



COLLEGE DOCTORAL

École Doctorale
BIOLOGIE SANTÉ



Université Lille Nord de France
Pôle de Recherche
et d'Enseignement Supérieur



Université Lille 2
Droit et Santé

UNIVERSITE LILLE NORD DE FRANCE – LILLE 2 DROIT ET SANTE
INSTITUT DE CHIMIE PHARMACEUTIQUE ALBERT LESPAGNOL

THESE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LILLE 2
Spécialité : Sciences du médicament

Présentée et soutenue publiquement le 10 juillet 2014
par
Séverine RAVEZ

CONCEPTION, SYNTHÈSE ET ÉVALUATION PHARMACOLOGIQUE
D'HÉTÉROCYCLES AZOTÉS À VISÉE ANTICANCÉREUSE

JURY

Directeur de thèse :

Patrick Depreux

Professeur des Universités – Université Lille 2
Praticien Hospitalier

Co-encadrant de thèse :

Laurence Goossens

Maître de Conférences des Universités – Université Lille 2

Rapporteurs :

Bernard Pirotte
Patricia Busca

Professeur des Universités – Université de Liège
Maître de Conférences des Universités – Université Paris Descartes

Examineurs :

Stéphanie Hesse
Véronique Servent
Christian Bailly
Jean-François Goossens

Maître de Conférences des Universités – Université de Lorraine
Praticien Hospitalier – Centre Oscar Lambret, Lille
Directeur de la Recherche – Laboratoire Pierre Fabre, Toulouse
Professeur des Universités – Université Lille 2

Remerciements

J'adresse mes plus vifs remerciements à :

Monsieur le Professeur Patrick Depreux

Professeur des Universités - Université Lille 2

Praticien Hospitalier

*Je tiens à vous adresser mes plus vifs remerciements
pour avoir mené à bien ce projet de recherche et pour en avoir assuré sa direction.
Je vous remercie également de m'avoir fait confiance durant ces trois années.
Vos qualités scientifiques et pédagogiques nous ont toujours permis d'avancer.*

Madame le Docteur Laurence Goossens

Maître de Conférences des Universités - Université Lille 2

*Je vous remercie vivement pour votre grande disponibilité.
Vous m'avez suivi et encadré pendant ces trois ans,
et je vous en suis très reconnaissante.
Vous avez su me laisser une marge de liberté pour mener à bien ce projet,
tout en y gardant un œil critique et avisé. Merci beaucoup Laurence.*

Je remercie les membres du jury :

Madame le Docteur Patricia Busca

Maître de conférences des Universités - Université Paris-Descartes

*Vous me faites l'honneur de siéger dans ce jury de thèse en tant que rapporteur.
Je tiens à vous remercier de nous faire partager vos compétences dans le domaine
de la chimie médicinale et d'apporter un regard critique à ce travail.*

Monsieur le Professeur Bernard Pirotte

Professeur des Universités - Université de Liège

*Vous me faites l'honneur de juger ce travail de thèse et d'en être rapporteur.
De par votre expérience et vos compétences en chimie médicinale,
je vous remercie du regard avisé que vous porterez à ce travail.
Je tiens également à vous remercier
d'avoir suivi mon travail durant ces trois années.*

Madame le Docteur Véronique Servent

Praticien Hospitalier - Centre Oscar Lambret de Lille

*Vous me faites l'honneur de juger ce travail de thèse.
Je vous remercie de nous faire partager vos compétences
dans le domaine du cancer et d'apporter un regard avisé à ce travail.*

Madame le Docteur Stéphanie Hesse

Maître de Conférences des Universités - Université de Lorraine

*Vous me faites l'honneur de siéger dans ce jury.
De par votre expérience et vos compétences en chimie hétérocyclique,
je vous remercie du regard avisé que vous porterez à ce travail.
Je tiens également à vous remercier
pour avoir suivi mon travail durant ces trois années.*

Monsieur le Professeur Christian Bailly

Directeur de la Recherche, Institut de Recherche Pierre Fabre, Toulouse

*Je suis très honorée que vous ayez accepté de juger mon travail.
Je vous remercie de nous faire partager vos connaissances
et d'apporter un regard critique à ce travail.*

Monsieur le Professeur Jean-François Goossens

Professeur des Universités - Université de Lille 2

*Vous me faites l'honneur de juger ce travail de thèse et je vous en remercie.
Je vous remercie également de m'avoir accueillie au sein de votre laboratoire pour
réaliser les tests pharmacologiques des agents intercalants.
Merci pour les conseils avisés que vous apporterez à ce travail.*

Je tiens à remercier toutes celles et ceux qui ont contribué à ce travail :

Monsieur le Professeur Philippe Chavatte. *Merci de m'avoir accueillie au sein de votre laboratoire de recherche de l'Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol.*

Madame Amélie Barczyk, ou Mamie Suze. *Je te remercie pour avoir réalisé TOUS les tests pharmacologiques de mes composés : inhibition enzymatique, inhibition de la prolifération, angiogenèse, invasion... (Ça en fait des schokobons tout ça !). Je te dois un grand merci aussi pour m'avoir aidée et accompagnée à Strasbourg. Enfin, je tiens également à te remercier pour ta sympathie et ta bonne humeur au quotidien. A quand un pulcinella pour fêter tout ça ?*

Madame Nadège Schifano : *Je te remercie de m'avoir accueillie en chimie analytique pour réaliser les tests de fluorescence. Tu m'as formée à ces tests avec une grande pédagogie et beaucoup de sympathie.*

Madame Brigitte Baldeyrou : *Je vous remercie de m'avoir consacré du temps pour me former aux tests d'interaction avec l'ADN. J'ai toujours été très bien accueillie au sein de votre laboratoire.*

Je tiens également à remercier tous mes collègues et amis du laboratoire :

- * *Les garçons du Labo 1 : Aurélien (Claudie) et Lucas (Lulu, Lucien, Pralino... et j'en passe), je vous remercie pour votre grande sympathie et votre sens de l'humour, comment dire... décalé ?!*
J'associe à ces remerciements le grand Jeff Tuches alias Davy pour son soutien et ses nombreux conseils.
Wei, thanks to you, I have a little progress in english !
- * **Perrine**, *je te remercie pour tout : ta sympathie, tes conseils, ta disponibilité, ton aide... et tes coups de gueule à la belote ! Vous formez une bonne équipe avec la vieille, un vrai couple ! Je repasserai te faire un petit coucou aux alentours du 16 septembre...*
- * **Omar**, *tu amènes du soleil dans ce labo et je t'en remercie ! Je te souhaite plein de bonnes choses pour la suite et surtout une belle thèse !*
- * **Frédérique**, *j'ai été très contente de travailler avec toi. Tu as toujours été là pour m'aider ou me rassurer dans mes choix. Merci maman !*

- * **Natascha**, merci de m'avoir aidée et conseillée pendant ces années de thèse.
- * **Xavier**, plus connu sous le nom de Papy ! Je te remercie d'avoir réalisé une partie des évaluations pharmacologiques. Merci également pour ta grande sympathie et pour avoir répondu à toutes mes questions de biologie !
- * **Fréd**, je te remercie pour ta bonne humeur quotidienne !
- * Je tiens également à remercier le **Professeur Régis Millet** et le **Docteur Christophe Furman**.

Je remercie aussi Monsieur le **Docteur Antonio Garofalo** qui m'a formé et qui m'a communiqué son enthousiasme pour ce sujet. *Merci Tonio !*

Je n'aurais pas pu réaliser tout ce travail sans l'aide de mes stagiaires : **Manon, Aurélie, Xavier, Anthony** et **Stéphane** ! *Un grand merci à vous !*

Mes remerciements vont également aux personnes des laboratoires de chimie thérapeutique et de chimie analytique ainsi qu'au personnel du laboratoire d'application de résonance magnétique nucléaire pour leur aide et leur disponibilité.

Enfin, je remercie ma famille et Chris pour leur soutien au cours de ces longues années d'études.

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX
LISTE DES ABRÉVIATIONS

INTRODUCTION	1
GENERALITES SUR LES CANCERS	2
I. LES CANCERS	2
1. Définition	2
2. Epidémiologie	2
2.1. Incidence	2
2.2. Mortalité.....	3
3. Typologie des cancers	4
4. Mécanismes fondamentaux de la carcinogenèse	4
4.1. Indépendance vis-à-vis des signaux de prolifération	5
4.2. Insensibilité aux signaux anti-prolifératifs	6
4.3. Acquisition d'une résistance à l'apoptose.....	6
4.4. Potentiel illimité de réplication	7
4.5. Stimulation de l'angiogenèse et métastases	7
5. Les traitements des cancers	7
5.1. La chirurgie	7
5.2. La radiothérapie	8
5.3. L'hormonothérapie	8
5.4. La chimiothérapie anticancéreuse	10
5.4.a. Les médicaments induisant des coupures de l'ADN.....	11
5.4.b. Les médicaments formant des adduits covalents avec l'ADN	12
5.4.c. Les médicaments interagissant avec le fuseau mitotique	13
5.4.d. Les anti-métabolites	14
5.4.e. Les nouvelles voies de recherche en chimiothérapie.....	15
II. LES PROTÉINES KINASES	18
1. Généralités sur les protéines kinases	18
2. Les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTKs)	19
2.1. Structure générale des RTKs.....	19
2.2. Activation des RTKs	20
2.2.a. Organisation du domaine tyrosine kinase intracellulaire	21
2.2.b. Phosphorylation du substrat	22
2.3. Régulation de l'activité tyrosine kinase	23
2.4. Les principales voies de signalisation activées par les RTKs	25
2.4.a. La voie des Mitogen Activated Protein Kinases (MAPK)	25
2.4.b. La voie PI3K/Akt	26
2.4.c. La voie JAK/STAT	27

3. L'Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)	29
3.1. La famille des récepteurs ErbB/HER à activité tyrosine kinase	29
3.2. Structure de l'EGFR.....	30
3.3. Les ligands de l'EGFR	30
3.4. Activation de l'EGFR	31
3.5. Expression de l'EGFR.....	34
4. Le Stem Cell Growth Factor Receptor ou le récepteur c-Kit	35
4.1. Structure du récepteur c-Kit	35
4.2. Le ligand SCF	36
4.3. Activation du récepteur c-Kit.....	37
4.4. Expression de c-Kit.....	39
4.5. Cas particulier : c-Kit et GIST	39
5. Le Platelet-Derived Growth Factor Receptor (PDGFR)	40
5.1. Les ligands de la famille PDGF	40
5.2. La famille des récepteurs PDGFR à activité tyrosine kinase	40
5.3. Activation du récepteur	41
5.4. Expression du PDGFR	42
6. La famille des récepteurs au VEGF	43
6.1. Les ligands de la famille VEGF	43
6.2. La famille des récepteurs VEGFR à activité tyrosine kinase	44
6.3. VEGFR et cancer	46
III. LA NÉOVASCULARISATION	47
1. Les cellules impliquées dans la néovascularisation	47
2. Mécanisme de la néovascularisation	48
3. Mécanisme de l'angiogenèse	49
3.1. L'angiogenèse physiologique.....	50
3.2. L'angiogenèse pathologique	51
3.2.a. Hypoxie et angiogenèse	52
3.2.b. Le « switch » angiogénique	53
IV. LES THÉRAPIES CIBLÉES	55
1. Les anticorps monoclonaux	55
1.1. Structure des anticorps monoclonaux	55
1.2. Anticorps monoclonaux et oncologie.....	56
1.3. Mécanismes d'action des anticorps monoclonaux	57
1.4. Effets secondaires des anticorps monoclonaux	59
2. Les inhibiteurs de tyrosine kinase	59
2.1. Classification et mécanismes des inhibiteurs de tyrosine kinase	59
2.1.a. Les inhibiteurs de type I	60
2.1.b. Les inhibiteurs de type II	61
2.1.c. Les inhibiteurs de type III et IV	62

2.1.d. Les inhibiteurs covalents ou inhibiteurs irréversibles.....	63
2.2. Les inhibiteurs de tyrosine kinase utilisés en oncologie	64
2.2.a. Les inhibiteurs de l'EGFR.....	64
2.2.b. Les inhibiteurs du VEGFR	65
2.2.c. Les inhibiteurs mixtes EGFR/VEGFR	66
2.3. Effets secondaires des inhibiteurs de tyrosine kinase	67
2.4. Résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase	67
3. Thérapies ciblées et traitements individualisés	68
4. Thérapies associatives.....	69
TRAVAUX SUR LES INHIBITEURS DE TYROSINE KINASE	71
TRAVAUX ANTÉRIEURS MENÉS AU SEIN DU LABORATOIRE.....	72
I. LA QUINAZOLINE AU CENTRE DES ITKS.....	72
II. FONCTIONNALISATION DE LA QUINAZOLINE	73
1. Travaux de modulation de la position 4.....	73
1.1. Les 4-anilinoquinazolines	74
1.2. Les 4-N-alkylanilinoquinazolines	76
1.3. Les 4-aryloxyquinazolines	78
2. Travaux de modulation des substituants en position 6 et 7.....	82
2.1. Modulations des chaînes sur les dérivés halogénés.....	82
2.2. Modulations des chaînes sur les dérivés substitués par un carbamate	83
3. Travaux de modulation de l'hétérocycle quinazolinique.....	84
3.1. Conception de dérivés tricycliques analogues du PD153035	84
3.2. Conception de dérivés pyrimidiniques analogues de l'Iressa.....	84
3.3. Conception de dérivés quinoléiniques.....	85
TRAVAUX PERSONNELS.....	86
LES 7-AMINOALKOXYQUINAZOLINES	86
I. CONCEPTION DES 7-AMINOALKOXYQUINAZOLINES.....	86
II. EVALUATION PHARMACOLOGIQUE DES 7-AMINOALKOXYQUINAZOLINES	87
1. Résultats d'inhibition enzymatique	87
2. Résultats d'inhibition de la prolifération cellulaire	89
2.1. Inhibition de la prolifération de PC3, HT29, MCF7 et HUVEC	89
2.2. Inhibition de la prolifération de MRC5.....	91
2.3. Chaînes aminoalkoxy et cytotoxicité	92
3. Inhibition de l'angiogenèse par les 7-aminoalkoxyquinazolines.....	94
4. Inhibition de l'invasion par les 7-aminoalkoxyquinazolines	96

5. Etude de stabilité du composé 13	99
5.1. Stabilité plasmatique	99
5.2. Stabilité microsomiale.....	100
III. STRATÉGIE DE SYNTHÈSE DES 7-AMINOALKOXYQUINAZOLINES	102
1. Synthèse des phénols substitués par un motif urée (15-17)	103
2. Synthèse du 3-butoxy-4-hydroxybenzoate de méthyle (21)	103
3. Synthèse des dérivés chlorés (42-46)	105
4. Synthèse des produits cibles (1-14)	107
MODULATION DE LA POSITION 2 DE LA QUINAZOLINE	109
I. TRAVAUX DE MODULATION DE LA POSITION 2 DE LA QUINAZOLINE	109
II. RÉSULTATS PHARMACOLOGIQUES	112
1. Résultats pharmacologiques des benzo-[d]-1,2,3-benzotriazines	112
2. Résultats pharmacologiques des 2-aminoquinazolines	113
2.1. Résultats pharmacologiques des 2-amino-4-anilinoquinazolines	113
2.1.a. Résultats d'inhibitions enzymatique et cellulaire	113
2.1.b. Identification de la cible des 2-amino-4-anilinoquinazolines 53, 54 et 55	115
2.2. Résultats pharmacologiques des 2-amino-4-aryloxyquinazolines	125
3. Résultats pharmacologiques des 2-aminométhylquinazolines	127
III. STRATÉGIE DE SYNTHÈSE DES 7-AMINOALKOXYQUINAZOLINES	128
1. Synthèse des intermédiaires de type anilino	128
1.1. Synthèse des dérivés de type anilino-carbamate	128
1.2. Synthèse du dérivé de type anilino-urée	128
2. Stratégie de synthèse des benzo-[d]-1,2,3-benzotriazines	129
2.1. Synthèse de la 4-chlorobenzo-[d]-1,2,3-benzotriazine (voie A)	130
2.2. Obtention des produits cibles par la voie B.....	131
2.3. Obtention des produits cibles par la voie C.....	132
3. Stratégie de synthèse des 2-aminoquinazolines	136
3.1. Synthèse du chlorhydrate de la 2-amino-6,7-diméthoxyquinazolin-4-one	136
3.2. Synthèse du produit cible 54 par la voie A	137
3.3. Synthèse de la 2- <i>tert</i> -butylamido-4-chloroquinazoline (75)	138
3.4. Obtention des 2-amino-4-anilinoquinazolines par la voie B.....	139
3.5. Obtention des 2-amino-4-aryloxyquinazolines par la voie B.....	140
3.6. Obtention de la 2-amino-4- <i>N</i> -méthylquinazoline 62.....	141
4. Stratégie de synthèse des 2-aminométhylquinazolines	142
4.1. Synthèse du 2-amino-4,5-diméthoxybenzonitrile	143
4.2. Obtention des produits cibles par la voie A	143
4.3. Obtention des produits cibles par la voie B	144
4.4. Obtention des produits cibles par la voie C	145
4.4.a. Synthèse du dérivé dichloré (81).....	145
4.4.b. Synthèse du produit cible (61).....	147

MODULATION DE L'HÉTÉROCYCLE.....	149
I. CONCEPTION DES THIAZOLOTRIAZINES ET THIÉNOPYRIMIDINES	149
II. RÉSULTATS PHARMACOLOGIQUES	151
1. Résultats pharmacologiques du composé 84.....	151
2. Résultats pharmacologiques des thiénoypyrimidines et des quinazolines	151
2.1. Résultats enzymatiques (EGFR et VEGFR-2) et cellulaires.....	151
2.2. Résultats enzymatiques des dérivés substitués par un motif urée	157
III. STRATÉGIE DE SYNTHÈSE	160
1. Synthèse des thiazolotriazines.....	160
1.1. Synthèse de l'intermédiaire chloré 107.....	160
1.2. Synthèse des 4-anilino-thiazolotriazines.....	161
1.3. Synthèse de la 4-aryloxy-thiazolotriazine 84.....	162
2. Synthèse des thiénoypyrimidines et des quinazolines.....	163
2.1. Synthèse des produits cibles « anilino ».....	163
2.2. Synthèse des produits cibles « aryloxy »	163
 CONCLUSIONS & PERSPECTIVES	 166
 PARTIE EXPERIMENTALE.....	 170
 PROTOCOLES BIOLOGIQUES.....	 170
Inhibition de la prolifération cellulaire	170
Inhibition de l'activité tyrosine kinase.....	172
Etude du pouvoir anti-angiogénique.....	174
Etude du pouvoir invasif.....	174
Test de dénaturation thermique de l'ADN.....	176
Etude de l'absorption UV-visible	177
Etude du dichroïsme circulaire	177
Etude de fluorescence	178
 CHEMICAL METHODS.....	 179
General chemistry	179
 SYNTHESIS OF ANILINO DERIVATIVES	 180
General procedure for (aminophenyl)carbamic acid esters (63-65).....	180
<i>N</i> -(4-aminophenyl)carbamic acid methyl ester (63)	180
<i>N</i> -(3-methyl-4-aminophenyl)carbamic acid ethyl ester (64).....	180
<i>N</i> -(3-chloro-4-aminophenyl)carbamic acid ethyl ester (65).....	181
<i>N</i> -(4-aminophenyl)- <i>N'</i> -(3-bromophenyl)urea (66)	181
 SYNTHESIS OF ARYLOXY DERIVATIVES.....	 183
General procedure for urea derivatives (15-17).....	183

<i>N</i> -(3-Bromophenyl)- <i>N'</i> -(4-hydroxyphenyl}urea (15)	183
<i>N</i> -(3-Bromophenyl)- <i>N'</i> -(3-methyl-4-hydroxyphenyl}urea (16).....	183
<i>N</i> -(3-Bromophenyl)- <i>N'</i> -(3-chloro-4-hydroxyphenyl}urea (17)	184
SYNTHESIS OF 7-AMINOALKOXYQUINAZOLINES	185
Methyl 3,4-dihydroxybenzoate (18)	185
Methyl 4-benzyloxy-3-hydroxybenzoate (19)	185
Methyl 4-benzyloxy-3-butoxybenzoate (20).....	186
Methyl 3-butoxy-4-hydroxybenzoate (21).....	186
General procedure for aminoalkoxy derivatives (22-26).....	187
Methyl 3-butoxy-4-diethylaminoethoxybenzoate hydrochloride (22)	187
Methyl 3-methoxy-4-diethylaminoethoxybenzoate hydrochloride (23).....	188
Methyl 3-methoxy-4-piperidinoethoxybenzoate (24).....	188
Methyl 3-methoxy-4-pyrrolidinoethoxybenzoate (25)	189
Methyl 3-methoxy-4-piperidinopropoxybenzoate (26).....	189
General procedure for nitro derivatives (27-31)	190
Methyl 2-nitro-4-diethylaminoethoxy-5-butoxybenzoate hydrochloride (27).....	190
Methyl 2-nitro-4-diethylaminoethoxy-5-methoxybenzoate hydrochloride (28).....	191
Methyl 2-nitro-4-piperidinoethoxy-5-methoxybenzoate (29).....	191
Methyl 2-nitro-4-pyrrolidinoethoxy-5-methoxybenzoate (30)	192
Methyl 2-nitro-4-piperidinopropoxy-5-methoxybenzoate (31)	192
General procedure for methyl-2-amino-benzoate derivatives (32-36)	193
Methyl 2-amino-4-diethylaminoethoxy-5-butoxybenzoate (32).....	193
Methyl 2-amino-4-diethylaminoethoxy-5-methoxybenzoate (33).....	193
Methyl 2-amino-4-piperidinoethoxy-5-methoxybenzoate (34)	194
Methyl 2-amino-4-pyrrolidinoethoxy-5-methoxybenzoate (35).....	194
Methyl 2-amino-4-piperidinopropoxy-5-methoxybenzoate (36).....	195
General procedure for quinazolin-4-one derivatives (37-41).....	195
6-Butoxy-7-diethylaminoethoxyquinazolin-4-one (37)	195
6-Methoxy-7-diethylaminoethoxyquinazolin-4-one (38)	196
6-Methoxy-7-piperidinoethoxyquinazolin-4-one (39)	196
6-Methoxy-7-pyrrolidinoethoxyquinazolin-4-one (40)	197
6-Methoxy-7-piperidinopropoxyquinazolin-4-one (41).....	197
General procedure for 4-chloroquinazoline derivatives (42-46).....	198
4-Chloro-6-butoxy-7-diethylaminoethoxyquinazoline (42).....	198
4-Chloro-6-methoxy-7-diethylaminoethoxyquinazoline (43).....	198
4-Chloro-6-methoxy-7-piperidinoethoxyquinazoline (44)	199
4-Chloro-6-methoxy-7-pyrrolidinoethoxyquinazoline (45).....	199
4-Chloro-6-methoxy-7-piperidinopropoxyquinazoline (46).....	200
General procedure for the obtention of 7-aminoalkoxyquinazolines (1-14).....	200
<i>N</i> -(3-Bromophényl)- <i>N'</i> -{4-[(6-butoxy-7-diethylaminoethoxyquinazolin-4-yl)oxy]-phenyl}urea (1).....	201
<i>N</i> -(3-Bromophenyl)- <i>N'</i> -{3-methyl-4-[(6-butoxy-7-diethylaminoethoxyquinazolin-4-yl)oxy]-phenyl} urea (2)	201

<i>N</i> -(3-Bromophenyl)- <i>N'</i> -{4-[(6-methoxy-7-diethylaminoethoxyquinazolin-4-yl)oxy]-phenyl}urea (3).....	202
<i>N</i> -(3-Bromophenyl)- <i>N'</i> -{3-methyl-4-[(6-methoxy-7-diethylaminoethoxyquinazolin-4-yl)oxy]-phenyl}urea (4)	203
<i>N</i> -(3-Bromophenyl)- <i>N'</i> -{3-chloro-4-[(6-methoxy-7-diethylaminoethoxyquinazolin-4-yl)oxy]-phenyl}urea (5)	204
<i>N</i> -(3-Bromophenyl)- <i>N'</i> -{4-[(6-methoxy-7-piperidinoethoxyquinazolin-4-yl)oxy]-phenyl}urea hydrochloride (6)	205
<i>N</i> -(3-Bromophenyl)- <i>N'</i> -{3-methyl-4-[(6-methoxy-7-piperidinoethoxyquinazolin-4-yl)oxy]-phenyl}urea (7).....	206
<i>N</i> -(3-Bromophenyl)- <i>N'</i> -{3-chloro-4-[(6-methoxy-7-piperidinoethoxyquinazolin-4-yl)oxy]-phenyl}urea (8).....	207
<i>N</i> -(3-Bromophenyl)- <i>N'</i> -{4-[(6-methoxy-7-pyrrolidinoethoxyquinazolin-4-yl)oxy]-phenyl}urea (9)	208
<i>N</i> -(3-Bromophenyl)- <i>N'</i> -{3-methyl-4-[(6-methoxy-7-pyrrolidinoethoxyquinazolin-4-yl)oxy]-phenyl}urea (10)	209
<i>N</i> -(3-Bromophenyl)- <i>N'</i> -{3-chloro-4-[(6-methoxy-7-pyrrolidinoethoxyquinazolin-4-yl)oxy]-phenyl}urea (11)	210
<i>N</i> -(3-Bromophenyl)- <i>N'</i> -{4-[(6-methoxy-7-piperidinopropoxyquinazolin-4-yl)oxy]-phenyl}urea (12)	211
<i>N</i> -(3-Bromophenyl)- <i>N'</i> -{3-methyl-4-[(6-methoxy-7-piperidinopropoxyquinazolin-4-yl)oxy]-phenyl}urea hydrochloride (13)	212
<i>N</i> -(3-Bromophenyl)- <i>N'</i> -{3-chloro-4-[(6-methoxy-7-piperidinopropoxyquinazolin-4-yl)oxy]-phenyl}urea (14)	213
SYNTHESIS OF BENZOTRIAZINES	214
6,7-Dimethoxy-benzo-[<i>d</i>]-1,2,3-triazin-4-one (68).....	214
6,7-Dimethoxy-benzo-[<i>d</i>]-1,2,3-triazin-4-thione (69)	214
4-Methylthio-6,7-dimethoxy-benzo-[<i>d</i>]-1,2,3-triazine (70).....	215
4-Methylsulfonyl-6,7-dimethoxy-benzo-[<i>d</i>]-1,2,3-triazine (71).....	215
General procedure 4-anilino-6,7-dimethoxy-benzo-[<i>d</i>]-1,2,3-triazines (47-49).....	216
4-(3-Chloro-4-fluoroanilino)-6,7-dimethoxy-benzo-[<i>d</i>]-1,2,3-triazines (47)	216
<i>N</i> -(3-Methyl-4-(6,7-dimethoxy-benzo-[<i>d</i>]-1,2,3-triazin-4-ylaminophenyl)-carbamic acid ethyl ester (48)	217
<i>N</i> -(3-Bromophenyl)- <i>N'</i> -{4-[(6,7-dimethoxy-benzo-[<i>d</i>]-1,2,3-triazin-4-ylamino)]-phenyl}urea (49)	217
SYNTHESIS OF 2-AMINOQUINAZOLINES	218
2-Amino-6,7-dimethoxyquinazolin-4-one hydrochloride (72)	218
2-Amino-4-chloro-6,7-dimethoxyquinazoline (73)	218
2-Pivaloylamino-6,7-dimethoxyquinazolin-4-one (74)	219
2-Pivaloylamino-4-chloro-6,7-dimethoxyquinazoline (75)	219
General procedure for 2-amino-4-anilino-6,7-dimethoxyquinazolines (50-56)	220
2-Amino-4-(3-chloro-4-fluoroanilino)-6,7-dimethoxyquinazoline (50).....	220
2-Amino-4-(3-bromoanilino)-6,7-dimethoxyquinazoline (51)	221
2-Amino-4-(3-bromo-4-methylanilino)-6,7-dimethoxyquinazoline (52)	221
<i>N</i> -[4-(2-Amino-6,7-dimethoxyquinazolin-4-ylamino)phenyl]-carbamic acid methyl ester (53).....	222
<i>N</i> -[2-Methyl-4-(2-amino-6,7-dimethoxyquinazolin-4-ylamino)phenyl]-carbamic acid ethyl ester (54).....	223
<i>N</i> -[2-chloro-4-(2-amino-6,7-dimethoxyquinazolin-4-ylamino)phenyl]-carbamic acid ethyl ester (55)	223
<i>N</i> -(3-Bromophenyl)- <i>N'</i> -[4-(2-amino-6,7-dimethoxyquinazolin-4-ylamino)phenyl]urea (56).....	224
<i>N</i> -[2-Chloro-4-(2-amino-6,7-dimethoxyquinazolin-4- <i>N</i> -(methyl)ylamino)phenyl]carbamic acid ethyl ester (62)	225
General procedure for 2-amino-4-aryloxy-6,7-dimethoxyquinazolines (57-60)	226
2-Amino-4-(3-chloro-4-fluoroaryloxy)-6,7-dimethoxyquinazoline (57).....	226
2-Amino-4-(3-bromoaryloxy)-6,7-dimethoxyquinazoline (58).....	227
<i>N</i> -(3-Bromophenyl)- <i>N'</i> -[4-(2-amino-6,7-dimethoxyquinazolin-4-yloxy)phenyl]urea (59).....	227

