744;

^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 7.28 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.20 (dd, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 13.5$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 8.6$ Hz, OCH'), 5.15 (dd, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 13.5$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 8.6$ Hz, OCH''), 4.08 (s, 3H, NCH_3), 3.74-3.64 (m, 4H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 3.53-3.36 (m, 8H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$, $\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3.10 (s, 6H, $\text{N}^+(\text{CH}_3)_2$), 3.02 (td, 2H, $^3J_{\text{H-P}} = 12.4$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 6.4$ Hz, CH_2NHP), 2.05-1.94 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.46-1.34 (m, 3H, CH_2CH_3);

^{13}C NMR (126 MHz, CD_3OD) δ 147.66 (C_{ArNO_2}), 134.99 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 7.3$ Hz, C_{ArCH_2}), 129.34 (CH_{Ar}), 62.83 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+$), 61.15 (CH_2CH_3), 57.93 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 4.7$ Hz, OCH_2), 51.03 (2C, $\text{N}^+(\text{CH}_3)_2$), 50.11 (d, 2C, $^2J_{\text{C-P}} = 4.6$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 43.24 (2C, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 38.83 (CH_2NHP), 35.36 (NCH_3), 25.89 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 4.8$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 8.58 (CH_2CH_3);

^{31}P NMR (202 MHz, CD_3OD) δ (ppm) 17.26;

HRMS (ESI) m/z 473.1595 $[\text{M}]^+$ (calculated for $[\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{Cl}_2\text{N}_6\text{O}_4\text{P}]^+$ 473.1594).

2-({[bis(2-chloroethyl)amino][(1-methyl-2-nitro-1*H*-imidazol-5-yl)methoxy]phosphoryl}amino)-*N*-ethyl-*N,N*-dimethylethane-1-aminium iodide (**28g**)

Alkylation of amine **23d** (114 mg, 0.264 mmol) with ethyl iodide (12 eq.) using the standard procedure (reaction time: 24 h) and purification by preparative high performance liquid

chromatography (gradient ACN in water) afforded compound **28g** as a hygroscopic lyophilisate (102 mg, 0.174 mmol).

Yield 70%;

IR (ATR) ν cm⁻¹ 3400, 3192, 1537, 1488, 1350, 1223, 1191, 1005, 974, 959, 835, 744;

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 7.28 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.20 (dd, 2H, ²J_{H-H} = 13.4 Hz, ³J_{H-P} = 8.4 Hz, CH'O), 5.17 (dd, 2H, ²J_{H-H} = 13.4 Hz, ³J_{H-H} = 8.4 Hz, CH''O), 4.08 (s, 3H, NCH₃), 3.74-3.68 (m, 4H, N(CH₂CH₂Cl)₂), 3.53-3.33 (m, 10H, N(CH₂CH₂Cl)₂, CH₂CH₂N⁺CH₂), 3.14 (s, 6H, N⁺(CH₃)₂), 1.42-1.36 (m, 3H, CH₂CH₃);

¹³C NMR (126 MHz, CD₃OD) δ 147.73 (C_{Ar}NO₂), 134.66 (d, ³J_{C-P} = 7.2 Hz, C_{Ar}CH₂), 129.39 (CH_{Ar}), 64.36 (CH₂CH₂N⁺), 61.65 (CH₂CH₃), 58.10 (d, ²J_{C-P} = 4.9 Hz, OCH₂), 51.46, 51.44 (N⁺(CH₃)₂), 49.95 (d, 2C, ²J_{C-P} = 4.8 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂), 43.15 (2C, N(CH₂CH₂Cl)₂), 35.74 (CH₂NHP), 35.29 (NCH₃), 8.53 (CH₂CH₃);

³¹P NMR (202 MHz, CD₃OD) δ 17.73;

HRMS (ESI) m/z 459.1427 [M]⁺ (calculated for [C₁₅H₃₀Cl₂N₆O₄P]⁺ 459.1438).

5-([bis(2-chloroethyl)amino][(1-methyl-2-nitro-1*H*-imidazol-5-yl)methoxy]phosphoryl)amino)-*N,N*-diethyl-*N*-methylpentane-1-aminium iodide (29a**)**

Alkylation of amine **24a** (148 mg, 295 μ mol) with methyl iodide (12 eq.) using the standard procedure (reaction time: 12 h) afforded compound **29a** analytically pure, as a yellow hygroscopic solid (168 mg, 261 μ mol).

Yield 88%;

IR (ATR) ν cm⁻¹ 3410, 3216, 1537, 1489, 1349, 1216, 1190, 1008, 978, 959, 834, 769, 743;

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 7.25 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.16 (dd, 1H, ²J_{H-H} = 13.4 Hz, ³J_{H-P} = 8.3 Hz, CH'O), 5.12 (dd, 1H, ²J_{H-H} = 13.4 Hz, ³J_{H-P} = 8.7 Hz, CH''O), 4.08 (s, 3H, NCH₃), 3.71-3.62 (m, 4H, N(CH₂CH₂Cl)₂), 3.50-3.35 (m, 5H, N(CH₂CH₂Cl)₂, NHP), 3.39 (q, 4H, ³J_{H-H} = 7.3 Hz, N⁺(CH₂CH₃)₂), 3.30-3.24 (m, 2H, CH₂CH₂N⁺), 3.00 (s, 3H, N⁺CH₃), 2.91 (tdd, 2H, ³J_{H-P} = 11.2 Hz, ³J_{H-H} = 6.8 Hz, ³J_{H-H} = 1.5 Hz, CH₂NHP), 1.80-1.70 (m, 2H, CH₂CH₂N⁺), 1.59 (qt, 2H, ³J_{H-H} = 7.2 Hz, CH₂CH₂NHP), 1.47-1.38 (m, 8H, CH₂CH₂CH₂NHP), 1.38-1.32 (m, 6H, N⁺(CH₂CH₃)₂);

¹³C NMR (126 MHz, CD₃OD) δ 147.65 (C_{Ar}NO₂), 135.11 (d, ³J_{C-P} = 7.0 Hz, C_{Ar}CH₂), 129.28 (CH_{Ar}), 61.78 (CH₂CH₂N⁺), 57.67 (2C, N⁺(CH₂CH₃)₂), 57.72 (d, ²J_{C-P} = 5.0 Hz, OCH₂), 50.31 (d, 2C, ²J_{C-P} = 4.7 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂), 47.83 (N⁺CH₃), 43.25 (2C, N(CH₂CH₂Cl)₂), 41.40 (CH₂NHP), 35.25 (NCH₃), 32.21 (d, ³J_{C-P} = 5.5 Hz, CH₂CH₂NHP), 24.51 (CH₂CH₂CH₂NHP), 22.80 (CH₂CH₂N⁺), 8.18 (2C, N⁺(CH₂CH₃)₂);

HRMS (ESI) m/z 515.2073 [M]⁺ (calculated for [C₁₉H₃₈Cl₂N₆O₄P]⁺ 515.2064).

4-([bis(2-chloroethyl)amino][(1-methyl-2-nitro-1*H*-imidazol-5-yl)methoxy]phosphoryl)amino)-*N,N*-diethyl-*N*-methylbutane-1-aminium iodide (29b**)**

Alkylation of amine **24b** (27 mg, 55.4 μ mol) with methyl iodide (12 eq.) using the standard procedure (reaction time: 24 h) afforded compound **29b** analytically pure, as a yellow hygroscopic solid (30 mg, 47.7 μ mol).

Yield 86%;

IR (ATR) ν cm⁻¹ 3419, 3208, 1537, 1490, 1350, 1217, 1191, 1012, 836, 744;

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 7.25 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.16 (dd, 1H, ²J_{H-H} = 13.3 Hz, ³J_{H-P} = 8.3 Hz, CH'O), 5.12 (dd, 1H, ²J_{H-H} = 13.3 Hz, ³J_{H-P} = 8.6 Hz, CH''O), 4.07 (s, 3H, NCH₃), 3.68 (td, 4H, ³J_{H-H} = 7.1 Hz, ⁴J_{H-P} = 2.7 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂), 3.51-3.33 (m, 8H, N(CH₂CH₂Cl)₂, N⁺(CH₂CH₃)₂), 3.29-3.22 (m, 2H, CH₂CH₂N⁺), 3.00 (s, 3H, N⁺CH₃), 2.94 (td, 2H, ³J_{H-H} = 6.8 Hz, ³J_{H-P} = 11.6 Hz, CH₂NHP), 1.82-1.71 (m, 2H, CH₂CH₂N⁺), 1.55 (qt, 2H, ³J_{H-H} = 7.8 Hz, CH₂CH₂NHP), 1.34 (t, 6H, ³J_{H-H} = 7.2 Hz, N⁺(CH₂CH₃)₂);
¹³C NMR (126 MHz, CD₃OD) δ 147.67 (C_{Ar}NO₂), 135.03 (d, ³J_{C-P} = 7.2 Hz, C_{Ar}CH₂), 129.25 (CH_{Ar}), 61.53 (CH₂N⁺), 57.76 (d, ²J_{C-P} = 4.9 Hz, OCH₂), 57.70 (2C, N⁺(CH₂CH₃)₂), 50.24 (d, 2C, ²J_{C-P} = 4.7 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂), 47.81 (N⁺CH₃), 43.22 (2C, N(CH₂CH₂Cl)₂), 41.12 (CH₂NHP), 35.22 (NCH₃), 29.54 (d, ³J_{C-P} = 4.6 Hz, CH₂CH₂NHP), 20.62 (CH₂CH₂N⁺), 8.15 (2C, N⁺(CH₂CH₃)₂);
³¹P NMR (202 MHz, CD₃OD) δ 18.32;
HRMS (ESI) m/z 501.1906 [M]⁺ (calculated for [C₁₈H₃₆Cl₂N₆O₄P]⁺ 501.1907).

5-([bis(2-chloroethyl)amino][(1-methyl-2-nitro-1*H*-imidazol-5-yl)methoxy]phosphoryl)amino)-*N,N*-diethyl-*N*-methylpropane-1-aminium iodide (29c)

Alkylation of amine **24c** (52 mg, 109 μmol) with methyl iodide (6 eq.) using the standard procedure (reaction time: 4 h) afforded compound **29c** analytically pure, as a yellow hygroscopic solid (63 mg, 102 mmol);

Yield 93%;

IR (ATR) ν cm⁻¹ 3338, 3210, 1537, 1489, 1350, 1219, 1190, 1008, 978, 960, 835, 745;

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 7.28 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.19 (dd, 1H, ²J_{H-H} = 13.4 Hz, ³J_{H-P} = 8.2 Hz, CH'O), 5.15 (dd, 1H, ²J_{H-H} = 13.4 Hz, ³J_{H-P} = 8.4 Hz, CH''O), 4.08 (s, 3H, NCH₃), 3.73-3.66 (m, 4H, N(CH₂CH₂Cl)₂), 3.50-3.35 (m, 10H, N(CH₂CH₂Cl)₂, CH₂N⁺(CH₂CH₃)₂), 3.05-2.97 (m, 2H, CH₂NHP), 3.02 (s, 3H, N⁺CH₃), 2.00-1.90 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂), 1.36 (t, 6H, ³J_{H-H} = 7.2 Hz, N⁺(CH₂CH₃)₂);

¹³C NMR (126 MHz, CD₃OD) δ 147.65 (C_{Ar}NO₂), 134.94 (d, ³J_{C-P} = 7.3 Hz, C_{Ar}CH₂), 129.32 (CH_{Ar}), 59.75 (CH₂CH₂N⁺), 57.92 (2C, N⁺(CH₂CH₃)₂), 57.89 (OCH₂), 50.09 (d, 2C, ²J_{C-P} = 4.7 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂), 47.99 (N⁺CH₃), 43.22 (2C, N(CH₂CH₂Cl)₂), 38.84 (CH₂NHP), 35.32 (NCH₃), 25.51 (d, ³J_{C-P} = 5.0 Hz, CH₂CH₂CH₂), 8.22 (2C, N⁺(CH₂CH₃)₂);

³¹P NMR (202 MHz, CD₃OD) δ 18.03;

HRMS (ESI) m/z 487.1750 [M]⁺ (calculated for [C₁₇H₃₄Cl₂N₆O₄P]⁺ 487.1751).

2-([bis(2-chloroethyl)amino][(1-methyl-2-nitro-1*H*-imidazol-5-yl)methoxy]phosphoryl)amino)-*N,N*-diethyl-*N*-methylethane-1-aminium iodide (29d)

Alkylation of amine **24d** (100 mg, 218 μmol) with methyl iodide (12 eq.) using the standard procedure (reaction time: 25 h) and purification by preparative high performance liquid chromatography (gradient ACN in water) afforded compound **29d** as a hygroscopic lyophilisate (104 mg, 173 μmol).

Yield 79%;

IR (ATR) ν cm⁻¹ 3433, 3195, 1537, 1489, 1350, 1223, 1190, 1006, 977, 960, 835, 772, 745;

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 7.29 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.20 (dd, 1H, ²J_{H-H} = 13.4 Hz, ³J_{H-P} = 8.4 Hz, CH'O), 5.17 (dd, 1H, ²J_{H-H} = 13.4 Hz, ³J_{H-P} = 8.4 Hz, CH''O), 4.08 (s, 3H, NCH₃), 3.75-3.65 (m, 4H,

$\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$, 3.52-3.32 (m, 12H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 3.06 (s, 3H, N^+CH_3), 1.36 (t, 6H, $^3J_{\text{H-H}} = 7.2$ Hz, $\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$);

^{13}C NMR (126 MHz, CD_3OD) δ 147.73 (C_{ArNO_2}), 134.70 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 6.8$ Hz, C_{ArCH_2}), 129.40 (CH_{Ar}), 61.25 ($\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2\text{CH}_3$), 58.37 (2C, $\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 58.08 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 4.5$ Hz, OCH_2), 49.86 (d, 2C, $^2J_{\text{C-P}} = 4.5$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 48.55 (N^+CH_3), 43.14 (2C, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 35.40 (CH_2NHP), 35.25 (NCH_3), 8.15 (2C, $\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$);

^{31}P NMR (202 MHz, CD_3OD) δ 17.70;

HRMS (ESI) m/z 473.1599 $[\text{M}]^+$ (calculated for $[\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{Cl}_2\text{N}_6\text{O}_4\text{P}]^+$ 473.1594).

5-({[bis(2-chloroethyl)amino][(1-methyl-2-nitro-1*H*-imidazol-5-yl)methoxy]phosphoryl}amino)-*N,N,N*-triethylpentane-1-aminium iodide (29e)

Alkylation of amine **24a** (124 mg, 247 μmol) with ethyl iodide (6 eq. initially followed by 6 eq at T 4h and 6 eq at T 6h) using the standard procedure (reaction time: 16 h) afforded compound **29e** analytically pure, as a yellow hygroscopic solid (146 mg, 222 μmol).

Yield 90%;

IR (ATR) ν cm^{-1} 3416, 3210, 1537, 1488, 1349, 1217, 1189, 1004, 978, 959, 835, 772, 744;

^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 7.26 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.17 (dd, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 13.4$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 8.3$ Hz, $\text{CH}'\text{O}$), 5.12 (dd, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 13.4$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 8.6$ Hz, $\text{CH}''\text{O}$), 4.08 (s, 3H, NCH_3), 3.70-3.62 (m, 4H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 3.50-3.32 (m, 4H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 3.35 (q, 6H, $^3J_{\text{H-H}} = 7.2$ Hz, $\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), 3.24-3.20 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+$), 2.91 (td, 2H, $^3J_{\text{H-P}} = 11.1$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 6.8$ Hz, CH_2NHP), 1.75-1.68 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+$), **1.60 (qt, 2H, $^3J_{\text{H-H}} = 7.1$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHP}$)**, 1.50-1.38 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHP}$), 1.31 (m, 9H, $\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$);

^{13}C NMR (126 MHz, CD_3OD) δ 147.61 (C_{ArNO_2}), 135.12 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 7.2$ Hz, C_{ArCH_2}), 129.29 (CH_{Ar}), 58.15 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+$), 57.73 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 4.6$ Hz, OCH_2), 54.04 (3C, $\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), 50.31 (d, 2C, $^2J_{\text{C-P}} = 4.7$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 43.29 (2C, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 41.42 (CH_2NHP), 35.30 (NCH_3), 32.20 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 5.4$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHP}$), 24.55 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHP}$), 22.43 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+$), 7.89 (3C, $\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$);

^{31}P NMR (202 MHz, CD_3OD) δ 18.40;

HRMS (ESI) m/z 529.2231 $[\text{M}]^+$ (calculated for $[\text{C}_{20}\text{H}_{40}\text{Cl}_2\text{N}_6\text{O}_4\text{P}]^+$ 529.2220).

4-({[bis(2-chloroethyl)amino][(1-methyl-2-nitro-1*H*-imidazol-5-yl)methoxy]phosphoryl}amino)-*N,N,N*-triethylbutane-1-aminium iodide (29f)

Alkylation of amine **24b** (28 mg, 57.8 μmol) with ethyl iodide (18 eq. initially followed by 18 eq after 15 h) using the standard procedure (reaction time: 56 h) afforded compound **29f** analytically pure, as a yellow hygroscopic solid (28 mg, 43.5 μmol).

Yield 78%;

IR (ATR) ν cm^{-1} 3414, 3255, 1537, 1488, 1350, 1221, 1190, 1007, 835, 744;

^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 7.26 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.21-5.09 (m, 2H, CH_2O), 4.08 (s, 3H, NCH_3), 3.73-3.61 (m, 4H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 3.52-3.32 (m, 4H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 3.35 (q, 6H, $^3J_{\text{H-H}} = 7.3$ Hz,

$\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), 3.24-3.19 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+$), 2.96 (td, 2H, $^3J_{\text{H-P}} = 11.4$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 6.7$ Hz, CH_2NHP), 1.79-1.72 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+$), 1.63-1.53 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHP}$), 1.36-1.28 (m, 9H, $\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$); **^{13}C NMR (126 MHz, CD_3OD) δ** 147.65 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{NO}_2$), 135.04 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 7.3$ Hz, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{CH}_2$), 129.26 (CH_{Ar}), 57.92 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+$), 57.76 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 4.6$ Hz, OCH_2), 54.07 (3C, $\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), 50.24 (d, 2C, $^2J_{\text{C-P}} = 4.6$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 43.25 (2C, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 41.19 (CH_2NHP), 35.27 (NCH_3), 29.56 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 4.7$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHP}$), 20.29 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+$), 7.85 (3C, $\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$); **^{31}P NMR (202 MHz, CD_3OD) δ 18.34;** **HRMS (ESI) m/z 515.2049 $[\text{M}]^+$ (calculated for $[\text{C}_{19}\text{H}_{38}\text{Cl}_2\text{N}_6\text{O}_4\text{P}]^+$ 515.2064).**

3-({[bis(2-chloroethyl)amino][(1-methyl-2-nitro-1*H*-imidazol-5-yl)methoxy]phosphoryl}amino)-*N,N,N*-triethylpropane-1-aminium iodide (29g)

Alkylation of amine **24c** (19 mg, 39.7 μmol) with ethyl iodide (12 eq. initially followed by 12 eq at T 24h and 12 eq at T 36h) using the standard procedure (reaction time: 72 h) and purification by preparative high performance liquid chromatography (gradient ACN in water) afforded compound **29g** as a hygroscopic lyophilisate.

Yield 23%;

IR (ATR) ν cm^{-1} 3431, 3229 (ν_{NH}), 1537 (δ_{NH}), 1489 (ν_{asNO_2}), 1351 (ν_{sNO_2}), 1215, 1190 ($\nu_{\text{P=O}}$, $\nu_{\text{C-N}}$), 1008, 982, 960 ($\nu_{\text{P-O}}$, $\nu_{\text{C-O}}$, $\nu_{\text{P-N}}$), 836 (δ_{NH}), 745 (δ_{CH});

^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 7.26 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.18 (dd, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 13.4$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 8.4$ Hz, $\text{CH}'\text{O}$), 5.14 (dd, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 13.4$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 8.5$ Hz, $\text{CH}''\text{O}$), 4.08 (s, 3H, NCH_3), 3.74-3.64 (m, 4H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 3.63-3.25 (m, 12H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$, $\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), 3.00 (td, 2H, $^3J_{\text{H-P}} = 12.2$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 6.4$ Hz, CH_2NHP), 1.98-1.80 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHP}$), 1.31 (t, 9H, $^3J_{\text{H-H}} = 6.2$ Hz, $\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$); **^{13}C NMR (126 MHz, CD_3OD) δ** 147.68 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{NO}_2$), 134.89 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 7.3$ Hz, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{CH}_2$), 129.27 (CH_{Ar}), 57.85 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 4.6$ Hz, OCH_2), 56.14 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+$), 54.16 (3C, $\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), 50.07 (d, 2C, $^2J_{\text{C-P}} = 4.7$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 43.18 (2C, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$), 38.81 (CH_2NHP), 35.23 (NCH_3), 25.15 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 5.5$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHP}$), 7.82 (3C, $\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$);

^{31}P NMR (202 MHz, CD_3OD) δ 18.03;

HRMS (ESI) m/z 501.1895 $[\text{M}]^+$ (calculated for $[\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{Cl}_2\text{N}_6\text{O}_4\text{P}]^+$ 501.1907).

4.1.4.15. 2-({[bis(2-chloroethyl)amino][(1-methyl-2-nitro-1*H*-imidazol-5-yl)methoxy]phosphoryl}amino)-*N,N,N*-triethylethane-1-aminium iodide (29h)

Alkylation of amine **24d** (**70** mg, 153 μmol) with ethyl iodide (12 eq. initially followed by 12 eq after 26 h) using the standard procedure (reaction time: 50 h) and purification by preparative high performance liquid chromatography (gradient ACN in water) afforded compound **29 h** as a hygroscopic lyophilisate (57 mg, 92 μmol).

Yield 60%;

IR (ATR) ν cm^{-1} 3438, 3182, 1537, 1489, 1350, 1222, 1190, 1001, 958, 834, 770;

^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 7.27 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.20 (dd, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 13.4$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 8.4$ Hz, $\text{CH}'\text{O}$), 5.17 (dd, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 13.4$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 8.4$ Hz, $\text{CH}''\text{O}$), 4.08 (s, 3H, NCH_3), 3.74-3.65 (m, 4H,

N(CH₂CH₂Cl)₂), 3.53-3.34 (m, 4H, N(CH₂CH₂Cl)₂), 3.38 (q, ³J_{H-H} = 7.3 Hz, N⁺(CH₂CH₃)₃), 3.33-3.25 (m, 4H, CH₂CH₂N⁺), 1.33 (t, 9H, ³J_{H-H} = 7.2 Hz, N⁺(CH₂CH₃)₃);

¹³C NMR (126 MHz, CD₃OD) δ 147.75 (C_{Ar}NO₂), 134.67 (d, ³J_{C-P} = 7.3 Hz, C_{Ar}CH₂), 129.43 (CH_{Ar}), 58.11 (d, ²J_{C-P} = 4.6 Hz, OCH₂), 57.79 (CH₂CH₂N⁺), 54.58 (3C, N⁺(CH₂CH₃)₃), 49.95 (d, 2C, ²J_{C-P} = 4.7 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂), 43.17 (d, 2C, ³J_{C-P} = 1.6 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂), 35.02 (CH₂NHP), 35.21 (NCH₃), 7.82 (3C, N⁺(CH₂CH₃)₃);

³¹P NMR (202 MHz, CD₃OD) δ 17.88;

HRMS (ESI) m/z 487.1760 [M]⁺ (calculated for [C₁₇H₃₄Cl₂N₆O₄P]⁺ 487.1751).

5-({[bis(2-chloroethyl)amino][(1-methyl-2-nitro-1*H*-imidazol-5-yl)methoxy]phosphoryl}amino)-*N,N*-diisopropyl-*N*-methyl-pentane-1-aminium iodide (30a)

Alkylation of amine **25a** (67 mg, 126 μmol) with methyl iodide (6 eq. initially followed by 6 eq at T 20h, 6 eq at T 24h and 6 eq at T 28h) using the standard procedure (reaction time: 48 h) afforded in quantitative yield, compound **30a** analytically pure, as a yellow hygroscopic solid (85 mg, 126 mmol).

IR (ATR) ν cm⁻¹ 3411, 1537, 1489, 1351, 1190, 1014, 961, 835, 743;

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 7.26 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.17 (dd, 1H, ²J_{H-H} = 13.4 Hz, ³J_{H-P} = 8.2 Hz, CH'O), 5.13 (dd, 1H, ²J_{H-H} = 13.4 Hz, ³J_{H-P} = 8.6 Hz, CH''O), 4.08 (s, 3H, NCH₃), 3.99 (hept, 2H, ³J_{H-H} = 6.6 Hz, CH(CH₃)₂), 3.74-3.62 (m, 4H, N(CH₂CH₂Cl)₂), 3.51-3.34 (m, 4H, N(CH₂CH₂Cl)₂), 3.33-3.25 (m, 2H, CH₂N⁺), 2.96-2.87 (m, 2H, CH₂NHP), 2.94 (s, 3H, N⁺CH₃), 1.88-1.77 (m, 2H, CH₂CH₂N⁺), 1.60 (qt, 2H, ³J_{H-H} = 7.1 Hz, CH₂CH₂NHP), 1.47 (d, ³J_{H-H} = 6.3 Hz, CH(CH₃)₂), 1.44-1.38 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂NHP);

¹³C NMR (126 MHz, CD₃OD) δ 147.60 (C_{Ar}NO₂), 135.12 (d, ³J_{C-P} = 7.1 Hz, C_{Ar}CH₂), 129.29 (CH_{Ar}), 64.92 (2C, CH(CH₃)₂), 58.34 (CH₂N⁺), 57.74 (d, ²J_{C-P} = 4.7 Hz, OCH₂), 50.31 (d, 2C, ²J_{C-P} = 4.7 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂), 44.17 (N⁺CH₃), 43.30 (2C, N(CH₂CH₂Cl)₂), 41.45 (CH₂NHP), 35.32 (NCH₃), 32.13 (d, ³J_{C-P} = 5.6 Hz, CH₂CH₂NHP), 25.11 (CH₂CH₂CH₂NHP), 24.79 (CH₂CH₂N⁺), 17.96, 17.69 (4C, CH(CH₃)₂);

³¹P NMR (202 MHz, CD₃OD) δ 18.39;

HRMS (ESI) m/z 543.2384 [M]⁺ (calculated for [C₂₁H₄₂Cl₂N₆O₄P]⁺ 543.2377).

4-({[bis(2-chloroethyl)amino][(1-methyl-2-nitro-1*H*-imidazol-5-yl)methoxy]phosphoryl}amino)-*N,N*-diisopropyl-*N*-methyl-butane-1-aminium iodide (30b)

Alkylation of amine **25b** (72 mg, 141 μmol) with methyl iodide (12 eq. initially followed by 12 eq after 3 h) using the standard procedure (reaction time: 72 h) afforded compound **30b** analytically pure, as a yellow hygroscopic solid (77 mg, 117 μmol).

Yield 83%;

IR (ATR) ν cm⁻¹ 3424, 3202, 1537, 1489, 1350, 1219, 1190, 1007, 980, 960, 835, 743;

¹H NMR (200 MHz, CD₃OD) δ 7.26 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.25-5.04 (m, 2H, CH₂O), 4.08 (s, 3H, NCH₃), 4.02-3.92 (m, 2H, CH(CH₃)₂), 3.75-3.60 (m, 4H, N(CH₂CH₂Cl)₂), 3.55-3.34 (m, 6H, N(CH₂CH₂Cl)₂, CH₂N⁺), 3.05-2.86 (m, 2H, CH₂NHP), 2.93 (s, 3H, N⁺CH₃), 1.93-1.73 (m, 2H, CH₂CH₂N⁺), 1.64-1.40 (m, 2H, CH₂CH₂NHP), 1.47 (d, 12H, ³J_{H-H} = 6.5 Hz, CH(CH₃)₂);

¹³C NMR (126 MHz, CD₃OD) δ 147.62 (C_{Ar}NO₂), 135.06 (d, ³J_{C-P} = 7.2 Hz, C_{Ar}CH₂), 129.27 (CH_{Ar}), 65.21, 64.97 (CH(CH₃)₂), 58.06 (CH₂N⁺), 57.75 (d, ²J_{C-P} = 4.7 Hz, OCH₂), 50.24 (d, 2C, ²J_{C-P} = 4.7 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂), 44.19 (N⁺CH₃), 43.26 (2C, N(CH₂CH₂Cl)₂), 41.12 (CH₂NHP), 35.30 (NCH₃), 30.06 (d, ³J_{C-P} = 5.4 Hz, CH₂CH₂NHP), 22.59 (CH₂CH₂N⁺), 17.95, 17.67 (4C, CH(CH₃)₂);

³¹P NMR (202 MHz, CD₃OD) δ 18.26;

HRMS (ESI) m/z 529.2222 [M]⁺ (calculated for [C₂₀H₄₀Cl₂N₆O₄P]⁺ 529.2220).

3-([bis(2-chloroethyl)amino][(1-methyl-2-nitro-1*H*-imidazol-5-yl)methoxy]phosphoryl)amino)-*N,N*-diisopropyl-*N*-methyl-propane-1-aminium iodide (30c)

Alkylation of amine **25c** (50 mg, 100 μmol) with methyl iodide (12 eq. initially followed by 12 eq after 72 h) using the standard procedure (reaction time: 96 h) afforded compound **30c** analytically pure, as a yellow hygroscopic solid (61 mg, 95.3 mmol).

Yield 96%; **IR (ATR) ν cm⁻¹** 3413, 3209, 1537, 1490, 1350, 1217, 1190, 1007, 980, 960, 835, 743;

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 7.27 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.20 (dd, 1H, ²J_{H-H} = 13.4 Hz, ³J_{H-P} = 8.1 Hz, CH'O), 5.15 (dd, 1H, ²J_{H-H} = 13.4 Hz, ³J_{H-P} = 8.4 Hz, CH''O), 4.08 (s, 3H, NCH₃), 3.98 (hept, 2H, ³J_{H-H} = 6.5 Hz, CH(CH₃)₂), 3.74-3.63 (m, 4H, N(CH₂CH₂Cl)₂), 3.54-3.33 (m, 6H, N(CH₂CH₂Cl)₂, CH₂N⁺), 3.04-2.94 (m, 2H, CH₂NHP), 2.94 (s, 3H, N⁺CH₃), 2.06-1.92 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂), 1.47 (d, 12H, ³J_{H-H} = 6.4 Hz, CH(CH₃)₂);

¹³C NMR (126 MHz, CD₃OD) δ 147.59 (C_{Ar}NO₂), 134.95 (d, ³J_{C-P} = 7.4 Hz, C_{Ar}CH₂), 129.31 (CH_{Ar}), 65.17, 65.11 (2C, CH(CH₃)₂), 57.89 (d, ²J_{C-P} = 4.8 Hz, OCH₂), 56.32 (CH₂N⁺), 50.07 (d, 2C, ²J_{C-P} = 4.7 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂), 44.37 (N⁺CH₃), 43.24 (2C, N(CH₂CH₂Cl)₂), 39.14 (CH₂NHP), 35.37 (NCH₃), 27.26 (d, ³J_{C-P} = 4.3 Hz, CH₂CH₂CH₂), 17.96, 17.69 (4C, CH(CH₃)₂);

³¹P NMR (202 MHz, CD₃OD) δ 17.94;

HRMS (ESI) m/z 515.2067 [M]⁺ (calculated for [C₁₉H₃₈Cl₂N₆O₄P]⁺ 515.2064).

2-([bis(2-chloroethyl)amino][(1-methyl-2-nitro-1*H*-imidazol-5-yl)methoxy]phosphoryl)amino)-*N,N*-diisopropyl-*N*-methyl-ethane-1-aminium iodide (30d)

Alkylation of amine **25d** (28 mg, 57.5 μmol) with methyl iodide (24 eq. initially followed by 24 eq after 15 h) using the standard procedure (reaction time: 96 h) afforded compound **30d** analytically pure, as a yellow hygroscopic solid (30 mg, 47.7 mmol).

Yield 83%;

IR (ATR) ν cm⁻¹ 3425, 3210, 1537, 1490, 1351, 1220, 1190, 1008, 960, 836, 743;

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 7.29 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.21 (dd, 1H, ²J_{H-H} = 13.4 Hz, ³J_{H-P} = 8.4 Hz, CH'O), 5.12 (dd, 1H, ²J_{H-H} = 13.4 Hz, ³J_{H-P} = 8.4 Hz, CH''O), 4.08 (s, 3H, NCH₃), 4.03-3.89 (m, 3H, NHP, CH(CH₃)₂), 3.70 (td, 4H, ³J_{H-H} = 6.5 Hz, ⁴J_{H-P} = 3.4 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂), 3.52-3.26 (m, 8H, N(CH₂CH₂Cl)₂, CH₂CH₂NHP), 2.96 (s, 3H, N⁺CH₃), 1.43-1.50 (m, 12H, CH(CH₃)₂);

¹³C NMR (126 MHz, CD₃OD) δ 147.69 (C_{Ar}NO₂), 134.70 (d, ³J_{C-P} = 7.2 Hz, C_{Ar}CH₂), 129.45 (CH_{Ar}), 65.60, 65.54 (CH(CH₃)₂), 58.16 (d, ²J_{C-P} = 4.7 Hz, OCH₂), 57.85 (d, ³J_{C-P} = 3.1 Hz, CH₂N⁺), 49.92 (d, 2C, ²J_{C-P} = 4.7 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂), 43.75 (N⁺CH₃), 43.22 (2C, N(CH₂CH₂Cl)₂), 36.61 (CH₂NHP), 35.33 (NCH₃), 17.87, 17.50 (4C, CH(CH₃)₂);

³¹P NMR (202 MHz, CD₃OD) δ 17.69;

HRMS (ESI) m/z 501.1894 [M]⁺ (calculated for [C₁₈H₃₆Cl₂N₆O₄P]⁺ 501.1907).

5-({[bis(2-chloroethyl)amino][(1-methyl-2-nitro-1*H*-imidazol-5-yl)methoxy]phosphoryl}amino)-*N*-benzyl-*N,N*-dimethylpentane-1-aminium (31a)

Alkylation of amine **26a** (33 mg, 61.3 μmol) with methyl iodide (6 eq.) using the standard procedure (reaction time: 20 h) afforded compound **31a** analytically pure, as a yellow hygroscopic solid (40 mg, 57.9 μmol).

Yield 94%;

IR (ATR) ν cm⁻¹ 3421, 3220, 1652, 1537, 1488, 1350, 1219, 1190, 1005, 960, 834, 729, 703;

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 7.65-7.50 (m, 5H, CH_{Ar}), 7.25 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.16 (dd, 1H, ²J_{H-H} = 13.5 Hz, ³J_{H-P} = 8.4 Hz, CH'O), 5.12 (dd, 1H, ²J_{H-H} = 13.5 Hz, ³J_{H-P} = 8.9 Hz, CH''O), 4.57 (s, 2H, CH₂Ph), 4.07 (s, 3H, NCH₃), 3.74-3.61 (m, 4H, N(CH₂CH₂Cl)₂), 3.51-3.33 (m, 7H, N(CH₂CH₂Cl)₂, CH₂CH₂N⁺, NHP), 3.05 (s, 6H, N⁺(CH₃)₂), 2.91 (tdd, 2H, ³J_{H-P} = 11.1 Hz, ³J_{H-H} = 6.7 Hz, ³J_{H-H} = 2.0 Hz, CH₂NHP), 1.94-1.87 (m, 2H, CH₂CH₂N⁺), 1.60 (qt, 2H, ³J_{H-H} = 7.1 Hz, CH₂CH₂NHP), 1.47-1.37 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂NHP);

¹³C NMR (126 MHz, CD₃OD) δ 147.64 (C_{Ar}NO₂), 135.10 (d, ³J_{C-P} = 6.9 Hz, C_{Ar}CH₂O), 134.13 (C_{Ar}CH₂N), 131.95, 130.38, 129.27, 128.89 (6C, CH_{Ar}), 68.98 (CH₂Ph), 65.78 (CH₂CH₂N⁺), 57.72 (d, ²J_{C-P} = 4.7 Hz, OCH₂), 50.50 (2C, N⁺(CH₃)₂), 50.31 (d, 2C, ²J_{C-P} = 4.7 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂), 43.24 (2C, N(CH₂CH₂Cl)₂), 41.40 (CH₂NHP), 35.22 (NCH₃), 32.21 (d, ³J_{C-P} = 5.5 Hz, CH₂CH₂NHP), 24.50 (CH₂CH₂CH₂NHP), 23.35 (CH₂CH₂N⁺);

³¹P NMR (202 MHz, CD₃OD) δ 18.27;

HRMS (ESI) m/z 563.2047 [M]⁺ (calculated for [C₂₃H₃₈Cl₂N₆O₄P]⁺ 563.2064).

4-({[bis(2-chloroethyl)amino][(1-methyl-2-nitro-1*H*-imidazol-5-yl)methoxy]phosphoryl}amino)-*N*-benzyl-*N,N*-dimethylbutane-1-aminium iodide (31b)

Alkylation of amine **26b** (31 mg, 56.4 μmol) with methyl iodide (6 eq.) using the standard procedure (reaction time: 20 h) afforded in quantitative yield, compound **31b** analytically pure, as a yellow hygroscopic solid (38 mg, 56.1 μmol).

IR (ATR) ν cm⁻¹ 3419, 3231, 1537, 1489, 1350, 1216, 1190, 1003, 980, 960, 835, 729, 703;

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 7.61-7.51 (m, 5H, CH_{Ar}), 7.25 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.18 (dd, 1H, ²J_{H-H} = 13.7 Hz, ³J_{H-P} = 8.5 Hz, CH'O), 5.13 (dd, 1H, ²J_{H-H} = 13.7 Hz, ³J_{H-P} = 8.9 Hz, CH''O), 4.57 (s, 2H, CH₂Ph), 4.07 (s, 3H, NCH₃), 3.70-3.66 (m, 4H, N(CH₂CH₂Cl)₂), 3.51-3.34 (m, 6H, N(CH₂CH₂Cl)₂, CH₂CH₂N⁺), 3.06 (s, 6H, N⁺(CH₃)₂), 2.97 (td, 2H, ³J_{H-P} = 11.4 Hz, ³J_{H-H} = 6.8 Hz, CH₂NHP), 1.99-1.91 (m, 2H, CH₂CH₂N⁺), 1.58 (qt, 2H, ³J_{C-P} = 7.0 Hz, CH₂CH₂NHP);

¹³C NMR (126 MHz, CD₃OD) δ 147.66 (C_{Ar}NO₂), 135.02 (d, ³J_{C-P} = 7.3 Hz, C_{Ar}CH₂O), 134.13 (C_{Ar}CH₂N), 131.97, 130.39, 129.26, 128.86 (6C, CH_{Ar}), 68.98 (CH₂Ph), 65.45 (CH₂CH₂N⁺), 57.79 (d, ²J_{C-P} = 4.7 Hz, OCH₂), 50.53 (2C, N⁺(CH₃)₂), 50.26 (d, 2C, ²J_{C-P} = 4.7 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂), 43.24 (2C, N(CH₂CH₂Cl)₂), 41.08 (CH₂NHP), 35.25 (NCH₃), 29.52 (d, ³J_{C-P} = 5.5 Hz, CH₂CH₂NHP), 21.18 (CH₂CH₂N⁺);

³¹P NMR (202 MHz, CD₃OD) δ 18.26;

HRMS (ESI) m/z 549.1895 [M]⁺ (calculated for [C₂₂H₃₆Cl₂N₆O₄P]⁺ 549.1907).

3-([bis(2-chloroethyl)amino][(1-methyl-2-nitro-1*H*-imidazol-5-yl)methoxy]phosphoryl)amino)-*N*-benzyl-*N,N*-dimethylpropane-1-aminium iodide (31c)

Method A: Alkylation of amine **26c** (28 mg, 53.7 μ mol) with methyl iodide (6 eq) using the standard procedure (reaction time: 20 h) afforded compound **31c** analytically pure, as a yellow hygroscopic solid (33 mg, 49.7 μ mol).

Yield 93%.

Method B: Alkylation of amine **23c** (52 mg, 117 μ mol) was carried out with 24 equivalents of benzyl iodide (**355**) (351 μ L, 2.82 mmol) in the presence of potassium carbonate (97 mg, 702 μ mol). The work up of the reaction mixture according to the general procedure allowed to obtain a crude product that was dissolved in a minimum amount of water and washed with DCM (10 mL). The aqueous layer was decanted and then lyophilised, to afford compound **31c**, analytically pure, as a yellow hygroscopic solid (23 mg, 34.7 μ mol).

Yield 30%;

IR (ATR) ν cm⁻¹ 3427, 3214 (ν_{NH}), 1645, 1537 (δ_{NH}), 1489 (ν_{asNO_2}), 1350 (ν_{sNO_2}), 1217, 1190 ($\nu_{\text{P=O}}$, $\nu_{\text{C-N}}$), 1005, 977, 960 ($\nu_{\text{P-O}}$, $\nu_{\text{C-O}}$, $\nu_{\text{P-N}}$), 835 (δ_{NH}), 729, 702 (δ_{CH});

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 7.61-7.51 (m, 5H, CH_{Ar}), 7.25 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.17 (dd, 1H, ²*J*_{H-H} = 13.4 Hz, ³*J*_{H-P} = 8.3 Hz, CH'O), 5.13 (dd, 1H, ²*J*_{H-H} = 13.4 Hz, ³*J*_{H-P} = 8.4 Hz, CH''O), 4.58 (s, 2H, CH₂Ph), 4.07 (s, 3H, NCH₃), 3.73-3.63 (m, 4H, N(CH₂CH₂Cl)₂), 3.52-3.35 (m, 6H, N(CH₂CH₂Cl)₂, CH₂CH₂N⁺), 3.07 (s, 6H, N⁺(CH₃)₂), 3.03 (td, 2H, ³*J*_{H-P} = 12.5 Hz, ³*J*_{H-H} = 6.5 Hz, CH₂NHP), 2.13-2.05 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂);

¹³C NMR (126 MHz, CD₃OD) δ 147.68 (C_{Ar}NO₂), 134.89 (d, ³*J*_{C-P} = 7.3 Hz, C_{Ar}CH₂O), 134.23 (C_{Ar}CH₂N), 131.99, 130.40, 129.33, 128.78 (6C, CH_{Ar}), 69.31 (CH₂Ph), 63.67 (CH₂CH₂N⁺), 57.92 (d, ²*J*_{C-P} = 4.8 Hz, OCH₂), 50.67, 50.65 (N⁺(CH₃)₂), 50.09 (d, 2C, ²*J*_{C-P} = 4.7 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂), 43.21 (2C, N(CH₂CH₂Cl)₂), 38.89 (CH₂NHP), 35.31 (NCH₃), 26.03 (CH₂CH₂CH₂);

³¹P NMR (202 MHz, CD₃OD) δ 18.01;

HRMS (ESI) *m/z* 535.1750 [M]⁺ (calculated for [C₂₁H₃₄Cl₂N₆O₄P]⁺ 535.1751).

2-([bis(2-chloroethyl)amino][(1-methyl-2-nitro-1*H*-imidazol-5-yl)methoxy]phosphoryl)amino)-*N*-benzyl-*N,N*-dimethylethane-1-aminium iodide (31d)

Alkylation of amine **26d** (24 mg, 47.3 μ mol) with methyl iodide (12 eq.) using the standard procedure (reaction time: 12 h) afforded in quantitative yield, compound **31d** analytically pure, as a yellow hygroscopic solid (30 mg, 47.3 μ mol).