<i>N</i> -(3-Bromophenyl)- <i>N'</i> -[3-methyl-4-(2-amino-6,7-dimethoxyquinazolin-4-yloxy)phenyl]urea (60).....	228
SYNTHESIS OF 2-AMINOMÉTHYLQUINAZOLINES	229
2-Amino-4,5-dimethoxybenzamide (76).....	229
2-[(2-Chloroacetyl)amino]-4,5-dimethoxybenzamide (77)	229
2-[(2-(Benzylamino)acetyl)amino]-4,5-dimethoxybenzamide (79).....	230
2-[(2-(Benzylamino)methyl]-6,7-dimethoxyquinazolin-4-one (79)	231
2-Chloromethyl-4-chloro-6,7-dimethoxyquinazoline (81)	231
2-(Chloromethyl)-4-(3-chloro-4-fluoroanilino)-6,7-dimethoxyquinazoline hydrochloride (82).....	232
2-(Phtalimidomethyl)-4-(3-chloro-4-fluoroanilino)-6,7-dimethoxyquinazoline hydrochloride (83)	232
2-(Aminomethyl)-4-(3-chloro-4-fluoroanilino)-6,7-dimethoxyquinazoline (61)	233
SYNTHESIS OF THIAZOLOTRIAZINES	234
4-Amino-2-(4-morpholinyl)-[1,3]-thiazole-5-carbonitrile (106)	324
4-Chloro-6-(4-morpholinyl)-[1,3]-thiazolo-[4,5- <i>d</i>]-[1,2,3]-triazine (107)	234
<i>N</i> -(3-Bromophenyl)- <i>N'</i> -{3-methyl-4-[(6-(4-morpholinyl)-[1,3]-thiazolo-[4,5- <i>d</i>]-[1,2,3]-triazin-4-yl)oxy]-phenyl}urea (84).....	235
SYNTHESIS OF QUINAZOLINES AND THIÉNOPYRIMIDINES	236
General procedure for 4-anilino-quinnazolines/thienopyrimidines (85-101)	236
4-(3-Chloro-4-fluoroanilino)-quinazoline (85)	236
<i>N</i> -[2-Methyl-4-(quinazolin-4-ylamino)phenyl]-carbamic acid ethyl ester (86).....	237
<i>N</i> -(3-Bromophenyl)- <i>N'</i> -[4-(quinazolin-4-ylamino)phenyl]urea (87)	237
4-(3-Chloro-4-fluoroanilino)-thieno[2,3- <i>d</i>]pyrimidine (91)	238
<i>N</i> -[2-Methyl-4-(thieno[2,3- <i>d</i>]pyrimidin-4-ylamino)phenyl]-carbamic acid ethyl ester (92).....	238
<i>N</i> -(3-Bromophenyl)- <i>N'</i> -[4-(thieno[2,3- <i>d</i>]pyrimidin-4-ylamino)phenyl]urea (93).....	239
4-(3-Chloro-4-fluoroanilino)-5,6,7,8-tetrahydrobenzo[4,5]thieno[2,3- <i>d</i>]pyrimidine (99)	239
<i>N</i> -[2-Methyl-4-(5,6,7,8-tetrahydrobenzo[4,5]thieno[2,3- <i>d</i>]pyrimidin-4-ylamino)phenyl]-carbamic acid ethyl ester (100).....	240
<i>N</i> -(3-Bromophenyl)- <i>N'</i> -[4-(5,6,7,8-tetrahydrobenzo[4,5]thieno[2,3- <i>d</i>]-pyrimidin-4-ylamino)phenyl]urea (101)	240
General procedure for 4-aryloxy-quinnazolines/thienopyrimidines substituted by halogen or urea	241
4-(3-Chloro-4-fluoroaryloxy)-quinazoline (88)	241
<i>N</i> -(3-Bromophenyl)- <i>N'</i> -{4-[(quinazolin-4-yl)oxy]-phenyl}urea (90).....	242
4-(3-Chloro-4-fluoroaryloxy)-thieno[2,3- <i>d</i>]pyrimidine (94)	242
<i>N</i> -(3-Bromophenyl)- <i>N'</i> -{4-[(thieno[2,3- <i>d</i>]pyrimidin-4-yl)oxy]-phenyl}urea (96)	243
<i>N</i> -(3-Bromophenyl)- <i>N'</i> -{3-methyl-4-[(thieno[2,3- <i>d</i>]pyrimidin-4-yl)oxy]-phenyl}urea (97)	243
<i>N</i> -(3-Bromophenyl)- <i>N'</i> -{3-chloro-4-[(thieno[2,3- <i>d</i>]pyrimidin-4-yl)oxy]-phenyl}urea (98)	244
4-(3-Chloro-4-fluoroaryloxy)-5,6,7,8-tetrahydrobenzo[4,5]-thieno[2,3- <i>d</i>]pyrimidine (102).....	244
<i>N</i> -(3-Bromophenyl)- <i>N'</i> -{4-[(5,6,7,8-tetrahydrobenzo[4,5]-thieno[2,3- <i>d</i>]pyrimidin-4-yl)oxy]-phenyl}urea (103)	245
<i>N</i> -(3-Bromophenyl)- <i>N'</i> -{3-methyl-4-[(5,6,7,8-tetrahydrobenzo[4,5]-thieno[2,3- <i>d</i>]pyrimidin-4-yl)oxy]-phenyl}urea (104).....	246
<i>N</i> -(3-Bromophenyl)- <i>N'</i> -{3-chloro-4-[(5,6,7,8-tetrahydrobenzo[4,5]-thieno[2,3- <i>d</i>]pyrimidin-4-yl)oxy]-phenyl}urea (105).....	246

4-(3-Methyl-4-aminoaryloxy)-quinazoline (109)	247
4-(3-Methyl-4-aminoaryloxy)-thieno[2,3- <i>d</i>]pyrimidine (110).....	247
<i>N</i> -[2-Methyl-4-(quinazolin-4-yloxy)phenyl]-carbamic acid ethyl ester (89).....	248
<i>N</i> -[2-Methyl-4-(thieno[2,3- <i>d</i>]pyrimidin-4-yloxy)phenyl]-carbamic acid ethyl ester (95).....	249

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	250
-----------------------------------	------------

LISTE
DES FIGURES
ET DES TABLEAUX

Figure 1 : Incidence des cas de cancers dans le monde en 2012	2
Figure 2 : Mortalité par cancer dans le monde en 2012	3
Figure 3 : Caractéristiques des cellules cancéreuses	5
Figure 4 : Mode d'action de l'hormonothérapie.....	10
Figure 5 : Mécanisme simplifié de phosphorylation par les kinases	18
Figure 6 : Schéma général des RTKs	19
Figure 7 : Schéma général des 20 familles de RTKs	20
Figure 8 : Domaine catalytique de la protéine kinase cAPK.....	21
Figure 9 : Principales interactions entre l'ATP et le site catalytique d'un RTK.....	23
Figure 10 : Phénomène d'endocytose des récepteurs ErbB1 et ErbB2	24
Figure 11 : Schéma simplifié de la voie des <i>Mitogen Activated Protein Kinases</i> (MAPK).....	26
Figure 12 : Schéma simplifié de la voie PI3K/Akt.....	27
Figure 13 : Schéma simplifié de la voie JAK/STAT	28
Figure 14 : Récepteurs ErbB/HER à activité tyrosine kinase.....	29
Figure 15 : Structure primaire (a) et structure tridimensionnelle (b) de l'EGF.....	31
Figure 16 : Représentation schématique de l'activation de l'EGFR par l'EGF	32
Figure 17 : Représentation schématique de l'activation de l'EGFR par l'EGF	33
Figure 18 : Schéma simplifié de l'organisation structurale du récepteur c-Kit.....	35
Figure 19 : Représentation schématique des différentes isoformes du SCF.....	36
Figure 20 : Représentation schématique de l'activation de c-Kit par le SCF.....	37
Figure 21 : Interaction entre le SCF et c-Kit au niveau des domaines D1, D2 et D3.....	38
Figure 22 : Structure tridimensionnelle d'un dimère de PDGF-BB	40
Figure 23 : La famille des récepteurs PDGFR à activité tyrosine kinase.....	41
Figure 24 : Isoformes du ligand VEGF	43
Figure 25 : Structure tridimensionnelle d'un monomère et d'un dimère de VEGF	44
Figure 26 : La famille des récepteurs VEGFR à activité tyrosine kinase.....	45
Figure 27 : Développement d'un réseau vasculaire sanguin	49
Figure 28 : Schéma de la formation d'un réseau vasculaire lors de l'angiogenèse	51
Figure 29 : Régulation du facteur HIF en condition de normoxie.....	52
Figure 30 : Régulation du facteur HIF en condition d'hypoxie.....	53
Figure 31 : La « balance » angiogénique.....	54
Figure 32 : Structures des différents types d'Acmo	56
Figure 33 : Principaux mécanismes d'action des Acmo.....	57
Figure 34 : Cristallisation de l'erlotinib (Tarceva) dans le site actif de l'EGFR.....	61
Figure 35 : Configuration DFG-in et DFG-out	61
Figure 36 : Pharmacophore des ITKs de type II.....	62
Figure 37 : Docking du composé P11 dans le site actif de l'EGFR et du VEGFR-2.....	75

Figure 38 : Docking du composé P20 dans le site actif du VEGFR-2	79
Figure 39 : Travaux de modulation autour de la position 4 de la quinazoline	81
Figure 40 : Pourcentages d'inhibition à 1 μ M des produits 1 à 14 sur MRC5 et HT29.....	92
Figure 41 : Mécanisme potentiel des analogues P24 et 13.....	93
Figure 42 : Inhibition de la formation de capillaires par les produits P23, 2, 4, 7, 10 et 14.....	95
Figure 43a : Inhibition de l'invasion par les produits P23, 2, 4, 7, 10 et 14.....	97
Figure 43b : Pourcentages d'invasion des produits P23, 2, 4, 7, 10 et 14.....	98
Figure 44 : Représentation graphique des résultats de stabilité plasmatique des composés P24 et 13	99
Figure 45 : Représentation graphique des résultats de stabilité microsomiale des composés P24 et 13	100
Figure 46 : Schéma simplifié de l'action des inhibiteurs de PDEs.....	116
Figure 47 : Représentation schématique de la mesure d'absorbance de l'ADN ou du complexe ADN/ligand en fonction de la température	118
Figure 48 : Etude spectrale des composés EBE-A22, P11, 55 et 62	120
Figure 49 : Etude du dichroïsme circulaire des composés EBE-A22, P11, 55 et 62.....	122
Figure 50 : Principe de l'étude de fluorescence par compétition avec le BET.....	123
Figure 51 : Mesure de la constante d'affinité pour l'ADN du composé 55.....	124
Tableau 1 : Classification TNM du cancer colorectal	4
Tableau 2 : Acmo approuvés par la FDA en oncologie depuis 1997.....	56
Tableau 3 : Résultats enzymatiques (EGFR et VEGFR-2) des produits P1 à P3.....	73
Tableau 4 : Résultats enzymatiques (EGFR et VEGFR-2) des produits P4 à P12.....	74
Tableau 5 : Résultats des tests de dénaturation thermique de l'ADN et d'inhibition de la prolifération cellulaire sur HT29 (cancer côlon) des produits P13 à P16	77
Tableau 6 : Résultats enzymatiques (EGFR et VEGFR-2) des produits P17 à P20.....	78
Tableau 7 : Résultats enzymatiques (VEGFR-2) des produits P20 à P28.....	79
Tableau 8 : Résultats enzymatiques (VEGFR-1, VEGFR-3, PDGFR- β , c-Kit, c-Met, Src et Raf) des produits P23 à P25.....	80
Tableau 9 : Résultats d'inhibition de la prolifération (PC3, HT29, MCF7, HUVEC) des produits P23 à P25.....	80
Tableau 10 : Résultats d'inhibition enzymatique (EGFR et VEGFR-2) et d'inhibition de la prolifération (PC3) des produits P26 à P29.....	83
Tableau 11 : Résultats d'inhibition enzymatique des produits 1 à 14.....	88
Tableau 12 : Résultats d'inhibition de la prolifération cellulaire des produits 1 à 14.....	90
Tableau 13 : Résultats d'inhibition (BCRP et P-gp) des produits P24 et 13.....	94
Tableau 14 : Rendements des produits 22 à 26.....	105
Tableau 15 : Rendements des produits cibles 1 à 14.....	108

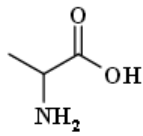
Tableau 16 : Résultats enzymatiques et cellulaires des produits 47, 48 et 49	112
Tableau 17 : Résultats enzymatiques et cellulaires des produits 50 à 56.....	114
Tableau 18 : Résultats d'inhibition enzymatique des PDEs 3, 4 et 5.....	117
Tableau 19 : Valeurs de ΔT_m obtenues pour les 2-amino-4-anilinoquinazolines.....	119
Tableau 20 : Résultats enzymatiques et cellulaires des produits 57 à 60.....	126
Tableau 21 : Optimisation de la réaction de <i>S</i> -méthylation	134
Tableau 22 : Rendements des produits cibles de type benzo-[<i>d</i>]-1,2,3-triaziniques	135
Tableau 23 : Optimisation de la synthèse du produit 81	146
Tableau 24 : Résultats enzymatiques et cellulaires du composé 84.....	151
Tableau 25 : Résultats enzymatiques et cellulaires des dérivés halogénés en série anilino et aryloxy	152
Tableau 26 : Résultats enzymatiques et cellulaires des dérivés substitués par un carbamate en série anilino et aryloxy.....	153
Tableau 27 : Résultats enzymatiques et cellulaires des dérivés substitués par une urée en série anilino et aryloxy.....	154
Tableau 28 : Résultats d'inhibition enzymatique des dérivés substitués par une urée.....	158
Tableau 29 : Différentes conditions utilisées pour l'obtention du produit 108.....	162

LISTE DES
ABRÉVIATIONS

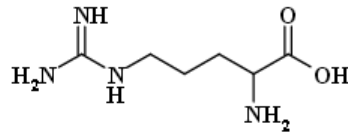
A	Absorbance
ABC	<i>ATP Binding Cassette</i>
ADCC	<i>Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity</i>
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADP	Adénosine DiPhosphate
Acmo	Anticorps monoclonaux
AMP	Adénosine MonoPhosphate
Ang-1	Angiopoïétine 1
Ang-2	Angiopoïétine 2
ATP	Adénosine TriPhosphate
BAD	<i>Bcl-2 Antagonist of cell Death</i>
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell Lymphoma 2</i>
BCRP	<i>Breast Cancer Resistance Protein</i>
BPE	<i>Buffer Phosphated EDTA</i>
CBNPC	Cancers Bronchiques Non à Petites Cellules
CDC	<i>Complement-Dependent Cytotoxicity</i>
CI50	Concentration Inhibitrice à 50%
Ct	C-terminal
ctDNA	<i>calf thymus DNA</i>
DC	Dichroïsme Circulaire
DMSO	DiMéthylSulfOxide
DMSO-d6	DiMéthylSulfOxide deutéré
DMF	<i>N,N-DiMéthylFormamide</i>
DNMT	<i>DNA MethylTransferase</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
Erk	<i>Extracellular-signal-regulated kinase</i>
Eq	Equivalent
Et	Ethyle
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FGFR	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor</i>
Flt	<i>Fms-like tyrosine</i>
FSH	Hormone Folliculo Stimulante
GAP	<i>GTPases Activating Protein</i>
GIST	<i>Gastro Intestinale Stromal Tumor</i>

Grb2	<i>Growth factor receptor binding 2</i>
HAT	Histone Acétyl Transférase
HB-EGF	<i>Heparin-Binding EGF</i>
HDAC	Histone DésACétylase
HIF-1	<i>Hypoxia Inducible Factor 1</i>
HRE	<i>Hypoxia-Regulated Element</i>
HUVEC	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cell</i>
IGF	<i>Insulin Growth Factor</i>
JAK	<i>Janus Kinase</i>
Kapp	Constante apparente
kDa	kilo Dalton
KDR	<i>Kinase insert Domain Receptor</i>
LH-RH	<i>Luteinising Hormone-Releasing Hormone</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MAPKK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase - Kinase</i>
mCPBA	Acide <i>mé</i> taChloroPerBenzoïque
Me	Méthyle
MMP	<i>Matrix MetalloProteinase</i>
mTOR	<i>mammalian Target Of Rapamycin</i>
NO	<i>Nitric Oxyde</i>
eNOS	<i>endothelial Nitric Oxide Synthase</i>
NRG	<i>Neuregulin</i>
NRP	<i>Neuropilin</i>
Nt	N-terminal
OMS	Organisation mondiale de la santé
PDE	PhosphoDiEstérase
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PDGFR	<i>Platelet-Derived Growth Factor Receptor</i>
PDK	<i>Phosphoinositide-Dependent Kinase</i>
PI3K	<i>PhosphatidyInositol-3-Kinase</i>
PIP2	<i>PhosphatidyInositol-(4,5)-biPhosphate</i>
PIP3	<i>PhosphatidyInositol-(3,4,5)-triPhosphate</i>
PLC γ	Phospholipase C γ

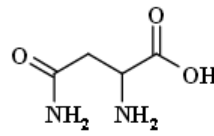
PIGF	<i>Placenta Growth Factor</i>
PTEN	<i>Phosphatase and TENsin homologue</i>
Rdt	Rendement
Rf	Rapport frontal
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RTK	Récepteur à activité Tyrosine Kinase
SCF	<i>Stem Cell Factor</i>
SCFR	<i>Stem Cell Factor Receptor</i>
SERM	<i>Selective Estrogen Receptor Modulator</i>
SOS	<i>Son Of Sevenless</i>
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
T.A.	Température Ambiante
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor β</i>
TFA	Acide TriFluoroacétique
THF	TétraHydroFurane
Tm	<i>Temperature of melting</i>
TNM	<i>Tumor Node Metastase</i>
mTOR	<i>mammalian Target of Rapamycin</i>
UV	Ultra-Violet
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VEGFR	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i>
VHL	<i>Von Hippel-Lindau</i>
5-FU	5-Fluoro-Uracile



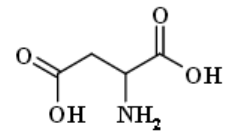
Alanine
Ala/A



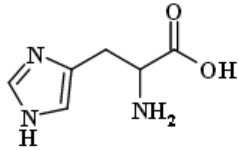
Arginine
Arg/R



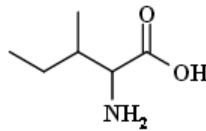
Asparagine
Asn/N



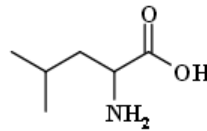
Acide Aspartique
Asp/D



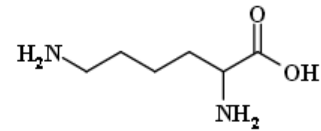
Histidine
His/H



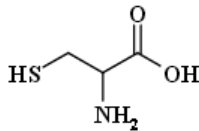
Isoleucine
Ile/IL



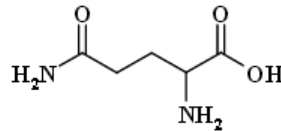
Leucine
Leu/L



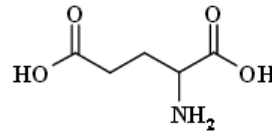
Lysine
Lys/K



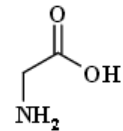
Cystéine
Cys/C



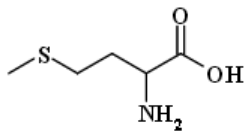
Glutamine
Gln/Q



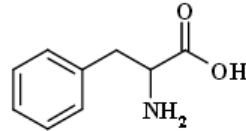
Acide Glutamique
Glu/E



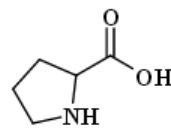
Glycine
Gly/G



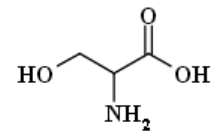
Méthionine
Met/M



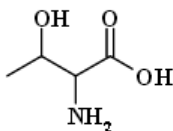
Phénylalanine
Phe/F



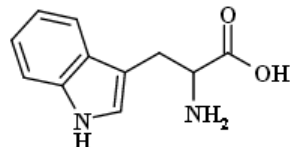
Proline
Pro/P



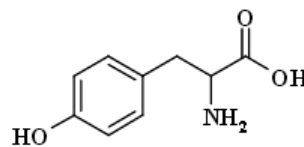
Sérine
Ser/S



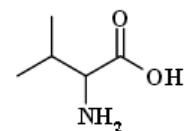
Thréonine
Thr/T



Tryptophane
Trp/W



Tyrosine
Tyr/Y



Valine
Val/V

INTRODUCTION

Avec près de 150 000 décès estimés en 2012, le cancer représente la première cause de mortalité en France. Cette maladie est caractérisée par la prolifération anarchique et incontrôlée de certaines cellules de l'organisme qui échappent aux mécanismes de contrôle. Même si les traitements comme l'hormonothérapie ou la chimiothérapie cytotoxique ralentissent efficacement la croissance tumorale, leur utilisation est souvent mal tolérée du fait de leur forte toxicité. A l'heure actuelle, les thérapies anticancéreuses visent principalement les cellules tumorales pour éviter ces effets secondaires. Ces nouvelles thérapies agissent notamment sur des protéines surexprimées par les cellules tumorales, telles que les récepteurs aux facteurs de croissance à activité tyrosine kinase. Plusieurs familles de récepteurs à activité tyrosine kinase sont considérées comme des cibles thérapeutiques potentielles pour concevoir de nouveaux composés anticancéreux. Nos travaux se sont essentiellement portés sur quatre de ces récepteurs : l'EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) et le récepteur c-Kit impliqués dans la prolifération cellulaire ainsi que sur deux récepteurs jouant un rôle crucial dans le phénomène angiogénique : le VEGFR (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*) et le PDGFR, (*Platelet-Derived Growth Factor Receptor*).

Sur la base de différentes études de relations structure-activité ainsi que sur des travaux antérieurs menés au laboratoire, nous avons conçu et synthétisé plusieurs molécules hétérocycliques azotées (quinazoline, benzotriazine, thiényrimidine) se différenciant par leur motif anilino ou aryloxy en position 4. Les études pharmacologiques ont permis de mettre en évidence de nouveaux anti-angiogéniques, inhibiteurs puissants des récepteurs VEGFR, PDGFR et c-Kit présentant une structure de type 7-aminoalkoxyquinazolinique. Aussi, les modulations de l'hétérocycle quinazoline en thiényrimidine ont permis de découvrir de nouveaux inhibiteurs multikinase originaux. En parallèle de ces travaux, des dérivés de type 2-aminoquinazoliniques ont été conçus et synthétisés. Ces composés substitués par différentes anilines en position 4 de la quinazoline ont montré un pouvoir antiprolifératif intéressant grâce à leur intercalation entre les paires de bases de l'ADN.

Après quelques généralités sur les cancers et sur les protéines kinases, les études antérieures menées au sein du laboratoire ainsi que nos travaux seront développés. Les résultats pharmacologiques obtenus seront détaillés pour chaque série chimique et permettront de conclure sur le potentiel inhibiteur de nos molécules. Enfin le travail expérimental sera détaillé dans une dernière partie.

GÉNÉRALITÉS
SUR LES CANCERS

LES CANCERS

- DÉFINITION

- EPIDÉMIOLOGIE

- TYPOLOGIE

- MÉCANISMES FONDAMENTAUX

- TRAITEMENTS CYTOTOXIQUES

I. LES CANCERS

1. Définition

Le processus cancéreux est caractérisé par la prolifération anarchique et incontrôlée de certaines cellules de l'organisme ayant échappé aux mécanismes classiques de régulation et de différenciation. Ces cellules anormales se développent à partir d'une cellule mère qui a subi une mutation de l'ADN et qui a acquis les caractéristiques nécessaires pour se multiplier indéfiniment, envahir les tissus avoisinants et se disséminer vers d'autres organes sains pour former des métastases.

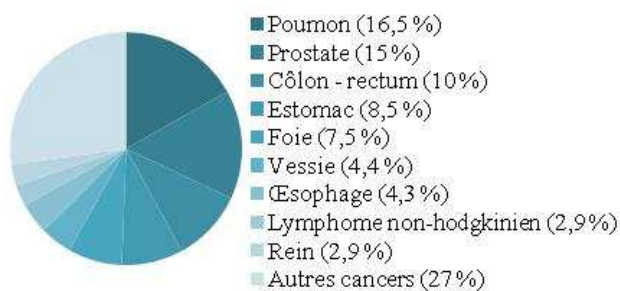
2. Epidémiologie

Pour étudier la fréquence des cancers, on dispose de deux indicateurs : l'incidence (nombre de nouveaux cas diagnostiqués chaque année) et la mortalité (nombre de décès annuel). Le projet GLOBOCAN 2012, initié par l'Agence internationale pour la Recherche sur le Cancer, présente des estimations de l'incidence et de la mortalité de 27 cancers dans le monde en 2012 (<http://globocan.iarc.fr>).

2.1. Incidence

D'après cette base de données, plus de quatorze millions de cas de cancers ont été recensés dans le monde pour l'année 2012 dont 53% chez l'homme et 47% chez la femme. En France, le nombre de nouveaux cas de cancers est estimé à 355 000, dont 200 000 chez l'homme et 155 000 chez la femme.

(a) Homme



(b) Femme

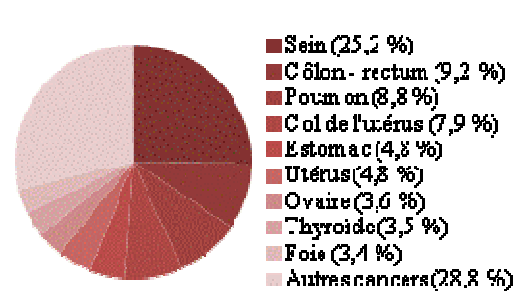


Figure 1 : Incidence des cas de cancers dans le monde en 2012

Source : <http://globocan.iarc.fr>

Les cancers les plus fréquents chez l'homme sont ceux du poumon, de la prostate et du côlon. Ils représentent à eux trois plus de 40% des cas de cancers. Chez la femme, le cancer du sein prédomine nettement avec 25,2% des cas diagnostiqués. Il est suivi par les cancers du côlon et du poumon (Figure 1).

2.2. Mortalité

Pour l'année 2012, l'analyse GLOBOCAN a estimé le nombre de décès dus au cancer à 8 200 900 avec 4 653 000 décès chez l'homme (57%) et 3 547 900 décès chez la femme (43%). En France, le nombre de décès par cancer est estimé à 85 000 chez l'homme et 63 000 chez la femme, soit au total 148 000 décès.

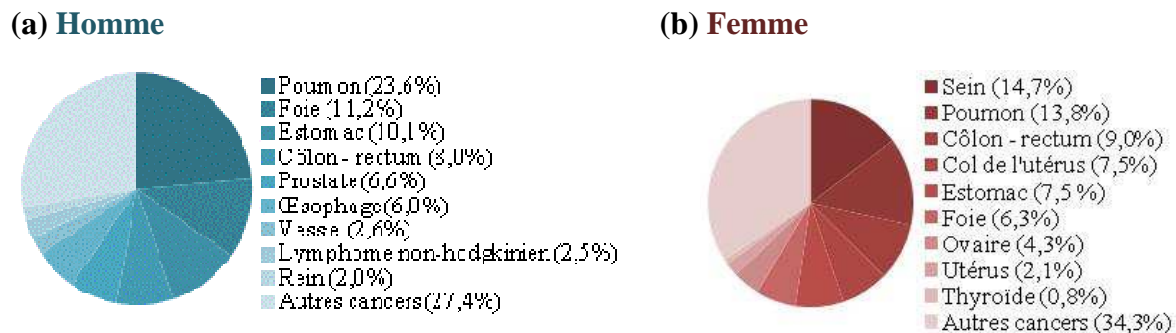


Figure 2 : Mortalité par cancer dans le monde en 2012

Source : <http://globocan.iarc.fr>

Le cancer du poumon se situe au premier rang chez l'homme (21 300 décès par an) devant le cancer colorectal (9 200 décès) et le cancer de la prostate (8 900 décès). Le cancer du sein est la première cause de mortalité par cancer chez la femme (11 886 décès par an). Le cancer du poumon se positionne au deuxième rang (8 700 décès par an) devant le cancer colorectal (8 400 décès) (Figure 2).

Malgré leur forte incidence, les cancers hormonodépendants, comme la plupart des cancers du sein et des cancers de la prostate, présentent un taux de mortalité moindre. Pour exemple, le taux de guérison du cancer du sein est élevé grâce au dépistage et aux traitements adjuvants (chimiothérapie et hormonothérapie). Le cancer du côlon présente également de bons taux de guérison grâce aux campagnes de dépistage mise en place par l'OMS. A l'inverse, le cancer du poumon est souvent associé à un mauvais pronostic. Le taux de survie

de ce cancer à cinq ans ne dépasse pas 10% malgré les progrès réalisés dans les protocoles thérapeutiques.

3. Typologie des cancers

A l'heure actuelle, on parle de cancer au pluriel, en effet tous les cancers ne sont pas identiques. En dehors de leur localisation, c'est le type de tissu dans lequel ils se développent qui permet de les classer :

- Les carcinomes se développent dans l'épithélium. Lorsque les carcinomes se développent dans le tissu d'une glande ou d'une muqueuse, on parle plus spécifiquement d'adénocarcinomes.
- Les sarcomes se forment sur des tissus conjonctifs tels que les os (ostéosarcome), les muscles (rhabdomyosarcome) ou encore le tissu adipeux (liposarcome).
- Les cancers hématolymphatiques touchent le sang et la lymphe ou les organes tels que les ganglions, les amygdales ou la rate.

Les cancers peuvent également être répertoriés grâce au système TNM. Ce classement repose sur l'extension tumorale locale (T), ganglionnaire (N, *node*) et métastatique (M). Il a été établi pour permettre des comparaisons entre différentes équipes médicales. Ci-dessous un exemple de classement TNM pour le cancer colorectal (Tableau 1).

Classification TNM			
T	Extension tumorale	<i>T0</i>	Pas de signe de tumeur primitive
		<i>T1</i>	Tumeur envahissant la sous-muqueuse
		<i>T2</i>	Tumeur envahissant la musculature
		<i>T3</i>	Tumeur envahissant la musculature dans la sous-séreuse
		<i>T4</i>	Tumeur envahissant directement d'autres organes ou structures
N	Extension ganglionnaire	<i>N0</i>	Aucune métastase ganglionnaire régionale
		<i>N1</i>	Ganglions suspects mobiles
		<i>N2</i>	Ganglions suspects fixés entre eux ou à d'autres structures
M	Extension métastatique	<i>M0</i>	Absence de métastases
		<i>M1</i>	Présence de métastases

Tableau 1 : Classification TNM du cancer colorectal ¹

¹ C. C. Compton, *Modern Pathology*, **2003**, 16, 376 -388.

4. Mécanismes fondamentaux de la carcinogenèse

Le développement de nouvelles techniques d'analyse en biologie moléculaire a permis aux scientifiques de progresser et de mieux comprendre les mécanismes cellulaires impliqués dans l'évolution du cancer. En effet, plusieurs caractéristiques biologiques propres aux cellules cancéreuses ont été mises en évidence (Figure 3) :

- indépendance vis-à-vis des signaux de prolifération,
- insensibilité aux signaux antiprolifératifs,
- acquisition d'une résistance à l'apoptose (mort cellulaire programmée),
- potentiel illimité de réplication,
- stimulation de l'angiogenèse,
- pouvoir d'invasion et de dissémination (métastases).

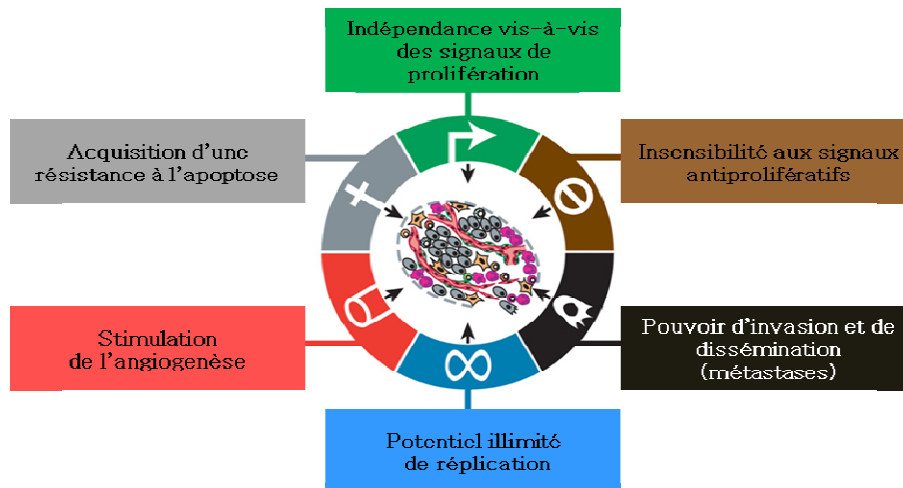


Figure 3 : Caractéristiques des cellules cancéreuses ²

Ces caractéristiques, présentes dans la majorité des tumeurs, permettent aux cellules cancéreuses de survivre, de proliférer, et de diffuser à travers différents tissus.

4.1. Indépendance vis-à-vis des signaux de prolifération

Les cellules cancéreuses acquièrent la capacité de maintenir leur prolifération grâce à plusieurs voies. Dans un premier temps, la production de facteurs de croissance tel que l'*Epidermal Growth Factor* (EGF) engendre l'expression de récepteurs associés, comme les récepteurs à l'EGF (EGFR) impliqués dans la prolifération cellulaire. La prolifération peut également être dérégulée par l'élévation du niveau de récepteurs présents à la surface de la

² D. Hanahan et R. A. Weinberg, *Cell*, **2011**, 144, 646-674.

cellule cancéreuse, rendant les cellules hyperactives aux facteurs de croissances associés. Aussi, la prolifération peut dériver de l'activation constitutive de protéines des voies de signalisation présentes en aval des récepteurs, éliminant ainsi la nécessité de stimuler les récepteurs.

Plusieurs défauts mécanistiques impliquant des oncogènes renforcent cette prolifération incontrôlée. Par exemple, l'oncoprotéine Ras agit comme un interrupteur moléculaire qui régule un certain nombre de fonctions fondamentales dont la réplication cellulaire. Des mutations de cette protéine sont mises en cause dans environ 30% des cancers. Une fois mutée, la protéine se bloque sur un « mode actif » qui mène à une prolifération anormale des cellules.³ La protéine *Phosphatase and TENsin homolog* (PTEN) peut également être impliquée dans la prolifération cellulaire. Dans des conditions normales, PTEN agit comme un régulateur de la voie de signalisation PI3K impliquée dans la prolifération cellulaire. Une mutation de cette protéine provoque une perte de fonction régulatrice engendrant une amplification de la voie PI3K et ainsi une prolifération cellulaire anormale.⁴

4.2. Insensibilité aux signaux anti-prolifératifs

La multiplication cellulaire est régulée physiologiquement de manière négative par les gènes suppresseurs de tumeurs également appelés anti-oncogènes. Certains anti-oncogènes, comme la protéine p53, favorise l'apoptose par l'arrêt du cycle cellulaire.⁵ Lors du processus tumoral, ces gènes perdent leur fonction suite à des mutations génétiques et favorisent ainsi la prolifération cellulaire.

4.3. Acquisition d'une résistance à l'apoptose

L'apoptose est régulée par la balance entre protéines pro-apoptotiques, comme la protéine Bax (*Bcl-2-associated X*) et protéines anti-apoptotiques, comme Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*). Bax est capable d'induire l'apoptose en se liant avec d'autres protéines. La protéine anti-apoptotique Bcl-2 inhibe Bax en formant des hétérodimères Bax-Bcl-2 inactifs.⁶

³ I. A. Prior *et al.*, *Cancer Research*, **2012**, 72, 2457-2467.

⁴ N. Chalhoub et S. J. Baker, *Annual Review of Pathology Mechanisms of Disease*, **2009**, 4, 127-150.

⁵ E. C. Pietsch *et al.*, *Oncogene*, **2008**, 27, 6507-6521.

⁶ M. F. van Delft et D. C. S. Huang, *Cell Research*, **2006**, 16, 203-213.

Dans de nombreuses tumeurs, Bcl-2 est en excès suite à une translocation génétique entre deux chromosomes. Les cellules cancéreuses sont alors protégées contre la mort cellulaire.

4.4. Potentiel illimité de réplication

A l'inverse des cellules saines, les cellules tumorales présentent un pouvoir de réplication illimité, ce qui permet de générer des tumeurs macroscopiques. Lors d'une division cellulaire, les extrémités des chromosomes appelées télomères ne sont pas répliquées correctement, ce phénomène est appelé sénescence réplivative. Après un certain nombre de réplication, les chromosomes se raccourcissent peu à peu ce qui aboutit à un arrêt du cycle et à la mort cellulaire. Il existe des enzymes (télomérases) capables de rétablir les télomères afin que l'ADN soit totalement réparé. Ces enzymes sont exprimées dans la majorité des lignées cellulaires cancéreuses, ce qui aboutit à une immortalisation réplivative.⁷

4.5. Stimulation de l'angiogenèse et métastases

Contrairement aux cellules saines, les cellules cancéreuses sont capables de former de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux pré-existants. Ce processus appelé angiogenèse est essentiel pour amener l'oxygène et les nutriments nécessaires à la croissance de la tumeur mais il est également un facteur important de la dissémination des cellules tumorales dans la circulation sanguine systémique favorisant l'invasion d'autres organes et ainsi la création de métastases.

5. Les traitements des cancers

Le traitement du cancer nécessite d'associer plusieurs techniques pour réduire le risque de récurrence locale et de diffusion métastatique. Chacune de ces techniques a bénéficié d'avancées spectaculaires tout au long de ces dernières décennies. La stratégie thérapeutique se définit en assemblée collégiale et dépend de plusieurs facteurs (type de tumeur, histologie, extension de la maladie, état général du patient).

⁷ S. Mocellin *et al.*, *Trends in Molecular Medicine*, **2013**, 19, 125-133.

5.1. La chirurgie

La chirurgie est un traitement utilisé lorsque la tumeur est localisée. Elle concerne les tumeurs solides (sein, poumon, prostate...) et elle n'est donc pas adaptée pour les lymphomes et les leucémies qui touchent respectivement le système lymphatique et le système sanguin. L'acte chirurgical consiste à retirer la tumeur et une marge de tissu sain l'entourant ainsi que les ganglions avoisinants. La technique du ganglion sentinelle permet de réduire la morbidité liée au geste du curage. Pour améliorer son efficacité, la chirurgie est souvent associée à une autre thérapie telle que la radiothérapie ou la chimiothérapie.

5.2. La radiothérapie

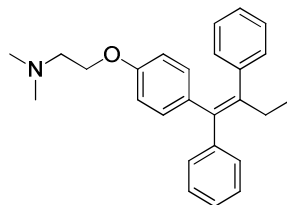
La radiothérapie est également un traitement local. Elle a pour but d'exposer les cellules cancéreuses d'une tumeur à des rayonnements qui altèrent le matériel génétique des cellules, rendant ainsi toute multiplication cellulaire impossible. On distingue deux types de radiothérapie qui se différencient par la source des rayonnements. Dans le cas d'une radiothérapie dite externe, les cellules tumorales sont irradiées grâce à un faisceau émis par un appareil de radiothérapie. A l'inverse, la radiothérapie interne ou curiethérapie consiste à placer une substance radioactive (iridium ou césium) au contact direct de la tumeur. Cette méthode plus récente a l'avantage de délivrer une quantité importante de rayonnements dans un volume étroit, ce qui permet de mieux cibler les cellules tumorales. Toutefois dans les deux cas, des tissus sains proches de la tumeur peuvent également être atteints, ce qui entraîne de nombreux effets secondaires. La radiothérapie est un traitement très fréquent du cancer, elle est utilisée chez plus d'un patient sur deux.

5.3. L'hormonothérapie

Certains cancers (sein, prostate) ont leur croissance favorisée par des hormones, ils sont dits hormonosensibles ou hormonodépendants. Le principe de l'hormonothérapie consiste à bloquer les hormones qui influencent la multiplication des cellules cancéreuses. Pour cela, différentes stratégies peuvent être utilisées :

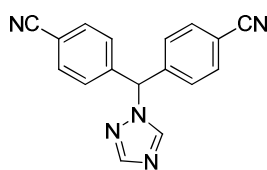
- **Bloquer l'action des hormones** : certaines molécules peuvent se substituer aux hormones au niveau de leurs récepteurs présents à la surface des cellules cancéreuses et bloquer ainsi leurs effets par compétition. Parmi ces molécules, on retrouve les anti-androgènes utilisés

dans le cancer de la prostate et les anti-œstrogènes indiqués dans le cancer du sein dont le représentant principal est le tamoxifène. Le tamoxifène appartient à la famille des *Selective Estrogen Receptor Modulators* (SERM) et il est utilisé dans le traitement du cancer du sein hormono-dépendant.



Tamoxifène

- Bloquer la sécrétion des hormones par les ovaires ou les testicules : les œstrogènes et les androgènes sont produits par une succession de réaction régulée par un premier maillon qui est la LH-RH (*Luteinizing Hormone - Releasing Hormone*) produite par l'hypothalamus. Les agonistes de la LH-RH sont des médicaments qui bloquent la fabrication des hormones par les ovaires ou les testicules grâce à une hyperstimulation de l'hypophyse qui répond en arrêtant toute stimulation. Les analogues de la LH-RH, comme la leuproréline (Enantone®) ou la goséreline (Zoladex®) sont administrés en sous-cutané au minimum une fois par mois dans les cancers de la prostate et parfois dans les cancers du sein chez de jeunes patientes.
- Empêcher la bio-transformation des hormones : après la ménopause, les œstrogènes ne sont plus produits par les ovaires mais à partir d'hormones, et plus spécifiquement à partir d'androgènes. Ces derniers sont transformés en œstrogènes par une enzyme appelée aromatase. Certaines molécules peuvent inhiber l'action de l'aromatase et permettent ainsi une diminution de la production d'œstrogènes indispensables à la croissance tumorale. Les anti-aromatases (létrozole, anastrozole ou exemestane) sont prescrits sous forme de comprimés dans le cancer du sein hormono-dépendant chez la femme ménopausée.



Létrozole

Les différentes stratégies utilisées en hormonothérapie sont représentées sur la Figure 4 ci-après.

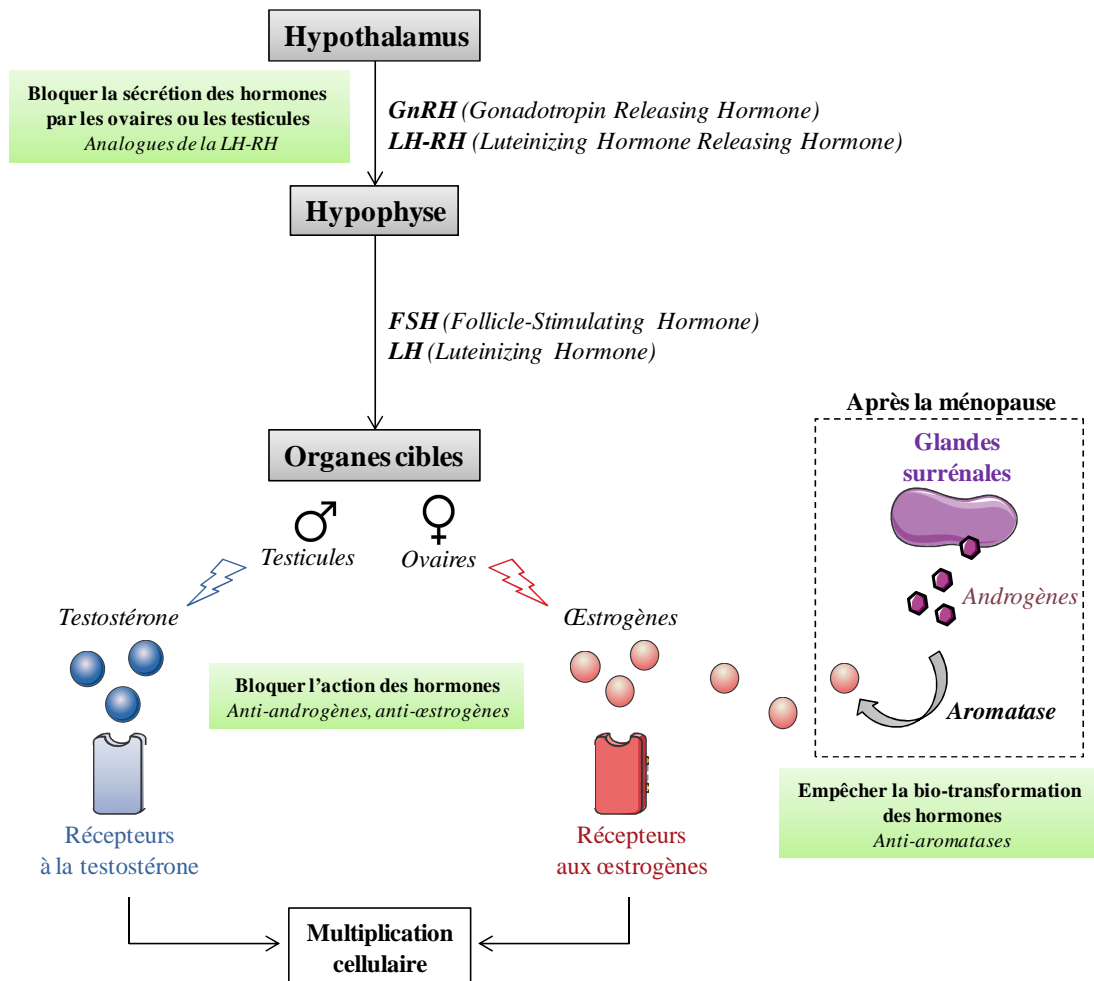


Figure 4 : Mode d'action de l'hormonothérapie

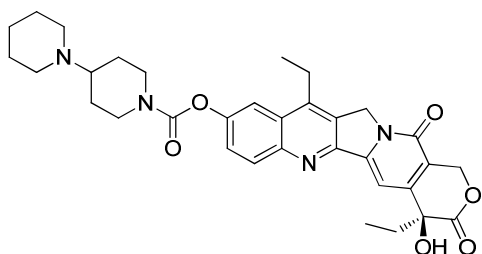
5.4. La chimiothérapie anticancéreuse

La chimiothérapie anticancéreuse est utilisée dans un grand nombre de cancers le plus souvent en association avec la chirurgie et/ou la radiothérapie. Les médicaments utilisés sont administrés dans la plupart des cas par perfusion et ont pour but de détruire les cellules tumorales en agissant de manière directe ou indirecte sur le matériel génétique par une action anti-mitotique. Les cellules tumorales seront plus sensibles à la chimiothérapie que les cellules saines car elles présentent des caractères de forte prolifération. Les chimiothérapies consistent en une association de médicaments administrés par voie veineuse et par voie orale à intervalle défini. Plusieurs classes thérapeutiques d'anticancéreux se distinguent suivant leur mode d'action. De nombreuses associations (protocoles de traitement) de médicaments cytotoxiques appartenant ou non à la même classe thérapeutique sont aujourd'hui utilisées.

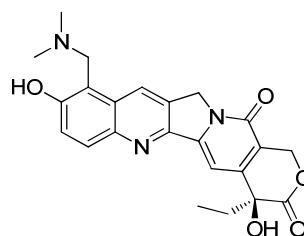
5.4.a. Les médicaments induisant des coupures de l'ADN

Les topo-isomérases sont des enzymes qui interviennent dans la réplication, la transcription et la réparation de l'ADN en réalisant des coupures mono ou double brin. Les topoisomérases de type I engendrent des coupures mono-brin, ce qui permet la rotation d'un fragment du brin d'ADN autour du brin intact. Les topoisomérases de type II engendrent des coupures double-brin, favorisant le passage d'un brin d'ADN au travers ces coupures. Les inhibiteurs de topoisomérase sont des molécules qui inhibent l'action d'enzymes jouant un rôle dans la topologie de l'ADN (topoisomérases de type I ou II), et qui perturbent ainsi la structure de l'ADN.⁸

Les inhibiteurs de topoisomérase I sont des produits dérivés de la camptothécine qui est un alcaloïde issu d'une plante ornementale chinoise, la *Camptotheca acuminata*.⁹ L'irinotécan (Campto®), obtenu par hémisynthèse, est un inhibiteur puissant de la topoisomérase I métabolisé *in vivo* par la carboxylestérase en un métabolite actif, le SN-38. Il est utilisé dans la prise en charge des cancers colorectaux. Le topotécan (Hycamtin®) est également un dérivé hémisynthétique de la camptothécine utilisé comme inhibiteur de topo I dans le cancer métastatique de l'ovaire et dans le cancer du poumon non à petites cellules.



Irinotécan



Topotécan

Les inhibiteurs de topoisomérase II se divisent en deux groupes : les épipodophyllotoxines et les anthracyclines.

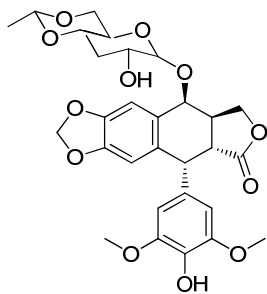
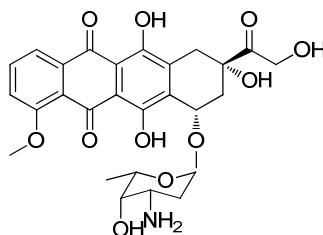
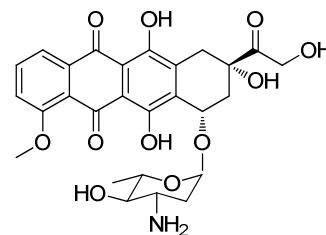
Les épipodophyllotoxines sont des dérivés hémisynthétiques de podophyllotoxines extraites de plantes voisines de la mandragore.¹⁰ Parmi ces agents, l'étoposide (Vepesid®) est utilisé dans de nombreux cancers comme les cancers du poumon, du sein, du testicule ou encore dans les leucémies.

⁸ M. Gellert, *Annual Review of Biochemistry*, **1981**, 50, 879-910.

⁹ R. B. Ewesuedo et M. J. Ratain, *Oncologist*, **1997**, 2, 359-364.

¹⁰ T. F. Impert, *Biochimie*, **1998**, 80, 207-222.

Outre leur potentiel inhibiteur de la topoisomérase II, les antibiotiques de la classe des anthracyclines s'intercalent entre les paires de bases de l'ADN grâce à leur structure plane.¹¹ La doxorubicine est la molécule de référence à ce jour dans cette catégorie. Elle est administrée pour lutter contre de nombreux cancers (poumon, estomac, ovaire, vessie...) mais sa toxicité cardiaque limite son utilisation. L'épirubicine (Farmorubicine®) est une anthracycline de deuxième génération qui présente une toxicité cardiaque moindre.

**Etoposide****Doxorubicine****Epirubicine**

5.4.b. Les médicaments formant des adduits covalents avec l'ADN

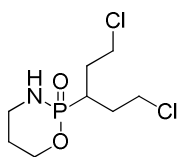
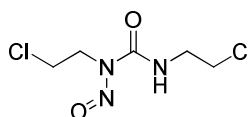
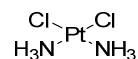
Les médicaments formant des adduits covalents avec l'ADN ou agents alkylants possèdent un ou des groupements chimiques pouvant former des liaisons covalentes avec l'ADN. La plupart des alkylants utilisés en chimiothérapie sont dits « bifonctionnels », c'est-à-dire qu'ils possèdent deux motifs chimiques pouvant se lier à deux nucléotides adjacents. Un agent bifonctionnel forme des ponts intra ou inter-brin rendant impossible la transcription ou la réplication de l'ADN.¹² Cette classe pharmacologique réunit un grand nombre de substances :

- Les moutardes à l'azote : ces composés sont des analogues du gaz moutarde utilisé comme gaz de combat pendant la première guerre mondiale. Ils présentent une fonction commune bis-chloroéthylamine. Le cyclophosphamide (Endoxan®) est couramment utilisé dans la prise en charge des cancers du poumon à petites cellules, de l'ovaire, de la vessie ou encore dans les leucémies et les sarcomes.

¹¹ G. Minotti *et al.*, *Pharmacological Reviews*, **2004**, 56, 185-229.

¹² G. P. Warwick, *Cancer Research*, **1963**, 23, 1315-1333.

- Les nitroso-urées : ces produits sont actifs sur un grand nombre de tumeurs et présentent comme leur nom l'indique un motif nitroso-urée dans leur structure. La carmustine (Bicnu®) est utilisée dans les lymphomes, les mélanomes, les myélomes et également dans les tumeurs cérébrales du fait de sa forte liposolubilité favorisant son passage à travers la barrière hémato-encéphalique.
- Les dérivés du platine : ces agents provoquent par réaction avec l'ADN des ponts intracaténares entre deux résidus guanine adjacents. Le cisplatine est administré dans les cas de cancers de l'œsophage, de l'ovaire, de la vessie, du col de l'utérus...

**Cyclophosphamide****Carmustine****Cisplatine**

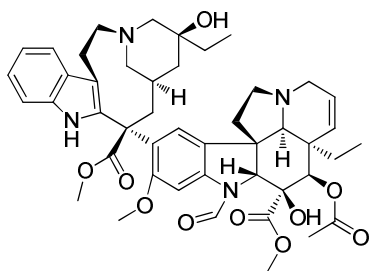
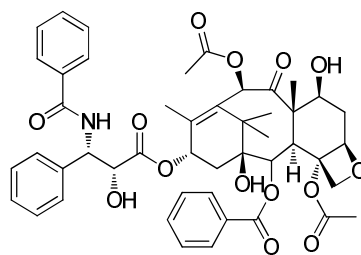
5.4.c. Les médicaments interagissant avec le fuseau mitotique

La cible moléculaire de ces composés est la tubuline cytoplasmique dont la polymérisation est nécessaire à la construction du fuseau mitotique. L'interaction de ces molécules avec la tubuline bloque la mitose en métaphase. On distingue deux groupes de composés dans cette classe thérapeutique.^{13,14}

- Les vinca-alcaloïdes sont issus de la pervenche de Madagascar et inhibent la polymérisation de la tubuline. Parmi ces composés, la vincristine (Oncovin®) est utilisée pour traiter plusieurs types de cancer (leucémie, lymphome, cancer du sein, cancer du poumon...).
- Les taxanes sont des composés naturels extraits d'ifs et inhibent la dépolymérisation de la tubuline. Le paclitaxel (Taxol®) et le docetaxel (Taxotère®) sont les principaux représentants de cette famille et il est utilisé dans la prise en charge des cancers bronchopulmonaires non à petites cellules, des cancers de l'ovaire et du sein.

¹³ I. Marzo et J. Naval, *Biochemical Pharmacology*, **2013**, 86, 703-710.

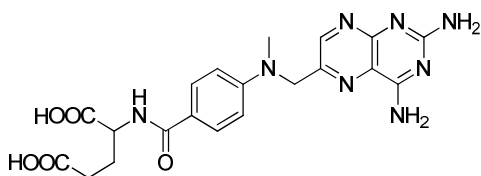
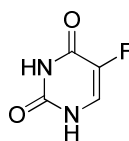
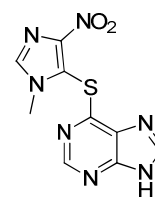
¹⁴ K. E. Gascoigne et S. S. Taylor, *Journal of Cell Science*, **2009**, 122, 2579-2585.

**Vincristine****Paclitaxel**

5.4.d. Les anti-métabolites

Les anti-métabolites inhibent la synthèse des acides nucléiques (ADN ou ARN), indispensables pour la multiplication et la différenciation des cellules. Il existe deux catégories d'anti-métabolites.

- Les antifoliques : ils inhibent des enzymes qui jouent un rôle majeur dans la synthèse des acides nucléiques.¹⁵ Le méthotrexate possède une structure proche de celle de l'acide folique (ou vitamine B9), ce qui lui permet d'agir comme faux-substrat de la dihydrofolate reductase et de bloquer la réplication de l'ADN.
- Les substances "leurres" : elles présentent une analogie structurale avec les bases azotées, et s'incorporent donc dans l'ADN à la place des bases puriques ou pyrimidiques inhibant ainsi la réplication. On distingue les anti-pyrimidiques, comme le 5-fluoro-uracile et les anti-puriques, comme l'azathioprine.¹⁶

**Méthotrexate****5-Fluoro-Uracile
(5-FU)****Azathioprine**

¹⁵ M. Visentin et al., *Hematology/Oncology Clinics of North America*, **2012**, 26, 629-648.

¹⁶ H. M. Pinedo et G. F. Peters., *Journal of Clinical Oncology*, **1988**, 6, 1653-1664.

5.4.e. Les nouvelles voies de recherche en chimiothérapie.

L'épigénétique.

L'expansion d'une cellule cancéreuse est fréquemment associée à des modifications épigénétiques non codées par la séquence de l'ADN. Parmi ces modifications épigénétiques, l'acétylation des histones et la méthylation de l'ADN semblent jouer un rôle important. Dans ce contexte, une stratégie thérapeutique récente et très prometteuse consiste à corriger des erreurs épigénétiques à l'aide de composés modulant l'acétylation des histones et la méthylation de l'ADN utilisés seuls ou en combinaison avec d'autres agents anticancéreux.¹⁷

- Les inhibiteurs d'histones désacétylases (HDACs)

Toutes les histones sont susceptibles d'être acétylées sur des résidus de lysine spécifiques. La neutralisation de la charge positive du groupement NH_3^+ de la lysine provoque une diminution des contacts avec l'ADN chargé négativement, et rend la chromatine plus flexible. Deux familles d'enzymes influencent les niveaux d'acétylation des histones : les histones acétyltransférases (HATs) qui acétylent des résidus lysine des histones et les histones désacétylases (HDACs) qui ont un rôle opposé aux HATs. Une hypoacétylation est associée à la répression de la transcription des gènes.

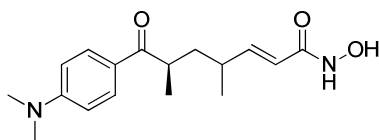
Le rôle répresseur transcriptionnel des HDACs peut être supprimé par certaines molécules appelées inhibiteurs de désacétylases. Ces molécules constituent actuellement un grand espoir de traitement contre certains cancers. En inhibant les HDACs, ces inhibiteurs provoquent l'arrêt de la prolifération des cellules cancéreuses, l'induction de leur différenciation et/ou leur mise en apoptose.¹⁸ Les inhibiteurs de HDACs peuvent être classés en plusieurs catégories en fonction de leur structure : les hydroxamates, les peptides cycliques, les acides aliphatiques, les benzamides et les cétones électrophiles.¹⁹ La trichostatine A (TSA) et le vorinostat qui est en phase II d'essais cliniques dans plusieurs cancers sont représentés ci-dessous et appartiennent à la famille des hydroxamates.²⁰

¹⁷ M. A. Dawson et T. Kouzarides, *Cell*, **2012**, 150, 12-27.

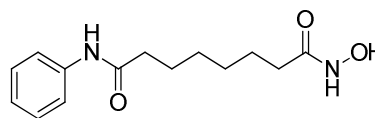
¹⁸ P. Bose *et al.*, *Pharmacology & Therapeutics*, **2014**, doi: 10.1016/j.pharmthera.2014.04.004

¹⁹ J. M. Wagner *et al.*, *Clinical Epigenetics*, **2010**, 1, 117-136.

²⁰ A. Grassadonia *et al.*, *Cancers*, **2013**, 5, 919-942.



Trichostatine A ou TSA

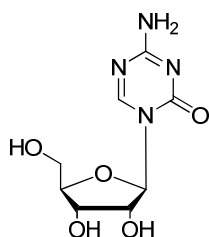


Vorinostat

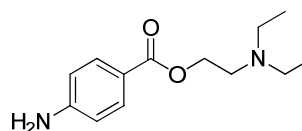
▪ Les inhibiteurs de *DNA-méthyltransférases* (DNMTs)

La méthylation de l'ADN se produit principalement dans des régions particulières de l'ADN appelées régions CpG. Les *DNA-méthyltransférases* (DNMTs) catalysent l'addition d'un groupement méthyle provenant de la *S*-adénosylméthionine sur le carbone 5 d'une cytosine. L'ADN méthylé peut fixer des protéines appelées *Methyl-CpG-binding domain proteins* qui à leur tour recrutent d'autres protéines, telles que les HDACs, provoquant une compaction de la chromatine et une répression de l'expression du gène.

Les inhibiteurs de DNMTs peuvent être classés en deux groupes : les inhibiteurs nucléosidiques et les inhibiteurs non-nucléosidiques. Les inhibiteurs nucléosidiques, comme la 5-azacytidine, fonctionnent comme des analogues de nucléosides pouvant s'insérer dans l'ADN mais ne pouvant pas être méthylés. Les inhibiteurs non-nucléosidiques, comme la procaine, inhibent les DNMT et empêchent ainsi la liaison des DNMT à l'ADN. Ces inhibiteurs sont moins toxiques que les inhibiteurs nucléosidiques.^{21,22}



5-Azacytidine



Procaine

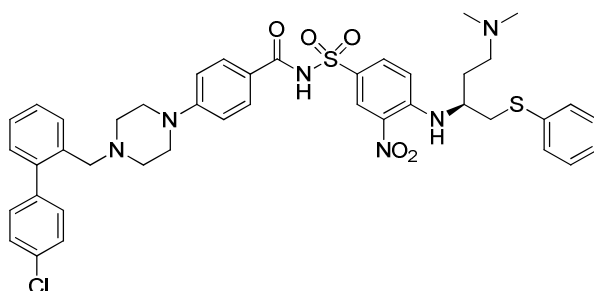
Inhibition des interactions protéine-protéine

Le processus cancéreux peut être déclenché par des interactions protéine-protéine dysfonctionnelles, telles que celle du dimère Bax/Bcl-2. L'inhibition de Bax par Bcl-2 *via* la formation d'hétérodimères Bax-Bcl-2 inactifs provoque une insensibilité des cellules tumorales face à la mort cellulaire.

²¹ F. Lyko et R. Brown, *Journal of the National Cancer Institute*, **2005**, 97, 1498-1506.

²² C. Gros *et al.*, *Biochimie*, **2012**, 94, 2280-2296.

La synthèse de molécules capables de sensibiliser des cellules résistantes à l'apoptose est actuellement en plein essor. Un criblage de petites molécules chimiques a permis d'identifier un composé (ABT-737) capable d'inhiber la liaison de Bax à Bcl-2. Ce composé induit ainsi l'apoptose et sensibilise les cellules tumorales surexprimant Bcl-2 aux chimiothérapies.