IR (ATR) ν cm⁻¹ 3421, 3203, 1537, 1489, 1350, 1217, 1191, 1000, 980, 959, 835, 765, 744, 703;

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 7.63-7.51 (m, 5H, CH_{Ar}), 7.25 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.19 (m, 2H, OCH₂), 4.60 (s, 2H, CH₂Ph), 4.06 (s, 3H, NCH₃), 3.69 (td, 4H, ³*J*_{H-H} = 6.6 Hz, ³*J*_{H-P} = 3.1 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂), 3.52-3.34 (m, 8H, N(CH₂CH₂Cl)₂, CH₂CH₂NHP), 3.11 (s, 6H, N⁺(CH₃)₂);

¹³C NMR (126 MHz, CD₃OD) δ 147.70 (C_{Ar}NO₂), 134.65 (d, ³*J*_{C-P} = 7.1 Hz, C_{Ar}CH₂O), 134.24 (C_{Ar}CH₂N), 132.11, 130.44, 129.39, 128.57 (6C, CH_{Ar}), 70.01 (CH₂Ph), 65.35 (CH₂CH₂N⁺), 58.08 (d, ²*J*_{C-P} = 4.9 Hz,

OCH₂), 50.96, 50.94 (N⁺(CH₃)₂), 49.85 (d, 2C, ²J_{C-P} = 4.7 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂), 43.12 (2C, N(CH₂CH₂Cl)₂), 35.91 (CH₂NHP), 35.24 (NCH₃);

³¹P NMR (202 MHz, CD₃OD) δ 17.80;

HRMS (ESI) m/z 521.1595 [M]⁺ (calculated for [C₂₀H₃₂Cl₂N₆O₄P]⁺ 521.1594).

5-([bis(2-chloroethyl)amino][(1-methyl-2-nitro-1*H*-imidazol-5-yl)methoxy]phosphoryl)amino)-*N*-benzyl-*N*-ethyl-*N*-methylpentane-1-aminium iodide (31e)

Alkylation of amine **26a** (32 mg, 58.2 μmol) with ethyl iodide (18 eq. initially followed by 18 eq at T 16h and 18 eq at T 24h) using the standard procedure (reaction time: 72 h) afforded in quantitative yield, compound **31e** analytically pure, as a yellow hygroscopic solid (40 mg, 56.7 μmol).

IR (ATR) ν cm⁻¹ 3425, 3240, 1537, 1489, 1350, 1215, 1190, 1008, 960, 835, 765, 744, 702;

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 7.64-7.50 (m, 5H, CH_{Ar}), 7.24 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.15 (dd, 1H, ²J_{H-H} = 13.3 Hz, ³J_{H-P} = 8.3 Hz, CH'O), 5.11 (dd, 1H, ²J_{H-H} = 13.1 Hz, ³J_{H-P} = 8.1 Hz, CH''O), 4.54 (s, 2H, CH₂Ph), 4.07 (s, 3H, NCH₃), 3.74-3.61 (m, 4H, N(CH₂CH₂Cl)₂), 3.50-3.33 (m, 6H, N(CH₂CH₂Cl)₂, N⁺CH₂CH₃), 3.29-3.18 (m, 2H, CH₂CH₂N⁺), 2.96 (s, 3H, N⁺CH₃), 2.94-2.87 (m, 2H, CH₂NHP), 1.85-1.77 (m, 2H, CH₂CH₂N⁺), 1.60 (qt, 2H, ³J_{H-H} = 6.9 Hz, CH₂CH₂NHP), 1.48-1.30 (m, 5H, CH₂CH₂CH₂NHP, N⁺CH₂CH₃);
¹³C NMR (126 MHz, CD₃OD) δ 147.65 (C_{Ar}NO₂), 135.09 (d, ³J_{C-P} = 7.0 Hz, C_{Ar}CH₂O), 134.09 (C_{Ar}CH₂N), 131.88, 130.40, 129.26, 128.78 (6C, CH_{Ar}), 66.42 (CH₂Ph), 61.75 (CH₂CH₂N⁺), 57.71 (d, ²J_{C-P} = 4.3 Hz, OCH₂), 57.70 (N⁺CH₂CH₃), 50.30 (d, 2C, ²J_{C-P} = 4.7 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂), 47.86 (N⁺CH₃), 43.24 (2C, N(CH₂CH₂Cl)₂), 41.43 (CH₂NHP), 35.20 (NCH₃), 32.23 (d, ³J_{C-P} = 5.5 Hz, CH₂CH₂NHP), 24.53 (CH₂CH₂CH₂NHP), 23.01 (CH₂CH₂N⁺), 8.47 (N⁺CH₂CH₃);

³¹P NMR (202 MHz, CD₃OD) δ 18.40;

HRMS (ESI) m/z 577.2204 [M]⁺ (calculated for [C₂₄H₄₀Cl₂N₆O₄P]⁺ 577.2220).

4-([bis(2-chloroethyl)amino][(1-methyl-2-nitro-1*H*-imidazol-5-yl)methoxy]phosphoryl)amino)-*N*-benzyl-*N*-ethyl-*N*-methylbutane-1-aminium iodide (31f)

Alkylation of amine **26b** (49 mg, 90.8 μmol) with ethyl iodide (25 eq.) using the standard procedure (reaction time: 48 h) and purification by preparative high performance liquid chromatography (gradient ACN in water) afforded compound **31f** as a hygroscopic lyophilisate (29 mg, 42.5 μmol). Yield 47%;

IR (ATR) ν cm⁻¹ 3412, 3214, 1537, 1489, 1350, 1215, 1190, 1005, 979, 959, 834, 767, 744, 702;

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 7.60-7.50 (m, 5H, CH_{Ar}), 7.25 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.17 (dd, 2H, ²J_{H-H} = 13.4 Hz, ³J_{H-P} = 8.5 Hz, CH'O), 5.13 (dd, 2H, ²J_{H-H} = 13.4 Hz, ³J_{H-P} = 8.5 Hz, CH''O), 4.55 (s, 2H, CH₂Ph), 4.07 (s, 3H, NCH₃), 3.72-3.64 (m, 4H, N(CH₂CH₂Cl)₂), 3.52-3.19 (m, 8H, N(CH₂CH₂Cl)₂, CH₂N⁺CH₂CH₃), 3.01-2.93 (m, 2H, CH₂NHP), 2.97 (s, 3H, N⁺CH₃), 2.00-1.82 (m, 2H, CH₂CH₂N⁺), 1.57 (qt, 2H, ³J_{H-H} = 7.2 Hz, CH₂CH₂NHP), 1.44 (t, 3H, ³J_{H-H} = 7.3 Hz, N⁺CH₂CH₃);

¹³C NMR (126 MHz, CD₃OD) δ 147.62 (C_{Ar}NO₂), 135.05 (d, ³J_{C-P} = 7.3 Hz, C_{Ar}CH₂O), 134.12 (C_{Ar}CH₂N), 131.83, 130.37, 129.29, 128.76 (6C, CH_{Ar}), 66.36 (CH₂Ph), 61.48 (CH₂CH₂N⁺), 57.81 (d, ²J_{C-P} = 4.6 Hz, OCH₂), 57.79 (N⁺CH₂CH₃), 50.27 (d, 2C, ²J_{C-P} = 4.7 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂), 47.94 (N⁺CH₃), 43.30 (2C,

N(CH₂CH₂Cl)₂), 41.11 (CH₂NHP), 35.36 (NCH₃), 29.50 (d, ³J_{C-P} = 5.2 Hz, CH₂CH₂NHP), 20.97 (CH₂CH₂N⁺), 8.57 (N⁺CH₂CH₃);

³¹P NMR (202 MHz, CD₃OD) δ 18.29;

HRMS (ESI) m/z 563.2048 [M]⁺ (calculated for [C₂₃H₃₈Cl₂N₆O₄P]⁺ 563.2064).

3-([bis(2-chloroethyl)amino][(1-methyl-2-nitro-1*H*-imidazol-5-yl)methoxy]phosphoryl)amino)-*N*-benzyl-*N*-ethyl-*N*-methylpropane-1-aminium iodide (31g)

Alkylation of amine **26c** (32 mg, 60.7 μmol) with ethyl iodide (24 eq. initially followed by 24 eq at T 24h and 24 eq at T 48 h) using the standard procedure (reaction time: 72 h) and purification by preparative high performance liquid chromatography (gradient ACN in water) afforded compound **31g** as a hygroscopic lyophilisate.

Yield 32%;

IR (ATR) ν cm⁻¹ 3397, 3213, 1537, 1488, 1350, 1214, 1190, 1006, 959, 835, 761, 702;

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 7.61-7.49 (m, 5H, CH_{Ar}), 7.25 (2s, 1H, CH_{Ar}), 5.19-5.09 (m, 2H, CH₂O), 4.54 (s, 2H, CH₂Ph), 4.06 (2s, 3H, NCH₃), 3.72-3.63 (m, 4H, N(CH₂CH₂Cl)₂), 3.51-3.33 (m, 8H, N(CH₂CH₂Cl)₂, CH₂N⁺CH₂CH₃), 3.06-2.96 (m, 2H, CH₂NHP), 2.97 (s, 3H, N⁺CH₃), 2.13-1.93 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂), 1.45 (t, 3H, ³J_{H-H} = 7.3 Hz, N⁺CH₂CH₃);

¹³C NMR (126 MHz, CD₃OD) δ 147.69 (C_{Ar}NO₂), 134.85 (d, ³J_{C-P} = 7.3 Hz, C_{Ar}CH₂O), 134.16 (C_{Ar}CH₂N), 131.94, 130.43, 129.28, 128.64 (6C, CH_{Ar}), 66.67 (CH₂Ph), 59.69 (CH₂CH₂N⁺), 57.84 (d, ²J_{C-P} = 4.6 Hz, OCH₂), 50.05 (d, 2C, ²J_{C-P} = 4.7 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂), 47.99 (N⁺CH₃), 43.17 (2C, N(CH₂CH₂Cl)₂), 38.87 (CH₂NHP), 35.21 (NCH₃), 25.68 (d, ³J_{C-P} = 4.6 Hz, CH₂CH₂CH₂), 8.46 (N⁺CH₂CH₃);

³¹P NMR (202 MHz, CD₃OD) δ 18.10, 18.09;

HRMS (ESI) m/z 549.1893 [M]⁺ (calculated for [C₂₂H₃₆Cl₂N₆O₄P]⁺ 549.1907).

3-([bis(2-chloroethyl)amino][(1-methyl-2-nitro-1*H*-imidazol-5-yl)methoxy]phosphoryl)amino)-*N*-methyl-*N*-piperidinylpropane-1-aminium iodide (32)

Alkylation of amine **27** (37 mg, 76.2 μmol) with methyl iodide (6 eq. initially followed by 6 eq after 20 h) using the standard procedure (reaction time: 24 h) afforded compound **32** analytically pure, as a yellow hygroscopic solid (47 mg, 75.0 μmol).

Yield 99%;

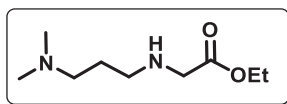
IR (ATR) ν cm⁻¹ 3420, 3213, 1652, 1537, 1489, 1349, 1217, 1190, 1007, 980, 959, 835, 744;

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.28 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.20 (dd, 1H, ²J_{H-H} = 13.4 Hz, ³J_{H-P} = 8.3 Hz, CH'O), 5.16 (dd, 1H, ²J_{H-H} = 13.5 Hz, ³J_{H-P} = 8.7 Hz, CH''O), 4.09 (s, 3H, NCH₃), 3.74-3.64 (m, 4H, N(CH₂CH₂Cl)₂), 3.54-3.36 (m, 10H, N(CH₂CH₂Cl)₂, CH₂N⁺(CH₂CH₂)₂CH₂), 3.09 (s, 3H, N⁺CH₃), 3.02 (td, 2H, ³J_{H-P} = 12.2 Hz, ³J_{H-H} = 6.2 Hz, CH₂NHP), 2.04-1.87 (m, 6H, CH₂CH₂N⁺(CH₂CH₂)₂CH₂), 1.76-1.65 (m, 2H, N⁺(CH₂CH₂)₂CH₂);

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 146.67 (C_{Ar}NO₂), 134.94 (d, ³J_{C-P} = 7.0 Hz, C_{Ar}CH₂), 129.33 (CH_{Ar}), 62.51 (3C, CH₂N⁺(CH₂CH₂)₂CH₂), 57.96 (d, ²J_{C-P} = 4.9 Hz, OCH₂), 50.11 (d, 2C, ²J_{C-P} = 4.7 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂), 43.23 (2C, N(CH₂CH₂Cl)₂), 38.90 (CH₂NHP), 35.34 (NCH₃), 25.20 (CH₂CH₂NHP), 22.01, 21.02 (3C, N⁺(CH₂CH₂)₂CH₂);

³¹P NMR (202 MHz, CD₃OD) δ 18.03;

HRMS (ESI) *m/z* 499.1752 [M]⁺ (calculated for [C₁₈H₃₄Cl₂N₆O₄P]⁺ 499.1751).

Ethyl 2-([3-(*N,N*-dimethylamino)propyl]amino)acetate (38a)

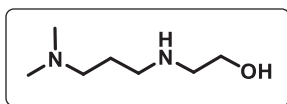
To a suspension of commercially available 3-(*N,N*-dimethylamino)propylamine (6.9 mL, 54.8 mmol) and potassium carbonate (6.72 g, 48.6 mmol) in toluene (30 mL) was added dropwise under stirring at 0 °C a solution of ethyl 2-bromoacetate (3 mL, 27.1 mmol) in toluene (15 mL). The reaction mixture was stirred at rt for 24 hours, after which it was filtered and the filtrate evaporated under reduced pressure. The obtained crude product was purified by silica gel column (EtOAc/EtOH/NH₄OH, 50/50/2, v/v/v) to afford pure compound **38a** as a colorless viscous liquid (2.75 g, 14.6 mmol).

Yield 54%;

Rf 0.64 (SiO₂, EtOAc/EtOH/TEA, 50/50/5, v/v/v);

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 4.01 (q, 2H, ³*J* = 7.1 Hz, OCH₂CH₃), 3.21 (s, 2H, CH₂CO), 2.48 (t, 2H, ³*J* = 7.0 Hz, CH₂NH), 2.16 (t, 2H, ³*J* = 8.0 Hz, CH₂N(CH₃)₂), 2.04 (s, 6H, N(CH₃)₂), 1.52-1.45 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂), 1.10 (t, 3H, ³*J* = 7.1 Hz, OCH₂CH₃);

¹³C NMR (CDCl₃, 126 MHz) δ 172.24 (CO), 60.63 (OCH₂CH₃), 57.69 (CH₂N(CH₃)₂), 50.86 (CH₂CO), 47.88 (CH₂NH), 45.25 (N(CH₃)₂), 27.81 (CH₂CH₂CH₂), 14.02 (OCH₂CH₃).

2-([3-(*N,N*-dimethylamino)propyl]amino)ethanol (39a)

To a suspension of LiAlH₄ (281 mg, 7.42 mmol) in anhydrous THF (10 mL), cooled at -10 °C, was added dropwise a solution of compound **38a** (700 mg, 3.71 mmol) in anhydrous THF (20 mL) under inert atmosphere. The reaction mixture was stirred to rt for 3 h. The reaction was then stopped according to Mihailovic's method (**341**) (700 mg of water, followed by 700 mg of a sodium hydroxide solution 15% (w/v) and finally 2.4 g of water, all added dropwise at 0 °C). The suspension was then filtered, the filtrate dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to afford compound **39a** with a satisfactory purity, as a brown colored oil (417 mg, 2.85 mmol).

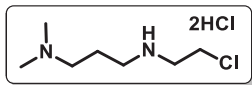
Yield 77%;

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 3.61 (t, 2H, ³*J* = 5.0 Hz, CH₂OH), 3.25 (br.s, 2H, NH, OH), 2.73 (t, 2H, ³*J* = 5.0 Hz, CH₂CH₂OH), 2.65 (t, 2H, ³*J* = 6.9 Hz, CH₂NH), 2.30 (t, 2H, ³*J* = 7.1 Hz, CH₂N(CH₃)₂), 2.17 (s, 6H, N(CH₃)₂), 1.71-1.57 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂);

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 60.66 (CH₂OH), 57.80 (CH₂N(CH₃)₂), 51.26 (CH₂CH₂OH), 48.10 (CH₂NH), 45.49 (N(CH₃)₂), 27.64 (CH₂CH₂CH₂);

HRMS (ESI) *m/z* 147.1490 [M+H]⁺ (calculated for [C₇H₁₉N₂O] 147.1492).

***N*¹-(2-chloroethyl)-*N*³,*N*³-dimethylpropane-1,3-diamine hydrochloride(40a)**



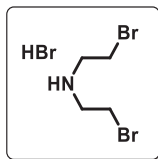
To a solution of compound **39a** (308 mg, 2.11 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (15 mL) cooled at 0 °C, was added dropwise a solution of thionyl chloride (460 μL, 6.32 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (5 mL) under inert atmosphere. The ice-bath was then removed and the reaction mixture was stirred at rt for 6 h. The reaction mixture was then evaporated under reduced pressure, to afford compound **39a** as hydrochloride (431 mg, 1.81 mmol).

Yield 86%;

¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ 3.97 (t, 2H, ³*J* = 5 Hz, CH₂Cl), 3.58 (t, 2H, ²*J* = 5 Hz, CH₂CH₂Cl), 3.38-3.22 (m, 4H, CH₂NH⁺, CH₂NH⁺(CH₃)₂), 2.99 (s, 6H, HN⁺(CH₃)₂), 2.34-2.20 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂); **¹³C NMR (126 MHz, CD₃OD)** δ 55.62 (CH₂NH⁺(CH₃)₂), 50.32 (CH₂CH₂Cl), 45.78 (CH₂NH⁺), 43.60 (NH⁺(CH₃)₂), 40.03 (CH₂Cl), 22.51 (CH₂CH₂CH₂);

HRMS (ESI) *m/z* 165.1152 [M+H]⁺ (calculated for [C₇H₁₉Cl₃N₂] 165.1153).

Bis(2-bromoethyl)amine hydrobromide salt (33)

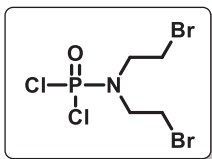


Hydrobromic acid 47% (w/w) (75 mL, 0.640 mol) was added slowly, with stirring, to diethanolamine (11 mL, 0.114 mol) at 0 °C. The reaction mixture was refluxed and then water was removed by distillation. After elimination of 40 mL of distillate, hydrobromic acid (50 mL, 0.30 mol, 47%) was added and further 50 mL of distillate was collected. Hydrobromic acid (25 mL, 47%) was added and the reaction mixture was refluxed overnight. The reaction mixture was then distilled (30 mL collected) and the residue was poured into acetone at -78 °C. The white solid was collected by filtration and then recrystallized in acetone at -78 °C six times in acetone to yield product **33** (7.70 g), as a white solid (6% morpholine HBr impurity).

Yield 20%;

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 3.78 (t, 4H, ³*J* = 6.4 Hz, CH₂Br), 3.62 (t, 4H, ³*J* = 6.5 Hz, HN⁺CH₂); **¹³C NMR (126 MHz, CD₃OD)** δ 49.87 (HN⁺CH₂), 25.97 (CH₂Br).

***N,N*-bis(2-bromoethyl)phosphoramidic dichloride (**34**)**



To a suspension of compound **33** (4.0 g, 12.8 mmol) in anhydrous DCM (25 mL) cooled at -10 °C, was added dropwise a solution of POCl₃ in anhydrous DCM (4 mL, 41.7 mmol) under an inert atmosphere. The reaction mixture was stirred for 5 minutes, before dropwise addition of TEA (5 mL, 35.8 mmol) under vigorous stirring. The reaction mixture was stirred for 3 h, with temperature maintained between -10 to -5 °C. A saturated aqueous solution of ammonium chloride (20 mL) was then added dropwise at 0 °C under stirring. The reaction mixture was extracted with DCM (3 × 25 mL), the organic layers were combined, dried over MgSO₄, filtered and evaporated under vacuum. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc, 80/20, v/v) to afford compound **34** (3.46 g, 9.57 mmol) as a colorless viscous liquid, slowly crystallizing into a white to slightly yellow solid.

Yield 75%;

mp 42 °C (Lit (**222**). 43-44 °C);

Rf 0.7 (SiO₂, cyclohexane/EtOAc, 80/20, v/v);

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 3.76-3.65 (m, 4H, N(CH₂CH₂Br)₂), 3.53 (t, 4H, ³J = 7.5 Hz, N(CH₂CH₂Br)₂);

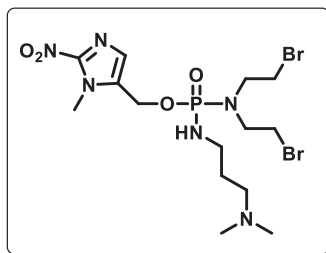
¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 49.15 (d, ²J_{H-P} = 3.5 Hz, N(CH₂CH₂Br)₂), 27.77 (s, N(CH₂CH₂Br)₂);

³¹P (202 MHz, CDCl₃) δ 16.76;

HRMS (ESI) m/z 343.8629 [M+H]⁺ (calculated for [C₄H₉Br₂Cl₂NOP] 345.8166).

(1-methyl-2-nitro-1*H*-imidazol-5-yl)methyl propyl]phosphorodiamidate (35a**)**

***N,N*-bis(2-bromoethyl)-*N'*-[3-(dimethylamino)**



Preparation of compounds **35a** was conducted according to the same general procedure used for compounds **23-27**. Starting from 275 mg (1.75 mmol) of alcohol **6**, the coupling reaction with bis(2-bromoethyl)phosphoramidic dichloride **34** was performed for 30 min before the addition of a commercially available amine, 3-(*N,N*-dimethylamino)propylamine (485 μL, 3.85 mmol). The reaction was then stopped after 5 min of stirring. The crude product was purified by silica gel chromatography (EtOAc/EtOH/NH₄OH ranging from 90/10/1 to 60/40/3, v/v/v) to afford **35a** (382 mg, 1.36 mmol) as a yellow-orange oil.