ABT-737

Conclusion

La chimiothérapie anticancéreuse est un traitement cytotoxique systémique qui permet d'atteindre les cellules cancéreuses quelle que soit leur localisation dans le corps mais aussi les cellules saines. Cela engendre de nombreux effets secondaires, variables selon les médicaments utilisés, dont les plus fréquents sont les suivants : chute des cheveux, nausées, vomissements, fatigue et diarrhée. Afin de limiter ces complications, la recherche actuelle en cancérologie se porte sur le développement de nouveaux agents anticancéreux plus sélectifs des cellules tumorales. Ces nouvelles thérapies visent à améliorer la qualité et l'espérance de vie des patients.

Notre travail de thèse s'est essentiellement porté sur cette dernière voie de recherche avec la conception et la synthèse de nouveaux agents anticancéreux plus spécifiques agissant sur des protéines kinases. Ces dernières sont présentées dans le chapitre suivant.

LES PROTEINES KINASES

- GÉNÉRALITÉS SUR LES PROTÉINES KINASES
- LES RÉCEPTEURS À ACTIVITÉ TYROSINE KINASE (RTKs)
(STRUCTURE, ACTIVATION, RÉGULATION, VOIES DE TRANSDUCTION)

II. LES PROTÉINES KINASES

1. Généralités sur les protéines kinases

Avec les phosphatases, les protéines kinases sont les protéines les plus impliquées dans les cascades d'événements intracellulaires. Chez l'être humain, 518 gènes codent pour des protéines kinases, ce qui correspond à 1,7% du génome. Ces protéines sont impliquées dans de nombreux phénomènes biologiques comme la prolifération cellulaire, la différenciation, l'angiogenèse ou encore l'apoptose. Elles forment une superfamille de protéines dont les membres sont très différents, de part leur taille, leur localisation et leur structure.

Ces enzymes agissent au niveau intracellulaire en transférant le groupement phosphate γ de l'adénosine triphosphate (ATP) à certaines protéines qui peuvent ainsi interagir avec d'autres molécules de signalisation une fois activées (Figure 5).

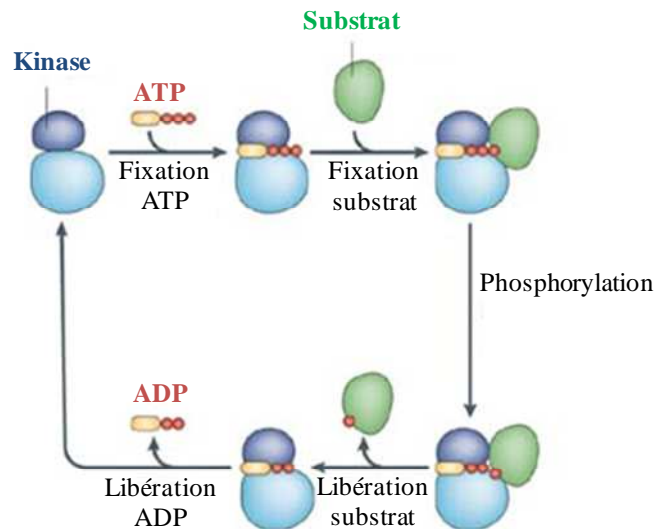


Figure 5 : Mécanisme simplifié de phosphorylation par les kinases
Adaptée de J. A. Ubersax et J. E. Ferrell Jr²³

Les protéines kinases peuvent être classées en fonction de leur site de phosphorylation. Les sérine/thréonine kinases, plutôt cytoplasmiques, phosphorylent des résidus sérine ou thréonine tandis que les tyrosine kinases, plutôt membranaires, phosphorylent des résidus tyrosine. Les sérine/thréonine kinases représentent environ 85% des protéines kinases. Sur les

²³ J. A. Ubersax et J. E. Ferrell Jr, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2007, 8, 530-541.

15% de tyrosine kinases, 65% sont des récepteurs transmembranaires et 35% des protéines cytoplasmiques.²⁴

2. Les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTKs)

2.1. Structure générale des RTKs

La majorité des RTKs sont composés d'un domaine extracellulaire, d'une partie transmembranaire et d'un domaine cytoplasmique contenant les sites catalytiques tyrosine kinase. Les facteurs de croissance se lient au domaine extracellulaire et activent ainsi le RTK qui régule de nombreux processus clés (prolifération cellulaire, survie, angiogenèse, apoptose) via différentes voies de signalisation qui seront développées par la suite (Figure 6).^{25,26}

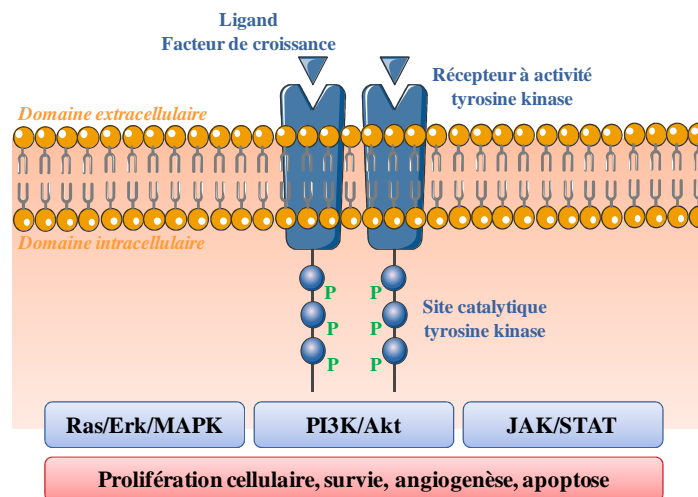


Figure 6 : Schéma général des RTKs

A l'heure actuelle, il existe 58 RTKs différents. Selon la structure de leurs domaines extra- et intracellulaires, ces récepteurs se regroupent en 20 familles. Parmi ces différentes familles, on peut citer les récepteurs aux facteurs de croissance de l'épiderme (EGFR), les récepteurs à l'insuline (IR), les récepteurs aux facteurs de croissance des plaquettes (PDGFR), les récepteurs aux facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGFR) et les récepteurs aux facteurs de croissance des fibroblastes (FGFR).

²⁴ T. Hunter, *Current Opinion in Cell Biology*, **2009**, 21, 140-146.

²⁵ M. K. Paul et A. K. Mukhopadhyay, *International Journal of Medical Sciences*, **2004**, 1, 101-115.

²⁶ S. R. Hubbard, *Progress in Biophysics & Molecular Biology*, **1999**, 71, 343-358.

Le domaine extracellulaire des RTKs est très complexe et diffère d'un récepteur à un autre. Il peut être de type immunoglobuline, de type fibronectine III ou encore riche en cystéine. A l'inverse, l'organisation du domaine intracellulaire est commune aux différentes familles. Ce domaine est composé d'une région juxta-membranaire, d'un domaine catalytique tyrosine kinase et d'une région C-terminale (Figure 7).²²

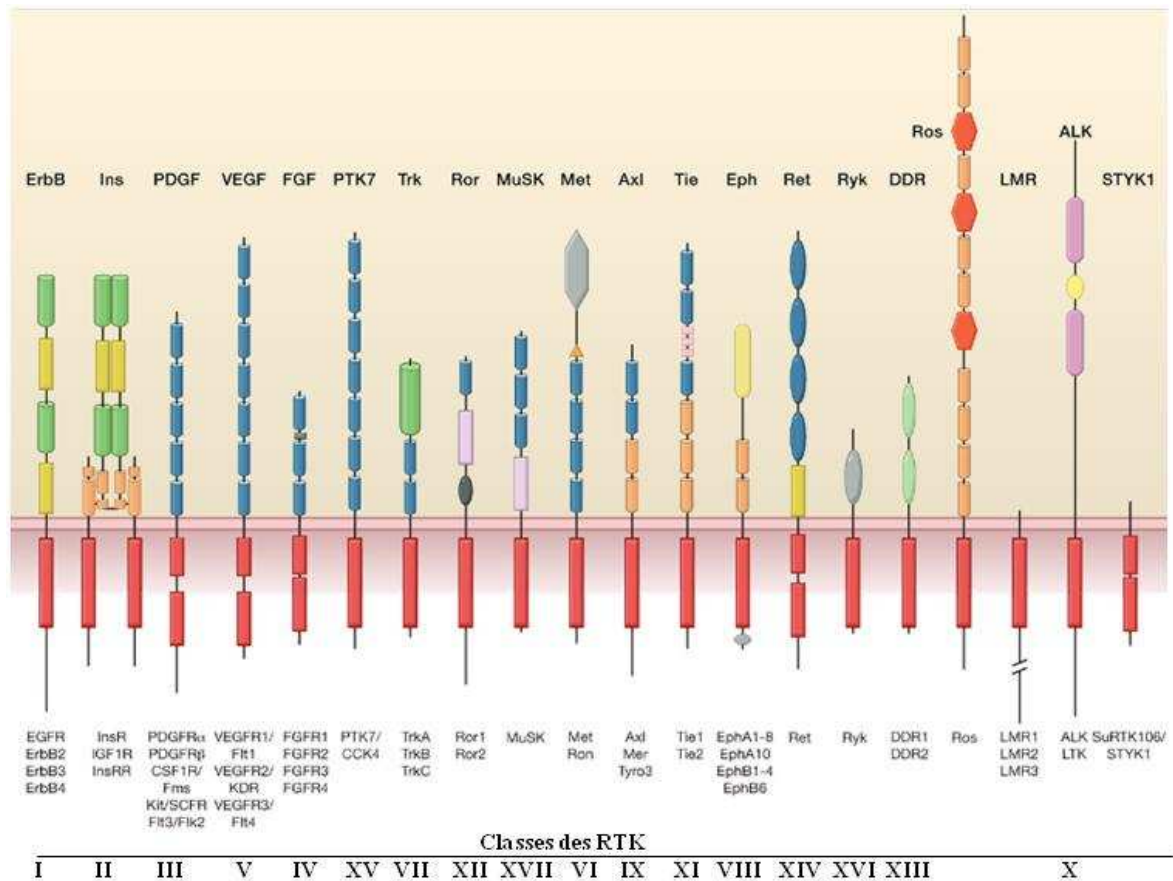


Figure 7 : Schéma général des 20 familles de RTKs²⁷

2.2. Activation des RTKs

L'élément initial qui permet l'activation du RTK est la fixation du ligand au niveau extracellulaire. Cette fixation conduit à la dimérisation non covalente de deux récepteurs identiques (homodimérisation) ou de deux récepteurs de la même famille (hétérodimérisation). Le complexe ligand-dimère formé permet ainsi le rapprochement cytoplasmique des domaines tyrosine kinase.

²⁷ M. A. Lemmon et J. Schlessinger, *Cell*, **2010**, 141, 1117-1134.

2.2.a. Organisation du domaine tyrosine kinase intracellulaire

Une des premières structures 3D d'un domaine kinase déposée à la *Protein Data Bank* (PDB) est celle de la protéine kinase cAPK. Celle-ci a été co-cristallisée avec l'ATP et un peptide substrat en 1993 par Zheng *et al.* (Figure 8).²⁸

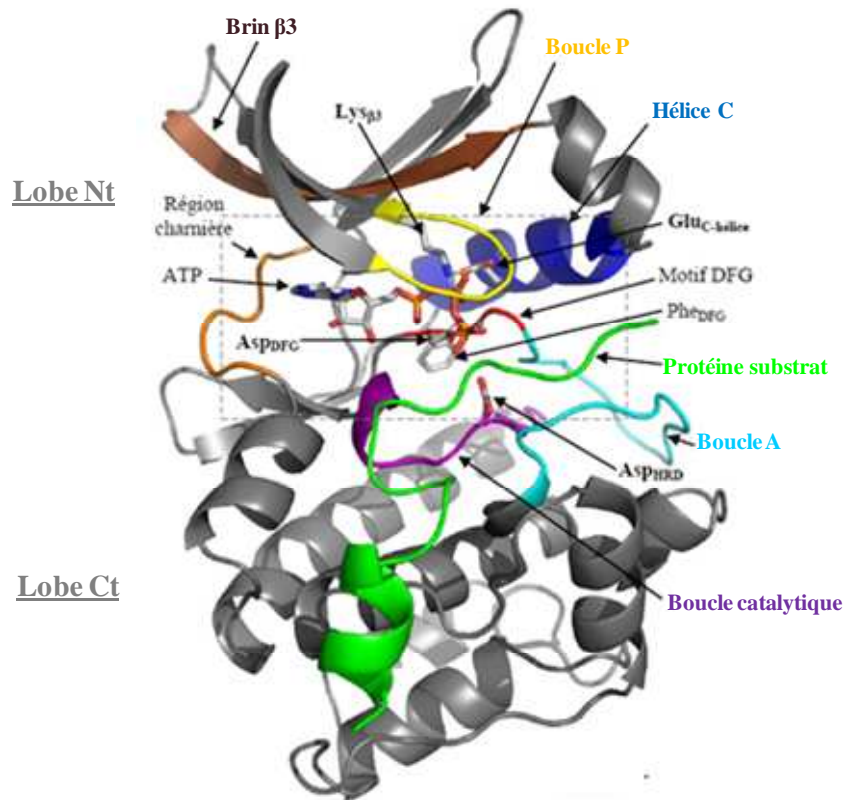


Figure 8 : Domaine catalytique de la protéine kinase cAPK

Les domaines kinase des RTKs, comme celui de la protéine cAPK, possèdent une structure bilobée constituée d'environ 270 acides aminés. Le lobe N-terminal (Nt), constitué d'environ 80 acides aminés, est formé d'une hélice α (notée hélice C) et de 5 feuillets β antiparallèles. La boucle reliant les deux premiers feuillets est notée boucle P (boucle de fixation du pyrophosphate). Ce lobe Nt est impliqué dans l'interaction et l'orientation de l'ATP. Le lobe C-terminal (Ct) quant à lui est formé d'environ 190 acides aminés et il est principalement constitué d'hélices α . Le lobe Ct assure la reconnaissance et la liaison du peptide substrat. Les lobes Nt et Ct sont séparés par une région charnière qui représente le site principal d'interaction avec l'ATP. Cette région est elle-même subdivisée en quatre sous-

²⁸ Zheng *et al.*, *Biochemistry*, **1993**, 32, 2154-2161.

domaines : le domaine d'interaction avec l'ATP, la poche de spécificité de la kinase, la boucle d'activation et le site catalytique.

2.2.b. Phosphorylation du substrat

La phosphorylation du substrat se réalise dans le site catalytique ou site actif situé dans la région charnière. Le site catalytique comprend deux poches : la première accueille l'ATP et la seconde reconnaît le substrat. La poche de reconnaissance du substrat, formée par la boucle A (boucle d'activation), est peu conservée d'une kinase à une autre, c'est donc elle qui contribue à la spécificité de l'enzyme.

La phosphorylation se fait par transfert du phosphate γ de l'ATP vers un résidu tyrosine du substrat. Pour cela, le positionnement de l'ATP dans son site actif est crucial. Le noyau adénine est localisé dans une cavité hydrophobe et son orientation est stabilisée par des liaisons hydrogène avec la chaîne principale de la région charnière. Le groupement ribose est quant à lui stabilisé grâce à des liaisons hydrogène avec des résidus du lobe Ct. Enfin les trois groupements phosphates sont alignés suite aux interactions qu'ils effectuent avec la boucle P et avec quatre acides aminés hautement conservés parmi les différentes kinases :

- une **lysine**, stabilisée par des liaisons ioniques avec un **acide glutamique** de l'hélice C, contribue au positionnement des phosphates α et β ,
- un **acide aspartique** situé sur une séquence particulière, la séquence Asp-Phe-Gly au niveau de la boucle A, coordonne un ion métallique (Mg^{2+}) qui est nécessaire au positionnement des phosphates β et γ ,
- un **acide aspartique** situé sur la boucle catalytique pourrait orienter l'hydroxyle du substrat avant l'attaque ou favoriser la dissociation après réaction.

Les principales interactions entre l'ATP et le site catalytique d'un RTK sont représentées dans la figure suivante (Figure 9).^{29,30}

²⁹ J. A. Adams, *Chemical reviews*, **2001**, 101, 2271-2290.

³⁰ J. A. Endicott et al., *Annual Review of Biochemistry*, **2012**, 81, 587-613.

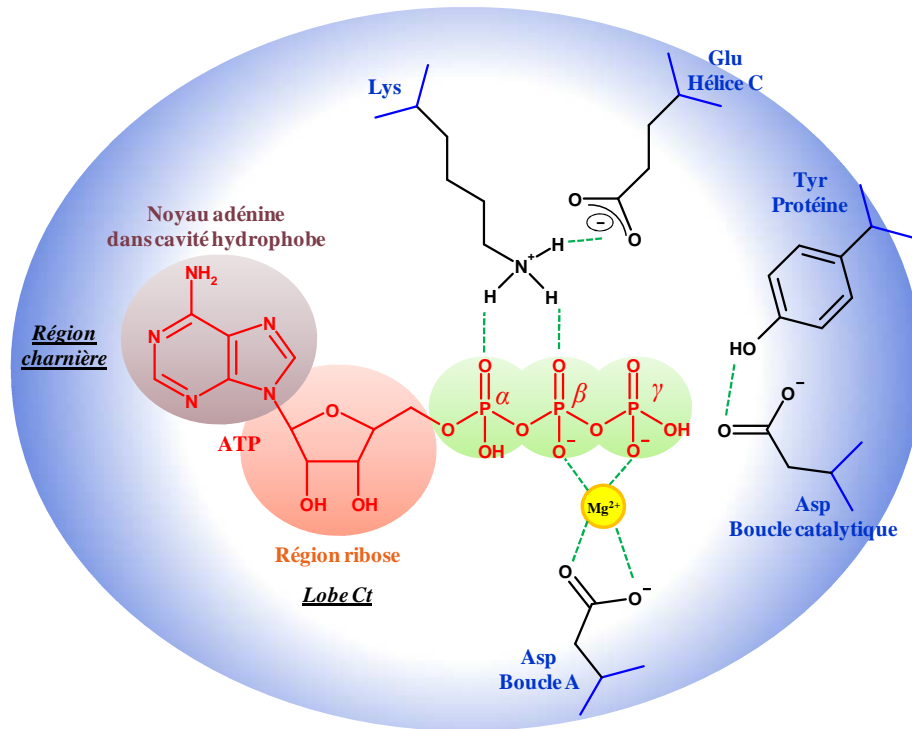


Figure 9 : Principales interactions entre l'ATP et le site catalytique d'un RTK

Une fois la phosphorylation terminée, l'ADP (adénosine diphosphate) et le substrat phosphorylé sont relâchés, ce qui permet l'activation de différentes voies de transduction impliquées dans la prolifération cellulaire, la survie, la différenciation, la migration ou encore l'angiogénèse.

2.3. Régulation de l'activité tyrosine kinase

Différents modes de régulation permettent le contrôle négatif de l'activité TK afin d'éviter toutes conséquences néfastes, comme le développement d'un cancer. Parmi ces phénomènes, l'endocytose et la déphosphorylation permettent la régulation de l'activité TK.

- **Déphosphorylation.** Les phosphatases sont des enzymes qui font le travail inverse des kinases. En effet, leur fonction est d'hydrolyser la liaison ester phosphorique pour libérer un groupement phosphate. Comme pour les kinases on distingue les sérine/thréonine phosphatases et les tyrosine phosphatases. Les tyrosine phosphatases modulent directement l'activité des RTKs en déphosphorylant les résidus tyrosine au niveau de leur domaine activateur.³¹

³¹ A. Ostman et F. D. Böhmer, *Trends in Cell Biology*, **2001**, 11, 258-266.

- **Endocytose.** La régulation négative de l'activité TK peut s'effectuer par internalisation du récepteur dans des vésicules d'endocytose. Dans l'endosome précoce, le complexe ligand-récepteur peut être dissocié puis redirigé vers la membrane plasmique pour être recyclé. Le complexe peut également être transporté vers l'endosome tardif pour être soumis à un processus de dégradation (Figure 10).³²

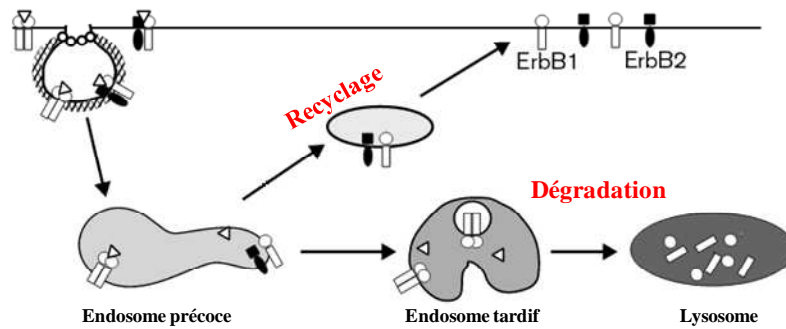


Figure 10 : Phénomène d'endocytose des récepteurs ErbB1 et ErbB2
Adaptée de B.P. Ceresa et S. L. Schmid³³

L'activité enzymatique peut être régulée par des paramètres extérieurs qui empêchent la fixation de l'ATP ou du substrat mais aussi par la conformation inactive du domaine kinase intracellulaire (régulation allostérique). A l'heure actuelle, deux conformations inactives du domaine kinase ont pu être caractérisées : la conformation inactive de l'hélice C et la conformation inactive de la séquence Asp-Phe-Gly ou DFG.³⁴

- **La configuration inactive de la séquence DFG.** La boucle d'activation ou boucle A présente une séquence particulière, la séquence DFG. L'orientation de cette séquence est cruciale pour l'activation de certains RTKs dont le récepteur c-Kit.³⁵ Dans l'état inactif non phosphorylé, la triade DFG adopte une orientation dite "DFG-out" où la phénylalanine bloque l'accès au site actif de l'ATP en occupant une zone située entre les poches réservées au noyau adénine et au ribose. A l'inverse, dans l'état actif phosphorylé, le résidu Phe de la boucle A est réorienté et permet l'entrée de l'ATP dans sa poche.³⁶ La fonction de la boucle A peut-être comparée à celle d'un interrupteur.

³² L. Kuan Goh et A. Sorkin, *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **2013**, doi: 10.1101/cshperspect.a017459.

³³ B.P. Ceresa et S. L. Schmid, *Current Opinion in Cell Biology*, **2000**, 12, 204-210.

³⁴ M. Huse et J. Kuriyan, *Cell*, **2002**, 109, 275-282.

³⁵ R. Roskoski, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **2005**, 338, 1307-1315.

³⁶ M. Linch et al., *OncoTargets and Therapy*, **2013**, 6, 1011-1023.

- **La configuration inactive de l'hélice C.** Tout comme la boucle d'activation, l'hélice C du lobe Nt peut adopter une configuration active et une configuration inactive. En effet, dans de nombreuses kinases, l'hélice C peut tourner et changer de position suite à la phosphorylation d'un ou plusieurs de ses résidus. Ce réarrangement modifie l'orientation de résidus clés comme l'acide glutamique catalytique qui n'interagit plus avec la lysine du site pour contribuer au positionnement des phosphates α et β de l'ATP.³⁷

2.4. Les principales voies de signalisation activées par les RTKs

Après phosphorylation du domaine tyrosine kinase, d'autres tyrosines du récepteur sont à leur tour phosphorylées. Celles-ci jouent le rôle de site d'attache pour de nombreux substrats, activant à leur tour, différentes voies. De nombreuses voies de signalisation peuvent être activées de manière concomitante après stimulation du récepteur par fixation du ligand. Etant donné la multitude des voies de signalisation engendrées par l'activation des RTKs, seules trois d'entre elles seront développées ci-après : la voie des MAPK (Mitogen Activated Protein Kinases), la voie PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase)/Akt et la voie JAK (Janus Kinase)/STAT (Signal Transducers and Activator of Transcription).

2.4.a. La voie des Mitogen Activated Protein Kinases (MAPK)

Les tyrosines phosphorylées permettent le recrutement de la protéine Grb2 qui est reconnue soit grâce à son domaine SH2, soit par l'intermédiaire de la protéine Shc. La protéine Grb2 possède un domaine SH3 qui permet sa reconnaissance par le facteur SOS (*Son of Sevenless*). Le complexe Grb2-SOS formé interagit ensuite avec la protéine G Ras, ce qui permet son activation grâce à des réactions contrôlées par les GAP (*GTPases Activating Protein*). Cette activation de Ras engendre une cascade de phosphorylations aboutissant à l'activation de facteurs de transcription. Trois sérine/thréonine kinases sont activées successivement : une MAP3 kinase (BRAF), une MAP2 kinase (MEK), et une MAP kinase (Erk). L'entrée de Erk dans le noyau permet de phosphoryler et d'activer des facteurs de transcription ou d'autres molécules nucléaires impliqués dans la **réplication de l'ADN** (Figure 11).^{38,39}

³⁷ L. Palmieri et G. Rastelli, *Drug Discovery Today*, **2013**, 18, 407-414.

³⁸ R. N. Jorissen *et al.*, *Experimental Cell Research*, **2003**, 284, 31-53.

³⁹ M. C. Lawrence *et al.*, *Cell Research*, **2008**, 18, 436-442.

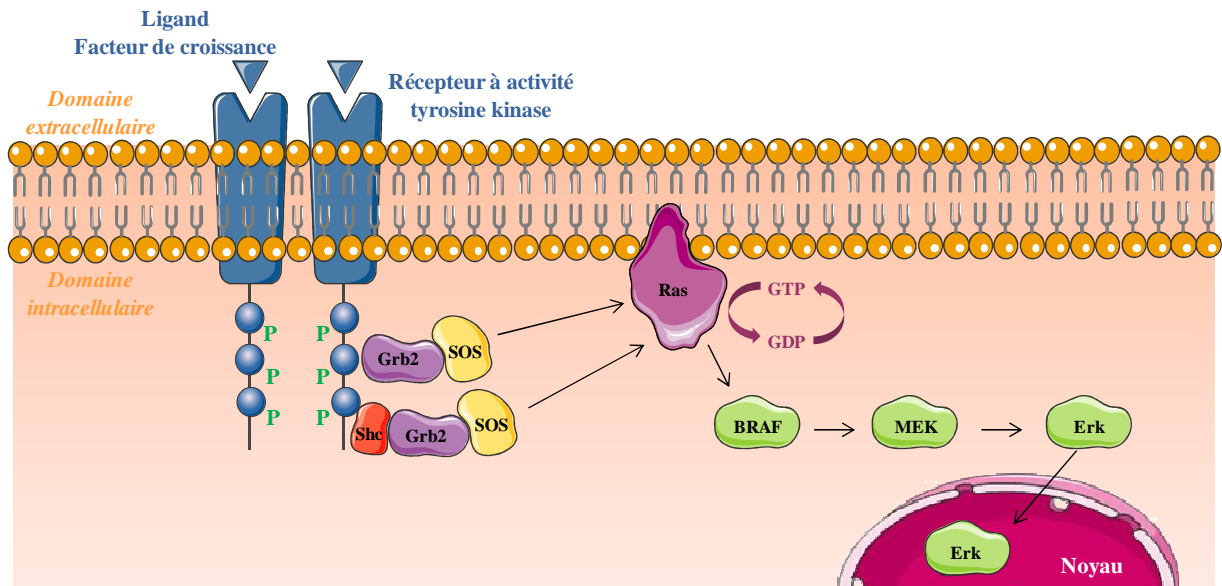


Figure 11 : Schéma simplifié de la voie des Mitogen Activated Protein Kinases (MAPK)

Les altérations oncogéniques de cette voie sont nombreuses. Il existe des mutations activatrices de la protéine G Ras au niveau du codon 12. Ces mutations provoquent une perte de l'activité GTPasique de la protéine, provoquant une suractivation de la voie de signalisation. Les mutations de Ras sont fréquemment rencontrées dans les cancers et près de 40% des cancers du côlon présentent une mutation. Des mutations activatrices de BRAF sont également détectées dans environ 15% des cancers colorectaux mais surtout dans 60% des mélanomes malins. La mutation de BRAF la plus courante est la mutation V600E.

2.42.b. La voie PI3K/Akt

Les RTKs contrôlent le métabolisme des phospholipides comme les phosphatidylinositols, l'acide phosphatidique et l'acide arachidonique. Ils peuvent activer directement la protéine PI3K (*Phosphatidylinositol-3-Kinase*) déclenchant la voie PI3K/Akt.

La voie PI3K/Akt est une voie de transduction jouant un rôle majeur dans la **croissance**, la **prolifération** et la **survie cellulaire**. Les enzymes PI3K sont des hétérodimères, constitués d'une sous-unité régulatrice (p85) et d'une sous-unité catalytique (p110). La sous-unité p85 permet l'activation de la PI3K avec les tyrosines phosphorylées grâce à son domaine SH2. L'activation de la PI3K peut également se faire de manière indirecte par l'intermédiaire de la protéine Ras qui se lie à la sous-unité catalytique p110. Une fois activée, la PI3K génère un phospholipide membranaire, le PIP2 (*Phosphatidylinositol-4,5-biPhosphate*) qui donne à son tour le PIP3 (*Phosphatidylinositol-3,4,5-triPhosphate*). Un contrôle inhibiteur de l'activité de la PI3K est effectué par la PTEN (*Phosphatase and TENsin*

homologue) qui déphosphoryle le PIP3 en PIP2. Son inactivation est associée à la progression de divers cancers.⁴⁰ Le PIP3 sert de ligand pour recruter la protéine Akt qui est transloquée à la membrane et mono- ou diphosphorylée par les sérine/thréonine kinases PDK1 (*Phosphatidylinositol 3-Dependent Kinase 1*) et PDK2 (*Phosphatidylinositol-3-Dependent Kinase 2*). La protéine Akt a pour cible de nombreuses protéines d'aval dont mTOR et BAD (Figure 12).^{41,42,43}

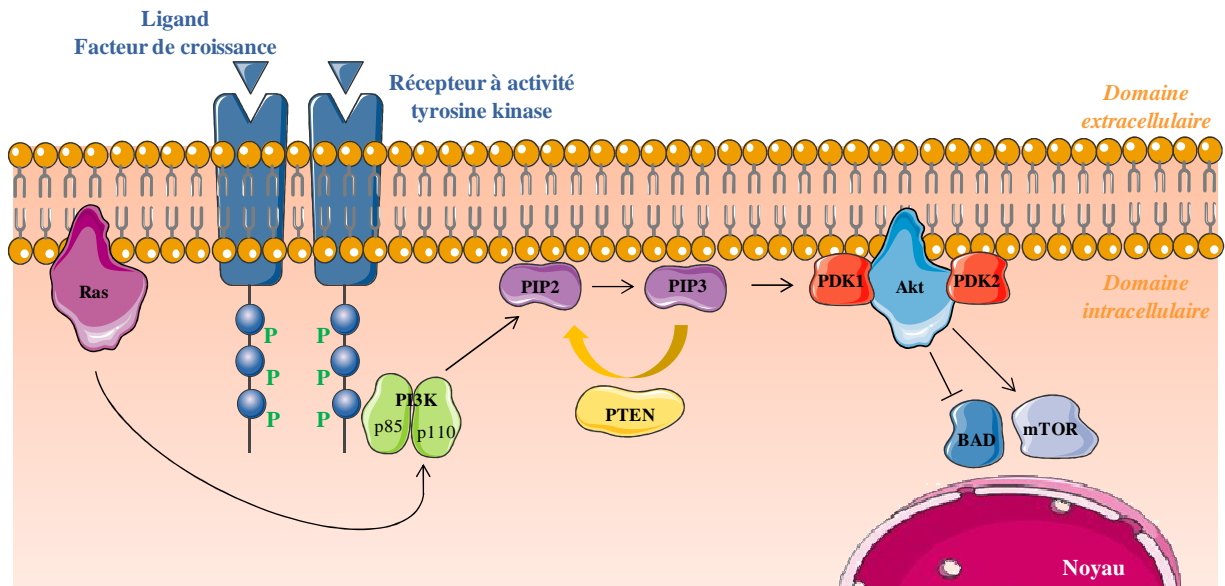


Figure 12 : Schéma simplifié de la voie PI3K/Akt

La sérine/thréonine kinase mTOR possède un rôle central dans la croissance cellulaire et l'apoptose, mais également dans l'angiogenèse tumorale. En effet, mTOR régule la production de HIF (*Hypoxia Inducible Factor*) qui joue un rôle clé dans l'angiogenèse en stimulant la production de facteurs de croissance comme le VEGF et le PDGF.

2.4.c. La voie JAK/STAT

La famille des tyrosine kinases cytoplasmiques JAK (*Janus Kinase*) est composée de quatre protéines, JAK1, JAK2, JAK3 et Tyk2, qui régulent l'expression de gènes impliqués dans la **prolifération** et la **différenciation cellulaires**.

⁴⁰ B. H. Jiang *et al.*, *Biochimica et Biophysica Acta*, **2008**, 1784, 150-158.

⁴¹ I. Vivanco et C. L. Sawyers, *Nature Reviews Cancer*, **2002**, 2, 489-501.

⁴² K. Kok *et al.*, *Trends in Biochemical Sciences*, **2009**, 34, 115-127

⁴³ L.C. Cantley, *Science*, **2002**, 296, 1652-1657.

L'activation des JAK stimule la phosphorylation des protéines STAT (*Signal Transducers and Activator of Transcription*) qui induisent la transcription de gènes cibles. Sept protéines STATs sont actuellement identifiées (STAT 1, 2, 3, 4, 5a, 5b et 6). Le domaine SH2 des STAT permet la liaison des STAT sur les résidus tyrosine phosphorylés du récepteur activé. Le domaine SH2 permet aussi la formation de dimères (homodimères et hétérodimères) entre les protéines STAT activées. Les dimères activés de STAT migrent ensuite dans le noyau nucléaire pour stimuler des gènes spécifiques (Figure 13).^{44,45}

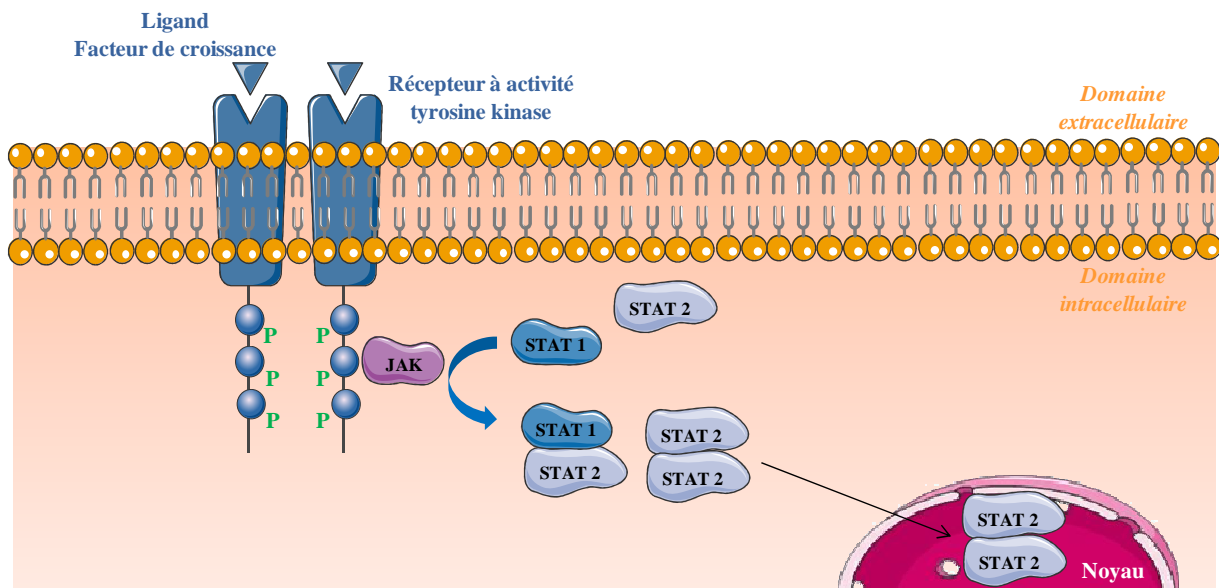


Figure 13 : Schéma simplifié de la voie JAK/STAT

Plusieurs RTKs sont capables d'activer, et même de suractiver ces différentes voies de signalisation. Parmi eux, nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux récepteurs EGFR, c-Kit, VEGFR et PDGFR. En effet, de par leur surexpression dans plusieurs lignées cellulaires cancéreuses, leur inhibition constitue une stratégie thérapeutique de choix pour le développement de nouveaux agents anticancéreux.

⁴⁴ D. A. Frank, *Molecular Medicine*, **1999**, 5, 432-456.

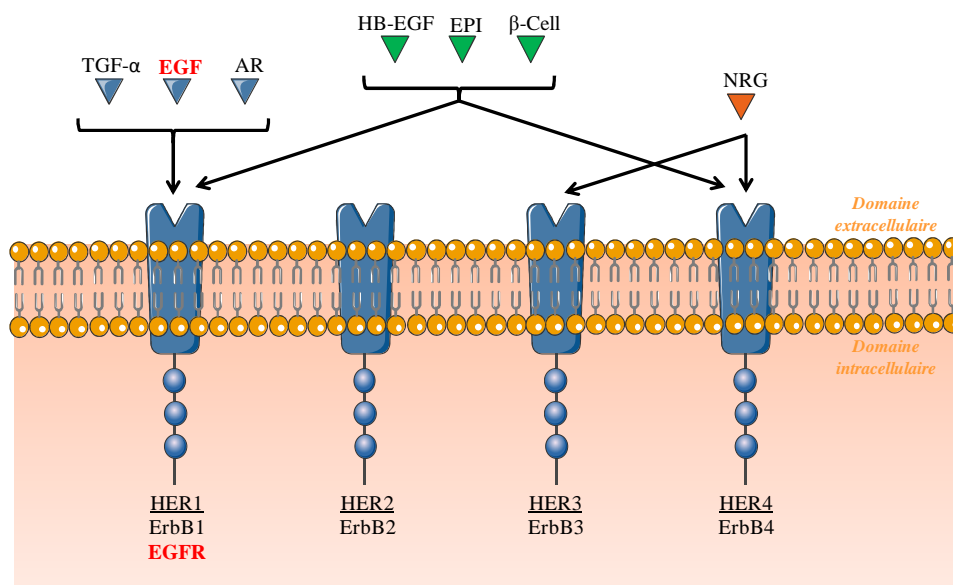
⁴⁵ A. P. Costa-Pereira *et al.*, *American Journal of Cancer Research*, **2011**, 1, 806-816.

3. L'Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)

L'EGFR appartient à la famille des récepteurs ErbB/HER à activité tyrosine kinase. Cette famille fait l'objet de nombreuses études du fait de sa surexpression dans plusieurs lignées cellulaires cancéreuses.⁴⁶

3.1. La famille des récepteurs ErbB/HER à activité tyrosine kinase

Les gènes HER codent pour des récepteurs transmembranaires dénommés HER1 (ErbB1 ou EGFR), HER2 (ErbB2), HER3 (ErbB3) et HER4 (ErbB4). Chaque récepteur lie des ligands spécifiques tels que l'épiréguine, l'EGF ou encore l'amphiréguine (Figure 14).⁴⁷



TGF- α : Transforming Growth Ffactor α ; **AR** : AmphiRéguine ; **EPI** : ÉPIréguine
HB-EGF : Heparin-Binding EGF ; **β -Cell** : bétaCelluline ; **NRG** : NeuReGulin

Figure 14 : Récepteurs ErbB/HER à activité tyrosine kinase

Les récepteurs transmembranaires HER appartiennent à la classe I des RTKs. Ils possèdent une structure à chaîne simple, de taille variable, composée de trois domaines : une région extracellulaire constituée du domaine N-terminal et impliquée dans la reconnaissance du ligand, une région hydrophobe transmembranaire et une région intracellulaire portant l'activité catalytique. Leur mécanisme d'action repose sur la phosphorylation de leur domaine

⁴⁶ R. Jr. Roskoski, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **2004**, 319, 1-11.

⁴⁷ N. E. Hynes et G. MacDonald, *Current Opinion in Cell Biology*, **2009**, 21, 177-184.

catalytique qui initie de nombreuses voies de signalisation comme la voie PI3K/Akt impliquée dans la stimulation de la croissance cellulaire.⁴⁸

Du fait de sa surexpression à la surface de nombreuses cellules tumorales, nous nous sommes plus particulièrement intéressés au premier membre de la famille des récepteurs HER : le récepteur EGFR. Ce récepteur a été découvert en 1980 par l'équipe du Docteur Stanley Cohen.

3.2. Structure de l'EGFR

Le gène codant pour le récepteur EGFR est situé sur le chromosome 7. Il code pour une glycoprotéine transmembranaire de 170 kDa.⁴⁹ Le domaine extracellulaire, également appelé ectodomaine est constitué d'environ 620 acides aminés chez l'homme. Cette région est subdivisée en quatre domaines, de DI à DIV. Ces domaines sont parfois appelés respectivement L1, CR1, L2 et CR2. Les domaines L1 et L2 sont analogues à un domaine du récepteur de l'IGF1 (*Insulin-like Growth Factor 1*), un autre récepteur à activité tyrosine kinase. Les domaines CR1 et CR2 (*Cystein-rich*) sont caractérisés par leur abondance en résidus cystéine. La région transmembranaire est une courte séquence de 23 acides aminés, principalement caractérisée par sa grande hydrophobicité. La région intracellulaire est composée du domaine juxtamembranaire, du domaine kinase et du domaine C-terminal riche en sites de phosphorylation.⁵⁰

3.3. Les ligands de l'EGFR

La région extracellulaire du récepteur permet la reconnaissance de plusieurs ligands. Les ligands spécifiques de l'EGFR sont l'EGF, le TGF- α (Transforming Growth Factor α) et l'amphiréguline. L'épiréguline, l'HB-EGF (*Heparin-Binding EGF*) et la bétacelluline reconnaissent l'EGFR mais aussi le récepteur HER4. Ces différents ligands sont synthétisés sous forme de précurseur transmembranaire. L'action de certaines enzymes (métalloprotéases ou protéases) permet le clivage du précurseur et la libération du facteur de croissance soluble et mature.

⁴⁸ A. Okines *et al.*, *Nature Reviews Clinical Oncology*, **2011**, 8, 492-503.

⁴⁹ M. Fickova, *Endocrine Regulations*, **2002**, 36, 87-93.

⁵⁰ R. Doris *et al.*, *Journal of Oncology*, **2010**, 1-20.

L'EGF est synthétisé à partir d'un précurseur transmembranaire de 1207 acides aminés, le préproEGF. Ce dernier est formé de la séquence de l'EGF de 53 acides aminés, de huit domaines EGF-like et d'une région hydrophobe assurant son ancrage membranaire.

L'EGF est un peptide comportant six cystéines formant trois ponts disulfure. Cette organisation favorise la formation de trois boucles (A, B, C) (Figure 15a). La structure cristalline du peptide laisse apparaître la présence de deux sous-domaines. Le sous-domaine N est formé de l'enchaînement des 32 premiers acides aminés et il est organisé en feuillets β antiparallèles. Le sous-domaine C (résidus 33 à 53) est organisé en feuillets β parallèles et il est formé de la boucle C et du segment C-terminal (Figure 15b).

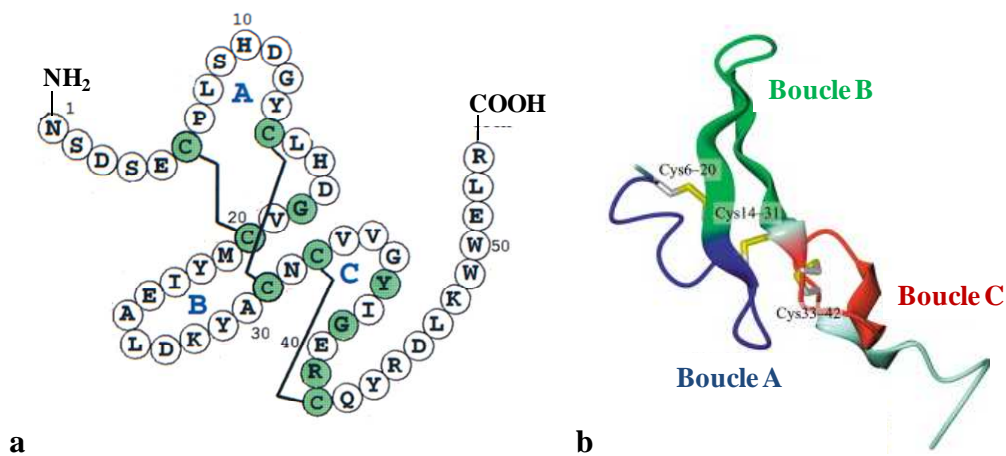


Figure 15 : Structure primaire (a) et structure tridimensionnelle (b) de l'EGF
Adaptée de C. McInnes et B. D. Sykes⁵¹ et de H. Ogiso et al.⁵²

3.4. Activation de l'EGFR

Fixation de l'EGF sur l'ectodomaine de l'EGFR et dimérisation

La fixation du ligand EGF sur le récepteur permet le passage de la forme monomérique auto-inhibée inactive à une forme dimérique active. En effet, en absence de ligand, le récepteur reste sous forme inactive monomérique. Les domaines riches en résidus cystéine CR1 et CR2 interagissent grâce à des liaisons hydrogène intramoléculaires et contraignent le récepteur dans une conformation dans laquelle seul le premier domaine L1 est accessible au ligand. Ce domaine L1 présente une faible affinité pour le ligand.

⁵¹ C. McInnes et B. D. Sykes, *Biopolymers*, **1997**, 43, 339-366.

⁵² H. Ogiso et al., *Cell*, **2002**, 775-787.

En présence de ligand, la fixation de ce dernier au niveau du domaine L1 entraîne la rotation des domaines L1 et CR1. La rotation du domaine L1 induit une haute affinité pour le ligand. La rotation du domaine CR1, quant à elle, provoque l'éloignement des domaines CR1 et CR2 suite à une rupture de l'interaction CR1-CR2. Au sein du dimère, les interactions se font exclusivement entre les récepteurs, sollicitant les domaines CR1 et CR2 de chacun. Les interactions entre le ligand et le récepteur sont également indispensables et sont assurées par les domaines L1 et L2 propres à chaque récepteur (Figure 16).

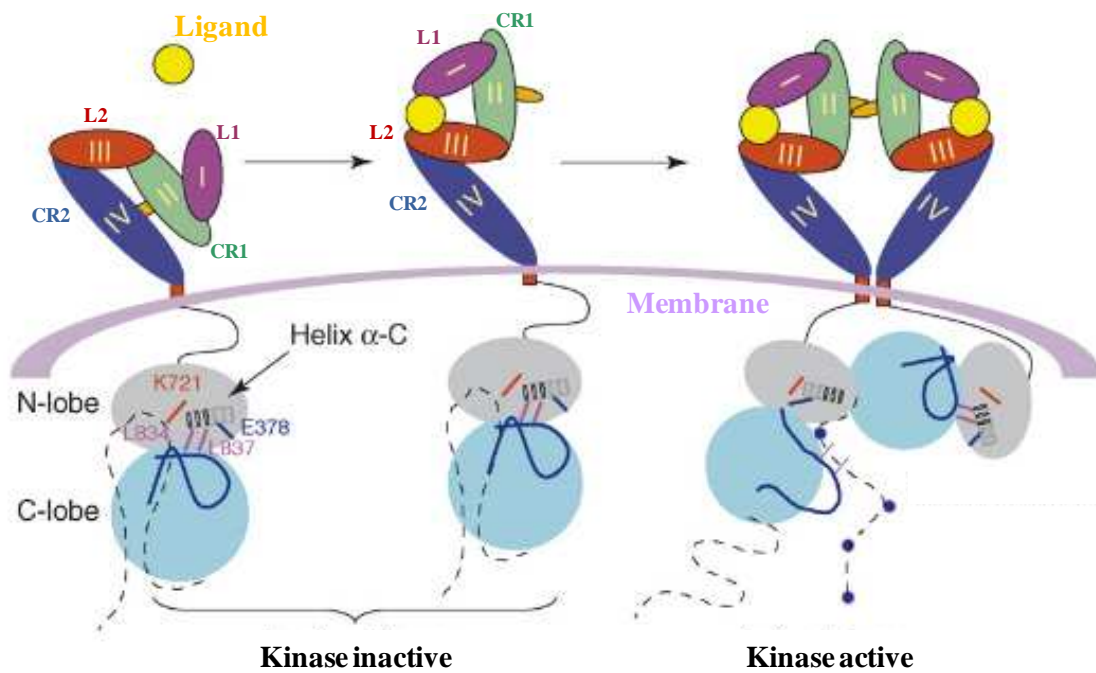


Figure 16 : Représentation schématique de l'activation de l'EGFR par l'EGF
Adaptée de E. M. Bublil et Y. Yarden⁵³

Interaction entre le ligand EGF et l'EGFR

L'EGF établit des interactions hydrophobes entre trois de ses acides aminés (Met₂₁, Ile₂₃ et Leu₂₆) et les chaînes latérales des résidus appartenant au domaine L1 de l'EGFR (Leu₁₄, Tyr₄₅, Leu₆₉ et Leu₉₈) (Figure 17 a). D'autres interactions entre l'EGF et le domaine L2 du récepteur sont connues : les résidus Tyr₁₃ et Leu₁₅ réalisent des interactions hydrophobes avec des résidus du domaine L2 du récepteur (Val₃₅₀ et Phe₃₅₇) ; et le résidu Arg₄₁ du ligand établit un pont salin avec la chaîne latérale de l'Asp₃₅₅ (Figure 17b). Enfin, les chaînes latérales des résidus du domaine L2 de l'EGFR sont impliquées dans des interactions hydrophobes avec la Leu₄₇ de l'EGF. Sur la figure 17c, on peut également voir que le résidu

⁵³ E. M. Bublil et Y. Yarden, *Current Opinion in Cell Biology*, 2007, 19, 124-134.

Gln₃₈₄ de l'EGFR interagit par des liaisons hydrogène avec deux résidus du ligand (Gln₄₃ et Arg₄₅).

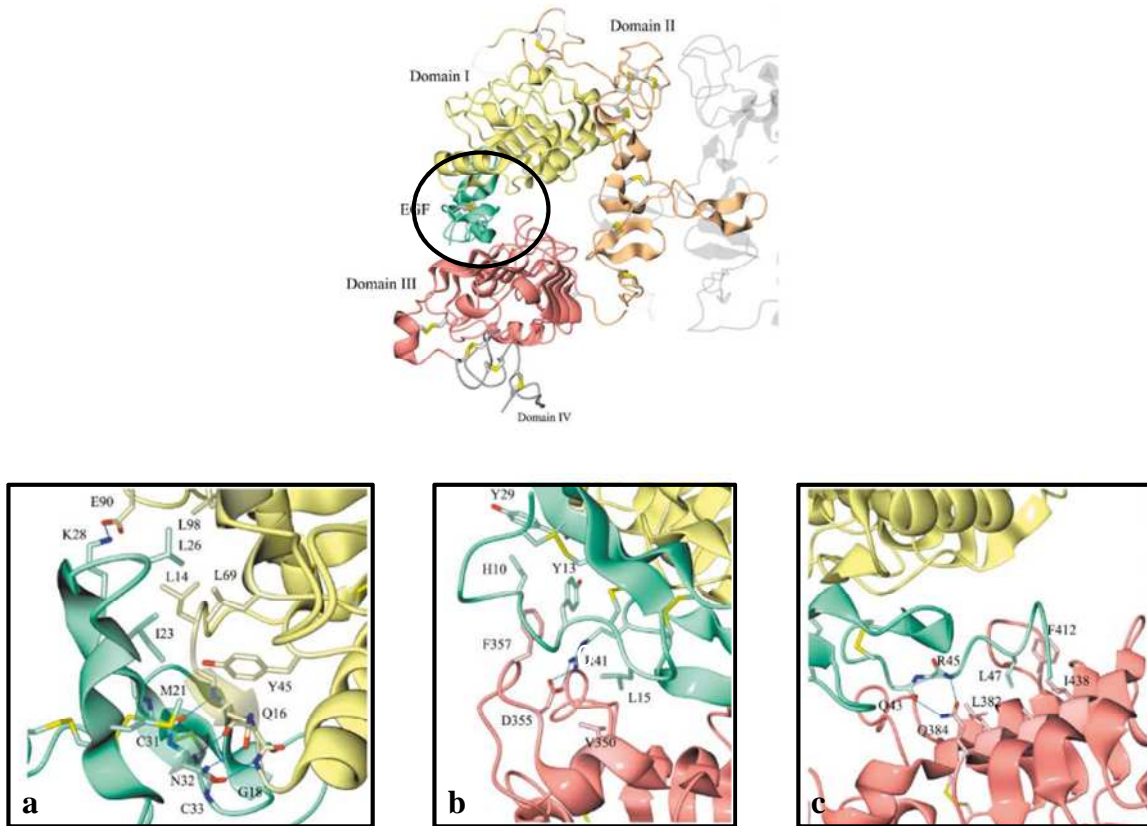


Figure 17 : Représentation schématique de l'activation de l'EGFR par l'EGF
Adaptée de H. Ogiso et al.⁴⁷

Activation du domaine kinase intracellulaire

La fixation du ligand, suivie de la dimérisation de deux monomères d'EGFR permet l'activation du domaine kinase intracellulaire. Ce dernier est alors capable de phosphoryler un substrat possédant une tyrosine par l'intermédiaire de l'ATP.⁵⁴

Le récepteur EGFR possède au niveau de sa région Ct intracellulaire des sites de phosphorylation qui lui sont propres. Ainsi, il peut activer différentes voies de signalisation dont : la voie Ras/Raf/MAPK, les voies du métabolisme des phospholipides (la voie PLC γ et la voie PI3K/Akt), la voie JAK/STAT et la voie Src kinase. Ces voies impliquées dans la **prolifération**, la **survie** et la **différenciation cellulaire** sont suractivées lors du développement du cancer suite à la dérégulation de l'EGFR.

⁵⁴ J. Stamos et al., *Journal of Biological Chemistry*, **2002**, 277, 46265-46272.

De manière physiologique, différents mécanismes tels que l'endocytose ou la déphosphorylation contribuent à la régulation négative de l'EGFR. Cependant, lors du développement tumoral, ces processus de dégradation sont diminués voire absents ce qui permet une suractivation de l'EGFR. De plus, un certain nombre de mutations ponctuelles ou de délétions peuvent survenir au niveau du domaine kinase engendrant une ouverture permanente de la poche et aboutissant à l'activation constante du récepteur.

3.5. Expression de l'EGFR

Le récepteur EGFR est présent à la surface des cellules de plusieurs organes sains. Parmi les organes qui expriment le plus l'EGFR, on peut citer la muqueuse orale, la peau, la prostate, le placenta et les amygdales. A un taux plus faible, l'EGFR est présent dans la majorité du tractus digestif et dans l'appareil reproducteur de l'homme (*d'après <http://www.proteinatlas.org>*).

Des taux élevés d'EGFR et de ses ligands (EGF et TGF- α) ont été identifiés en tant que marqueur commun dans plusieurs types de cancer et semblent favoriser la croissance de tumeurs solides.⁵⁵ L'EGFR est particulièrement surexprimé dans les cancers suivants : cancer de la tête et du cou, cancer du sein, cancer de la vessie, cancer de l'ovaire, cancer rénal, cancer du côlon et dans le cancer du poumon. La surexpression de l'EGFR (due à une amplification génique ou à stimulation autocrine) favoriserait la cancérogenèse par stimulation de la prolifération cellulaire des cellules cancéreuses.⁵⁶ Les cellules normales expriment en moyenne entre $4 \cdot 10^4$ et $1 \cdot 10^5$ récepteurs par cellules alors que les cellules tumorales en présentent plus de $2 \cdot 10^6$ au niveau membranaire.⁵⁷ L'inhibition de l'EGFR est donc une stratégie de choix pour cibler les cellules tumorales et pour lutter contre la prolifération des cellules cancéreuses.

⁵⁵ D. S. Salomon *et al.*, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, **1995**, 19, 183-232.

⁵⁶ R. Nicholson *et al.*, *European Journal of Cancer*, **2001**, 37, 9-15.

⁵⁷ C. Yewale *et al.*, *Biomaterials*, **2013**, 34, 8690-8707.

4. Le Stem Cell Growth Factor Receptor ou le récepteur c-Kit

L'oncogène viral v-Kit (kitten : chaton) a été identifié dans le rétrovirus félin *Hardy-Zuckerman 4 Feline Sarcoma Virus* en 1986. La découverte de cet oncogène a permis d'identifier son homologue cellulaire, le proto-oncogène c-Kit chez l'Homme. Ce dernier, découvert en 1987, code pour un récepteur transmembranaire appartenant à la classe III des RTKs. Le récepteur c-Kit est également connu sous le nom SCFR pour *Stem cell growth factor receptor* ou encore CD117.

4.1. Structure du récepteur c-Kit

Ce récepteur a une masse de 145 kDa et est constitué de 976 acides aminés dont 519 constituent le domaine extracellulaire, 23 le domaine transmembranaire et 434 le domaine intracellulaire. Le domaine extracellulaire est formé de 5 domaines d'immunoglobulines (D1-D5), les domaines D1 à D3 constituent le point d'attache du ligand SCF (*Stem Cell Factor*) et les domaines D4 et D5 sont essentiels pour la dimérisation du récepteur (Figure 18).^{58,59}

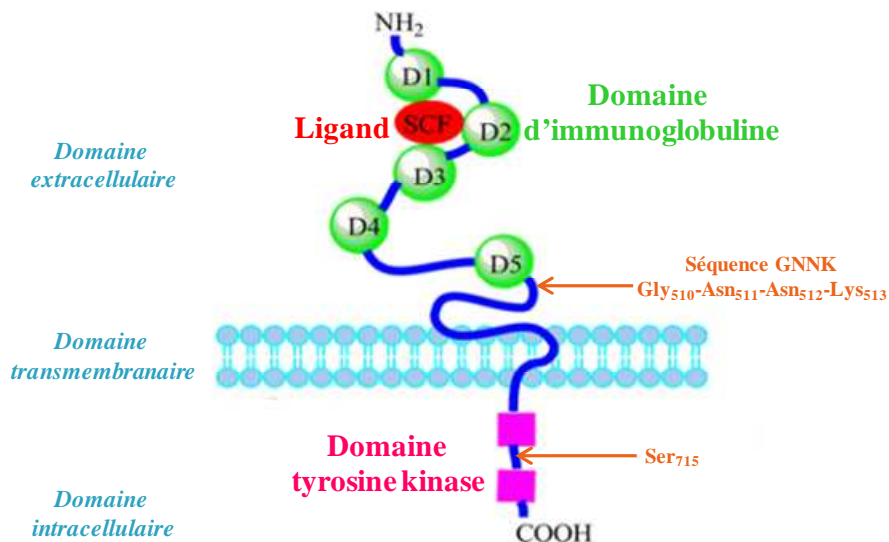


Figure 18 : Schéma simplifié de l'organisation structurale du récepteur c-Kit
Adaptée de J. Liang et al.⁶⁰

Quatre isoformes du récepteur c-Kit ont été caractérisées à ce jour. Au niveau du domaine extracellulaire, la séquence Gly₅₁₀-Asn₅₁₁-Asn₅₁₂-Lys₅₁₃, notée séquence GNNK, n'est pas toujours présente dans la structure du récepteur. On distingue donc les récepteurs c-

⁵⁸ L. Reber et al., *European Journal of Pharmacology*, **2006**, 533, 327-340.

⁵⁹ C. E. Edling et B. Hallberg, *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **2007**, 39, 1995-1998.

⁶⁰ J. Liang et al., *International Journal of Biological Sciences*, **2013**, 9, 435-443.

Kit GNNK+ possédant cette séquence et les récepteurs c-KitA GNNK- où cette séquence est absente. Ces deux isoformes ont des activités biologiques différentes, c'est l'isoforme GNNK- qui est principalement exprimées dans différentes cellules tumorales.⁶¹ Une différence peut également être observée dans le domaine inter-kinase intracellulaire. La présence ou l'absence d'un résidu sérine en position 715 permet d'identifier des récepteurs c-Kit Ser₇₁₅ +/-.

4.2. Le ligand SCF

Le ligand SCF pour *Stem Cell Factor*, également appelé ligand c-Kit, est un facteur de croissance qui existe à la fois sous forme transmembranaire et sous forme soluble. Il joue un rôle dans la prolifération cellulaire, la migration, la survie et la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques, des mélanocytes, et des cellules germinales.

Les deux isoformes transmembranaires du SCF (SCF₂₂₀ et SCF₂₄₈) présentent un domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et une région intracellulaire. Les deux isoformes ne diffèrent que par leur exon 6. Le SCF₂₄₈, plus long, est clivé par des protéases pour générer le SCF₁₆₅ soluble, tandis que la forme plus courte (SCF₂₂₀) reste liée à la membrane. La forme membranaire (*m*SCF₂₂₀) et la forme soluble (*s*SCF₁₆₅) se lient au récepteur c-Kit sous forme de dimère pour activer son activité tyrosine kinase (Figure 19).