Yield 41%;

Rf 0.34 (SiO₂, EtOAc/EtOH/TEA, 70/30/3, v/v/v);

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 7.25 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.13 (d, 2H, ³J_{H-P} = 5 Hz, CH₂O), 4.07 (s, 3H, NCH₃), 3.57-3.37 (m, 8H, N(CH₂CH₂Br)₂), 2.94 (dt, 2H, ³J_{H-H} = 6.8 Hz, ³J_{H-P} = 11.8 Hz, CH₂NHP), 2.63 (t, 2H, ³J_{H-H} = 7.5 Hz, CH₂N(CH₃)₂), 2.45 (s, 6H, NH⁺(CH₃)₂), 1.81-1.70 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂);

¹³C NMR (126 MHz, CD₃OD) δ 147.68 (C_{Ar}NO₂), 134.89 (d, ³J_{C-P} = 7.3 Hz, C_{Ar}CH₂), 129.27 (CH_{Ar}), 57.85 (d, ²J_{C-P} = 4.7 Hz, CH₂O), 57.17 (CH₂NH⁺(CH₃)₂), 50.18 (d, 2C, ²J_{C-P} = 4.7 Hz, N(CH₂CH₂Br)₂), 44.18 (2C, NH⁺(CH₃)₂), 39.29 (CH₂NHP), 35.13 (NCH₃), 30.82 (d, 2C, ³J_{C-P} = 1.2 Hz, N(CH₂CH₂Br)₂); 28.60 (d, ³J_{C-P} = 4.9 Hz, CH₂CH₂CH₂);

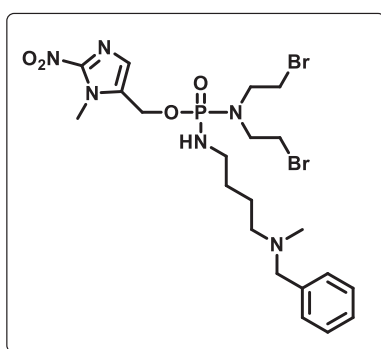
³¹P NMR (202 MHz, CD₃OD) δ 18.06;

HRMS (ESI) m/z 535.0242 [M+H]⁺ (calculated for [C₁₄H₂₈Br₂N₆O₄P]⁺ 535.0251).

(1-methyl-2-nitro-1*H*-imidazol-5-yl)methyl

***N,N*-bis(2-bromoethyl)-*N'*-[4-(*N''*-benzyl-*N''*-**

methylamino)butyl]phosphorodiamidate (35b**)**



Preparation of compounds **35b** was conducted according to the same general procedure used for compounds **23-27**. Starting from 245 mg (1.56 mmol) of alcohol **6**, the coupling reaction with bis(2-bromoethyl)phosphoramidic dichloride (**34**) was performed for 30 min before the addition of the prepared amine **21b** (660 mg, 3.43 mmol). The reaction was then stopped after 5 min of stirring. The crude product was purified by silica gel chromatography (EtOAc/EtOH/TEA ranging from 95/5/0.5 to 85/15/1, v/v/v) to afford **35b** as a yellow-brown oil (493 mg, 0.79 mmol).

Yield 51%;

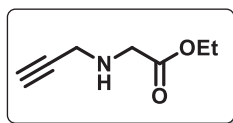
Rf 0.40 (SiO₂, EtOAc/EtOH/TEA, 90/10/1, v/v/v);

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 7.43-7.31 (m, 5H, CH_{Ar}), 7.24 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.12 (d, 2H, ³J_{H-P} = 8.2 Hz, CH₂O), 4.05 (s, 3H, NCH₃), 3.80 (s, 2H, CH₂Ph), 3.56-3.35 (m, 8H, N(CH₂CH₂Br)₂), 2.90 (dt, 2H, ³J_{H-H} = 6.9 Hz, ³J_{H-P} = 11.1 Hz, CH₂NHP), 2.65 (t, 2H, ³J_{H-H} = 7.5 Hz, CH₂N(Bn)CH₃), 2.40 (s, 3H, N(Bn)CH₃), 1.70-1.64 (m, 2H, CH₂CH₂N(Bn)CH₃), 1.55-1.49 (m, 2H, CH₂CH₂NHP);

¹³C NMR (126 MHz, CD₃OD) δ 147.59 (C_{Ar}NO₂), 134.98 (d, ³J_{C-P} = 7.4 Hz, C_{Ar}CH₂O), 131.18, 129.71, 129.35, 129.19 (6C, CH_{Ar}), 62.31 (CH₂Ph), 57.63 (d, ²J_{C-P} = 4.6 Hz, CH₂O), 57.52 (CH₂N(Bn)CH₃), 50.28 (d, ²J_{C-P} = 4.6 Hz, N(CH₂CH₂Br)₂), 41.59 (N(Bn)CH₃), 41.52 (CH₂NHP), 35.15 (NCH₃), 30.88 (N(CH₂CH₂Br)₂), 30.41 (d, ³J_{C-P} = 6.9 Hz, CH₂CH₂NHP), 24.29 (CH₂CH₂N(Bn)CH₃);

³¹P NMR (202 MHz, CD₃OD) δ 16.44; **HRMS (ESI) m/z** 625.0703 [M+H]⁺ (calculated for [C₂₁H₃₄Cl₂N₆O₄P]⁺ 625.0720).

Ethyl 2-(prop-2-yn-1-ylamino)acetate (**45**)



To a suspension of propargylamine (1.5 mL, 23.42 mmol) and potassium carbonate (9.7 g, 70.26 mmol) in ACN (100 mL), was added dropwise, at 0 °C, a solution of ethyl 2-bromoacetate (1.3 mL, 11.75 mmol, 1 eq.) in ACN (20 mL). The reaction mixture was stirred at rt overnight. The suspension was then filtered, the filtrate evaporated to dryness and the obtained residue purified by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc/TEA, 90/10/1, v/v/v) to afford compound **45** as a yellow liquid (1.356 g, 9.605 mmol).

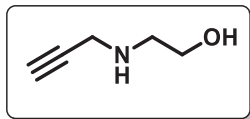
Yield 82%;

Rf 0.7 (SiO₂, cyclohexane/EtOAc/TEA, 90/10/1, v/v/v);

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 4.15 (q, 2H, ³J = 7.1 Hz, OCH₂CH₃), 3.44 (s, 2H, CH₂CO), 3.43 (d, 2H, ⁴J = 2.5 Hz, HC≡CCH₂), 2.19 (t, 1H, ⁴J = 2.5 Hz, HC≡CCH₂), 1.81 (br s, 1H, NH), 1.23 (t, 3H, ³J = 7.1 Hz, OCH₂CH₃);

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 171.89 (CO), 81.23 (HC≡CCH₂), 71.99 (HC≡CCH₂), 60.85 (OCH₂CH₃), 49.29 (CH₂CO), 37.69 (HC≡CCH₂), 14.21 (OCH₂CH₃).

2-(prop-2-yn-1-ylamino)ethanol (**46**)



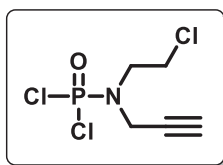
To a solution of compound **45** (1.36 g, 9.61 mmol, 1 eq.) in anhydrous THF (50 mL), was added dropwise, at -10 °C, a solution of LiAlH₄ in THF (10 mL, 24.0 mmol, 2.4 M). The reaction mixture was stirred at the same temperature over 4 h. The reaction mixture was then treated according to Mihailovic's method (0.92 g water, then 0.92 g NaOH 15%, w/v, then 2.76 g water, all added dropwise at 0 °C) and the mixture was stirred over 15 min. The suspension was then filtered, the filtrate dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The obtained residue was then purified by column chromatography on silica gel (EtOAc/EtOH/TEA, ranging from 85/15/1 to 75/25/1.5, v/v/v) to afford compound **46** as a yellow viscous liquid (488 mg, 4.912 mmol).

Yield 51%;

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 3.69-3.66 (m, 2H, CH₂OH), 3.45 (d, 2H, ⁴J = 2.4 Hz, HC≡CCH₂), 2.89-2.84 (m, 2H, CH₂CH₂OH), 2.33 (br s, 1H, NH), 2.23 (t, 1H, ⁴J = 2.4 Hz, HC≡CCH₂);

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 81.86 (HC≡CCH₂), 71.81 (HC≡CCH₂), 60.95 (CH₂OH), 50.10 (CH₂CH₂OH), 37.87 (HC≡CCH₂).

***N*-(2-chloroethyl)-*N*-(prop-2-yn-1-yl)phosphoramidic dichloride (48)**



Compound **46** (488 mg, 4.92 mmol) was refluxed overnight in the presence of an excess of POCl₃ (4.7 mL, 49.2 mmol). The reaction mixture was then cooled to rt and the excess of POCl₃ removed under reduced pressure. The remaining brown residue was purified by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc, 80/20, v/v) to afford compound **48** as a colorless viscous liquid (242 mg, 1.032 mmol).

Yield 21%;

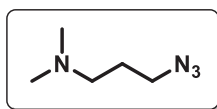
Rf 0.63 (SiO₂, cyclohexane/EtOAc, 80/20, v/v);

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 4.10 (dd, 2H, ³J_{H-P} = 16.2 Hz, ⁴J_{H-H} = 2.5 Hz, HC≡CCH₂), 3.72-3.65 (m, 4H, CH₂CH₂Cl), 2.40 (t, 1H, ⁴J = 2.4 Hz, HC≡CCH₂);

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 76.41 (d, ³J_{C-P} = 4.8 Hz, HC≡CCH₂), 74.77 (HC≡CCH₂), 47.95 (d, ²J_{C-P} = 3.8 Hz, CH₂CH₂Cl), 40.67 (d, ³J_{C-P} = 4.3 Hz, CH₂CH₂Cl), 36.82 (d, ²J_{C-P} = 6.5 Hz, HC≡CCH₂); **³¹P NMR (202 MHz, CDCl₃)** δ 17.34;

HRMS (ESI) *m/z* 233.9397 [M+H]⁺ (calculated for [C₆H₇Cl₃NOP]⁺ 233.9404).

3-azido-*N,N*-dimethylpropanamine (50)



3-Chloro-*N,N*-dimethylpropanamine hydrochloride (2.5 g, 15.8 mmol) was gently heated in water at 80 °C in the presence of sodium azide (3.08 g, 47.4 mmol) over 24 h. The reaction mixture was then cooled to rt and potassium hydroxide pellets (887 mg, 15.81 mmol, 1 eq.) were added. After 1 h stirring, the reaction mixture was extracted with Et₂O (3 × 30 mL). The organic layers were combined, dried over MgSO₄, filtrated and evaporated under reduced pressure to afford compound **50** as a colorless oil (1.39 g, 10.9 mmol).

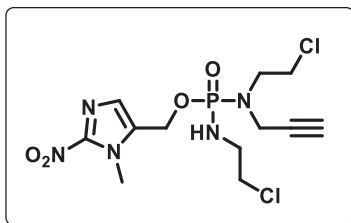
Yield 69%;

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 3.30 (t, 2H, ³J = 6.8 Hz, CH₂N₃), 2.31 (t, 2H, ³J = 7.1 Hz, CH₂N(CH₃)₂), 2.18 (s, 6H, N(CH₃)₂); 1.74-1.66 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂);

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 56.64 (CH₂N(CH₃)₂), 49.61 (CH₂N₃), 45.47 (N(CH₃)₂), 27.13 (CH₂CH₂CH₂).

**(1-methyl-2-nitro-1*H*-imidazol-5-yl)methyl
chloroethyl)phosphorodiamidate (49)**

***N*-(2-chloroethyl)-*N*-(prop-2-yn-1-yl)-*N'*-(2-**



Preparation of compound **49** was conducted according to the same general procedure used for compounds **23-27**. Starting from 107 mg (0.681 mmol) of alcohol **6**, the coupling reaction with compound **48** (175.6 mg, 0.749 mmol) was performed for 5 min before the addition of 2-chloroethylamine hydrochloride (196 mg, 1.70 mmol) and TEA (283 μ L, 1.70 mmol), successively. After gradual return to rt and stirring for 4 h, the reaction was evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel chromatography (EtOAc) to afford compound **49** (92.4 mg, 0.232 mmol) as a pale yellow oil.

Yield 34%;

Rf 0.38 (SiO₂, EtOAc);

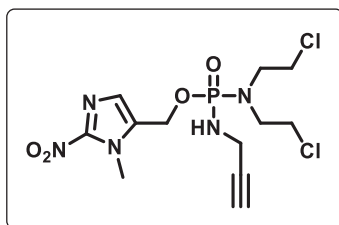
¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 7.24 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.13 (d, 2H, ³J_{H-P} = 8.2 Hz, CH₂O), 4.07 (s, 3H, NCH₃), 3.95 (dd, 2H, ³J_{H-P} = 11.5 Hz, ⁴J_{H-H} = 2.4 Hz, HC $\equiv$ CCH₂), 3.71 (td, 2H, ³J_{H-H} = 6.6 Hz, ⁴J_{H-P} = 1.7 Hz, NCH₂CH₂Cl), 3.58 (td, 2H, ³J = 6.3 Hz, ³J = 2.5 Hz, NHCH₂CH₂Cl), 3.56-3.42 (m, 2H, NCH₂CH₂Cl), 3.26-3.13 (m, 2H, NHCH₂CH₂Cl), 2.75 (t, 1H, ⁴J_{H-H} = 2.4 Hz, HC $\equiv$ CCH₂);

¹³C NMR (126 MHz, CD₃OD) δ 147.71 (C_{Ar}NO₂), 134.80 (d, ³J_{C-P} = 7.6 Hz, C_{Ar}CH₂), 129.23 (CH_{Ar}), 80.71 (d, ³J_{C-P} = 2.7 Hz, HC $\equiv$ CCH₂), 74.25 (HC $\equiv$ CCH₂), 57.67 (d, ²J_{C-P} = 4.4 Hz, CH₂O), 48.72 (NCH₂CH₂Cl), 45.69 (d, ³J_{C-P} = 5.1 Hz, HNCH₂CH₂Cl), 43.83 (HNCH₂CH₂Cl), 42.59 (d, ³J = 2.8 Hz, NCH₂CH₂Cl), 36.90 (d, ³J = 5.6 Hz, HC $\equiv$ CCH₂), 35.09 (NCH₃);

³¹P NMR (202 MHz, CD₃OD) δ 17.39; **HRMS** (ESI) *m/z* 398.0534 [M+H]⁺ (calculated for [C₁₂H₁₉Cl₂N₅O₄P]⁺ 398.0546).

**(1-methyl-2-nitro-1*H*-imidazol-5-yl)methyl
yl)phosphorodiamidate (53)**

***N,N*-bis(2-chloroethyl)-*N'*-(prop-2-yn-1-**



Preparation of compound **53** was conducted according to the same general procedure used for compounds **23-27**. Starting from 163 mg (1.04 mmol) of alcohol **6**, the coupling reaction with compound **8** (295.7 mg, 1.14 mol) was performed for 5 min before the addition of propargylamine (146 μ L, 2.24 mmol). After gradual return to rt and stirring for 1.5 h, the reaction was evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel chromatography

(EtOAc/cyclohexane, 95/5, v/v) to afford compound **53** (272.4 mg, 0.684 mmol) as a pale yellow oil.

Yield 66%;

Rf 0.6 (SiO₂, EtOAc);

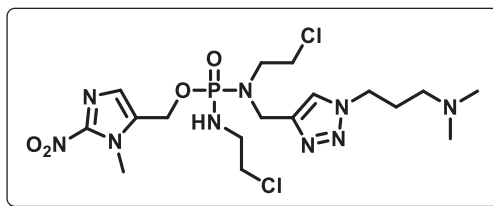
¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 7.25 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.14 (d, 2H, ³J_{H-P} = 8.1 Hz, CH₂O), 4.07 (s, 3H, NCH₃), 3.73-3.60 (m, 6H, HC≡CCH₂N(CH₂CH₂Cl)₂), 3.50-3.35 (m, 4H, N(CH₂CH₂Cl)₂), 2.67 (t, 1H, ⁴J_{H-H} = 2.5 Hz, HC≡CCH₂);

¹³C NMR (126 MHz, CD₃OD) δ 147.62 (C_{Ar}NO₂), 134.77 (d, ³J_{C-P} = 7.5 Hz, C_{Ar}CH₂), 129.25 (CH_{Ar}), 82.51 (d, ³J_{C-P} = 5.7 Hz, HC≡CCH₂), 72.64 (HC≡CCH₂), 57.69 (d, ²J_{C-P} = 4.4 Hz, CH₂O), 50.25 (d, 2C, ²J_{C-P} = 4.9 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂), 43.02 (2C, N(CH₂CH₂Cl)₂), 35.12 (NCH₃), 30.97 (d, ²J = 1.6 Hz, HC≡CCH₂);

³¹P NMR (202 MHz, CD₃OD) δ 16.61;

HRMS (ESI) m/z 398.0538 [M+H]⁺ (calculated for [C₁₂H₁₉Cl₂N₅O₄P]⁺ 398.0546).

(1-methyl-2-nitro-1H-imidazol-5-yl)methyl N-(2-chloroethyl)-N'-({1-[3-(dimethylamino)propyl]-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl}-N'-(2-chloroethyl)phosphorodiamidate (51**)**



To a solution of alkyne **49** (54.4 mg, 0.136 mmol) and azide **50** (15.7 mg, 0.123 mmol) in a water/butanol mixture (1/1 mL) was added successively a solution of ascorbic acid (0.123 mmol, 22 mg in 250 μL of water), a solution of copper sulfate (0.08 mmol, 20 mg in 250 μL of water) and Fokin catalyst (0.018 mmol). The reaction mixture was stirred at rt for 1 h. The reaction mixture was filtered and the filtrate concentrated under reduced pressure. The obtained residue was purified on column chromatography on silica gel (EtOAc/EtOH/NH₄OH ranging from 80/20/1 to 60/40/3, v/v/v) to afford compound **51** as a pale yellow oil (31.8 mg, 60.4 μmol).

Yield 49%;

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 7.94 (CH_{Ar}-triaz), 7.19 (s, 1H, CH_{Ar}-imid), 5.18 (dd, 1H, ²J_{H-H} = 13.4 Hz, ³J_{H-P} = 8.3 Hz, CH'O), 5.13 (dd, 1H, ²J_{H-H} = 13.4 Hz, ³J_{H-P} = 8.5 Hz, CH''O), 4.49 (t, 2H, ³J_{H-H} = 6.8 Hz, CH₂CH₂CH₂N(CH₃)₂), 4.37 (d, ³J_{H-P} = 11.2 Hz, C_{Ar}CH₂N), 4.06 (s, 3H, NCH₃), 3.72-3.55 (m, 5H, CH₂Cl, NHP), 3.45-3.33 (m, 2H, NCH₂CH₂Cl), 3.30-3.15 (m, 2H, NHCH₂CH₂Cl), 2.99 (t, 2H, ³J_{H-H} = 7.5 Hz, CH₂CH₂CH₂N(CH₃)₂), 2.75 (s, 6H, N(CH₃)₂), 2.37-2.25 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂);

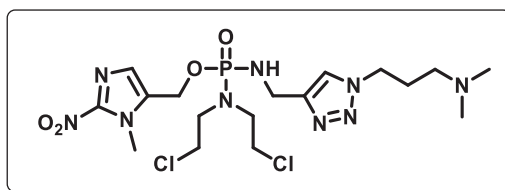
¹³C NMR (126 MHz, CD₃OD) δ 147.65 (C_{Ar}NO₂), 145.96 (C_{Ar}-triaz), 135.04 (d, ³J_{C-P} = 7.3 Hz, C_{Ar}CH₂O), 129.16 (CH_{Ar}-imid), 125.17 (CH_{Ar}-triaz), 57.73 (d, ²J_{C-P} = 4.2 Hz, CH₂O), 56.47 (CH₂N(CH₃)₂), 45.91 (d, ²J_{C-P} = 4.7 Hz, NHCH₂CH₂Cl), 44.08, 44.03 (NHCH₂CH₂Cl, N(CH₃)₂), 42.74 (NCH₂CH₂Cl), 42.41 (d, ²J_{C-P} = 5.5 Hz, C_{Ar}CH₂N), 35.11 (NCH₃), 26.93 (CH₂CH₂CH₂);

³¹P NMR (202 MHz, CD₃OD) δ 17.64; **HRMS (SI)** m/z 526.1613 [M+H]⁺ (calculated for [C₁₇H₃₁Cl₂N₉O₄P]⁺ 526.1608).

(1-methyl-2-nitro-1*H*-imidazol-5-yl)methyl

N,N-bis(2-chloroethyl)-*N'*-({1-[3-

(dimethylamino)propyl]-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)phosphorodiamidate (**54**)



To a solution of alkyne **53** (116 mg, 0.291 mmol) and azide **50** (34 mg, 0.264 mmol) in a water/butanol mixture (1/1 mL) was added successively a solution of ascorbic acid (0.264 mmol, 41 mg in 250 μ L of water), a solution of copper sulfate (0.168 mmol, 42 mg in 250 μ L of water) and Fokin catalyst (0.04 mmol). The reaction mixture was stirred at rt for 1 h. The reaction mixture was filtered and the filtrate concentrated under reduced pressure. The obtained residue was purified by preparative high performance liquid chromatography (gradient ACN in water) to afford compound **54** as a hygroscopic lyophilisate (31.8 mg, 0.06 mmol).