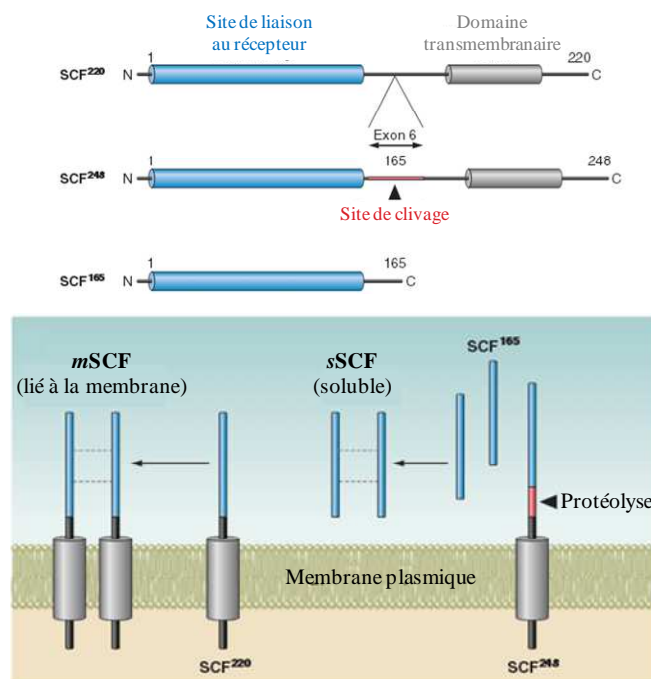


Figure 19 : Représentation schématique des différentes isoformes du SCF
Adaptée de J. Lennartsson et L. Rönnstrand⁶²

⁶¹ F. Guerrini *et al.*, *Leukemia*, **2007**, 21, 2056-2058.

⁶² J. Lennartsson et L. Rönnstrand, *Physiological Reviews*, **2012**, 92, 1619-1649.

4.3. Activation du récepteur c-Kit

Fixation de ligand SCF sur l'ectodomaine de c-Kit

L'activation de c-Kit, comme celle des RTKs, nécessite la dimérisation de deux récepteurs. Au cours des dix dernières années, une importante augmentation des données structurales de c-Kit combinée aux données biochimiques, a permis une description détaillée du processus d'activation du récepteur. Il a été démontré que seuls les trois premiers domaines d'immunoglobulines (D1, D2 et D3) étaient nécessaires pour lier le SCF comme le montre la Figure 20. Chaque molécule de SCF se lie donc à un monomère de c-Kit par contact avec les trois premiers domaines d'immunoglobuline de c-Kit. Cette région D1-D3 est structurellement intacte lors de la liaison du ligand. Cependant, les deux domaines D4 et D5 les plus proches de la membrane plasmique subissent une réorientation significative afin de positionner correctement les deux monomères de c-Kit pour la transphosphorylation.

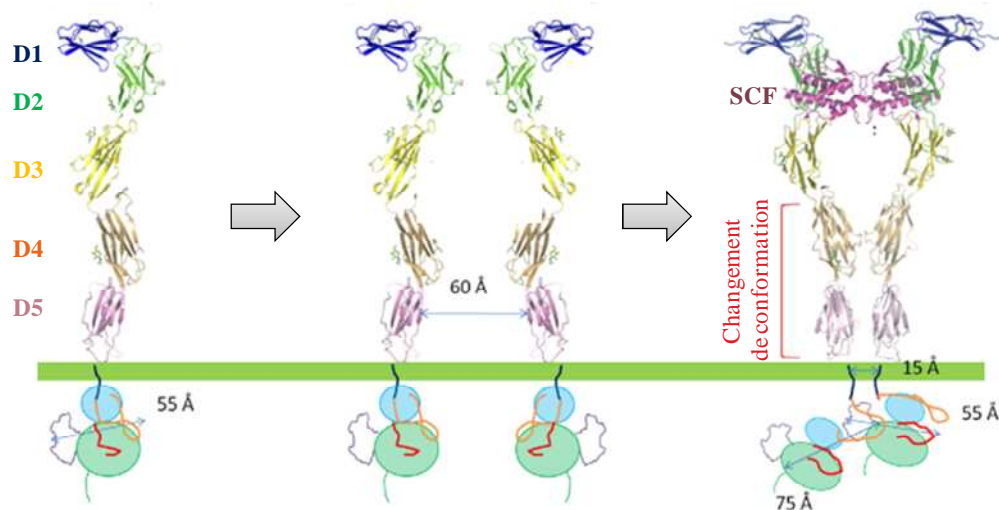


Figure 20 : Représentation schématique de l'activation de c-Kit par le SCF

Adaptée de E. Laine et al.⁶³

Interaction entre le ligand SCF et c-Kit

Le ligand SCF peut se lier au récepteur c-Kit au niveau de 3 sites (Figure 21) :

- Site I : Dans cette hypothèse, le SCF est aligné perpendiculairement au domaine d'immunoglobuline D1. Les acides aminés Asp₇₂, Glu₇₃ et Thr₇₄ du domaine D1 sont très proches des résidus Lys₉₉₀, Ser₁₀₁₀ et Phe₁₀₂₀ du SCF (distance inférieure à 8 Å), cependant aucune interaction spécifique n'a pu être définie à ce jour.

⁶³ E. Laine et al., *PLoS Computational Biology*, **2011**, 7, 1-20.

- Site II : Trois résidus du domaine D2 (Tyr₁₂₅, Arg₁₈₁ et Lys₂₀₃) forment des liaisons de type hydrogène avec les acides aminés suivants : Asp₇₇₀, Asn₈₁₀, Asp₈₄₀, Ser₅₃₀, et Thr₅₇₀ du SCF.
- Site III : Le segment N-terminal du SCF interagit avec le domaine d'immunoglobuline D3. Les liaisons hydrogène se forment entre la chaîne latérale (Asn₁₀₀) du SCF et les résidus Ser₂₆₁, Asp₂₆₀ et Trp₂₆₂ du domaine D3.

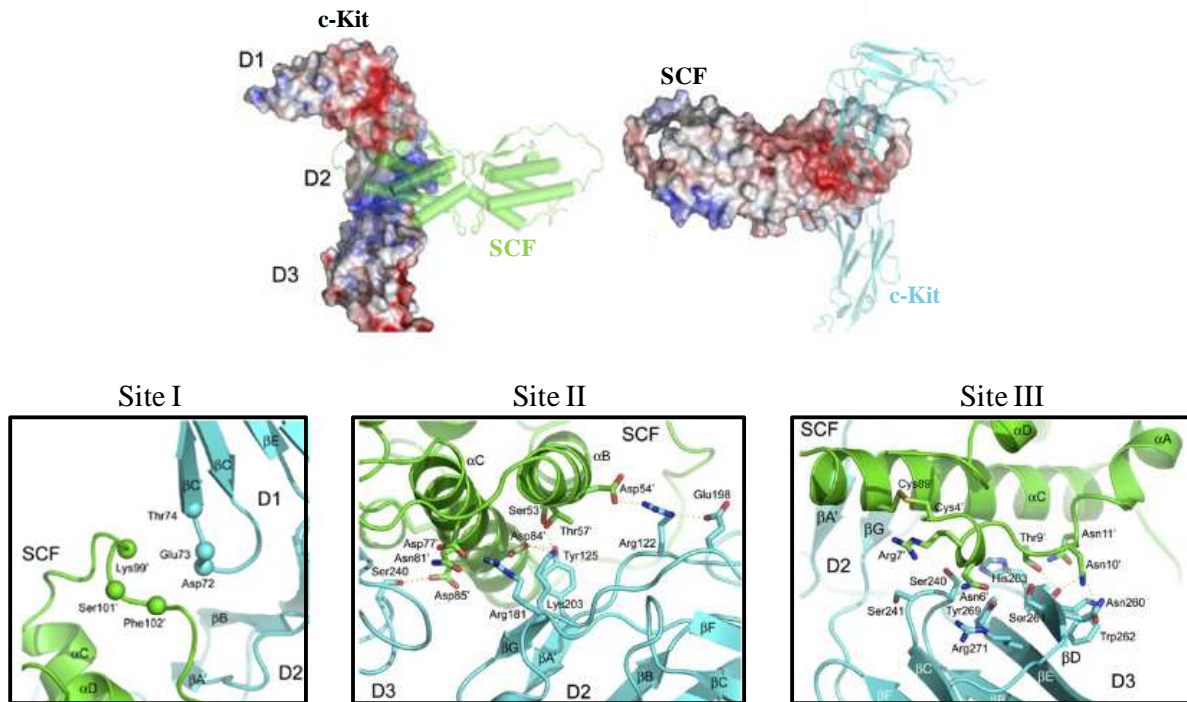


Figure 21 : Interaction entre le SCF et c-Kit au niveau des domaines D1, D2 et D3
Adaptée de S. Yuzawa et al.⁶⁴

Activation du domaine kinase intracellulaire

Après fixation du ligand, dimérisation et rapprochement cytosolique, plusieurs résidus tyrosine du récepteur sont phosphorylés suite à l'activation du domaine kinase : les tyrosines 568 et 570 de la région juxtamembranaire ; les tyrosines 703, 721 et 730 de la région inter-kinase ; les Tyr₈₂₃ et Tyr₉₀₀ du domaine kinase et la Tyr₉₃₆ de la partie C-terminale.^{65, 66} Ces résidus activent les voies PLC γ , PI3K/Akt, JAK/STAT et MAPK qui conduisent à la **croissance**, la **différenciation** et la **survie** des mastocytes.⁶⁷

⁶⁴ S. Yuzawa et al., *Cell*, **2007**, 130, 323-334. Cell

⁶⁵ J. Lennartsson et al., *Stem Cells*, **2005**, 23, 16-43.

⁶⁶ J. Lennartsson et L. Rönnstrand, *Physiological Reviews*, **2012**, 92, 1619-1649.

⁶⁷ A. M. Gilfillan et C. Tkaczyk, *Nature Reviews Immunology*, **2006**, 6, 218-230.

L'activité du récepteur c-Kit est régulée par différentes voies. Après activation, le complexe c-Kit/SCF est transporté vers le lysosome où il est dégradé. L'activité kinase de c-Kit est également régulée négativement par l'intermédiaire de la phosphatase SHp-1 (*SH2 phosphatase domain-containing 1*) qui déphosphoryle le résidu tyrosine Y570.⁶⁸

4.4. Expression de c-Kit

Le récepteur c-kit est exprimé dans certaines structures uniquement pendant leur développement comme le placenta, le septum du cœur, les reins, le tube neural, le foie et les poumons. Le c-kit et son ligand sont aussi exprimés dans le cerveau en cours de développement ainsi qu'à l'état adulte. Au stade adulte, le récepteur c-kit est exprimé uniquement par les structures constituées de mastocytes (derme, tractus respiratoire, gastro-intestinal et urinaire), par les mélanocytes ainsi que par les cellules épithéliales glandulaires mammaires, les glandes oesophagiennes et les glandes sudoripares.

Outre son expression dans les cellules saines, le récepteur c-Kit est également présent à la surface de certaines cellules tumorales. En effet, une étude de 2012 a démontré l'expression de c-Kit dans différents types de tumeurs. D'après cette étude, le récepteur c-Kit est fortement exprimé dans les GIST (*Gastro Intestinale Stromal Tumor*) et les cancers du testicule (seminomes). On retrouve également son expression mais de manière moins élevée dans les mélanomes malins, les carcinomes pulmonaires et les cancers du sein.

4.5. Cas particulier : c-Kit et GIST

Près de 95% des GIST expriment le récepteur c-Kit et des mutations du gène c-Kit sont identifiées dans 80% des cas environ. Dans environ deux tiers des cas, les mutations concernent le domaine juxtamembranaire du récepteur (exon 11) qui a pour fonction d'inhiber la dimérisation du récepteur en l'absence de son ligand. Des mutations dans cette région entraînent donc une perte de cette fonction et une dimérisation du récepteur indépendante du ligand.⁶⁹ D'autres mutations sont présentes dans la plupart des GIST : elles concernent le PDGFR- α dont la famille est décrite ci-après. L'inhibition du récepteur c-Kit est une stratégie actuellement utilisée dans les GIST et à l'étude dans plusieurs cancers. Ce récepteur se présente comme une nouvelle cible pour la conception d'agents anti-cancéreux innovants.

⁶⁸ R. Roskoski, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **2005**, 338, 1307-1315.

⁶⁹ A. W. Beham *et al.*, *International Journal of Colorectal Disease*, **2012**, 27, 689-670.

5. Le Platelet-Derived Growth Factor Receptor (PDGFR)

La découverte du PDGF et de ses récepteurs en 1974 découle d'études montrant que la croissance des fibroblastes et des cellules musculaires lisses était stimulée par un facteur provenant des plaquettes sanguines (d'où la nomenclature : *Platelet-Derived-Growth*).

5.1. Les ligands de la famille PDGF

La famille des ligands PDGF se compose de quatre polypeptides, notés PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C et PDGF-D. Les quatre types de PDGF contiennent une séquence hautement conservée d'environ 100 acides aminés, notée domaine PDGF/VEGF. Le même motif structural se retrouve également dans la famille des facteurs de croissance VEGF. Ce domaine est caractérisé par un « nœud cystéine » impliqué dans les liaisons disulfure inter- ou intra-dimère. En effet, chaque ligand PDGF fonctionne sous forme d'homodimère (PDGF-AA) ou d'hétérodimère (PDGF-AB) stabilisés grâce à ces liaisons disulfures.⁷⁰

L'homodimère PDGF-BB a été cristallisé en 1992. Les deux sous-unités du dimère sont disposées de façon anti-parallèle, et chaque sous-unité est principalement constituée de feuillets anti-parallèles (Figure 22).⁷¹

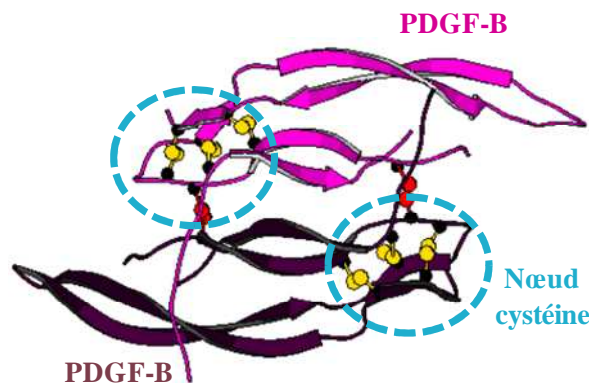


Figure 22 : Structure tridimensionnelle d'un dimère de PDGF-BB
Adaptée de L. Fredriksson et al.⁶⁴

5.2. La famille des récepteurs PDGFR à activité tyrosine kinase

Les récepteurs au PDGF appartiennent à la classe III des RTKs, tout comme le récepteur c-Kit. Chaque récepteur comporte cinq domaines d'immunoglobuline au niveau

⁷⁰ L. Fredriksson et al., *Cytokine & Growth Factor Reviews*, **2004**, 15, 197-204.

⁷¹ C.Oefner et al., *The EMBO Journal*, **1992**, 11, 3921-3926.

extracellulaire, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire composé par une région tyrosine kinase séparée par une courte séquence peptidique. On distingue deux types de récepteurs au PDGF : le récepteur PDGFR- α et le récepteur PDGFR- β . Les chaînes polypeptidiques du PDGF se lient aux récepteurs avec des affinités différentes. Ainsi, les ligands PDGF-AA, -AB, -BB et -CC induisent une homodimérisation des récepteurs PDGFR- $\alpha\alpha$; les ligands PDGF-AB, -BB -CC et -DD induisent une hétérodimérisation des récepteurs PDGFR- $\alpha\beta$; et les ligands PDGF-BB et -CC induisent une homodimérisation des récepteurs PDGFR- $\beta\beta$ (Figure 23).⁷²

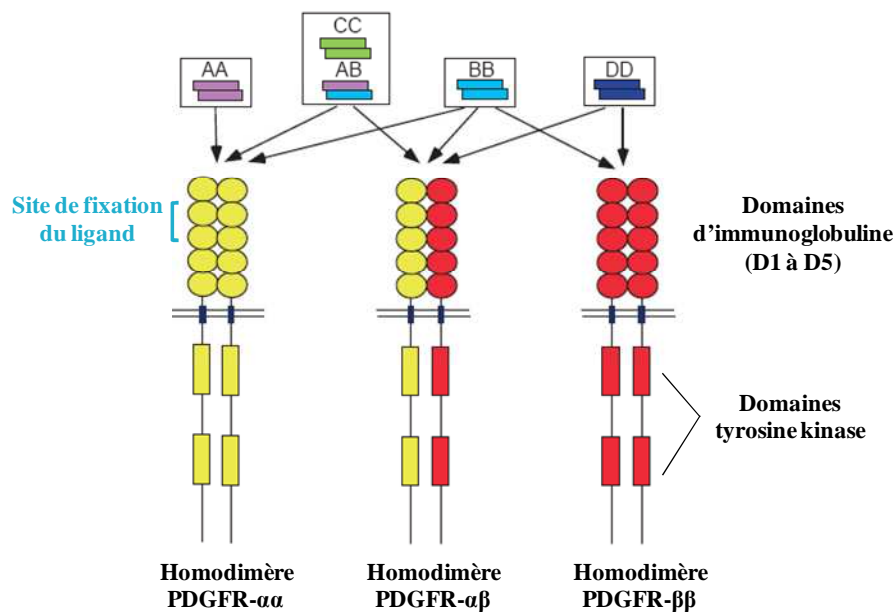


Figure 23 : La famille des récepteurs PDGFR à activité tyrosine kinase
Adaptée de R. V. Hoch et P. Soriano⁶⁶

5.3. Activation du récepteur

Grâce à la liaison du ligand sous forme dimérique sur les domaines d'immunoglobuline D2 et D3 du récepteur, la dimérisation des deux monomères de PDGFR active les domaines tyrosine kinase qui à leur tour phosphorylent plusieurs résidus tyrosine au niveau cytoplasmique.^{73,74} Ces résidus phosphorylés créent des sites d'accueil pour les protéines adaptatrices de signalisation qui initient la transduction du signal. Les deux récepteurs peuvent activer de nombreuses voies de transduction, dont les voies MAPK, PI3K/Akt et PLC γ engendrant la **prolifération**, la **migration** et la **différenciation**.

⁷² R. V. Hoch et P. Soriano, *Development*, **2003**, 130, 4769-4784.

⁷³ A.Hye-Ryong Shim *et al.*, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **2010**, 107, 11307-11312.

⁷⁴ J. D. Kelly *et al.*, *Journal of Biological Chemistry*, **1991**, 266, 8987-8992.

On distingue essentiellement deux mécanismes de régulation de l'activité tyrosine kinase du PDGFR. L'activité TK peut-être immédiatement atténuée après fixation du ligand. En effet, lorsque le PDGF induit la phosphorylation des tyrosines du récepteur il y a simultanément une activation de la tyrosine phosphatase SHp-2 (*SH2 phosphatase domain-containing 2*) par le récepteur. Cette dernière se lie au récepteur, par son domaine SH2, et le déphosphoryle, ce qui se traduit par une inactivation du récepteur.⁷⁵ La liaison du ligand peut également induire l'internalisation du complexe ligand/récepteur qui est alors dirigé vers les lysosomes pour subir un processus de dégradation.⁷⁶

5.4. Expression du PDGFR

De manière physiologique, les récepteurs au PDGF sont exprimés au niveau de la moelle osseuse, des monocytes, des mégacaryocytes, des fibroblastes, des cellules endothéliales, des cellules gliales et des ostéoblastes.

La surexpression et la suractivation du PDGFR sont retrouvées dans différentes pathologies comme les maladies vasculaires, les fibroses et le cancer.⁷⁷ En se fixant sur leurs récepteurs, les facteurs de croissance de la famille du PDGF stimulent la prolifération des cellules tumorales par un mécanisme autocrine. Ils permettent aussi le recrutement de différents types de cellules stromales par un mécanisme paracrine, favorisant ainsi l'angiogenèse. Parmi les tumeurs causées par des altérations génétiques du récepteur PDGFR, on peut citer les glioblastomes (surexpression du récepteur PDGFR- α), les GISTs (mutation ponctuelle du PDGFR- α) et les leucémies myéloïdes (translocation FIP1L1/ PDGFR- α).^{78,79,80}

⁷⁵ A. Jazayeri *et al.*, *Experimental Cell Research*, **2000**, 254, 197-203.

⁷⁶ K. Kawada *et al.*, *Molecular and Cellular Biology*, **2009**, 29, 4508-4518.

⁷⁷ C. H. Heldin, *Cell Communication and Signaling*, **2013**, 11, 97.

⁷⁸ K. Motomura *et al.*, *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, **2013**, 72, 61-66.

⁷⁹ C. L. Corless, *Journal of Clinical Oncology*, **2005**, 23, 5357-5364.

⁸⁰ J. Gotlib *et al.*, *Blood*, **2004**, 103, 2879-2891.

6. La famille des récepteurs au VEGF

6.1. Les ligands de la famille VEGF

La famille VEGF stimule la prolifération, la survie et la migration des cellules endothéliales. C'est une famille de glycoprotéines comprenant plusieurs membres : le VEGF-A, B, C et D ainsi que le PlGF pour *Placental Growth Factor*. Il existe également deux formes plus rares du VEGF : le VEGF-E et F. Le médiateur majeur de l'angiogenèse tumorale est le VEGF-A nommé classiquement le VEGF.⁸¹

Le VEGF est une glycoprotéine homodimérique de 206 acides aminés dont le gène comprend 8 exons. Par épissage alternatif des exons 6 et 7, plusieurs transcrits sont générés et les peptides produits diffèrent par leur capacité de liaison à l'héparine. Les différentes isoformes sont nommées en fonction du nombre d'acides aminés qui les composent : VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₄₈, VEGF₁₆₂, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉ et VEGF₂₀₆ (Figure 24). Le VEGF₁₆₅ est l'isoforme majoritaire.^{82,83}

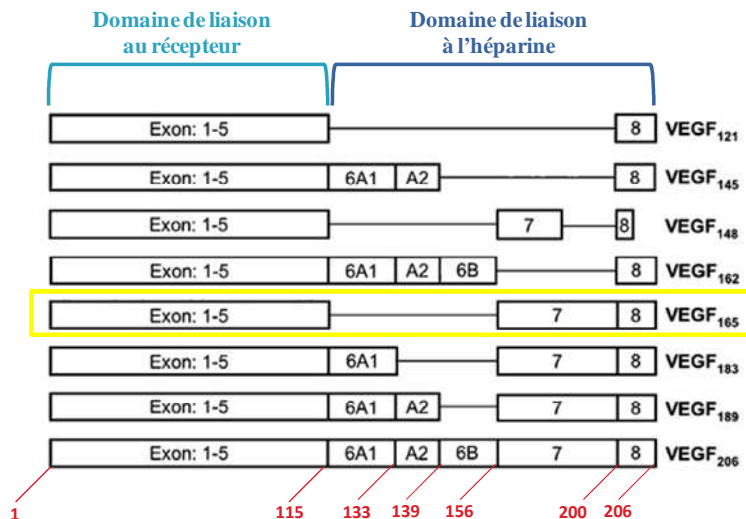


Figure 24 : Isoformes du ligand VEGF
Adaptée de S. A Eming et T. Krieg⁷⁶

Le VEGF est un peptide contenant de nombreuses liaisons hydrogène induisant un total de 7 bandes β ($\beta 1$ à $\beta 7$) et de 2 hélices α ($\alpha 1$ et $\alpha 2$). Il est constitué d'un feuillet β

⁸¹ L. Claesson-Welsh et M. Welsh, *Journal of General Internal Medicine*, **2013**, 273, 114-127.

⁸² S. A Eming et T. Krieg, *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, **2006**, 11, 79-86.

⁸³ H. Roy et al., *FEBS Letters*, **2006**, 580, 2879-2887.

antiparallèle central ($\beta 4$) et peut être séparé en deux paires de bandes β ($\beta 1$ à $\beta 3$ et $\beta 5$ à $\beta 6$). Le nœud de cystéine est constitué de plusieurs ponts disulfures et joue un rôle important dans le maintien du monomère ou du dimère (Figure 25).⁸⁴

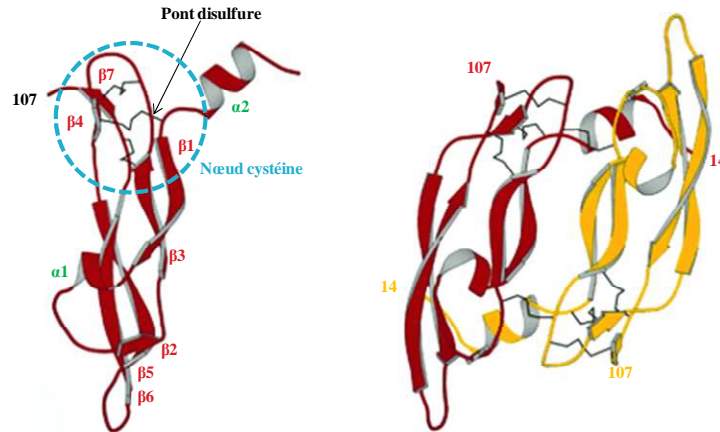


Figure 25 : Structure tridimensionnelle d'un monomère et d'un dimère de VEGF
Adaptée de Y. A. Muller et al.⁷⁸

6.2. La famille des récepteurs VEGFR à activité tyrosine kinase

L'action des ligands de la famille du VEGF passe par une interaction avec des récepteurs de la classe V des RTKs dont le VEGFR-1 (ou Flt-1), le VEGFR-2 (ou KDR/FLK-1) et le VEGFR-3 (ou Flt-4). Plusieurs interactions spécifiques ont été décrites : le VEGF-A se lie aux VEGFR- 1 et -2 ; le PlGF et le VEGF-B se lient exclusivement au VEGFR-1 ; et les VEGF-C et -D se fixent aux récepteurs VEGFR-2 et -3 (Figure 26). Le VEGF-A, le VEGF-B et le PlGF sont nécessaires à la formation de vaisseaux sanguins, tandis que les formes C et D du VEGF sont essentielles pour la lymphangiogenèse.^{85,86}

Les récepteurs VEGFR sont constitués d'un domaine extracellulaire de 750 acides aminés organisé en sept domaines d'immunoglobuline. Dans la structure du VEGFR-3, le cinquième domaine de type immunoglobuline est remplacé par un pont disulfure. Les domaines 2 et 3 d'immunoglobuline constituent le site de fixation du ligand. Les domaines transmembranaires des trois récepteurs sont analogues et permettent l'ancrage des récepteurs au niveau membranaire. Le domaine intracellulaire des récepteurs au VEGF est composé d'une région juxtamembranaire, d'une région tyrosine kinase interrompue par un court

⁸⁴ Y. A. Muller et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **1997**, 94, 7192-7197.

⁸⁵ T. Tammela et al., *Cardiovascular Research*, **2005**, 65, 550-563.

⁸⁶ C. Ruiz De Almodovar et al., *Physiological Reviews*, **2009**, 89, 607-648.

peptide de 70 acides aminés et d'une séquence portant plusieurs résidus tyrosine impliqués dans le recrutement de molécules de signalisation.⁸⁷

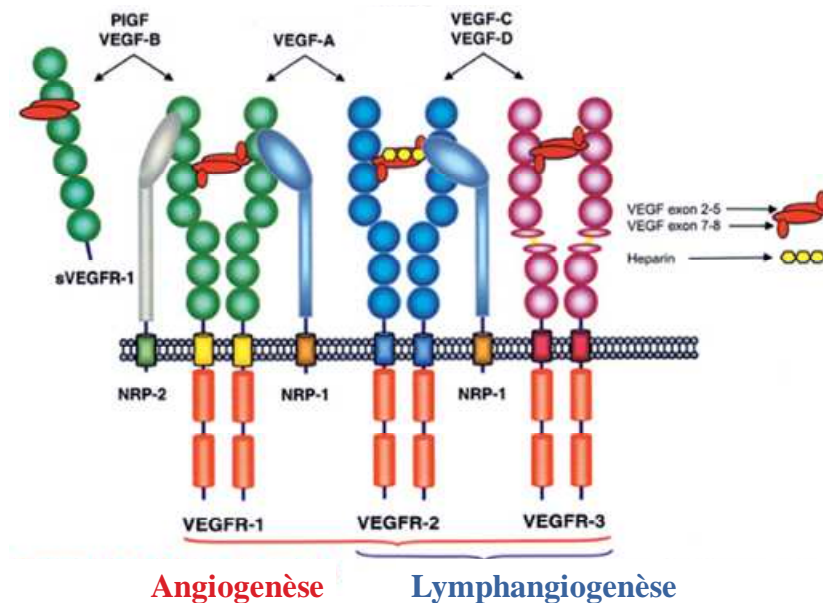


Figure 26 : La famille des récepteurs VEGFR à activité tyrosine kinase
Adaptée de S. Cébe-Suarez et al.⁸⁸

Le **VEGFR-1** est surexprimé dans les cellules endothéliales vasculaires mais également non endothéliales (cellules hématopoïétiques, macrophages et monocytes). Grâce à sa forte affinité pour le VEGF, ce récepteur joue un rôle de régulateur en cas de surexpression du facteur de croissance. En effet, contrairement au récepteur VEGFR-2, VEGFR-1 a une faible activité de phosphorylation tyrosine kinase après stimulation du VEGF. VEGFR-1 régule donc négativement l'action du VEGF en agissant comme un leurre (la fixation du ligand ne provoque pas ou peu d'effet).⁸⁹ Le récepteur **VEGFR-2** est surexprimé à la surface des cellules tumorales de nombreux cancers et des cellules endothéliales. Ce récepteur est l'un des principaux médiateurs des effets mitogènes, angiogéniques et de la perméabilité vasculaire.⁹⁰ Le **VEGFR-3** est exprimé dans les cellules endothéliales lymphatiques et joue un rôle important dans la prolifération, la migration et la survie de ce type de cellule.

Les Neuropilines (**NRP-1** et **NRP-2**) sont des glycoprotéines de 120 et 140 kDa exprimées dans une grande variété de tissus adultes humains. Ils agissent comme co-

⁸⁷ A.-K. Olsson et al., *Molecular Cell Biology*, 2006, 7, 359-371.

⁸⁸ S. Cébe-Suarez et al., *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2006, 63, 601-615.

⁸⁹ D. M. Roberts et al., *American Journal of Pathology*, 2004, 164, 1531-1535.