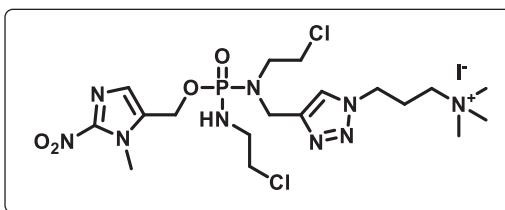
Yield 23%;

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 7.86 (CH_{Ar}-triaz), 7.20 (s, 1H, CH_{Ar}-imid), 5.13 (d, 2H, ³J_{H-P} = 8.3 Hz, CH₂O), 4.43 (t, 2H ³J_{H-H} = 7.0 Hz, CH₂CH₂CH₂N(CH₃)₂), 4.16 (d, ³J_{H-P} = 12.2 Hz, C_{Ar}CH₂NH), 4.03 (s, 3H, NCH₃), 3.76-3.59 (m, 4H, N(CH₂CH₂Cl)₂), 3.56-3.33 (m, 4H, N(CH₂CH₂Cl)₂), 2.42 (t, 2H, CH₂N(CH₃)₂), 2.31 (s, 6H, N(CH₃)₂), 2.13-2.07 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂);

¹³C NMR (126 MHz, CD₃OD) δ 148.06 (C_{Ar}-triaz), 147.67 (C_{Ar}NO₂), 134.86 (d, ³J_{C-P} = 7.3 Hz, C_{Ar}CH₂), 129.24 (CH_{Ar}-imid), 124.11 (CH_{Ar}-triaz), 57.69 (d, ²J_{C-P} = 4.5 Hz, CH₂O), 57.08 (CH₂N(CH₃)₂), 50.20 (2C, ²J_{C-P} = 4.8 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂), 49.25 (CH₂CH₂CH₂N(CH₃)₂), 45.22 (N(CH₃)₂), 43.09 (2C, N(CH₂CH₂Cl)₂), 37.07 (C_{Ar}CH₂NH), 35.06 (NCH₃), 28.68 (CH₂CH₂CH₂); **³¹P NMR (202 MHz, CD₃OD) δ** 16.86;

HRMS (SI) m/z 526.1622 [M+H]⁺ (calculated for [C₁₇H₃₁Cl₂N₉O₄P]⁺ 526.1608).

3-{4-[[[(2-chloroethyl){[(2-chloroethyl)amino][(1-methyl-2-nitro-1*H*-imidazol-5-yl)methoxy]phosphoryl]amino)methyl]-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]-*N,N,N*-trimethylpropan-1-aminium iodide (52**)**



To a solution of compound **51** (17.3 mg, 0.032 mmol) in anhydrous ACN (4 mL) under an inert atmosphere, was added potassium carbonate (26 mg, 0.192 mmol) and methyl iodide (13 μ L, 0.192 mmol). Stirring was maintained at rt for 3 h in a sealed flask. The suspension was filtered and the precipitate washed thoroughly with ACN. After evaporation of the filtrate, the residue was dissolved in acetone (5 mL) and the mixture was filtered. After evaporation under reduced

pressure, the corresponding quaternary ammonium **52** was obtained analytically pure (16.9 mg, 0.025 mmol).

Yield 79%;

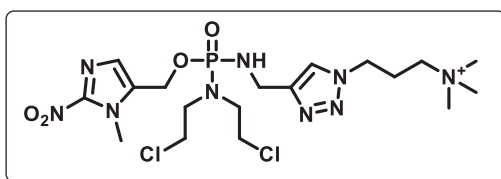
¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 8.00 (CH_{Ar}-triaz), 7.19 (s, 1H, CH_{Ar}-imid), 5.20 (dd, 1H, ²J_{H-H} = 13.4 Hz, ³J_{H-P} = 8.4 Hz, CH'O), 5.13 (dd, 1H, ²J_{H-H} = 13.4 Hz, ³J_{H-P} = 8.8 Hz, CH''O), 4.52 (t, 2H, ³J_{H-H} = 6.8 Hz, CH₂CH₂CH₂N(CH₃)₂), 4.38 (dd, 2H, ³J_{H-P} = 11.3 Hz, ⁴J_{H-H} = 2.8 Hz, C_{Ar}CH₂N), 4.06 (s, 3H, NCH₃), 3.71-3.56 (m, 4H, CH₂Cl), 3.51-3.44 (m, 2H, CH₂N⁺(CH₃)₃), 3.44-3.31 (m, 2H, NCH₂CH₂Cl), 3.29-3.20 (m, 2H, NHCH₂CH₂Cl), 3.18 (s, 9H, N⁺(CH₃)₃), 2.52-2.43 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂);

¹³C NMR (126 MHz, CD₃OD) δ 147.67 (C_{Ar}NO₂), 146.00 (C_{Ar}-triaz), 135.06 (d, ³J_{C-P} = 7.3 Hz, C_{Ar}CH₂), 129.17 (CH_{Ar}-imid), 125.33 (CH_{Ar}-triaz), 64.96 (CH₂N⁺(CH₃)₃), 57.77 (d, ²J_{C-P} = 4.5 Hz, CH₂O), 53.91, 53.88, 53.85 (N⁺(CH₃)₃), 48.98 (NCH₂CH₂Cl), 48.01 (CH₂CH₂CH₂N⁺(CH₃)₃), 45.92 (d, ³J_{C-P} = 4.9 Hz, NHCH₂CH₂Cl), 44.03 (NHCH₂CH₂Cl), 42.78 (NCH₂CH₂Cl), 42.41 (d, ²J_{C-P} = 5.2 Hz, C_{Ar}CH₂N), 35.19 (NCH₃), 24.89 (CH₂CH₂CH₂);

³¹P NMR (202 MHz, CD₃OD) δ 17.68;

HRMS (SI) m/z 540.1755 [M]⁺ (calculated for [C₁₈H₃₃Cl₂N₉O₄P]⁺ 540.1765).

3-{4-[[[bis(2-chloroethyl)amino][(1-methyl-2-nitro-1H-imidazol-5-yl)methoxy]phosphoryl]amino)methyl]-1H-1,2,3-triazol-1-yl}-N,N,N-trimethylpropan-1-aminium (55**)**



To a solution of compound **54** (8.5 mg, 0.016 mmol) in anhydrous ACN (4 mL) under an inert atmosphere, was added potassium carbonate (13 mg, 0.096 mmol) and methyl iodide (12 μL, 0.192 mmol). Stirring was maintained at rt for 3 h in a sealed flask. The suspension was filtered and the precipitate washed thoroughly with ACN. After evaporation of the filtrate, the residue was dissolved in acetone (5 mL) and the mixture was filtered. After evaporation under reduced pressure, the corresponding quaternary ammonium **55** was obtained (8.2 mg, 0.012 mmol).

Yield 77%;

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 7.93 (CH_{Ar}-triaz), 7.17 (s, 1H, CH_{Ar}-imid), 5.18 (dd, 1H, ²J_{H-H} = 13.5 Hz, ³J_{H-P} = 8.7 Hz, OCH'), 5.12 (dd, 1H, ²J_{H-H} = 13.5 Hz, ³J_{H-P} = 9.4 Hz, OCH''), 4.52 (t, 2H, ³J_{H-H} = 6.8 Hz, CH₂CH₂CH₂N(CH₃)₂), 4.18-4.13 (m, 2H, C_{Ar}CH₂N), 4.05 (s, 3H, NCH₃), 3.70-3.64 (m, 4H, N(CH₂CH₂Cl)₂), 3.52-3.35 (m, 6H, N(CH₂CH₂Cl)₂, CH₂N⁺(CH₃)₃), 3.18 (s, 9H, N⁺(CH₃)₃), 2.50-2.44 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂);

³¹P NMR (202 MHz, CD₃OD) δ 16.76.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Heymann D, Redini F. Bone sarcomas: pathogenesis and new therapeutic approaches. *IBMS BoneKEy*. **2011**;8(9):402-14.
2. Streitbuerger A, Gosheger G, Harges J. Chapter 35 - Chondrosarcoma of bone: diagnosis and therapy. In: Heymann D, editor. *Bone Cancer (Second edition)*. San Diego: Academic Press; **2015**. p. 415-24.
3. Desandes E, Clavel J, Berger C, Bernard JL, Blouin P, De Lumley L, et al. Cancer incidence among children in France, 1990–1999. *Pediatric blood & cancer*. **2004**;43(7):749-57.
4. Parvizi J, Kim GK. Chapter 49 - Chondrosarcoma. In: Parvizi J, Kim GK, editors. *High Yield Orthopaedics*. Philadelphia: W.B. Saunders; **2010**. p. 100-1.
5. National Cancer Registration and Analysis Service PHE. Bone Sarcomas: incidence and survival rates in England - NCIN Data Briefing [cited 2018 12/05/2018]. Available from: http://www.ncin.org.uk/publications/data_briefings/bone_sarcomas_incidence_and_survival.
6. Gelderblom H, Hogendoorn PCW, Dijkstra SD, van Rijswijk CS, Krol AD, Taminiau AHM, et al. The Clinical Approach Towards Chondrosarcoma. *The Oncologist*. **2008**;13(3):320-9.
7. Kim M-J, Cho K-J, Ayala AG, Ro JY. Chondrosarcoma: with updates on molecular genetics. *Sarcoma*. **2011**; 2011.
8. Fletcher CD, Bridge JA, Hogendoorn P, Mertens F. WHO classification of tumours of soft tissue and bone. 2013. Lyon: IARC. **2003**:305-10.
9. Gorlick RG TJ, Marina N, et al. Chondrosarcoma. In: Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, et al., editors. *Holland-Frei Cancer Medicine*. 6th edition. Hamilton (ON): BC Decker; **2003**. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK13415/>.
10. Hogendoorn P, Group EEW, committee: W, Athanasou N, Bielack S, De Alava E, et al. Bone sarcomas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology*. **2010**;21(5):204-13.
11. Morère J-F, Piccart M, Nabholz J-M. *Thérapeutique du cancer*: Springer Science & Business Media; **2001**.
12. Aprin H, Calandra J, Mir R, Lee J. Radiation-induced chondrosarcoma of the clavicle complicating Hodgkin's disease. A case report. *Clinical orthopaedics and related research*. **1986** (209):189.
13. Hatfield P, Schulz M. Postirradiation sarcoma. Including 5 cases after X-ray therapy of breast carcinoma. *Radiology*. **1970**;96(3):593.
14. Verdegaal SHM, Bovée J, Pansuriya TC, Grimer RJ, Ozger H, Jutte PC, et al. Incidence, Predictive Factors, and Prognosis of Chondrosarcoma in Patients with Ollier Disease and Maffucci Syndrome: An International Multicenter Study of 161 Patients. *Oncologist*. **2011**;16(12):1771-9.
15. Malghem J, Lecouvet F, Docquier P-L, Galant C, Simoni P, Maldague B, et al. In: Masson E, editor. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale : Radiologie et Imagerie médicale : Musculosquelettique - Neurologique - Maxillofaciale*. Paris (France) **2009**. p. 31-484-A-10 [1-14].
16. Wittig JC. [cited 2018 12/05/2018]. Available from: <http://www.tumorsurgery.org/tumor-education/bone-tumors/types-of-bone-tumors/enchondroma.aspx>.

17. Orphanet: le portail des maladies rares et des médicaments orphelins. [cited 2017 06/10/2017]. Available from: <http://www.orpha.net/consor4.01/www/cgi-bin/Disease.php?lng=FR>.
18. Evola FR, Costarella L, Pavone V, Caff G, Cannavò L, Sessa A, et al. Biomarkers of osteosarcoma, chondrosarcoma, and Ewing sarcoma. *Frontiers in pharmacology*. **2017**;8:150.
19. Lüllmann-Rauch R. *Histologie: De Boeck Supérieur*; **2008**.
20. Sobol EN, Baum OI, Shekhter AB, Guller A, Baskov AV. Laser-induced regeneration of cartilage. *Journal of Biomedical Optics*. **2011**;16(8):080902.
21. Atlas d'Histologie humaine et animale [cited 2017 29/10/2017]. Available from: http://webapps.fundp.ac.be/umdb/histohuma/histohuma/index.php?go=img&chap=27&pos=14#to_pimg.
22. Wright E, Hargrave MR, Christiansen J, Cooper L, Kun J, Evans T, et al. The Sry-related gene Sox9 is expressed during chondrogenesis in mouse embryos. *Nat Genet*. **1995**;9(1):15-20.
23. Murphey MD, Walker EA, Wilson AJ, Kransdorf MJ, Temple HT, Gannon FH. From the archives of the AFIP: imaging of primary chondrosarcoma: radiologic-pathologic correlation. *Radiographics*. **2003**;23(5):1245-78.
24. Hemmi A, Osaka S, Sumie O, Nemoto N, Ohno N, Terada N, et al. Chondrosarcoma with Myxoid Change: A Study Using a Quick-freezing and Deep-etching Method. *Ultrastructural Pathology*. **2007**;31(4):293-302.
25. Evans H, Ayala A, Romsdahl M. Prognostic factors in chondrosarcoma of bone: a clinicopathologic analysis with emphasis on histologic grading. *Cancer*. **1977**;40(2):818.
26. Fletcher C. Pathology and genetics of tumors of soft tissue and bone. *World Health Organization Classification of Tumors*. 2002;4:35-46.
27. Rozeman LB, Hogendoorn PC, Bovée JV. Diagnosis and prognosis of chondrosarcoma of bone. Expert review of molecular diagnostics. **2002**;2(5):461-72.
28. among Expert SLIC. Browser's notes. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. **2007**;89:2113-23.
29. Bovée JVMG, Cleton-Jansen A-M, Taminiau AHM, Hogendoorn PCW. Emerging pathways in the development of chondrosarcoma of bone and implications for targeted treatment. *The Lancet Oncology*. **2005**;6(8):599-607.
30. ZHANG J, NIU C, YE L, HUANG H, HE X, TONG W-G, et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature*. **2003**;425(6960):836-41.
31. Grünewald TG, Fulda S. Biology-Driven Targeted Therapy of Pediatric Soft-Tissue and Bone Tumors: Current Opportunities and Future Challenges: *Frontiers Media SA*; **2016**.
32. David E, Blanchard F, Heymann M-F, De Pinieux G, Gouin F, Rédini F, et al. The Bone Niche of Chondrosarcoma: A Sanctuary for Drug Resistance, Tumour Growth and also a Source of New Therapeutic Targets. *Sarcoma*. **2011**;2011:932451.
33. Fokas E, Engenhardt-Cabillic R, Daniilidis K, Rose F, An HX. Metastasis: the seed and soil theory gains identity. *Cancer metastasis reviews*. **2007**:705-15

34. Grimaud E, Damiens C, Rousselle A, Passuti N, Heymann D, Gouin F. Bone remodelling and tumour grade modifications induced by interactions between bone and swarm rat chondrosarcoma. *Histology and histopathology*. **2002**;17(4):1103.
35. Alman BA. The role of hedgehog signalling in skeletal health and disease. *Nature Reviews Rheumatology*. **2015**;11:552.
36. Campbell VT, Nadesan P, Ali SA, Wang CY, Whetstone H, Poon R, et al. Hedgehog pathway inhibition in chondrosarcoma using the smoothened inhibitor IPI-926 directly inhibits sarcoma cell growth. *Molecular cancer therapeutics*. **2014**;13(5):1259-69.
37. Jabrani A. Régulation de la voie Hedgehog: étude structurale et fonctionnelle de protéines de signalisation: Université Paris Sud-Paris XI; **2012**.
38. Sun Y, Guo W, Ren T, Liang W, Zhou W, Lu Q, et al. Gli1 inhibition suppressed cell growth and cell cycle progression and induced apoptosis as well as autophagy depending on ERK1/2 activity in human chondrosarcoma cells. *Cell death & disease*. **2015**;5(1):e979.
39. Rozeman LB, Hameetman L, Cleton-Jansen AM, Taminiau AH, Hogendoorn PC, Bovée JV. Absence of IHH and retention of PTHrP signalling in enchondromas and central chondrosarcomas. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*. **2005**;205(4):476-82.
40. Bovee JV, van den Broek LJ, Cleton-Jansen AM, Hogendoorn PC. Up-regulation of PTHrP and Bcl-2 expression characterizes the progression of osteochondroma towards peripheral chondrosarcoma and is a late event in central chondrosarcoma. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. **2000**;80(12):1925-34.
41. Tarpey PS, Behjati S, Cooke SL, Van Loo P, Wedge DC, Pillay N, et al. Frequent mutation of the major cartilage collagen gene COL2A1 in chondrosarcoma. *Nature genetics*. **2013**;45(8):923-6.
42. POMMIER Y, KOHN KW. Cycle cellulaire et points de contrôle en oncologie: nouvelles cibles thérapeutiques. *MS Médecine sciences*. **2003**;19(2):173-86.
43. Van Dyke T. p53 and tumor suppression. *The New England journal of medicine*. **2007**;356(1):79.
44. Hickman ES, Moroni MC, Helin K. The role of p53 and pRB in apoptosis and cancer. *Current opinion in genetics & development*. **2002**;12(1):60-6.
45. van Beerendonk HM, Rozeman LB, Taminiau AH, Sciort R, Bovée JV, Cleton-Jansen AM, et al. Molecular analysis of the INK4A/INK4A-ARF gene locus in conventional (central) chondrosarcomas and enchondromas: indication of an important gene for tumour progression. *The Journal of pathology*. **2004**;202(3):359-66.
46. Bovée JVMG, Hogendoorn PCW, Wunder JS, Alman BA. Cartilage tumours and bone development: molecular pathology and possible therapeutic targets. *Nature Reviews Cancer*. **2010**;10:481.
47. Schrage YM, Lam S, Jochemsen AG, Cleton-Jansen A-M, Taminiau AH, Hogendoorn PC, et al. Central chondrosarcoma progression is associated with pRb pathway alterations: CDK4 down-regulation and p16 overexpression inhibit cell growth in vitro. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. **2009**;13(9a):2843.
48. Bovée J, Cleton-Jansen A, Kuipers-Dijkshoorn N, van den Broek L, Taminiau A, Cornelisse C, et al. Loss of heterozygosity and DNA ploidy point to a diverging genetic mechanism in the origin of peripheral and central chondrosarcoma. *Genes, chromosomes & cancer*. **1999**;26(3):237.

49. Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nature Reviews Cancer*. **2011**;11(2):85.
50. Dang L, White DW, Gross S, Bennett BD, Bittinger MA, Driggers EM, et al. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature*. **2009**;462(7274):739.
51. Zhao S, Lin Y, Xu W, Jiang W, Zha Z, Wang P, et al. Glioma-derived mutations in IDH1 dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1 α . *Science*. **2009**;324(5924):261-5.
52. Cairns R, Mak T. Oncogenic isocitrate dehydrogenase mutations: mechanisms, models, and clinical opportunities. *Cancer discovery*. **2013**; 3 (7): 730–41.
53. Mondesir J, Willekens C, Touat M, de Botton S. IDH1 and IDH2 mutations as novel therapeutic targets: current perspectives. *Journal of blood medicine*. **2016**;7:171.
54. Amary MF, Bacsí K, Maggiani F, Damato S, Halai D, Berisha F, et al. IDH1 and IDH2 mutations are frequent events in central chondrosarcoma and central and periosteal chondromas but not in other mesenchymal tumours. *The Journal of pathology*. **2011**;224(3):334-43.
55. Pansuriya TC, van Eijk R, d'Adamo P, van Ruler MA, Kuijjer ML, Oosting J, et al. Somatic mosaic IDH1 and IDH2 mutations are associated with enchondroma and spindle cell hemangioma in Ollier disease and Maffucci syndrome. *Nature genetics*. **2011**;43(12):1256-61.
56. De Andrea CE, Zhu JF, Jin H, Bovée JV, Jones KB. Cell cycle deregulation and mosaic loss of Ext1 drive peripheral chondrosarcomagenesis in the mouse and reveal an intrinsic cilia deficiency. *The Journal of pathology*. **2015**;236(2):210-8.
57. Simmons AD, Musy MM, Lopes CS, Hwang L-Y, Yang Y-P, Lovett M. A direct interaction between EXT proteins and glycosyltransferases is defective in hereditary multiple exostoses. *Human molecular genetics*. **1999**;8(12):2155-64.
58. Samuel AM, Costa J, Lindskog DM. Genetic alterations in chondrosarcomas – keys to targeted therapies? *Cellular Oncology*. **2014**;37(2):95-105.
59. Hickey M, Farrokhyar F, Deheshi B, Turcotte R, Ghert M. A systematic review and meta-analysis of intralesional versus wide resection for intramedullary grade I chondrosarcoma of the extremities. **2011**.
60. Campanacci DA, Scoccianti G, Franchi A, Roselli G, Beltrami G, Ippolito M, et al. Surgical treatment of central grade 1 chondrosarcoma of the appendicular skeleton. *Journal of Orthopaedics and Traumatology*. **2013**;14(2):101-7.
61. Bauer HC, Brosjö O, Kreicbergs A, Lindholm J. Low risk of recurrence of enchondroma and low-grade chondrosarcoma in extremities: 80 patients followed for 2-25 years. *Acta Orthopaedica Scandinavica*. **1995**;66(3):283-8.
62. Leerapun T, Hugate RR, Inwards CY, Scully SP, Sim FH. Surgical management of conventional grade I chondrosarcoma of long bones. *Clinical orthopaedics and related research*. **2007**;463:166-72.
63. Deloin X, Dumaine V, Biau D, Karoubi M, Babinet A, Tomeno B, et al. Pelvic chondrosarcomas: surgical treatment options. *Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research*. **2009**;95(6):393-401.
64. Widhe B, Bauer HC. Surgical treatment is decisive for outcome in chondrosarcoma of the chest wall: a population-based Scandinavian Sarcoma Group study of 106 patients. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. **2009**;137(3):610-4.

65. Lee SY, Lim YC, Song MH, Seok JY, Lee WS, Choi EC. Chondrosarcoma of the Head and Neck. *Yonsei Med J.* **2005**;46(2):228-32.
66. Andreou D, Ruppin S, Fehlberg S, Pink D, Werner M, Tunn P-U. Survival and prognostic factors in chondrosarcoma: Results in 115 patients with long-term follow-up. *Acta Orthopaedica.* **2011**;82(6):749.
67. Angelini A, Guerra G, Mavrogenis AF, Pala E, Picci P, Ruggieri P. Clinical outcome of central conventional chondrosarcoma. *Journal of surgical oncology.* **2012**;106(8):929-37.
68. van Maldegem AM, Gelderblom H, Palmerini E, Dijkstra SD, Gambarotti M, Ruggieri P, et al. Outcome of advanced, unresectable conventional central chondrosarcoma. *Cancer.* **2014**;120(20):3159-64.
69. Provenzano S, Hindi N, Morosi C, Ghilardi M, Collini P, Casali PG, et al. Response of conventional chondrosarcoma to gemcitabine alone: a case report. *Clinical sarcoma research.* **2015**;5:9.
70. Zeman EM. Chapter 1 - Biologic Basis of Radiation Oncology. In: Gunderson LL, Tepper JE, editors. *Clinical Radiation Oncology (Third Edition)*. Philadelphia: W.B. Saunders; **2012**. p. 3-42.
71. Leibel SA, Phillips TL. *Textbook of radiation oncology*: London: WB Saunders, **1998**; 1998.
72. Noël G, Antoni D. Protonthérapie. *Cancer/Radiothérapie.* **2016**;20(6-7):508-12.
73. Noël G, Habrand J, Jauffret E, de Crevoisier R, Dederke S, Mammar H, et al. Radiation therapy for chordoma and chondrosarcoma of the skull base and the cervical spine. Prognostic factors and patterns of failure. *Strahlentherapie und Onkologie: Organ der Deutschen Röntgengesellschaft[et al].* **2003**;179(4):241.
74. Hug E, Loredó L, Slater J, DeVries A, Grove R, Schaefer R, et al. Proton radiation therapy for chordomas and chondrosarcomas of the skull base. *Journal of neurosurgery.* **1999**;91(3):432.
75. Weber D, Rutz H, Pedroni E, Bolsi A, Timmermann B, Verwey J, et al. Results of spot-scanning proton radiation therapy for chordoma and chondrosarcoma of the skull base: the Paul Scherrer Institut experience. *International journal of radiation oncology, biology, physics.* **2005**;63(2):401.
76. Munzenrider JE, Liebsch NJ. Proton therapy for tumors of the skull base. *Strahlentherapie und Onkologie.* **1999**;175(2):57-63.
77. Schulz-Ertner D, Nikoghosyan A, Hof H, Dideringer B, Combs S, Jäkel O, et al. Carbon ion radiotherapy of skull base chondrosarcomas. *International journal of radiation oncology, biology, physics.* **2007**;67(1):171.
78. Uhl M, Mattke M, Welzel T, Oelmann J, Habl G, Jensen AD, et al. High control rate in patients with chondrosarcoma of the skull base after carbon ion therapy: first report of long-term results. *Cancer.* **2014** 15;120(10):1579-85.
79. Castro J, Linstadt D, Bahary J, Petti P, Daftari I, Collier J, et al. Experience in charged particle irradiation of tumors of the skull base: 1977-1992. *International journal of radiation oncology, biology, physics.* **1994**;29(4):647.
80. McNaney D, Lindberg R, Ayala A, Barkley Jr H, Hussey D. Fifteen year radiotherapy experience with chondrosarcoma of bone. *International journal of radiation oncology, biology, physics.* **1982**;8(2):187.
81. Krochak R, Harwood A, Cummings B, Quirt I. Results of radical radiation for chondrosarcoma of bone. *Radiotherapy and oncology: journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology.* **1983**;1(2):109.

82. Terek RM, Schwartz GK, Devaney K, Glantz L, Mak S, Healey JH, et al. Chemotherapy and P-glycoprotein expression in chondrosarcoma. *Journal of orthopaedic research*. **1998**;16(5):585-90.
83. van Maldegem AM, Bovee JV, Gelderblom H. Comprehensive analysis of published studies involving systemic treatment for chondrosarcoma of bone between 2000 and 2013. *Clinical sarcoma research*. **2014**;4:11.
84. Tinoco G, Wilky BA, Paz-Mejia A, Rosenberg A, Trent JC. The biology and management of cartilaginous tumors: a role for targeting isocitrate dehydrogenase. *American Society of Clinical Oncology educational book American Society of Clinical Oncology Meeting*. **2015**:e648-55.
85. Italiano A, Mir O, Cioffi A, Palmerini E, Piperno-Neumann S, Perrin C, et al. Advanced chondrosarcomas: role of chemotherapy and survival. *Annals of oncology*. **2013**;24(11):2916-22.
86. Fox E, Patel S, Wathen JK, Schuetze S, Chawla S, Harmon D, et al. Phase II Study of Sequential Gemcitabine Followed by Docetaxel for Recurrent Ewing Sarcoma, Osteosarcoma, or Unresectable or Locally Recurrent Chondrosarcoma: Results of Sarcoma Alliance for Research Through Collaboration Study 003. *The Oncologist*. **2012**;17(3):321.
87. Dantonello TM, Int-Veen C, Leuschner I, Schuck A, Furtwaengler R, Claviez A, et al. Mesenchymal chondrosarcoma of soft tissues and bone in children, adolescents, and young adults. *Cancer*. **2008**;112(11):2424-31.
88. Cesari M, Bertoni F, Bacchini P, Mercuri M, Palmerini E, Ferrari S. Mesenchymal chondrosarcoma. An analysis of patients treated at a single institution. *Tumori*. **2007**;93(5):423.
89. Huvos AG, Rosen G, Dabska M, Marcove RC. Mesenchymal chondrosarcoma a clinicopathologic analysis of 35 patients with emphasis on treatment. *Cancer*. **1983**;51(7):1230-7.
90. Gordon EM, Sankhala KK, Chawla N, Chawla SP. Trabectedin for Soft Tissue Sarcoma: Current Status and Future Perspectives. *Advances in therapy*. **2016**;33(7):1055-71.
91. Morioka H, Takahashi S, Araki N, Sugiura H, Ueda T, Takahashi M, et al. Results of sub-analysis of a phase 2 study on trabectedin treatment for extraskeletal myxoid chondrosarcoma and mesenchymal chondrosarcoma. *BMC cancer*. **2016**;14(16):479.
92. Bindiganavile S, Han I, Yun JY, Kim H-S. Long-term Outcome of Chondrosarcoma: A Single Institutional Experience. *Cancer Res Treat*. **2015**;47(4):897-903.
93. Donati D, El Ghoneimy A, Bertoni F, Di Bella C, Mercuri M. Surgical treatment and outcome of conventional pelvic chondrosarcoma. *The Journal of bone and joint surgery British volume*. **2005**;87(11):1527.
94. F. F, A. A, J. GR, R. CS, M. TR, K. A, et al. Risk factors for survival and local control in chondrosarcoma of bone. *The Journal of Bone and Joint Surgery British volume*. **2002**;84-B(1):93-9.
95. Nakamura T, Matsumine A, Yamada S, Tsukushi S, Kawanami K, Ohno T, et al. Oncological outcome after lung metastasis in patients presenting with localized chondrosarcoma at extremities: Tokai Musculoskeletal Oncology Consortium study. *OncoTargets and therapy*. **2016**;9:4747-51.
96. Nota SP, Braun Y, Schwab JH, van Dijk CN, Bramer JA. The Identification of Prognostic Factors and Survival Statistics of Conventional Central Chondrosarcoma. *Sarcoma*. **2015**;2015:623746.
97. Xu J, Li D, Xie L, Tang S, Guo W. Mesenchymal chondrosarcoma of bone and soft tissue: a systematic review of 107 patients in the past 20 years. *PloS one*. **2015**;10(4):e0122216.

98. Lee FY, Mankin HJ, Fondren G, Gebhardt MC, Springfield DS, Rosenberg AE, et al. Chondrosarcoma of bone: an assessment of outcome. The Journal of bone and joint surgery American volume. **1999**;81(3):326-38.
99. Granter SR, Renshaw AA, Fletcher CDM, Bhan AK, Rosenberg AE. CD99 reactivity in mesenchymal chondrosarcoma. Human Pathology. **1996**;27(12):1273-6.
100. Harwood A, Krajchich J, Fornasier V. Mesenchymal chondrosarcoma: a report of 17 cases. Clinical orthopaedics and related research. **1981** (158):144.
101. Tsukamoto S, Honoki K, Kido A, Fujii H, Enomoto Y, Ohbayashi C, et al. Chemotherapy improved prognosis of mesenchymal chondrosarcoma with rare metastasis to the pancreas. Case reports in oncological medicine. **2014**;2014:249757.
102. Nakashima Y, Unni K, Shives T, Swee R, Dahlin D. Mesenchymal chondrosarcoma of bone and soft tissue. A review of 111 cases. Cancer. **1986**;57(12):2444.
103. Huvos A, Rosen G, Dabska M, Marcove R. Mesenchymal chondrosarcoma. A clinicopathologic analysis of 35 patients with emphasis on treatment. Cancer. **1983**;51(7):1230.
104. Dabska M, Huvos A. Mesenchymal chondrosarcoma in the young. Virchows Archiv A, Pathological anatomy and histopathology. **1983**;399(1):89.
105. Chow WA. Update on chondrosarcomas. Current Opinion in Oncology. **2007**;19(4):371-6.
106. Björnsson J, McLeod RA, Unni KK, Ilstrup DM, Pritchard DJ. Primary chondrosarcoma of long bones and limb girdles. Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society. **1998**;83(10):2105-19.
107. Thomas A, Susanna M, Daniel N, M. ID, Thomas K, Johannes B. Prognostic relevance of cell biologic and biochemical features in conventional chondrosarcomas. Cancer. **2002**;94(8):2273-81.
108. Endo M, Matsumura T, Yamaguchi T, Yamaguchi U, Morimoto Y, Nakatani F, et al. Cyclooxygenase-2 overexpression associated with a poor prognosis in chondrosarcomas. Human pathology. **2006**;37(4):471.
109. Sutton K, Wright M, Fondren G, Towle C, Mankin H. Cyclooxygenase-2 expression in chondrosarcoma. Oncology. **2004**;66(4):275.
110. Amling M, Posl M, Hentz MW, Priemel M, Delling G. PTHrP and Bcl-2: essential regulatory molecules in chondrocyte differentiation and chondrogenic tumors. Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie. **1998**;82:160-9.
111. Hantraye B, Leroux A, Clere N. Les inhibiteurs de tyrosine kinase. Actualités Pharmaceutiques. **2015**;54(551):22-7.
112. Tzeng H-E, Chen P-C, Lin K-W, Lin C-Y, Tsai C-H, Han S-M, et al. Basic fibroblast growth factor induces VEGF expression in chondrosarcoma cells and subsequently promotes endothelial progenitor cell-primed angiogenesis. Clinical science. **2015**;129(2):147-58.
113. Liu G-T, Chen H-T, Tsou H-K, Tan T-W, Fong Y-C, Chen P-C, et al. CCL5 promotes VEGF-dependent angiogenesis by down-regulating miR-200b through PI3K/Akt signaling pathway in human chondrosarcoma cells. Oncotarget. **2014**;5(21):10718.
114. Maher OM, Khatua S, Mukherjee D, Olar A, Lazar A, Luthra R, et al. Primary intracranial soft tissue sarcomas in children, adolescents, and young adults: single institution experience and review of the literature. Journal of Neuro-Oncology. **2015**:1-9.

115. Sulzbacher I, Birner P, Trieb K, Mühlbauer M, Lang S, Chott A. Platelet-derived growth factor- α receptor expression supports the growth of conventional chondrosarcoma and is associated with adverse outcome. *The American journal of surgical pathology*. **2001**;25(12):1520.
116. Tsavaris O, Economopoulou P, Kotsantis I, Reppas L, Avgerinou C, Spathas N, et al. Clinical Benefit of Pazopanib in a Patient with Metastatic Chondrosarcoma: A Case Report and Review of the Literature. *Frontiers in oncology*. **2018**;8(45).
117. Klenke FM, Abdollahi A, Bertl E, Gebhard M-M, Ewerbeck V, Huber PE, et al. Tyrosine kinase inhibitor SU6668 represses chondrosarcoma growth via antiangiogenesis in vivo. *BMC cancer*. **2007**;7(1):49.
118. Jones RL, Katz D, Loggers ET, Davidson D, Rodler ET, Pollack SM. Clinical benefit of antiangiogenic therapy in advanced and metastatic chondrosarcoma. *Medical Oncology*. **2017**;34(10):167.
119. Fujii T, Khawaja MR, DiNardo CD, Atkins JT, Janku F. Targeting isocitrate dehydrogenase (IDH) in cancer. *Discovery medicine*. **2016**;21(117):373-80.
120. Dang L, Su S-SM. Isocitrate Dehydrogenase Mutation and (R)-2-Hydroxyglutarate: From Basic Discovery to Therapeutics Development. *Annual Review of Biochemistry*. **2017**;86(1):305-31.
121. Li L, Paz AC, Wilky BA, Johnson B, Galoian K, Rosenberg A, et al. Treatment with a small molecule mutant IDH1 inhibitor suppresses tumorigenic activity and decreases production of the oncometabolite 2-hydroxyglutarate in human chondrosarcoma cells. *PloS one*. **2015**;10(9):e0133813.
122. Suijker J, Oosting J, Koornneef A, Struys EA, Salomons GS, Schaap FG, et al. Inhibition of mutant IDH1 decreases D-2-HG levels without affecting tumorigenic properties of chondrosarcoma cell lines. *Oncotarget*. **2015**;6(14):12505.
123. Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes & development*. **1999**;13(22):2905-27.
124. Porta C, Paglino C, Mosca A. Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling in cancer. *Frontiers in oncology*. **2014**;4:64.
125. Zhang Y-X, van Oosterwijk JG, Sicinska E, Moss S, Remillard SP, Van Wezel T, et al. Functional profiling of receptor tyrosine kinases and downstream signaling in human chondrosarcomas identifies pathways for rational targeted therapy. *Clinical Cancer Research*. **2013**;19(14):3796-807.
126. Bernstein-Molho R, Kollender Y, Issakov J, Bickels J, Dadia S, Flusser G, et al. Clinical activity of mTOR inhibition in combination with cyclophosphamide in the treatment of recurrent unresectable chondrosarcomas. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. **2012**;70(6):855-60.
127. Tiet TD, Hopyan S, Nadesan P, Gokgoz N, Poon R, Lin AC, et al. Constitutive hedgehog signaling in chondrosarcoma up-regulates tumor cell proliferation. *The American journal of pathology*. **2006**;168(1):321-30.
128. Campbell VT, Nadesan PP, Wang Y, Whetstone H, McGovern K, Read M, et al. Abstract LB-380: Direct targeting of the Hedgehog pathway in primary chondrosarcoma xenografts with the Smoothened inhibitor IPI-926. *AACR*; **2011**.
129. stops Phase I. trials of saridegib in chondrosarcoma and Myelofibrosis [press release]. *Business Wire*, Cambridge, MA, USA. **2012**;18.
130. Italiano A, Le Cesne A, Bellera C, Piperno-Neumann S, Duffaud F, Penel N, et al. GDC-0449 in patients with advanced chondrosarcomas: a French Sarcoma Group/US and French National Cancer Institute Single-Arm Phase II Collaborative Study. *Annals of Oncology*. **2013**;24(11):2922.

131. Chen Y-J, Kuo C-D, Chen S-H, Chen W-J, Huang W-C, Chao KC, et al. Small-molecule synthetic compound norcantharidin reverses multi-drug resistance by regulating Sonic hedgehog signaling in human breast cancer cells. *PloS one*. **2012**;7(5):e37006.
132. Morii T, Ohtsuka K, Ohnishi H, Mochizuki K, Yoshiyama A, Aoyagi T, et al. BH3 mimetics inhibit growth of chondrosarcoma--a novel targeted-therapy for candidate models. *Anticancer research*. **2014**;34(11):6423-30.
133. van Oosterwijk Jv, Herpers B, Meijer D, Briaire-de Bruijn I, Cleton-Jansen A, Gelderblom H, et al. Restoration of chemosensitivity for doxorubicin and cisplatin in chondrosarcoma in vitro: BCL-2 family members cause chemoresistance. *Annals of oncology*. **2011**;23(6):1617-26.
134. De Jong Y, Van Oosterwijk J, Kruisselbrink A, Briaire-de Bruijn I, Agrogiannis G, Baranski Z, et al. Targeting survivin as a potential new treatment for chondrosarcoma of bone. *Oncogenesis*. **2016**;5(5):e222.
135. Vita M, Henriksson M. The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer. *Seminars in cancer biology*. **2006**;16(4):318-30.
136. Wu J, Ding M, Mao N, Wu Y, Wang C, Yuan J, et al. Celastrol inhibits chondrosarcoma proliferation, migration and invasion through suppression CIP2A/c-MYC signaling pathway. *Journal of pharmacological sciences*. **2017**;134(1):22-8.
137. Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G, et al. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nature Genetics*. **2005**;37:391.
138. Sakimura R, Tanaka K, Yamamoto S, Matsunobu T, Li X, Hanada M, et al. The effects of histone deacetylase inhibitors on the induction of differentiation in chondrosarcoma cells. *Clinical Cancer Research*. **2007**;13(1):275-82.
139. Otero JE, Stevens JW, Malandra AE, Fredericks DC, Odgren PR, Buckwalter JA, et al. Osteoclast inhibition impairs chondrosarcoma growth and bone destruction. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. **2014**;32(12):1562-71.
140. Heymann D, Ory B, Blanchard F, Heymann M, Coipeau P, Charrier C, et al. Enhanced tumor regression and tissue repair when zoledronic acid is combined with ifosfamide in rat osteosarcoma. *Bone*. **2005**;37(1):74-86.
141. Gouin F, Ory B, Rédini F, Heymann D. Zoledronic acid slows down rat primary chondrosarcoma development, recurrent tumor progression after intralesional curettage and increases overall survival. *International journal of cancer*. **2006**;119(5):980-4.
142. Sun L, Li Y, Jiang Z, Zhang J, Li H, Li B, et al. Vγ9Vδ2 T cells and zoledronate mediate antitumor activity in an orthotopic mouse model of human chondrosarcoma. *Tumor Biology*. **2016**;37(6):7333-44.
143. David E, Guihard P, Brounais B, Riet A, Charrier C, Battaglia S, et al. Direct anti-cancer effect of oncostatin M on chondrosarcoma. *International journal of cancer*. **2011**;128(8):1822-35.
144. Chari R, Miller M, Widdison W. Antibody-drug conjugates: an emerging concept in cancer therapy. *Angewandte Chemie (International ed in English)*. **2014**;53(15):3796.
145. Mahato R, Tai W, Cheng K. Prodrugs for Improving Tumor Targetability and Efficiency. *Advanced drug delivery reviews*. **2011**;63(8):659.

146. Dawidczyk CM, Kim C, Park JH, Russell LM, Lee KH, Pomper MG, et al. State-of-the-Art in Design Rules for Drug Delivery Platforms: Lessons from FDA-approved Nanomedicines. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*. **2014**;187:133.
147. Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer research*. **1989**;49(23):6449-65.
148. Mik EG, van Leeuwen TG, Raat NJ, Ince C. Quantitative determination of localized tissue oxygen concentration in vivo by two-photon excitation phosphorescence lifetime measurements. *Journal of applied physiology*. **2004**;97(5):1962-9.
149. Ivanovic Z. Hypoxia or in situ normoxia: The stem cell paradigm. *Journal of cellular physiology*. **2009**;219(2):271-5.
150. Czyzyk-Krzeska MF. Molecular aspects of oxygen sensing in physiological adaptation to hypoxia1. *Respiration physiology*. **1997**;110(2-3):99-111.
151. Cassavaugh J, Lounsbury KM. Hypoxia-mediated biological control. *Journal of cellular biochemistry*. **2011**;112(3):735-44.
152. Benito J, Zeng Z, Konopleva M, Wilson WR. Targeting hypoxia in the leukemia microenvironment. *International journal of hematologic oncology*. **2013**;2(4):279-88.
153. Hammond EM, Asselin MC, Forster D, O'Connor JP, Senra JM, Williams KJ. The meaning, measurement and modification of hypoxia in the laboratory and the clinic. *Clinical oncology (Royal College of Radiologists (Great Britain))*. **2014**;26(5):277-88.
154. THOMLINSON R, GRAY L. The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *British journal of cancer*. **1955**;9(4):539.
155. Chaplin DJ, Olive PL, Durand RE. Intermittent blood flow in a murine tumor: radiobiological effects. *Cancer research*. **1987**;47(2):597-601.
156. Horsman MR, Mortensen LS, Petersen JB, Busk M, Overgaard J. Imaging hypoxia to improve radiotherapy outcome. *Nature Reviews Clinical Oncology*. **2012**;9:674.
157. Vaupel P, Kelleher DK, Höckel M, editors. Oxygenation status of malignant tumors: pathogenesis of hypoxia and significance for tumor therapy. *Seminars in oncology*; **2001**: Elsevier.
158. Lacave R, Larsen C-J, Robert J. *Cancérologie fondamentale*: John Libbey Eurotext; **2005**.
159. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature Reviews Cancer*. **2003**;3:401.
160. Carmeliet P, Jain RK. Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*. **2011**;10:417.
161. Becker A, Stadler P, Lavey RS, Hänsgen G, Kuhnt T, Lautenschläger C, et al. Severe anemia is associated with poor tumor oxygenation in head and neck squamous cell carcinomas 1. *International Journal of Radiation Oncology• Biology• Physics*. **2000**;46(2):459-66.
162. Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nature Reviews Cancer*. **2004**;4(11):891.
163. Wouters BG, Koritzinsky M. Hypoxia signalling through mTOR and the unfolded protein response in cancer. *Nature reviews Cancer*. **2008**;8(11):851-64.