⁹⁰ K. Holmes et al., *Cellular Signalling*, 2007, 19, 2003-2012.

récepteurs de la famille VEGFR. Chaque NRP se lie spécifiquement à un récepteur de la famille : la NRP-1 se dimérise préférentiellement avec VEGFR-1 et -2 alors que NRP-2 se dimérise avec VEGFR-3.⁹¹

6.3. VEGFR et cancer

L'expression de cette famille de récepteurs est fortement représentée dans l'organisme. Ces récepteurs sont en effet présents dans les cellules endothéliales, lymphatiques et hématopoïétiques et sont indispensables au maintien des systèmes vasculaires de notre organisme. La dérégulation de cette famille a un impact majeur dans l'organisme et conduit à des phénomènes pathologiques comme les ischémies, les maladies inflammatoires et le cancer.⁹²

La croissance des tumeurs est dépendante de leur capacité à stimuler la création de nouveaux vaisseaux (angiogénèse). Le VEGF et ses récepteurs sont des acteurs très importants de cette néovascularisation angiogénique et constituent ainsi une cible très intéressante pour le traitement des tumeurs solides.

⁹¹ G. Neufeld *et al.*, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **2002**, 515, 81-90.

⁹² A. Rapisarda et G. Melillo, *Advances in Cancer Research*, **2012**, 114, 237-267.

LA NÉOVASCULARISATION

- CELLULES IMPLIQUÉES

- ANGIOGENÈSE PHYSIOLOGIQUE

- ANGIOGENÈSE TUMORALE

III. LA NÉOVASCULARISATION

La formation de vaisseaux sanguins ou néovascularisation se déroule en trois étapes : la *vasculogénèse*, qui se traduit par une différenciation des angioblastes en cellules endothéliales pour donner un réseau vasculaire primitif, l'*angiogénèse*, qui décrit le processus de remodelage de ce réseau primitif en réseau vasculaire mature, et l'*artériogénèse*, qui permet de recouvrir les vaisseaux formés d'une couche musculaire. Le réseau vasculaire ainsi formé permet le transport de l'oxygène et des nutriments ainsi que l'élimination des déchets métaboliques et du dioxyde de carbone.

1. Les cellules impliquées dans la néovascularisation

Trois types de cellules interviennent dans la néovascularisation : les cellules endothéliales qui tapissent l'intérieur des vaisseaux sanguins, les péricytes et les cellules musculaires lisses.

- Les **cellules endothéliales** sont des cellules allongées pavimenteuses qui forment un réseau continu ou discontinu, et qui s'organisent en tubules que l'on appelle capillaires sanguins. Chez l'adulte, le renouvellement de ces cellules est lent, il peut prendre plus de 6 mois, voire un an. Les cellules endothéliales se multiplient de manière anarchique sous l'action de certains signaux pro-angiogéniques et reviennent à l'état quiescent dans des conditions physiologiques.
- Les **péricytes** sont étroitement accolés aux cellules endothéliales des capillaires. Essentiellement présents au niveau des capillaires, on en retrouve quelques uns dans la tunique adventice des artères ou des veines de petit diamètre.
- Les vaisseaux matures de plus gros diamètre (au niveau artériel et veineux) sont entourés de **cellules musculaires lisses** qui sont très importantes pour assurer le soutien des cellules endothéliales. Ces cellules assurent également la vasomotricité et donc la régulation du flux sanguin parvenant aux tissus. De par leur capacité à produire un certain nombre de médiateurs, les cellules musculaires lisses participent activement à l'angiogénèse. Il faut noter que certains vaisseaux, en particulier les

vaisseaux tumoraux, sont fréquemment dépourvus de ces cellules, ce qui évoque une dysrégulation au niveau du remodelage vasculaire.

2. Mécanisme de la néovascularisation

La différenciation des angioblastes en cellules endothéliales permet la formation d'un réseau vasculaire primitif par jonction des cellules. Les cellules endothéliales subissent une différenciation soit artérielle, soit veineuse en réponse à un ensemble de stimuli permettant l'élaboration d'un plexus vasculaire. Par exemple, l'expression de la protéine transmembranaire Notch favorise la différenciation artérielle, alors que le récepteur nucléaire orphelin COUP réprime la signalisation de Notch et favorise la différenciation veineuse. Le remodelage angiogénique du réseau primitif conduit à la formation d'un système vasculaire fonctionnel (Figure 27).⁹³

Plus tardivement dans le processus, diverses spécificités fonctionnelles peuvent se développer en réponse à certains signaux. Une de ces spécificités est la naissance du réseau de vaisseaux lymphatiques à partir de l'endothélium veineux. Ces dernières années, on a démontré l'implication de la lymphangiogenèse dans la progression tumorale. Il a été prouvé que le système lymphatique est une route privilégiée pour la dissémination métastatique. En effet, les caractéristiques structurales des vaisseaux lymphatiques (absence de membrane basale et jonctions lâches) ainsi que le flux ralenti à l'intérieur de ces vaisseaux facilitent l'échappement des cellules tumorales.^{94,95}

⁹³ V. Caolo et al., *Stem Cells International*, **2012**, 2012, 1-9.

⁹⁴ D. Vittet et J. J. Feige, *Bulletin du Cancer*, **2007**, 94, 881-886.

⁹⁵ Y. He et al., *Biochimica et Biophysica Acta*, **2004**, 1654, 3-12.

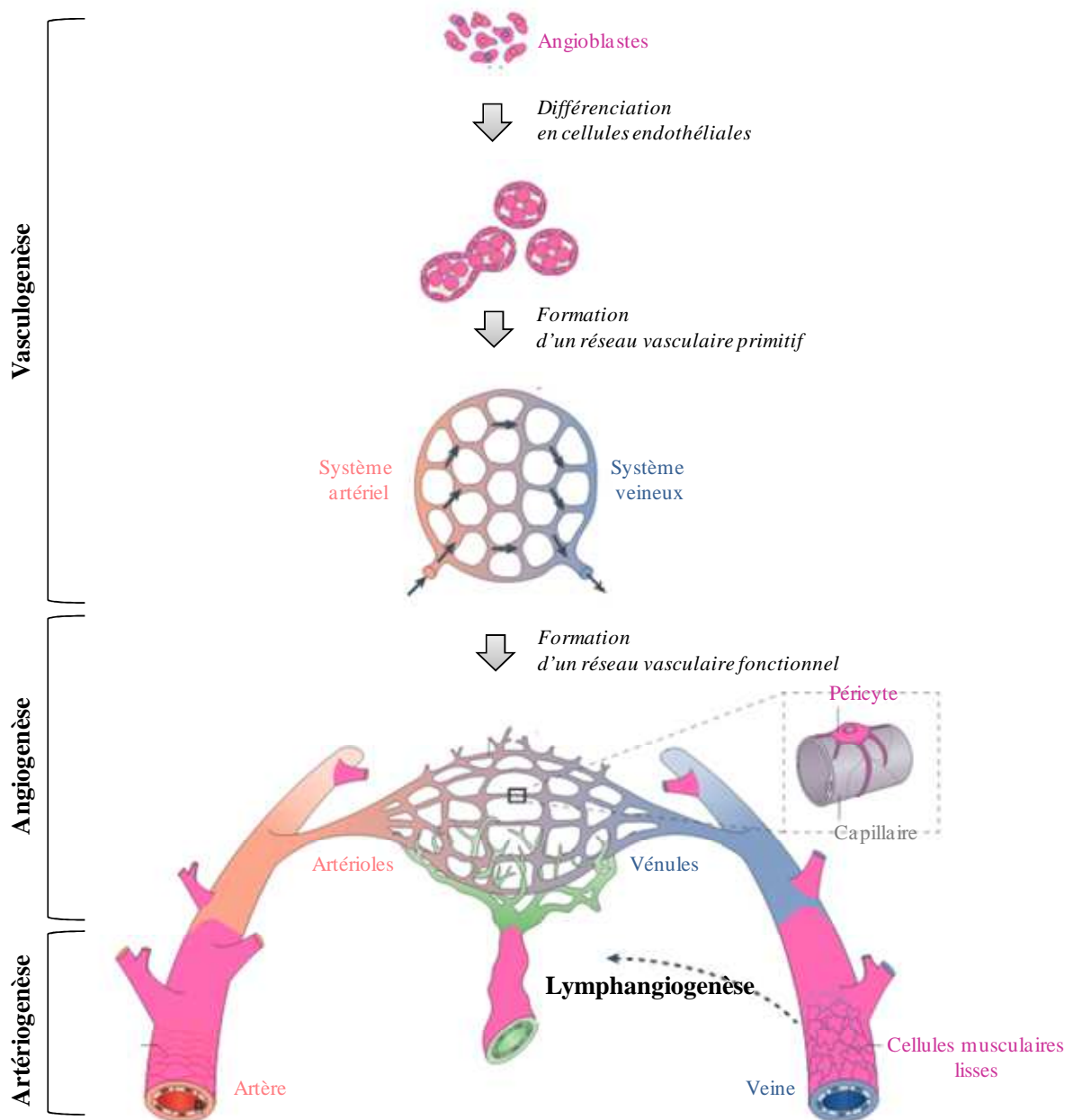


Figure 27 : Développement d'un réseau vasculaire sanguin
Adaptée de Shane P. Herbert et D. Y. R. Stainier⁹⁶

3. Mécanisme de l'angiogenèse

Le phénomène angiogénique se caractérise par la formation de nouveaux vaisseaux sanguins qui se développent à partir d'une structure endothéliale préexistante. Dans un organisme adulte, l'angiogenèse est un événement peu fréquent et intervient dans l'appareil reproducteur de la femme et durant la grossesse alors que l'angiogenèse pathologique survient, quant à elle, en cas de croissance tumorale, de cicatrisation ou encore de psoriasis.

⁹⁶ S. P. Herbert et D. Y. R. Stainier, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **2011**, 12, 551-564.

3.1. L'angiogenèse physiologique

La formation de vaisseaux sanguins par l'angiogenèse est un processus très complexe que l'on peut décomposer en plusieurs étapes (Figure 28).⁹⁷

- **Vasodilatation du vaisseau sanguin primaire.** Au sein des vaisseaux, les cellules endothéliales pavimenteuses forment généralement une monocouche qui tapisse la surface luminale du tube vasculaire. Ce phénotype de repos est maintenu jusqu'à ce que les cellules endothéliales détectent des signaux pro-angiogéniques comme le VEGF et le monoxyde d'azote. En réponse à ces signaux angiogéniques, le vaisseau se dilate ce qui réduit la cohésion entre cellules endothéliales adjacentes et active des protéases de type métalloprotéases MMP-2 et MMP-9 responsables de la dégradation de la membrane basale.⁹⁸

L'angiopoïétine-1, notée ANG-1, est un inhibiteur naturel de la perméabilité vasculaire resserrant les jonctions cellulaires des vaisseaux sanguins. Ce facteur de croissance exerce son action suite à sa fixation sur le récepteur à activité tyrosine kinase TIE-2. L'angiopoïétine-2 (ANG-2) se lie également au récepteur TIE-2 mais sa liaison ne provoque aucune phosphorylation du récepteur, ce qui induit un relâchement des contacts intercellulaires nécessaires à la migration des cellules endothéliales. Dans le processus d'angiogenèse, les vaisseaux sont déstabilisés sous l'action de l'ANG-2.⁹⁹

- **Migration et prolifération des cellules endothéliales.** Suite à la déstabilisation du vaisseau sanguin, les cellules endothéliales migrent vers un site distant, prolifèrent et s'assemblent en tubules. Cette étape est appelée bourgeonnement. Le VEGF, ainsi que ses récepteurs sont les principaux acteurs de cette migration des cellules endothéliales.
- **Stabilisation des vaisseaux.** La dernière étape de maturation permet le recrutement des péricytes et des cellules musculaires lisses *via* le PDGF-B. Lors de cette étape cruciale, il y a également formation d'une nouvelle membrane basale faisant intervenir différents facteurs dont l'ANG-1 et le TGF- β . L'ANG-1 maintient les vaisseaux en stabilisant les jonctions cellulaires des vaisseaux sanguins et le TGF- β est impliqué dans la maturation des vaisseaux.

⁹⁷ A. A. Ucuzian *et al.*, *Journal of Burn Care & Research*, **2010**, 31, 158-175.

⁹⁸ E. I. Deryugina et J. P. Quigley, *Cancer and metastasis reviews*, **2006**, 25, 9-34.

⁹⁹ M. Felcht *et al.*, *Journal of Clinical Investigation*, **2012**, 122, 1991-2005.

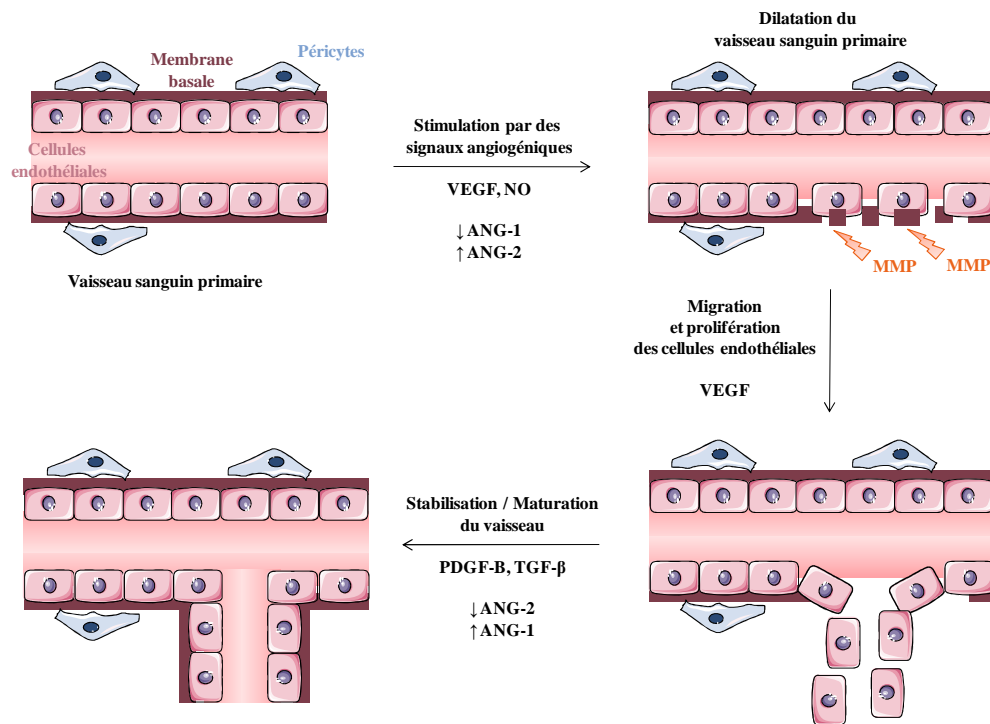


Figure 28 : Schéma de la formation d'un réseau vasculaire lors de l'angiogenèse

3.2. L'angiogenèse pathologique

L'angiogenèse est un processus hautement régulé chez l'être humain adulte, cependant suite à un dysfonctionnement des mécanismes de contrôle, l'angiogenèse peut être impliquée dans le développement de plusieurs pathologies comme le cancer, l'athérosclérose, l'arthrite rhumatoïde ou encore le psoriasis.¹⁰⁰ Ci-après, nous nous intéressons plus précisément à l'angiogenèse dite tumorale.

En 1971, Judah Folkman a proposé la théorie selon laquelle sans réseau vasculaire, une tumeur ne peut pas grossir au-delà d'une taille d'environ 2 mm^3 et ne peut pas métastaser à d'autres organes. Au stade initial, la tumeur est avasculaire et le sang périphérique satisfait sa croissance. Pendant la phase de croissance, les cellules tumorales prolifèrent pour former un amas cellulaire et dès lors que cet amas atteint une taille d'environ 2 mm^3 , les cellules au centre de la tumeur se retrouvent en hypoxie (très faible taux d'oxygène), ce qui engendre une cascade d'événements pro-angiogéniques.¹⁰¹

¹⁰⁰ S.Y. Yoo et S. M. Kwon, *Mediators of Inflammation*, **2013**, 2013, 1-11.

¹⁰¹ F. Hillen et A. W. Griffioen, *Cancer and metastasis reviews*, **2007**, 26, 489-502.

3.2.a. Hypoxie et angiogénèse

Les cellules tumorales d'une tumeur supérieure à 2 mm³ sont exposées à un environnement hypoxique. La tumeur répond à ces changements environnementaux en activant des processus de survie capables de restaurer l'équilibre en oxygène.

Le facteur HIF-1 (*Hypoxia Inducible Factor-1*) induit par l'hypoxie est un complexe protéique qui stimule l'expression de gènes spécifiques en réponse à de faibles concentrations en oxygène. Ce facteur est activé de manière exponentielle en fonction de la diminution en oxygène. Le complexe protéique HIF-1 est constitué d'une sous-unité α régulée par la teneur en oxygène du milieu et une sous-unité constitutive β .¹⁰²

Dans des conditions de **normoxie**, la sous unité α de la protéine HIF-1 est hydroxylée par des hydroxylases au niveau des résidus d'acides aminés 402, 564 et 804. De ce fait, HIF-1 α n'est pas reconnu par la protéine p300-CBP et il est poly-ubiquitinylé grâce à la protéine VHL (*Von Hippel-Lindau*) pour être dégradé par le protéasome (Figure 29).¹⁰³

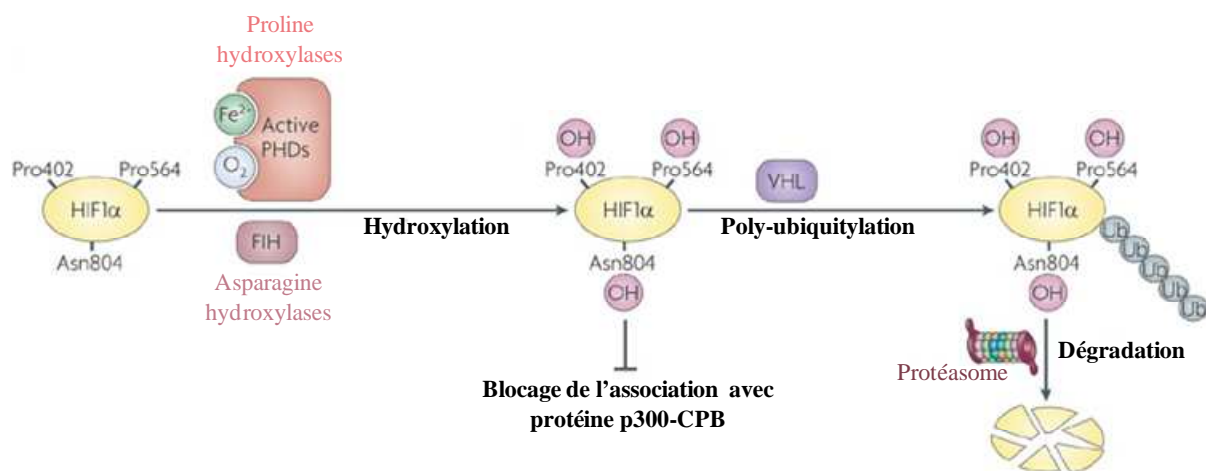


Figure 29 : Régulation du facteur HIF en condition de normoxie
Adaptée de V. Nizet et R. S. Johnson¹⁰⁴

Dans des conditions d'**hypoxie**, la forme non hydroxylée de HIF-1 α s'associe avec la protéine p300-CBP pour migrer vers le noyau et se lier avec la sous-unité HIF-1 β . Le complexe HIF-1 α / HIF-1 β se lie à l'élément de réponse HRE, ce qui conduit à la

¹⁰² Bryan L. Krock et al., *Genes & Cancer*, 2011, 2, 1117-1133.

¹⁰³ Z. K. Otrrock et al., *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 2009, 70, 93-102.

¹⁰⁴ V. Nizet et R. S. Johnson, *Nature Reviews Immunology*, 2009, 9, 609-617.

transcription de gènes pro-angiogéniques comme le VEGF-A, l'ANG-2 ou le PDGF-B (Figure 30).¹⁰⁵

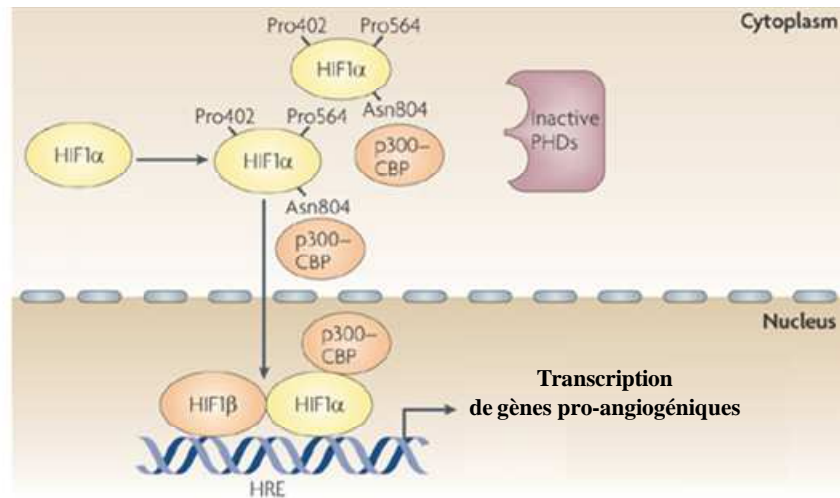


Figure 30 : Régulation du facteur HIF en condition d'hypoxie
Adaptée de V. Nizet et R. S. Johnson

L'adaptation des cellules cancéreuses pour maintenir leur homéostasie dans un milieu hypoxique favorise la croissance tumorale, l'invasion et la néovascularisation avec, pour conséquence principale, l'apparition de métastases. L'hypoxie tumorale est souvent corrélée à une maladie plus agressive et un mauvais pronostic des cancers.¹⁰⁶

3.2.b. Le « switch » angiogénique

Une des étapes les plus importantes du processus d'angiogenèse tumorale est le « switch angiogénique », provoqué par un déséquilibre entre facteurs pro-angiogéniques et facteurs anti-angiogéniques suite à :¹⁰⁷

- des conditions hypoxiques favorisant le maintien du déséquilibre en faveur des facteurs pro-angiogéniques et jouant un rôle majeur dans l'induction de divers facteurs pro-angiogéniques,
- l'activation de certains proto-oncogènes comme Ras,
- la neutralisation de certains gènes suppresseurs de tumeurs comme l'anti-oncogène p53 muté dans près de 50% des cancers, qui régulent positivement les facteurs anti-angiogéniques et négativement les facteurs pro-angiogéniques.

¹⁰⁵ P. M. Hoff et K. Machado, *Cancer Treatment Reviews*, **2012**, 38, 825-833.

¹⁰⁶ J. M. Simon, *Bulletin du Cancer*, **2007**, 94, S160-165.

¹⁰⁷ V. Baeriswyl et G. Christofori, *Seminars in Cancer Biology*, **2009**, 19, 329-337.

L'angiogenèse est étroitement contrôlée par l'équilibre entre inhibiteurs et activateurs angiogéniques (Figure 31). Parmi les inhibiteurs endogènes de l'angiogenèse découverts dans les années 90, on retrouve la thrombospondine-1 (TSP-1), l'angiostatine et l'endostatine qui inhibent la prolifération et la migration des cellules endothéliales.¹⁰⁸ Les facteurs pro-angiogéniques capables de stimuler la prolifération, la migration et l'organisation des cellules endothéliales sont nombreux et principalement représentés par le VEGF.

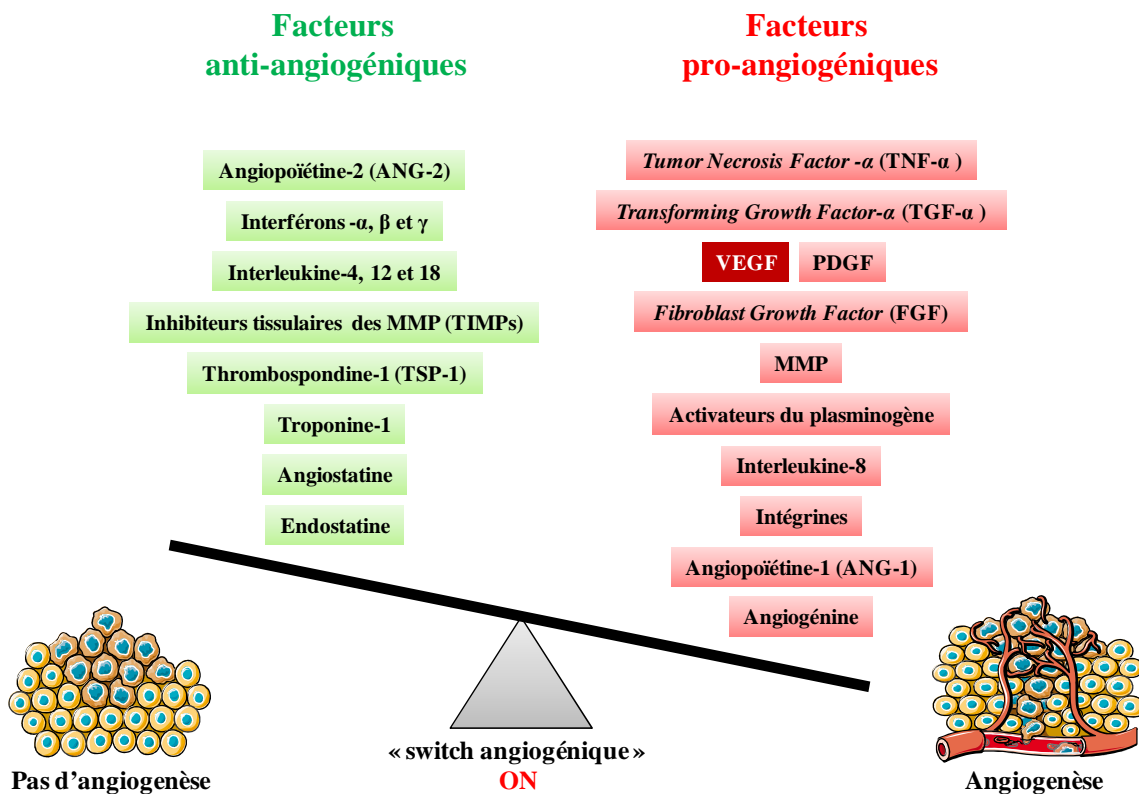


Figure 31 : La « balance » angiogénique

Le « switch angiogénique » est une étape indispensable à la progression tumorale favorisant la croissance tumorale et la formation de métastases. L'inhibition de l'angiogenèse, et plus particulièrement l'inhibition de facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF ou le PDGF est donc une stratégie de choix dans le traitement des cancers.

¹⁰⁸ D. Ribatti, *Leukemia Research*, 2009, 33, 638-644.

LES THÉRAPIES CIBLÉES

- LES ANTICORPS MONOCLONAUX
- LES INHIBITEURS DE TYROSINE KINASE

IV. LES THÉRAPIES CIBLÉES

Les progrès de la recherche ont permis de développer de nouveaux médicaments contre les cancers, appelés thérapies ciblées ou traitements ciblés. Ces agents médicamenteux freinent la croissance de la tumeur en s'attaquant aux mécanismes qui lui permettent de se développer. Ainsi, ils agissent :

- soit sur les mécanismes qui stimulent la prolifération des cellules,
- soit sur les agents tumoraux nécessaires à la fabrication de nouveaux vaisseaux sanguins.

Différentes stratégies sont aujourd'hui étudiées et utilisées en thérapie ciblée. Celles-ci peuvent être classées en fonction de leur site d'action : les inhibiteurs des récepteurs à activité kinase agissent au niveau intracellulaire alors que les anticorps monoclonaux agissent au niveau du domaine extracellulaire.

1. Les anticorps monoclonaux

1.1. Structure des Anticorps monoclonaux

Les anticorps monoclonaux (Acmo) sont des glycoprotéines reconnaissant un type d'épitope sur une protéine donnée. Ils sont tous identiques et produits par un seul clone de plasmocyte. Il y a eu un développement progressif des Acmo à partir des Acmo murins, ainsi on distingue les Acmo chimériques (*-ximab*), les Acmo humanisés (*-zumab*) et les Acmo humains (*-mumab*) (Figure 32). De manière générale, les Acmo sont constitués par 2 chaînes lourdes associées à deux chaînes dites légères. Contrairement au fragment Fc relativement constant, le fragment Fab (*antigen-binding*) est constitué de région variable et permet la reconnaissance avec la protéine cible (ou épitope).¹⁰⁹

¹⁰⁹ T. T. Hansel *et al.*, *Nature Reviews Drug Discovery*, **2010**, 9, 325-338

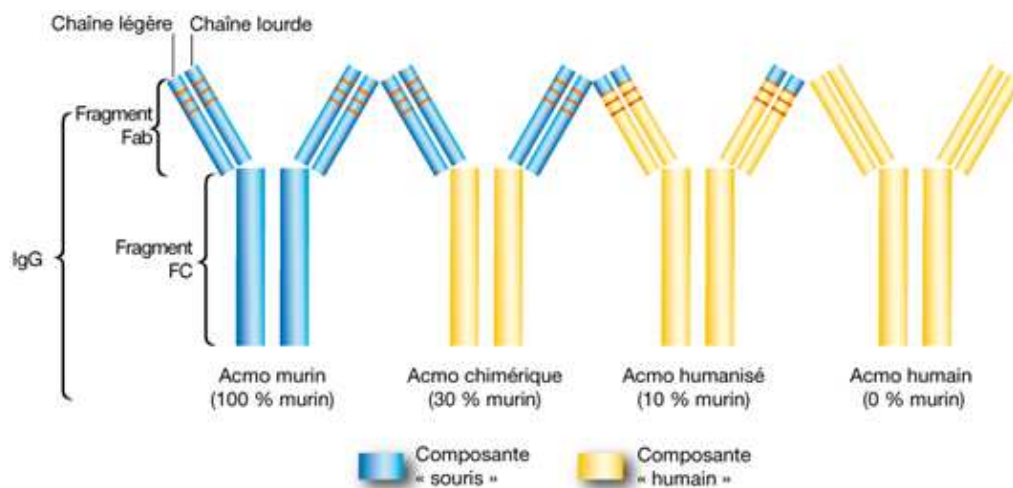


Figure 32 : Structures des différents types d'Acmo
Adaptée de G. Milano¹¹⁰

1.2. Anticorps monoclonaux et oncologie

Depuis l'approbation du rituximab (Rituxan) en 1997, les Acmo sont devenus une des composantes principales des schémas thérapeutiques en oncologie. Actuellement, il y a 14 Acmo approuvés par la FDA en oncologie (Tableau 2).