164. Schofield CJ, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. **2004**;5:343.
165. Ortmann B, Druker J, Rocha S. Cell cycle progression in response to oxygen levels. *Cellular and molecular life sciences*. **2014**;71(18):3569-82.
166. Brown JM. The hypoxic cell: a target for selective cancer therapy—eighteenth Bruce F. Cain Memorial Award lecture. *Cancer research*. **1999**;59(23):5863-70.
167. Brown JM, Wilson WR. Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nature Reviews Cancer*. **2004**;4(6):437.
168. Sagggar JK, Tannock IF. Activity of the hypoxia-activated pro-drug TH-302 in hypoxic and perivascular regions of solid tumors and its potential to enhance therapeutic effects of chemotherapy. *International journal of cancer*. **2014**;134(11):2726-34.
169. Vaupel P, Harrison L. Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response. *The oncologist*. **2004**;9(Supplement 5):4-9.
170. Harris AL. Hypoxia—a key regulatory factor in tumour growth. *Nature Reviews Cancer*. **2002**;2(1):38.
171. Zhou J, Schmid T, Schnitzer S, Brüne B. Tumor hypoxia and cancer progression. *Cancer letters*. **2006**;237(1):10-21.
172. Wilson WR, Hay MP. Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*. **2011**;11(6):393.
173. Kruh GD, Belinsky MG. The MRP family of drug efflux pumps. *Oncogene*. **2003**;22(47):7537.
174. Ding Z, Yang L, Xie X, Xie F, Pan F, Li J, et al. Expression and significance of hypoxia-inducible factor-1 alpha and MDR1/P-glycoprotein in human colon carcinoma tissue and cells. *Journal of cancer research and clinical oncology*. **2010**;136(11):1697-707.
175. Liu L, Ning X, Sun L, Zhang H, Shi Y, Guo C, et al. Hypoxia-inducible factor-1 α contributes to hypoxia-induced chemoresistance in gastric cancer. *Cancer science*. **2008**;99(1):121-8.
176. Krishnamurthy P, Schuetz JD. The ABC transporter Abcg2/Bcrp: role in hypoxia mediated survival. *Biometals*. **2005**;18(4):349-58.
177. Hall EJ, Giaccia AJ. *Radiobiology for the Radiologist*: Lippincott Williams & Wilkins Philadelphia; **2006**.
178. Hockel M, Schlenger K, Aral B, Mitze M, Schaffer U, Vaupel P. Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. *Cancer research*. **1996**;56(19):4509.
179. Kuo P, Le Q-T. Hypoxia and Radioresistance in Head and Neck Cancer. *Molecular Determinants of Head and Neck Cancer*: Springer; **2014**. p. 283-302.
180. Nordsmark M, Høyer M, Keller J, Nielsen O, Jensen O, Overgaard J. The relationship between tumor oxygenation and cell proliferation in human soft tissue sarcomas. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. **1996**;35(4):701.
181. Dubois LJ, Niemans R, van Kuijk SJ, Panth KM, Parvathaneni NK, Peeters SG, et al. New ways to image and target tumour hypoxia and its molecular responses. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. **2015**;116(3):352-7.

182. Karakashev SV, Reginato MJ. Progress toward overcoming hypoxia-induced resistance to solid tumor therapy. *Cancer management and research*. **2015**;7:253.
183. Phillips RM. Targeting the hypoxic fraction of tumours using hypoxia-activated prodrugs. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. **2016**;77(3):441-57.
184. Albert A. Chemical Aspects of Selective Toxicity. *Nature*. **1958**;182:421.
185. Rautio J, Kumpulainen H, Heimbach T, Oliyai R, Oh D, Järvinen T, et al. Prodrugs: design and clinical applications. *Nature Reviews Drug Discovery*. **2008** ;7:255.
186. Papot S, Tranoy I, Tillequin F, Florent J, Gesson J. Design of selectively activated anticancer prodrugs: elimination and cyclization strategies. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*. **2002**;2(2):155-85.
187. Rautio J. Prodrug Strategies in Drug Design. *Prodrugs and Targeted Delivery: Towards Better ADME Properties*.1-30.
188. Stangier J, Rathgen K, Stähle H, Gansser D, Roth W. The pharmacokinetics, pharmacodynamics and tolerability of dabigatran etexilate, a new oral direct thrombin inhibitor, in healthy male subjects. *British journal of clinical pharmacology*. **2007**;64(3):292-303.
189. Guise CP, Mowday AM, Ashoorzadeh A, Yuan R, Lin WH, Wu DH, et al. Bioreductive prodrugs as cancer therapeutics: targeting tumor hypoxia. *Chinese journal of cancer*. **2014**;33(2):80-6.
190. Denny WA. The role of hypoxia-activated prodrugs in cancer therapy. *Lancet Oncol*. **2000**;1(1):25-9.
191. Hunter FW, Wouters BG, Wilson WR. Hypoxia-activated prodrugs: paths forward in the era of personalised medicine. *British journal of cancer*. **2016**;114(10):1071-7.
192. Wilson W, Denny W, Pullen S, Thompson K, Li A, Patterson L, et al. Tertiary amine N-oxides as bioreductive drugs: DACA N-oxide, nitracrine N-oxide and AQ4N. *The British journal of cancer Supplement*. **1996**;27:S43.
193. Baumann RP, Penketh PG, Ishiguro K, Shyam K, Zhu YL, Sartorelli AC. Reductive activation of the prodrug 1,2-bis(methylsulfonyl)-1-(2-chloroethyl)-2-[[1-(4-nitrophenyl)ethoxy]carbonyl]hydrazine (KS119) selectively occurs in oxygen-deficient cells and overcomes O(6)-alkylguanine-DNA alkyltransferase mediated KS119 tumor cell resistance. *Biochemical pharmacology*. **2010**;79(11):1553-61.
194. Granchi C, Funaioli T, Erler JT, Giaccia AJ, Macchia M, Minutolo F. Bioreductively activated lysyl oxidase inhibitors against hypoxic tumours. *ChemMedChem*. **2009**;4(10):1590-4.
195. Connors T. *Bioreductive agents, hypoxie cells and therapy*. Pergamon; **1996**.
196. Phillips RM, Loadman P, Cronin B. Evaluation of a novel in vitro assay for assessing drug penetration into avascular regions of tumours. *British journal of cancer*. **1998**;77(12):2112.
197. Choudry GA, Stewart PH, Double JA, Krul M, Naylor B, Flannigan GM, et al. A novel strategy for NQO1 (NAD (P) H: quinone oxidoreductase, EC 1.6. 99.2) mediated therapy of bladder cancer based on the pharmacological properties of EO9. *British journal of cancer*. **2001**;85(8):1137.
198. Karsh L, Shore N, Saltzstein D, Bhat G, Reddy G, Allen LF, et al. PD11-07 INTEGRATED RESULTS OF TWO MULTICENTER, RANDOMIZED, PLACEBO CONTROLLED, DOUBLE BLIND, PHASE 3 TRIALS (SPI-611/612) OF SINGLE-DOSE INTRAVESICAL APAZQUONE IMMEDIATELY FOLLOWING RESECTION IN PATIENTS WITH NON-MUSCLE INVASIVE BLADDER CANCER. *The Journal of urology*. **2016**;195(4):e290.

199. Witjes F, Karsh L, Soloway M, Bhat G, Reddy G, Yang A, et al. MP13-07 IMPROVED EFFICACY OF ADJUVANT, SINGLE DOSE INTRAVESICAL APAZQUONE BY TIMING POST-RESECTION IN TWO DOUBLE-BLIND, RANDOMIZED, PLACEBO-CONTROLLED PHASE 3 STUDIES IN NON-MUSCLE INVASIVE BLADDER CANCER. *The Journal of urology*. **2016**;195(4):e136-e7.
200. Phillips RM, Hendriks HR, Sweeney JB, Reddy G, Peters GJ. Efficacy, pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of apaziquone in the treatment of non-muscle invasive bladder cancer. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*. **2017**;13(7):783-91.
201. Peters KB, Brown JM. Tirapazamine: a hypoxia-activated topoisomerase II poison. *Cancer research*. **2002**;62(18):5248-53.
202. Zeman EM, Brown JM, Lemmon MJ, Hirst VK, Lee WW. SR-4233: a new bioreductive agent with high selective toxicity for hypoxic mammalian cells. *International Journal of Radiation Oncology• Biology• Physics*. **1986**;12(7):1239-42.
203. Marcu L, Olver I. Tirapazamine: from bench to clinical trials. *Current clinical pharmacology*. **2006**;1(1):71-9.
204. DiSilvestro PA, Ali S, Craighead PS, Lucci JA, Lee Y-C, Cohn DE, et al. Phase III randomized trial of weekly cisplatin and irradiation versus cisplatin and tirapazamine and irradiation in stages IB2, IIA, IIB, IIIB, and IVA cervical carcinoma limited to the pelvis: a Gynecologic Oncology Group study. *Journal of Clinical Oncology*. **2014**;32(5):458.
205. Williamson SK, Crowley JJ, Lara Jr PN, McCoy J, Lau DH, Tucker RW, et al. Phase III trial of paclitaxel plus carboplatin with or without tirapazamine in advanced non-small-cell lung cancer: Southwest Oncology Group Trial S0003. *Journal of Clinical Oncology*. **2005**;23(36):9097-104.
206. Rischin D, Peters LJ, O'Sullivan B, Giralt J, Fisher R, Yuen K, et al. Tirapazamine, cisplatin, and radiation versus cisplatin and radiation for advanced squamous cell carcinoma of the head and neck (TROG 02.02, HeadSTART): a phase III trial of the Trans-Tasman Radiation Oncology Group. *Oncology*. **2008**.
207. Hicks KO, Pruijn FB, Sturman JR, Denny WA, Wilson WR. Multicellular resistance to tirapazamine is due to restricted extravascular transport: a pharmacokinetic/pharmacodynamic study in HT29 multicellular layer cultures. *Cancer research*. **2003**;63(18):5970-7.
208. Brown JM. Imaging tumor sensitivity to a bioreductive prodrug: two for the price of one! *Clinical Cancer Research*. **2012**;18(6):1487-9.
209. Chang L, Liu X, Wang D, Ma J, Zhou T, Chen Y, et al. Hypoxia-Targeted Drug Q6 Induces G2-M Arrest and Apoptosis via Poisoning Topoisomerase II under Hypoxia. *PloS one*. **2015**;10(12):e0144506.
210. Hicks K, Siim BG, Jaiswal JK, Pruijn FB, Fraser AM, Patel R, et al. Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling identifies SN30000 and SN29751 as tirapazamine analogs with improved tissue penetration and hypoxic cell killing in tumors. *Clinical Cancer Research*. **2010**:clincanres. 1439.2010.
211. Gu Y, Chang TT-A, Wang J, Jaiswal JK, Edwards D, Downes NJ, et al. Reductive Metabolism Influences the Toxicity and Pharmacokinetics of the Hypoxia-Targeted Benzotriazine Di-Oxide Anticancer Agent SN30000 in Mice. *Frontiers in pharmacology*. **2017**;8:531.
212. Patterson LH, McKeown SR. AQ4N: a new approach to hypoxia-activated cancer chemotherapy. *British journal of cancer*. **2000**;83(12):1589-93.
213. Smith PJ, Desnoyers R, Blunt N, Giles Y, Patterson LH, Watson JV. Flow cytometric analysis and confocal imaging of anticancer alkylaminoanthraquinones and their n-oxides in intact human cells using

647-nm krypton laser excitation. *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*. **1997**;27(1):43-53.

214. Patterson LH. Rationale for the use of aliphatic N-oxides of cytotoxic anthraquinones as prodrug DNA binding agents: a new class of bioreductive agent. *Cancer and Metastasis Reviews*. **1993**;12(2):119-34.

215. Friery O, Gallagher R, Murray M, Hughes C, Galligan E, McIntyre I, et al. Enhancement of the anti-tumour effect of cyclophosphamide by the bioreductive drugs AQ4N and tirapazamine. *British journal of cancer*. **2000**;82(8):1469.

216. Patterson L, McKeown S, Ruparelia K, Double J, Bibby M, Cole S, et al. Enhancement of chemotherapy and radiotherapy of murine tumours by AQ4N, a bioreductively activated anti-tumour agent. *British journal of cancer*. **2000**;82(12):1984.

217. Albertella MR, Loadman PM, Jones PH, Phillips RM, Rampling R, Burnet N, et al. Hypoxia-selective targeting by the bioreductive prodrug AQ4N in patients with solid tumors: results of a phase I study. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. **2008**;14(4):1096-104.

217. Albertella MR, Loadman PM, Jones PH, Phillips RM, Rampling R, Burnet N, et al. Hypoxia-selective targeting by the bioreductive prodrug AQ4N in patients with solid tumors: results of a phase I study. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2008 Feb 15;14(4):1096-104. PubMed PMID: 18281542. Epub 2008/02/19. Eng.

218. Nesbitt H, Worthington J, Errington RJ, Patterson LH, Smith PJ, McKeown SR, et al. The unidirectional hypoxia-activated prodrug OCT1002 inhibits growth and vascular development in castrate-resistant prostate tumors. *The Prostate*. **2017**;77(15):1539-47.

219. Seow HA, Penketh PG, Shyam K, Rockwell S, Sartorelli AC. 1,2-Bis(methylsulfonyl)-1-(2-chloroethyl)-2-[[1-(4-nitrophenyl)ethoxy]carbonyl]hydrazine: an anticancer agent targeting hypoxic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **2005**;102(26):9282-7.

220. Knox RJ, Knight RC, Edwards DI. Studies on the action of nitroimidazole drugs: the products of nitroimidazole reduction. *Biochemical pharmacology*. **1983**;32(14):2149-56.

221. Tocher JH. Reductive activation of nitroheterocyclic compounds. *General Pharmacology: The Vascular System*. **1997**;28(4):485-7.

222. Borch RF, Liu J, Schmidt JP, Marakovits JT, Joswig C, Gipp JJ, et al. Synthesis and Evaluation of Nitroheterocyclic Phosphoramidates as Hypoxia-Selective Alkylating Agents. *Journal of medicinal chemistry*. **2000**;43(11):2258-65.

223. Meng F, Bhupathi D, Sun JD, Liu Q, Ahluwalia D, Wang Y, et al. Enhancement of hypoxia-activated prodrug TH-302 anti-tumor activity by Chk1 inhibition. *BMC cancer*. **2015**;15(1):422.

224. Meng F, Evans JW, Bhupathi D, Banica M, Lan L, Lorente G, et al. Molecular and cellular pharmacology of the hypoxia-activated prodrug TH-302. *Molecular cancer therapeutics*. **2012**;11(3):740-51.

225. Li S, Zhang J, Li J, Chen D, Matteucci M, Curd J, et al. Inhibition of both thioredoxin reductase and glutathione reductase may contribute to the anticancer mechanism of TH-302. *Biological trace element research*. **2010**;136(3):294-301.

226. Meng F, Evans JW, Bhupathi D, Banica M, Lan L, Lorente G, et al. Molecular and cellular pharmacology of the hypoxia-activated prodrug TH-302. *Molecular cancer therapeutics*. **2011**:molcanther. 0634.2011.

227. Saggar JK, Tannock IF. Chemotherapy Rescues Hypoxic Tumor Cells and Induces Their Reoxygenation and Repopulation-An Effect That Is Inhibited by the Hypoxia-Activated Prodrug TH-302. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. **2015**;21(9):2107-14.
228. Duan JX, Jiao H, Kaizerman J, Stanton T, Evans JW, Lan L, et al. Potent and highly selective hypoxia-activated achiral phosphoramidate mustards as anticancer drugs. *Journal of medicinal chemistry*. **2008**;51(8):2412-20.
229. Hu J, Handisides DR, Van Valckenborgh E, De Raeve H, Menu E, Broek IV, et al. Targeting the multiple myeloma hypoxic niche with TH-302, a hypoxia-activated prodrug. *Blood*. **2010**;116(9):1524-7.
230. Liu Q, Sun JD, Wang J, Ahluwalia D, Baker AF, Cranmer LD, et al. TH-302, a hypoxia-activated prodrug with broad in vivo preclinical combination therapy efficacy: optimization of dosing regimens and schedules. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. **2012**;69(6):1487-98.
231. Sun JD, Liu Q, Wang J, Ahluwalia D, Ferraro D, Wang Y, et al. Selective tumor hypoxia targeting by hypoxia-activated prodrug TH-302 inhibits tumor growth in preclinical models of cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. **2012**;18(3):758-70.
232. Peeters SG, Zegers CM, Biemans R, Lieuwes NG, van Stiphout RG, Yaromina A, et al. TH-302 in combination with radiotherapy enhances the therapeutic outcome and is associated with pretreatment [18F] HX4 hypoxia PET imaging. *Clinical Cancer Research*. **2015**;21(13):2984-92.
233. Larue RT, Van De Voorde L, Berbee M, van Elmpst WJ, Dubois LJ, Panth KM, et al. A phase 1 'window-of-opportunity' trial testing evofosfamide (TH-302), a tumour-selective hypoxia-activated cytotoxic prodrug, with preoperative chemoradiotherapy in oesophageal adenocarcinoma patients. *BMC cancer*. **2016**;16:644.
234. Borad MJ, Reddy SG, Bahary N, Uronis HE, Sigal D, Cohn AL, et al. Randomized Phase II Trial of Gemcitabine Plus TH-302 Versus Gemcitabine in Patients With Advanced Pancreatic Cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. **2015**;33(13):1475-81.
235. Chawla SP, Cranmer LD, Tine BAV, Reed DR, Okuno SH, Butrynski JE, et al. Phase II Study of the Safety and Antitumor Activity of the Hypoxia-Activated Prodrug TH-302 in Combination With Doxorubicin in Patients With Advanced Soft Tissue Sarcoma. *Journal of Clinical Oncology*. **2014**;32(29):3299-306.
236. Tap WD, Papai Z, Van Tine BA, Attia S, Ganjoo KN, Jones RL, et al. Doxorubicin plus evofosfamide versus doxorubicin alone in locally advanced, unresectable or metastatic soft-tissue sarcoma (TH CR-406/SARC021): an international, multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. **2017**;18(8):1089-103.
237. Anderson RF, Li D, Hunter FW. Antagonism in effectiveness of evofosfamide and doxorubicin through intermolecular electron transfer. *Free Radical Biology and Medicine*. **2017**;113:564-70.
238. Guise CP, Abbattista MR, Singleton RS, Holford SD, Connolly J, Dachs GU, et al. The bio-reductive prodrug PR-104A is activated under aerobic conditions by human aldo-keto reductase 1C3. *Cancer research*. **2010**;70(4):1573-84.
239. Foehrenbacher A, Patel K, Abbattista M, Guise CP, Secomb TW, Wilson WR, et al. The role of bystander effects in the antitumor activity of the hypoxia-activated prodrug PR-104. *Frontiers in oncology*. **2013**;3:263.

240. Patterson AV, Ferry DM, Edmunds SJ, Gu Y, Singleton RS, Patel K, et al. Mechanism of action and preclinical antitumor activity of the novel hypoxia-activated DNA cross-linking agent PR-104. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. **2007**;13(13):3922-32.
241. McKeage MJ, Jameson MB, Ramanathan RK, Rajendran J, Gu Y, Wilson WR, et al. PR-104 a bioreductive pre-prodrug combined with gemcitabine or docetaxel in a phase Ib study of patients with advanced solid tumours. *BMC cancer*. **2012**;12(1):496.
242. Penketh PG, Baumann RP, Shyam K, Williamson HS, Ishiguro K, Zhu R, et al. 1,2-Bis(methylsulfonyl)-1-(2-chloroethyl)-2-[[1-(4-nitrophenyl)ethoxy]carbonyl]hydrazine (KS119): a cytotoxic prodrug with two stable conformations differing in biological and physical properties. *Chemical biology & drug design*. **2011**;78(4):513-26.
243. Kim EY, Liu Y, Akintujoye OM, Shyam K, Grove TA, Sartorelli AC, et al. Preliminary studies with a new hypoxia-selective cytotoxin, KS119W, in vitro and in vivo. *Radiation research*. **2012**;178(3):126-37.
244. Zhang Z, Tanabe K, Hatta H, Nishimoto S-i. Bioreduction activated prodrugs of camptothecin: molecular design, synthesis, activation mechanism and hypoxia selective cytotoxicity. *Organic & biomolecular chemistry*. **2005**;3(10):1905-10.
245. Bertozzi D, Marinello J, Manzo SG, Fornari F, Gramantieri L, Capranico G. The natural inhibitor of DNA topoisomerase I, camptothecin, modulates HIF-1 α activity by changing miR expression patterns in human cancer cells. *Molecular cancer therapeutics*. **2013**.
246. Jin C, Zhang Q, Lu W. Synthesis and biological evaluation of hypoxia-activated prodrugs of SN-38. *European journal of medicinal chemistry*. **2017**;132:135-41.
247. Damen EWP, Nevalainen TJ, van den Bergh TJM, de Groot FMH, Scheeren HW. Synthesis of novel paclitaxel prodrugs designed for bioreductive activation in hypoxic tumour tissue. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2002**;10(1):71-7.
248. Jin C, Wen S, Zhang Q, Zhu Q, Yu J, Lu W. Synthesis and biological evaluation of paclitaxel and camptothecin prodrugs on the basis of 2-nitroimidazole. *ACS medicinal chemistry letters*. **2017**;8(7):762-5.
249. Patterson AV, Silva S, Guise C, Bull M, Abbattista M, Hsu A, et al. TH-4000, a hypoxia-activated EGFR/Her2 inhibitor to treat EGFR-TKI resistant T790M-negative NSCLC. *American Society of Clinical Oncology*; **2015**.
250. Lindquist KE, Cran JD, Kordic K, Chua PC, Winters GC, Tan JS, et al. Selective radiosensitization of hypoxic cells using BCCA621C: a novel hypoxia activated prodrug targeting DNA-dependent protein kinase. *Tumor Microenvironment and Therapy*. **2013**;1:46-55.
251. Zhu R, Baumann RP, Penketh PG, Shyam K, Sartorelli AC. Hypoxia-Selective O 6-Alkylguanine-DNA Alkyltransferase Inhibitors: Design, Synthesis, and Evaluation of 6-(Benzyloxy)-2-(aryldiazenyl)-9 H-purines as Prodrugs of O 6-Benzylguanine. *Journal of medicinal chemistry*. **2013**;56(3):1355-9.
252. Cazares-Korner C, Pires IM, Swallow ID, Grayer SC, O'Connor LJ, Olcina MM, et al. CH-01 is a hypoxia-activated prodrug that sensitizes cells to hypoxia/reoxygenation through inhibition of Chk1 and Aurora A. *ACS chemical biology*. **2013**;8(7):1451-9.
253. Hanna E, Quick J, Libutti S. The tumour microenvironment: a novel target for cancer therapy. *Oral diseases*. **2009**;15(1):8.

254. Theocharis AD, Skandalis SS, Neill T, Multhaupt HA, Hubo M, Frey H, et al. Insights into the key roles of proteoglycans in breast cancer biology and translational medicine. *BBA-Reviews on Cancer*. **2015**;2(1855):276-300.
255. Kim SH, Turnbull J, Guimond S. Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. *The Journal of endocrinology*. **2011**;209(2):139-51.
256. Kerkar SP, Restifo NP. Cellular constituents of immune escape within the tumor microenvironment. *Cancer research*. **2012**;72(13):3125-30.
257. Baghy K, Tátrai P, Regös E, Kovalszky I. Proteoglycans in liver cancer. *World Journal of Gastroenterology*. **2016**;22(1):379-93.
258. Iozzo RV, Schaefer L. Proteoglycan form and function: a comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Matrix Biology*. **2015**;42:11-55.
259. Iozzo RV, Sanderson RD. Proteoglycans in cancer biology, tumour microenvironment and angiogenesis. *J Cell Mol Med*. **2011**;15(5):1013-31.
260. Theocharis AD, Gialeli C, Bouris P, Giannopoulou E, Skandalis SS, Aletras AJ, et al. Cell-matrix interactions: focus on proteoglycan-proteinase interplays and pharmacological targeting in cancer. *FEBS J*. **2014**;281(22):5023-42.
261. Suhovskih AV, Aidagulova SV, Kashuba VI, Grigorieva EV. Proteoglycans as potential microenvironmental biomarkers for colon cancer. *Cell and tissue research*. **2015**;361(3):833-44.
262. Oegema Jr T, Parzych S. Effect of the retinoic acid analog Ro 11-1430 on proteoglycans of swarm rat chondrosarcoma. *Journal of the National Cancer Institute*. **1981**;67(1):99.
263. Grässel S, Aszódi A. *Cartilage*: Springer; **2016**.
264. Camarero-Espinosa S, Rothen-Rutishauser B, Foster EJ, Weder C. Articular cartilage: from formation to tissue engineering. *Biomaterials Science*. **2016**;4(5):734-67.
265. Maroudas A, Muir H, Wingham J. The correlation of fixed negative charge with glycosaminoglycan content of human articular cartilage. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. **1969**;177(3):492-500.
266. Knudson CB, Knudson W, editors. *Cartilage proteoglycans*. *Seminars in cell & developmental biology*; **2001**: Elsevier.
267. Kiani C, Liwen C, Wu YJ, Albert JY, Burton BY. Structure and function of aggrecan. *Cell research*. **2002**;12(1):19.
268. Madelmont JC, Giraud I, Nicolas C, Maurizis JC, Rapp M, Ollier M, et al. Novel quaternary ammonium derivatives, method for preparing same and pharmaceutical use. *Google Patents*; **2001**.
269. Miot-Noirault E, Gouin F, Vidal A, Rapp M, Maublant J, Askienazy S, et al. First preclinical imaging of primary cartilage neoplasm and its local recurrence using ^{99m}Tc-NTP 15-5 radiotracer. *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine*. **2009**;50(9):1541.
270. Peyrode C, Gouin F, Vidal A, Auzeloux P, Besse S, Dauplat M-M, et al. A "Proteoglycan Targeting Strategy" for the Scintigraphic Imaging and Monitoring of the Swarm Rat Chondrosarcoma Orthotopic Model. *Sarcoma*. **2011**;2011.

271. Miot-Noirault E, David E, Vidal A, Peyrode C, Besse S, Dauplat M-M, et al. 99mTc-NTP 15-5 assessment of the early therapeutic response of chondrosarcoma to zoledronic acid in the Swarm rat orthotopic model. *EJNMMI Research*. **2013**;3:40.
272. Nicolas C, Verny M, Giraud I, Ollier M, Rapp M, Maurizis J-C, et al. New quaternary ammonium oxicam derivatives targeted toward cartilage: synthesis, pharmacokinetic studies, and antiinflammatory potency. *Journal of medicinal chemistry*. **1999**;42(25):5235-40.
273. Vidal A, Chezal J, Mounetou E. New quaternary ammonium oxicam derivatives: synthesis and in vitro antiosteoarthritis evaluation. *European journal of medicinal chemistry*. **2010**;45(1):405.
274. Giraud I, Rapp M, Maurizis J-C, Madelmont J-C. Application to a Cartilage Targeting Strategy: Synthesis and in Vivo Biodistribution of ¹⁴C-Labeled Quaternary Ammonium– Glucosamine Conjugates. *Bioconjugate chemistry*. **2000**;11(2):212-8.
275. Giraud I, Rapp M, Maurizis J-C, Madelmont J-C. Synthesis and in vitro evaluation of quaternary ammonium derivatives of chlorambucil and melphalan, anticancer drugs designed for the chemotherapy of chondrosarcoma. *Journal of medicinal chemistry*. **2002**;45(10):2116-9.
276. Rapp M, Giraud I, Maurizis JC, Galmier MJ, Madelmont JC. Synthesis and in vivo biodisposition of [¹⁴C]-quaternary ammonium-melphalan conjugate, a potential cartilage-targeted alkylating drug. *Bioconjug Chem*. **2003** Mar-Apr;14(2):500-6. PubMed PMID: 12643763. Epub 2003/03/20. eng.
277. Rapp M, Giraud I, Maurizis J-C, Madelmont J-C. Synthesis and pharmacokinetic profile of a quaternary ammonium derivative of chlorambucil, a potential anticancer drug for the chemotherapy of chondrosarcoma. *Bioorganic & medicinal chemistry*. **2003**;11(23):5007-12.
278. Peyrode C, Weber V, David E, Vidal A, Auzeloux P, Communal Y, et al. Quaternary ammonium-melphalan conjugate for anticancer therapy of chondrosarcoma: in vitro and in vivo preclinical studies. *Investigational new drugs*. **2012**;30(4):1782.
279. Peyrode C, Weber V, Voissière A, Maisonia-Besset A, Vidal A, Auzeloux P, et al. Proteoglycans as target for an innovative therapeutic approach in chondrosarcoma: preclinical proof of concept. *Molecular cancer therapeutics*. **2016**;15(11):2575-85.
280. Marckwald W. *Ber Detsch Chem Ges*. **1892**;25:2359–61.
281. Grimmett MR. *Imidazole and benzimidazole synthesis*: Academic press; **1997**.
282. Cavalleri B, Ballotta R, Lancini GC. Synthesis of 1-alkyl-2-nitroimidazole-5-carboxaldehydes. *Journal of Heterocyclic Chemistry*. **1972**;9(5):979-84.
283. Matteucci M, Duan JX, Jiao H, Kaizerman J, Ammons S. Phosphoramidate alkylator prodrugs. *Google Patents*; **2007**.
284. O'Connor LJ, Cazares-Körner C, Saha J, Evans CN, Stratford MR, Hammond EM, et al. Efficient synthesis of 2-nitroimidazole derivatives and the bio-reductive clinical candidate Evofosfamide (TH-302). *Organic Chemistry Frontiers*. **2015**;2(9):1026-9.
285. O'Connor LJ, Cazares-Körner C, Saha J, Evans CN, Stratford MR, Hammond EM, et al. Design, synthesis and evaluation of molecularly targeted hypoxia-activated prodrugs. *Nature protocols*. **2016**;11(4):781-94.
286. Collman JP, Zhong M, Costanzo S, Zhang C. New Imidazole-Based Tripodal Ligands as CuB Site Mimics of Cytochrome c Oxidase. *The Journal of organic chemistry*. **2001**;66(24):8252-6.

287. Aulaskari P, Ahlgrén M, Rouvinen J, Vainiotalo P, Pohjala E, Vepsäläinen J. Preparation and structure determination of 1-benzyl-, 1-methyl- and 1H-5-[(2-nitro-2-phenyl) ethenyl] imidazoles. *Journal of heterocyclic chemistry*. **1996**;33(4):1345-54.
288. Sulima A, Cheng K, Jacobson AE, Rice KC, Gawrisch K, Lee YS. Z and E rotamers of N-formyl-1-bromo-4-hydroxy-3-methoxymorphinan-6-one and their interconversion as studied by ¹H/¹³C NMR spectroscopy and quantum chemical calculations. *Magnetic Resonance in Chemistry*. **2013**;51(2):82-8.
289. Stewart WE, Siddall TH. Nuclear magnetic resonance studies of amides. *Chemical Reviews*. **1970**;70(5):517-51.
290. Dunetz JR, Magano J, Weisenburger GA. Large-Scale Applications of Amide Coupling Reagents for the Synthesis of Pharmaceuticals. *Organic Process Research & Development*. **2016**;20(2):140-77.
291. Nedev H, Nabarisoa H, Haertle T. A convenient method for synthesis of Fmoc-amino acid p-nitroanilides based on isobutyl chloroformate as condensation agent. *Tetrahedron Letters*. **1993**;34(26):4201-4.
292. Periasamy M, Thirumalaikumar M. Methods of enhancement of reactivity and selectivity of sodium borohydride for applications in organic synthesis. *Journal of Organometallic Chemistry*. **2000**;609(1-2):137-51.
293. Boechat N, da Costa JCS, de Souza Mendonça J, de Oliveira PSM, Vinícius Nora De Souza M. A simple reduction of methyl aromatic esters to alcohols using sodium borohydride-methanol system. *Tetrahedron Letters*. **2004**;45(31):6021-2.
294. Zhu H-J, Pittman CU. Reductions of Carboxylic Acids and Esters with NaBH₄ in Diglyme at 162°C. *Synthetic Communications*. **2003**;33(10):1733-50.
295. Katritzky AR, Ley SV, Meth-Cohn O, Rees CW. *Comprehensive Organic Functional Group Transformations: Synthesis: carbon with one heteroatom attached by a single bond*: Elsevier; **1995**.
296. Soai K, Ookawa A. Mixed solvents containing methanol as useful reaction media for unique chemoselective reductions within lithium borohydride. *The Journal of Organic Chemistry*. **1986**;51(21):4000-5.
297. Sartillo-Piscil F, Quintero L, Cruz-Gregorio S, Espinosa-Aguirre J, Elinos-Baez CM, Höpfl H, et al. Further evidence on the favorable role of the anomeric effect on the cleavage of HepDirect and cyclophosphamide prodrugs. *The Journal of organic chemistry*. **2014**;79(20):9647-54.
298. Cates LA, Li V-S. Phosphorus-nitrogen compounds XXIII: Oncolytic phosphorylated imines. *Journal of pharmaceutical sciences*. **1982**;71(3):308-11.
299. Eibl H. Derivatives of N, N-(2-chloro-ethyl)-phosphoric acid amide. Google Patents; **1988**.
300. Kanduluru AK, Cirandur SR. A simple and convenient protocol for the synthesis of seven- and eight-membered phosphorus heterocycles. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*. **2016**;191(5):719-22.
301. Liu K, Li DD, Zhao XM, Dai LL, Zhang T, Tao ZW. Synthesis, cytotoxicity, topoisomerase I inhibition and molecular docking of novel phosphoramidate mustard sophoridinic acid analogues. *Applied Organometallic Chemistry*. **2017**;31(2).

302. Domínguez MJ, Sanmartín C, Font M, Palop JA, San Francisco S, Urrutia O, et al. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Phosphoramidate Derivatives as Urease Inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2008**;56(10):3721-31.
303. Mcguigan C, Narashiman P. Synthesis of some amino acid linked nitrogen mustard derivatives. *Synthesis*. **1993** (3):311-4.
304. Wan H, Modro TA. Chemistry of N-phosphorylated nitrogen mustards: the effect of a second nitrogen substituent at phosphorus on the stability of the system. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*. **1996**;108(1-4):155-68.
305. Laborde E, Kelson AB, Ma W, Weber KT. 2-[[2-(substituted amino) ethyl] sulfonyl] ethyl N, N-bis (2-chloroethyl) phosphorodiamidates. Google Patents; **2011**.
306. Liuji Z, Lingbo Q, Baojun Z, Xiaolan C, Yufen Z. A convenient method for the synthesis of cyclophosphamide analogues. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon*. **2008**;183(2-3):799-803.
307. Lu S-M, Mao L-J, Xiong Y-R. Synthesis and Antitumor Activity Of Novel Nitrogen Mustard Derivatives Of 2, 4, 6-Trioxo-1,3,5,2-Triazaphosphorine. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*. **2000**;165(1):91-7.
308. Thomas JJ, Kim J, Mauro D. 4-(4-Nitrobenzyl) pyridine tests for alkylating agents following chemical oxidative activation. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. **1992**;22(2):219-27.
309. Kim JH, Thomas JJ. Use of 4-(nitrobenzyl) pyridine (4-NBP) to test mutagenic potential of slow-reacting epoxides, their corresponding olefins, and other alkylating agents. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*. **1992**;49(6):879-85.
310. Borch RF, Canute GW. Synthesis and antitumor properties of activated cyclophosphamide analogs. *Journal of medicinal chemistry*. **1991**;34(10):3044-52.
311. Seguin H, Gardette D, Moreau M-F, Madelmont J-C, Gramain J-C. A General Method for the Synthesis of N,N-Dialkylaminobutylamines. *Synthetic Communications*. **1998**;28(22):4257-72.
312. Bridger G, Kaller A, Harwig C, Skerlj R, Bogucki D, Wilson TR, et al. Chemokine receptor binding heterocyclic compounds with enhanced efficacy. Google Patents; **2008**.
313. Sassaman MB, Giovanelli J, Sood VK, Eckelman WC. Synthesis and screening of conformationally restricted and conformationally free N-(tertiary aminoalkyl)dithiocarbamic acids and esters as inhibitors of neuronal nitric oxide synthase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **1998**;6(10):1759-66.
314. Nigh WG. The Gabriel synthesis of benzylamine: An undergraduate organic experiment. *Journal of Chemical Education*. **1975**;52(10):670.
315. Hu K, Qi YJ, Zhao J, Jiang HF, Chen X, Ren J. Synthesis and biological evaluation of sulforaphane derivatives as potential antitumor agents. *European journal of medicinal chemistry*. **2013**;64:529-39.
316. Christensen MK, Erichsen KD, Olesen UH, Tjornelund J, Fristrup P, Thougard A, et al. Nicotinamide phosphoribosyltransferase inhibitors, design, preparation, and structure-activity relationship. *Journal of medicinal chemistry*. **2013**;56(22):9071-88.
317. Kong X, He Z, Zhang Y, Mu L, Liang C, Chen B, et al. A Mesogenic Triphenylene–Perylene–Triphenylene Triad. *Organic letters*. **2011**;13(4):764-7.

318. Borch RF, Liu J, Joswig C, Baggs RB, Dexter DL, Mangold GL. Antitumor activity and toxicity of novel nitroheterocyclic phosphoramidates. *Journal of medicinal chemistry*. **2001**;44(1):74-7.
319. Homola J. Surface Plasmon Resonance Sensors for Detection of Chemical and Biological Species. *Chemical Reviews*. **2008**;108(2):462-93.
320. Homola J, Yee SS, Gauglitz G. Surface plasmon resonance sensors: review. *Sensors and Actuators B: Chemical*. **1999**;54(1):3-15.
321. Zhang P, Chen Y-P, Wang W, Shen Y, Guo J-S. Surface plasmon resonance for water pollutant detection and water process analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. **2016**;85:153-65.
322. Hong CR, Dickson BD, Jaiswal JK, Pruijn FB, Hunter FW, Hay MP, et al. Cellular pharmacology of evofosfamide (TH-302): A critical re-evaluation of its bystander effects. *Biochemical pharmacology*. **2018**.
323. Wilcken R, Zimmermann MO, Lange A, Joerger AC, Boeckler FM. Principles and applications of halogen bonding in medicinal chemistry and chemical biology. *Journal of medicinal chemistry*. **2013**;56(4):1363-88.
324. Hernandez MZ, Cavalcanti SMT, Moreira DRM, de Azevedo J, Filgueira W, Leite ACL. Halogen atoms in the modern medicinal chemistry: hints for the drug design. *Current drug targets*. **2010**;11(3):303-14.
325. Bissantz C, Kuhn B, Stahl M. A medicinal chemist's guide to molecular interactions. *Journal of medicinal chemistry*. **2010**;53(14):5061-84.
326. Flader C, Liu J, Borch RF. Development of novel quinone phosphorodiamidate prodrugs targeted to DT-diaphorase. *Journal of medicinal chemistry*. **2000**;43(16):3157-67.
327. Pettit GR, Chamberland MR, Blonda DS, Vickers MA. Antineoplastic agents: XI. N-Bis (2-bromoethyl) amines. *Canadian Journal of Chemistry*. **1964**;42(7):1699-706.
328. Knorr. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*. **1898**;301:10.
329. Hampton BL, Pollard CB. A New Synthesis of Morpholine. *Journal of the American Chemical Society*. **1936**;58(11):2338-9.
330. Clayden J, Greeves N, Warren S. *Chimie organique: une approche orbitale*: De Boeck Supérieur; **2013**.
331. Filbey AH, Buzbee LR. Process for obtaining sec-n-aryl-betahaloalkylamines. *Google Patents*; **1959**.
332. Ravlee I, Sivakumar R, Muruganantham N, Anbalagan N, Gunasekaran V, Thomas Leonard J. Pharmacological Evaluation of Some New 6-Amino/Methyl Pyridine Derivatives. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. **2003**;51(2):162-70.
333. Burdi DF, Tanaka D. Tricyclic piperazine derivative. *Google Patents*; **2016**.
334. Brinner KM, Mi Kim J, Habashita H, Gluzman IY, Goldberg DE, Ellman JA. Novel and Potent Anti-malarial Agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2002**;10(11):3649-61.
335. J BDABMGMA, inventor; Forum Pharmaceuticals Inc. , assignee. FUSED MORPHLINOPYRIMIDINES AND METHODS OF USE THEREOF **2015**.

336. Kirkovits GJ, Zimmerman RS, Huggins MT, Lynch VM, Sessler JL. Synthesis, Structural Characterization and Complexation Properties of the First "Crowned" Dipyrrolylquinoxalines. *European Journal of Organic Chemistry*. **2002**;2002(22):3768-78.
337. Mewshaw RE, Zhou D, Zhou P, Shi X, Hornby G, Spangler T, et al. Studies toward the discovery of the next generation of antidepressants. 3. Dual 5-HT_{1A} and serotonin transporter affinity within a class of N-aryloxyethylindolylalkylamines. *Journal of medicinal chemistry*. **2004**;47(15):3823-42.
338. Gunnlaugsson T, Brougham DF, Fanning A-M, Nieuwenhuyzen M, O'Brien JE, Viguiier R. Effect on p K_a of Metal-Bound Water Molecules in Lanthanide Ion-Induced Cyclen "Cavities". *Organic letters*. **2004**;6(26):4805-8.
339. Mei C, Zhao Y, Chen Q, Cao C, Pang G, Shi Y. Synthesis of Oxazolidinones and Derivatives through Three-Component Fixation of Carbon Dioxide. *ChemCatChem*. **2018**;10(14):3057-68.
340. Boens B, Teste K, Hadj-Bouazza A, Ismaili J, Zerrouki R. New thymine-based derivative of nitrogen mustards. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*. **2012**;31(3):197-205.
341. Micovic V, Mihailovic M. The reduction of acid amides with lithium aluminum hydride. *The Journal of Organic Chemistry*. **1953**;18(9):1190-200.
342. Zhang W, Fan W, Zhou Z, Garrison J. Synthesis and Evaluation of Radiolabeled Phosphoramidate Mustard with Selectivity for Hypoxic Cancer Cells. *ACS medicinal chemistry letters*. **2017**;8(12):1269-74.
343. XIAODI WHSXHCW, inventorAmido phosphate bis-curcumin ester compound, preparation method and application **2016**.
344. Bauermeister S, Modro AM, Modro TA, Zwierzak A. Phosphoric amides. Part 11. Intramolecular reactivity of phosphorotriamidates. *Canadian journal of chemistry*. **1991**;69(5):811-6.
345. Mathis R, Bouissou T, Ayed N, Baccar B-G. Méthodes d'investigation de la liaison P-N et étude comparative, en spectrographie infrarouge, de la mobilité du proton N-H dans des motifs A-NH (A = Si, Ge, P, As, S). *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy*. **1986**;42(4):519-23.
346. Pink R, Spratt R, Stirling C. 1058. Long-range effects in nuclear magnetic resonance. Specific shielding by aryl groups in some flexible systems. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*. **1965**:5714-8.
347. Price CC, Kabas G, Nakata I. Some Amino and Ammonio Nitrogen Mustard Analogs. *Journal of medicinal chemistry*. **1965**;8(5):650-5.
348. Arendaruk AP, Skoldinov AP, Smirnova NV, Solov'ev VM, Kharkevich DA. Quaternary salts of aminoalkyl esters of benzoic acid. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. **1972**;6(1):14-7.
349. Urry WH, Szecsi P, Ikoku C, Moore DW. Electrophilic Addition Reactions of 1,1-Dimethyldiazonium Bromide with 1,3-Dienes and Styrenes. *Journal of the American Chemical Society*. **1964**;86(11):2224-9.
350. Hoffmann KJ, Stenberg P, Ljunggren C, Svensson U, Nilsson JLG, Eriksson O, et al. Fibrin-stabilizing factor inhibitors. 12. 5-Dibenzylaminopentylamine and related compounds, a new type of FSF [fibrin-stabilizing factor] inhibitors. *Journal of medicinal chemistry*. **1975**;18(3):278-84.
351. Aiko I. Studies on Carcinostatic Substances. XXXIII. Preparation of Derivatives of Nitrogen Mustard of Strongly Basic Character. *CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN*. **1961**;9(5):343-51.

352. Corse HASW, inventor; Eli Lilly and Co Ltd (GB) assignee. 2-methoxy-6-chloro-9-[4'-(diisopropylamino)-butylamino]-acridine. United States of America patent US2424062A. 1944.
353. Finch H, Peterson E, Ballard S. Reactions of acrolein and related compounds. VI. Condensations with amines. Journal of the American Chemical Society. **1952**;74(8):2016-
354. Burckhalter. Journal of the American Chemical Society. **1943**;65:2013.
355. Hoang CT, Bouillère F, Johannesen S, Zulauf A, Panel C, Pouilhès A, et al. Amino Acid Homologation by the Blaise Reaction: A New Entry into Nitrogen Heterocycles. The Journal of Organic Chemistry. **2009**;74(11):4177-87.