	DCI	Nom	Cible	Indication principale
1997	Rituximab	<i>Rituxan</i>	CD20	Lymphome non-Hodgkinien
1998	Trastuzumab	<i>Herceptin</i>	HER-2	Cancer du sein
2001	Alemtuzumab	<i>Campah</i>	CD52	Leucémie
2002	Ibritumomab	<i>Zevalin</i>	CD20	Lymphome non-Hodgkinien
2003	Tositumomab	<i>Bexxar</i>	CD20	Lymphome non-Hodgkinien
2004	Cetuximab	<i>Erbitux</i>	EGFR	Carcinome épidermique
2004	Bevacizumab	<i>Avastin</i>	VEGF	Cancer colorectal
2006	Panitumumab	<i>Vectibix</i>	EGFR	Cancer colorectal
2009	Ofatumumab	<i>Arzerra</i>	CD20	Leucémie lymphocytaire chronique
2010	Denosumab	<i>Xgeva</i>	RANKL	Métastases osseuses
2011	Ipilimumab	<i>Yervoy</i>	CTLA-4	Mélanome métastatique
2011	Brentuximab vedotin	<i>Adcetris</i>	CD30	Lymphome Hodgkinien
2012	Pertuzumab	<i>Perjeta</i>	HER-2	Cancer du sein
2013	Trastuzumab emtansine	<i>Kadcyla</i>	HER-2	Cancer du sein

Tableau 2 : Acmo approuvés par la FDA en oncologie depuis 1997

¹¹⁰ G. Milano, *Le concept de cible en cancérologie*, 2008.

Parmi ces Acmo commercialisés, dix sont administrés comme Acmo « nus », deux sont « radioimmunoconjugués » (ibritumomab et tositumomab), et deux sont des « anticorps-médicament » ou ADC (*Antibody-Drug Conjugates*) (brentuximab vedotin et trastuzumab emtansine). Ces produits sont utilisés pour une large variété de cancers (lymphomes, leucémies, cancers du sein, cancers colorectaux...).

1.3. Mécanismes d'action des anticorps monoclonaux

Les Acmo peuvent agir selon différents mécanismes repris dans la Figure 33.^{111,112,113}

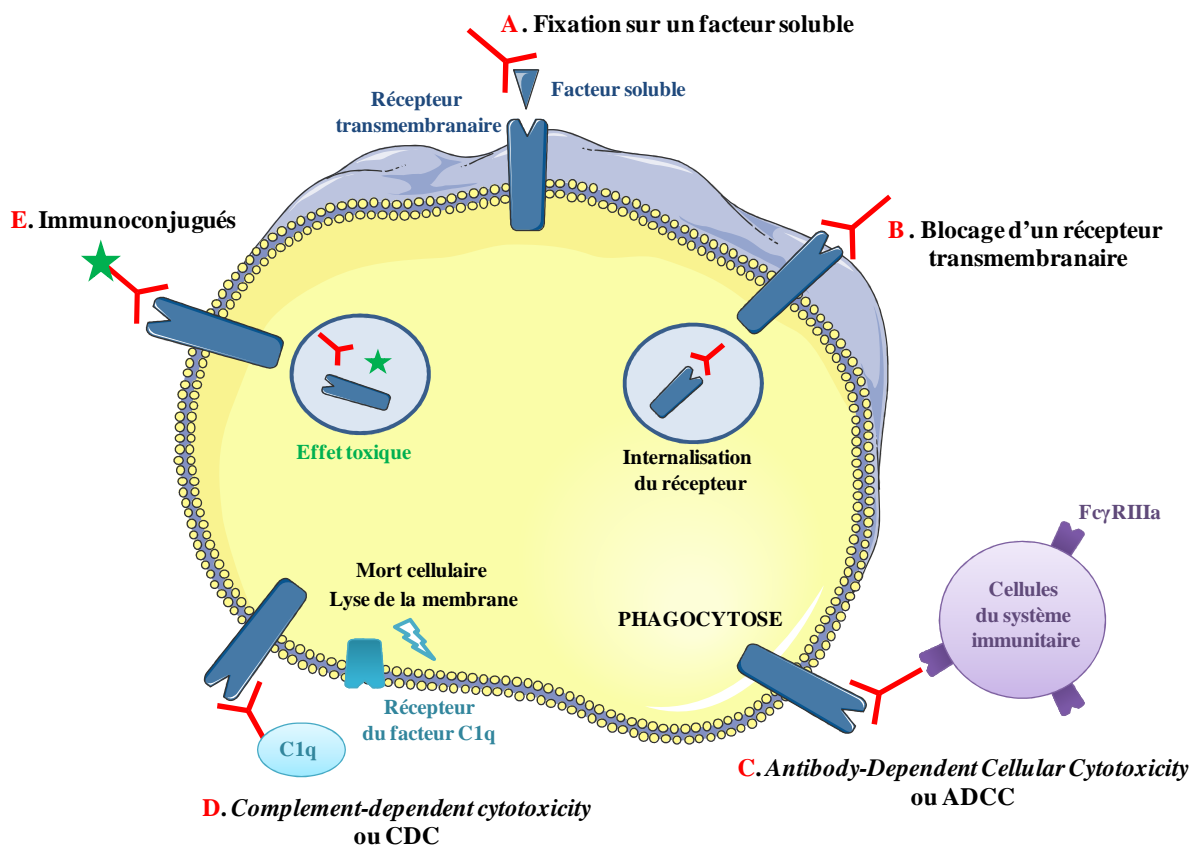


Figure 33 : Principaux mécanismes d'action des Acmo

▪ Blocage d'un facteur soluble ou d'un récepteur transmembranaire par l'Acmo

Les Acmo peuvent inhiber les voies de signalisation cellulaire par neutralisation du facteur de signalisation soluble (comme le VEGF) ou par liaison et blocage de récepteurs transmembranaires (comme le VEGFR ou l'EGFR). Dans ce dernier cas, le complexe

¹¹¹ P. M. Glassman et J. P. Balthasar, *Cancer Biology & Medicine*, **2014**, 11, 20-33.

¹¹² J. Golay et M. Introna, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **2012**, 526, 146-153.

¹¹³ L. M. Weine *et al.*, *Nature Reviews Immunology*, **2010**, 10, 317-327.

Acmo/récepteur est internalisé, ce qui diminue l'expression du récepteur à la surface de la cellule.

- *Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity ou ADCC*

Des études ont démontré la capacité des monocytes à tuer des cellules tumorales de façon accrue en présence d'anticorps. Ce phénomène ADCC (pour *Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity*) est médié par l'interaction entre la région Fc d'un anticorps et les récepteurs FcγRIIIa présents à la surface de cellules du système immunitaire. Plus précisément, l'Acmo se lie à sa cible cellulaire par l'intermédiaire de son fragment Fab, puis il recrute des leucocytes exprimant le récepteur FcγRIIIa *via* son fragment Fc, cette interaction multiple conduit à la mort cellulaire.¹¹⁴

- *Complement-Dependent Cytotoxicity ou CDC*

Un mécanisme semblable est celui représenté sur la Figure 33D et appelé *Complement-dependent cytotoxicity*. Après liaison de l'Acmo sur sa cible, le fragment Fc peut se lier au facteur du complément C1q soluble, qui à son tour se fixe sur son récepteur. Les voies de signalisation alors activées conduisent à la mort cellulaire par lyse de la membrane.¹⁰⁸

- *Immunoconjugués*

Le dernier mécanisme d'action des Acmo repose sur l'utilisation de la spécificité de l'Acmo pour délivrer une substance toxique au sein des cellules tumorales. Dans cette catégorie récente, on retrouve : les ADC, les immunotoxines et les radioimmunoconjugués. Le premier exemple d'ADC est le brentuximab vedotin commercialisé depuis 2011. Cet anticorps conjugué est composé d'un anticorps monoclonal anti-CD30 lié de façon covalente à la monométhylauristatine E (MMAE), qui est un agent antimicrotubules. Les immunotoxines utilisent de puissantes toxines, comme la ricine pour exercer leur effet anti-tumoral.¹¹⁵ Actuellement, il existe deux immunotoxines anti-CD22 en développement clinique.¹¹⁶ Enfin les radioimmunoconjugués sont utilisés comme agents de ciblage pour

¹¹⁴ S. E. Strome et al., *Oncologist*, **2007**, 12, 1084-1095.

¹¹⁵ Chen X et al., *OncoTargets and Therapy*, **2013**, 7, 45-56.

¹¹⁶ A. Antignani et D. Fitzgerald, *Toxins*, **2013**, 5, 1486-1502.

délivrer sélectivement des radionucléides dans les cellules tumorales. Les deux radionucléides utilisés aujourd'hui en clinique emploient l' ^{90}Y et l' ^{131}I .¹¹⁷

1.4. Effets secondaires des anticorps monoclonaux

Ce type d'immunothérapie est en général bien toléré et la principale toxicité repose sur des réactions allergiques d'intensité variable, surtout pour les anticorps d'origine murine. Les réactions allergiques peuvent être prévenues par une prémédication et par une perfusion prudente de l'anticorps. Il existe également une toxicité spécifique à chaque anticorps qui dépend de la cible du produit. Les anticorps dirigés contre l'EGFR sont connus pour provoquer une toxicité cutanée qui peut aller d'une simple sécheresse cutanée à des éruptions pustuleuses prédominant sur le visage et le tronc. L'Herceptin, ciblant HER-2 est quant à lui connu pour sa toxicité cardiaque.

Le développement des Acmo dans le traitement des cancers s'est fait conjointement à celui d'autres thérapies ciblées : les inhibiteurs de tyrosine kinase (ITKs).

2. Les inhibiteurs de tyrosine kinase

Les ITKs sont des petites molécules de faible poids moléculaire appartenant à diverses classes chimiques. Ces composés diffusent à travers la membrane cellulaire pour agir au niveau de la partie intracellulaire des RTKs (ou sur les kinases cytoplasmiques). Ils sont ainsi capables d'inhiber spécifiquement l'activité enzymatique tyrosine kinase des RTK.¹¹⁸

2.1. Classification et mécanismes des inhibiteurs de tyrosine kinase

Les ITKs peuvent être classés en fonction de leur sélectivité (agents monofonctionnels ou agents multifonctionnels) et de la nature de leur liaison avec le site catalytique (inhibiteurs réversibles ou irréversibles). Dernièrement, les ITKs ont été classifiés selon la région de la kinase avec laquelle ils interagissent en inhibiteurs de type I, II, III ou IV.¹¹⁹

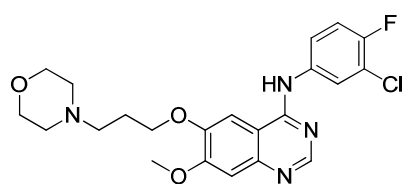
¹¹⁷ C.-Y. Huang *et al.*, *Cancer Treatment Reviews*, **2012**, 38, 854-860.

¹¹⁸ S. Boutayeb *et al.*, *Pathologie Biologie*, **2012**, 60, 229-233.

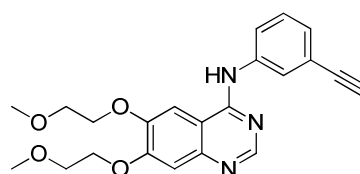
¹¹⁹ J. Blanc *et al.*, *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, **2013**, 13, 1-17.

2.1.a. Les inhibiteurs de type I

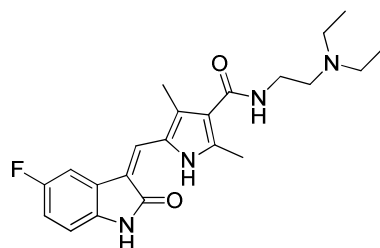
Ces molécules sont des « ATP-mimétiques » ou « ATP-compétitifs » mimant le cycle purine de l'adénine de l'ATP et agissant dans le site de fixation de l'ATP dans la région charnière de la kinase. Une dizaine d'inhibiteurs de type I sont actuellement approuvés par la FDA dans le traitement du cancer comme le géfitinib et l'erlotinib, qui sont toutes les deux des agents monofonctionnels ciblant l'EGFR. Parmi les agents multifonctionnels de cette classe d'ITKs, on peut citer le sunitinib (ITK VEGFR et PDGFR) et le pazopanib (ITK VEGFR, PDGFR et c-Kit).



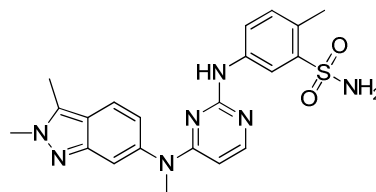
Géfitinib (Iressa®)
EGFR



Erlotinib (Tarceva®)
EGFR



Sunitinib (Sutent®)
VEGFR et PDGFR



Pazopanib (Votrient®)
VEGFR, PDGFR et c-Kit

Ces molécules se lient au site de fixation de l'ATP de la kinase *via* une à trois liaisons hydrogène habituellement formées entre l'ATP et le site actif. La structure cristalline de l'erlotinib dans le site actif de l'EGFR permet de mettre en évidence trois liaisons hydrogène (Figure 34). La quinazoline de l'erlotinib se lie au niveau du domaine Nt du récepteur dans la poche adénine. L'atome d'azote N1 forme une liaison hydrogène stable avec le NH de la Met₇₆₉ (normalement lié à l'atome N1 du motif adénine). L'atome d'azote (N3) de l'hétérocycle établit une liaison hydrogène avec l'hydroxyle de la chaîne latérale de la Thr₇₆₆ via une molécule d'eau. Une interaction entre l'hétérocycle et le résidu Gln₇₆₇ a également été démontrée ainsi que l'insertion du motif aniline dans une poche hydrophobe.

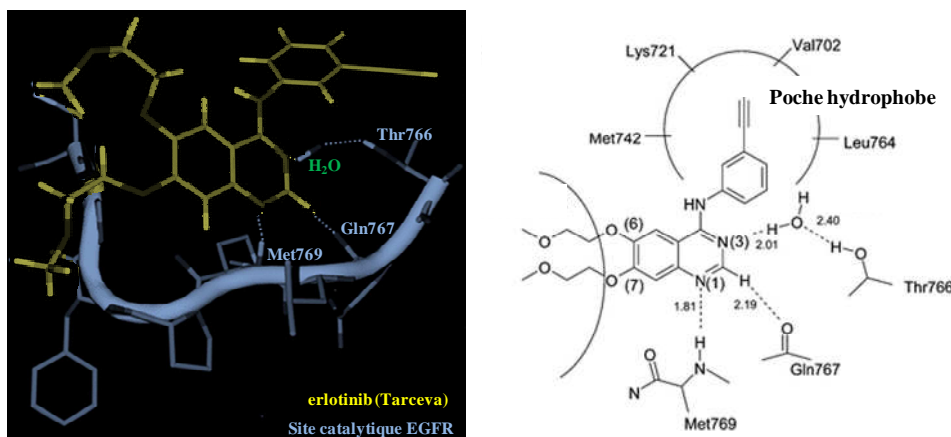


Figure 34 : Crystallisation de l'erlotinib (Tarceva) dans le site actif de l'EGFR
Adaptée de G. R. Desiraju¹²⁰

2.1.b. Les inhibiteurs de type II

Ces inhibiteurs ne sont pas des inhibiteurs compétitifs de l'ATP. Ils interagissent avec la région adénine du site catalytique, tout comme les inhibiteurs de type I, mais également avec la triade DFG (ou site allostérique) du domaine tyrosine kinase.

L'orientation de la séquence DFG joue un rôle crucial dans l'activation de certains RTKs. De manière physiologique, il existe une balance entre l'état actif « DFG-in » et l'état inactif « DFG-out » dans lequel le résidu Phe de la séquence DFG occupe la poche à ATP (Figure 35). Les ITKs de type II se fixent dans la conformation « DFG-out » et ils la stabilisent, diminuant ainsi l'activité enzymatique du récepteur.

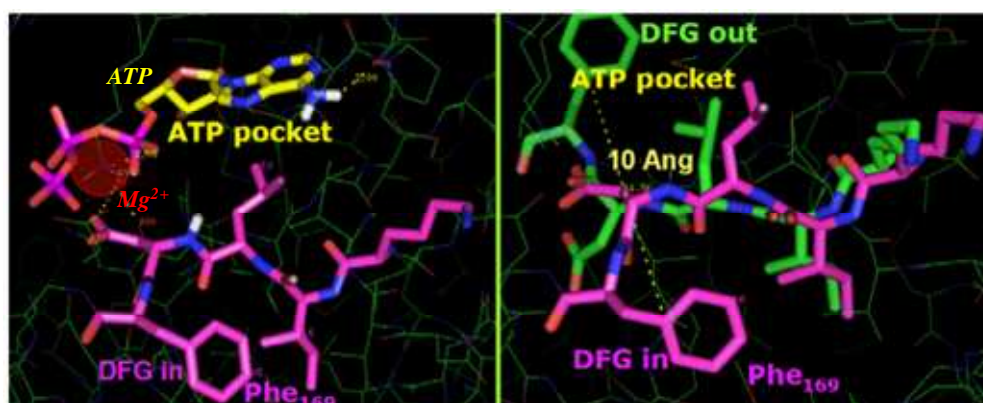


Figure 35 : Configuration DFG-in et DFG-out
en magenta : configuration « DFG-in » / en vert : configuration « DFG-out »
Adaptée de Justin Dietrich et al.¹²¹

¹²⁰ G. R. Desiraju, *Chemical communications*, **2005**, 2995-3001.

¹²¹ J.Dietrich et al., *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2010**, 18, 5738-5748.

Les inhibiteurs de type II, comme le sorafénib (ITK VEGFR et PDGFR) et l'imatinib (ITK c-Kit et Bcr-Abl), présentent plusieurs caractéristiques communes qui permettent quatre interactions clés avec leur cible (Figure 36) : ^{115,122}

- un cycle aromatique azoté capable d'interagir avec la région charnière *via* une ou plusieurs liaisons hydrogène (en rouge)
- un motif aromatique se positionnant dans la région adénine du site ATP
- un linker de type amide ou urée permettant des liaisons hydrogène donneur-accepteur avec la séquence DFG et le site allostérique
- un groupement hydrophobe qui interagit également avec le site allostérique.

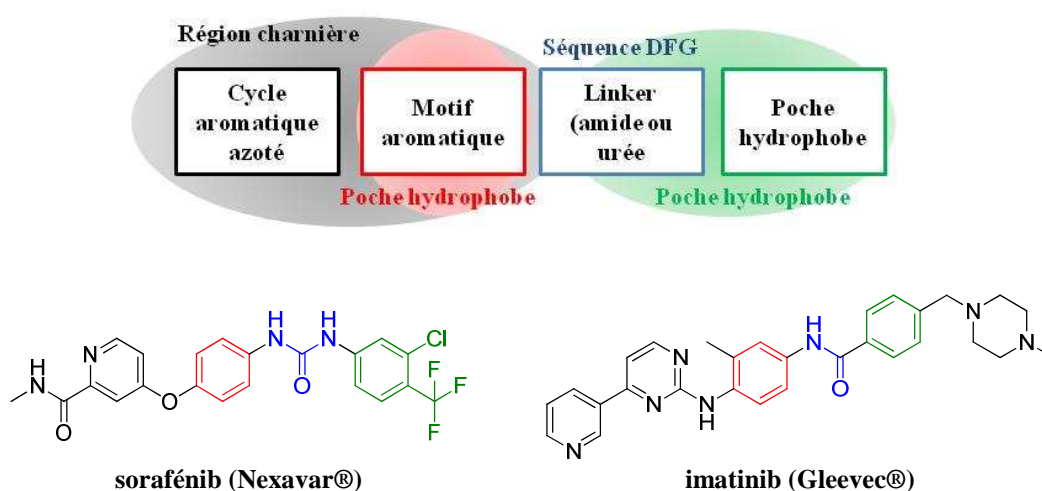


Figure 36 : Pharmacophore des ITKs de type II

Les inhibiteurs de type II présentent un degré de sélectivité plus élevé que les inhibiteurs de type I. En effet, le site allostérique créé par la configuration DFG-out de la kinase est beaucoup moins conservé que le site de l'ATP, ce qui engendre des interactions plus spécifiques.

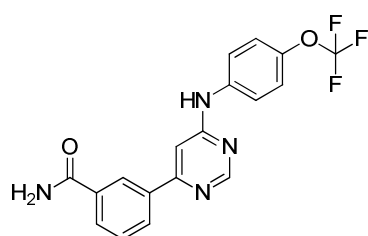
2.1.c. Les inhibiteurs de type III et IV

Les ITKs de type III et de type IV ne se lient pas dans le site catalytique de l'ATP mais au niveau de sites allostériques. Ces deux classes de composés sont en cours de développement.

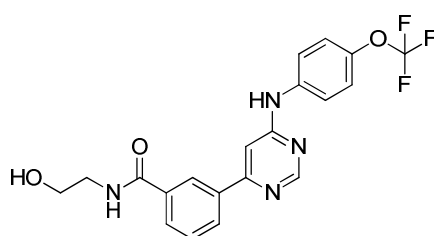
¹²² Y. Liu et N. S. Gray, *Nature Chemical Biology*, **2006**, 2, 358-364.

Les inhibiteurs de type III se lient au niveau des régions qui sont impliquées dans la régulation l'activité enzymatique à l'extérieur du domaine catalytique de la kinase. Les premières molécules actives de cette catégorie appartiennent à la classe des pyrimidines disubstituées en position 4 et 6. Parmi elles, les composés GNF-2 et GNF-5 inhibent sélectivement la protéine Bcr-Abl. Des études de cristallographie et de mutagenèse dirigée ont démontré que ces molécules se fixent à proximité de l'extrémité C-terminale du domaine kinase et facilitent la stabilisation d'une forme inactive de la kinase.¹²³

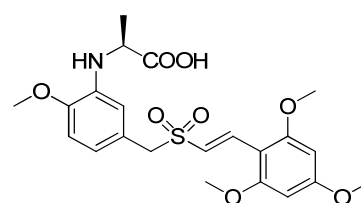
Les inhibiteurs de type IV sont de petites molécules qui se lient de manière réversible en dehors de la poche ATP, dans le site de liaison du substrat. Ce domaine de liaison confère une haute spécificité à ces composés. L'ON012380 est un ITK de type IV ciblant Bcr-Abl.¹²⁴



GNF-2



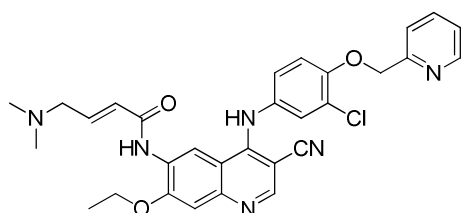
GNF-5



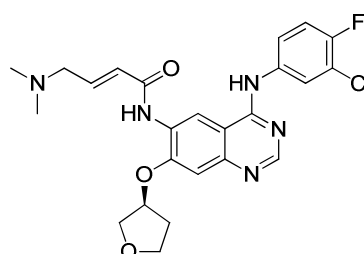
ON012380

2.1.d. Les inhibiteurs covalents ou inhibiteurs irréversibles

Ces inhibiteurs de kinases se lient de façon covalente dans le site de l'ATP. Cette inhibition, dite « suicide », a lieu entre un résidu de cystéine du site actif et une fonction chimique présente dans la structure de l'inhibiteur, comme un accepteur de Michael. Parmi ces inhibiteurs, le nératinib et l'afatinib présentent un noyau hétérocyclique azoté (quinoléine et quinazoline) et un motif 4-diméthylaminocrotonamide en position 7 jouant le rôle d'accepteur de Michael.



Nératinib



Afatinib (Giotrif®)

¹²³ J. Zhang *et al.*, *Nature*, **2010**, 463, 501-506.

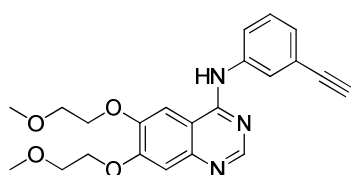
¹²⁴ K. Gumireddy *et al.*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **2005**, 102, 1992-1997.

2.2. Les inhibiteurs de tyrosine kinase utilisés en oncologie

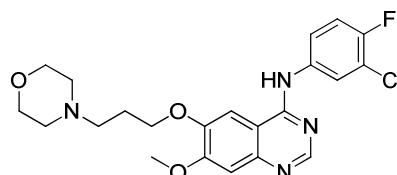
Les indications des ITKs sont très variées et évoluent très rapidement. Plus d'une cinquantaine de composés sont actuellement en phase d'essai clinique. Contrairement aux Acmo, ces composés sont administrés par voie orale, ce qui représente un avantage majeur.

2.2.a. Les inhibiteurs de l'EGFR

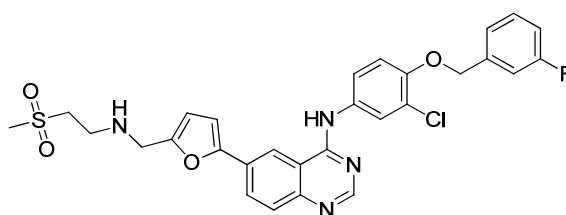
Plusieurs inhibiteurs sont actuellement utilisés en clinique en tant qu'inhibiteurs de l'EGFR : l'erlotinib, le gefitinib et le lapatinib.^{125,126} Toutes ces molécules présentent un motif 4-anilinoquinazolinique substitué uniquement en position 6 pour le lapatinib, ou en position 6 et 7 par des chaînes éther symétriques (erlotinib) ou dissymétriques (géfitinib).



Erlotinib (Tarceva®)



Géfitinib (Iressa®)



Lapatinib (Tyverb®)

- Erlotinib (Tarceva®)

Le Tarceva®, a été approuvé pour la première fois par la FDA en 2004 dans le traitement du cancer du pancréas métastatique en association à la gemcitabine (antineoplasique). En 2005, le Tarceva® a été indiqué dans le traitement des formes localement avancées ou métastatiques du cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC) après échec d'au moins une ligne de chimiothérapie.¹²⁷ Depuis 2010, il est également indiqué en monothérapie dans le traitement de maintenance du CBNPC chez les patients avec une maladie stable après traitement par chimiothérapie standard à base de sels de platine. Plus

¹²⁵ C. Yewale *et al.*, *Biomaterials.*, **2013**, 34, 8690-8707.

¹²⁶ A. Mahipal *et al.*, *Cancer Control*, **2014**, 21, 74-79.

¹²⁷ M. H. Cohen *et al.*, *Oncologist*, **2005**, 10, 461-466.

récemment, le Tarceva® a été approuvé en première ligne de traitement du CBNPC chez les patients présentant des mutations activatrices de l'EGFR.

- Géfitinib (Iressa®)

Comme l'erlotinib, le gefitinib (Iressa®) est indiqué depuis 2005 dans le traitement du CBNPC localement avancé ou métastatique avec mutations activatrices de l'EGFR chez des patients ayant déjà subi deux chimiothérapies sans succès.¹²⁸

- Lapatinib (Tyverb®)

Le lapatinib est un ITK qui cible à la fois les récepteurs EGFR mais aussi les récepteurs HER-2. En mars 2007, la FDA a approuvé le lapatinib pour le traitement du cancer du sein avancé ou métastatique avec surexpression d'HER-2 en combinaison avec la capécitabine chez des patients ayant reçu un traitement antérieur incluant une anthracycline, un taxane et le trastuzumab (Herceptin®). Depuis 2010, le Tyverb® est administré en association avec le létrozole (Femara®) chez les femmes ménopausées atteintes d'un cancer du sein métastatique surexprimant HER-2.¹²⁹

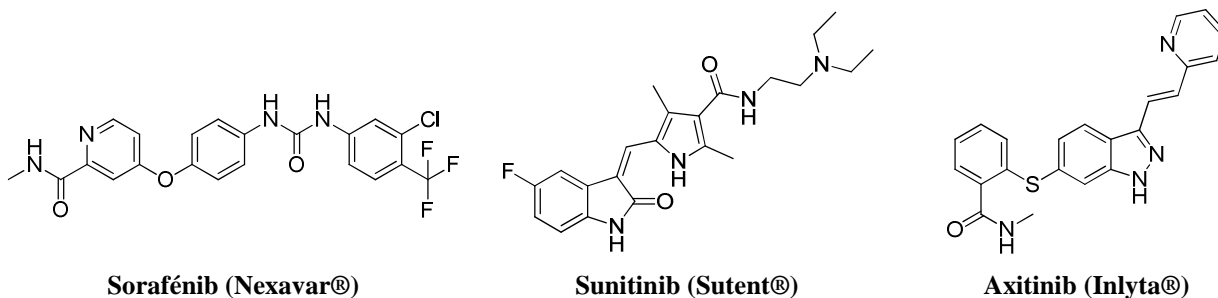
2.2.b. Les inhibiteurs du VEGFR

Contrairement aux ITKs de l'EGFR, les ITKs du VEGFR sont très différents d'un point de vue structural et sont pour la plupart des agents multifonctionnels. Ces agents ciblent en effet un certain nombre de kinases (VEGFR, PDGFR et c-Kit) car le domaine kinase est extrêmement bien conservé au sein des RTKs. Les voies activées par le VEGFR et le PDGFR jouent un rôle important dans l'angiogenèse. Pour inhiber ce processus, un inhibiteur multikinase VEGFR/PDGFR sera donc plus efficace qu'un inhibiteur qui ne cible qu'un seul des deux récepteurs.¹³⁰ Parmi ces anti-angiogéniques, le sorafénib, le sunitinib et l'axitinib sont utilisés en clinique dans plusieurs cancers.

¹²⁸ W. Pao *et al.*, *Seminars in Cancer Biology*, **2004**, 14, 33-40.

¹²⁹ P. J. Medina et S. Goodin, *Clinical Therapeutics*, **2008**, 30, 1426-1447.

¹³⁰ K. J. Gotink et H. M. W. Verheul, *Angiogenesis*, **2010**, 13, 1-14.



- Sorafénib (Nexavar®)

Le Nexavar® est un inhibiteur du VEGFR (1, 2 et 3), du PDGFR, de c-Kit et de Raf.¹³¹ Il est indiqué dans le traitement des patients atteints de carcinome hépatocellulaire ou de carcinome rénal avancé lorsqu'un premier traitement anti-cancéreux a échoué.

- Sunitinib (Sutent®)

Cette molécule inhibe les trois membres de la famille du VEGFR, le PDGFR et c-Kit.¹³² Le Sutent® est indiqué dans le traitement des tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST) malignes non résecables et/ou métastatiques chez l'adulte, après échec d'un traitement par imatinib. Il est également administré dans le traitement des cancers du rein avancés et/ou métastatiques et pour lutter contre les tumeurs neuroendocrines du pancréas.

- Axitinib (Inlyta®)

L'axitinib est un inhibiteur du VEGFR (1, 2 et 3), du PDGFR, de c-Kit. C est le dernier agent anti-angiogénique ayant reçu une AMM. Il est commercialisé depuis 2012 pour traiter les patients adultes atteints d'un cancer du rein avancé après échec d'un traitement antérieur par sunitinib.¹³³

2.2.c. Les inhibiteurs mixtes EGFR/VEGFR

Plusieurs inhibiteurs mixtes EGFR/VEGFR-2, comme le composé BMS-690514 (phase I-II), le composé XL-647 (phase II) et le vandétanib, sont à l'étude dans plusieurs types de cancers.^{134, 135} Le vandétanib est actuellement commercialisé sous le nom de

¹³¹ S. M. Wilhelm et al., *Molecular Cancer Therapeutics*, **2008**, 7, 3129-3140.

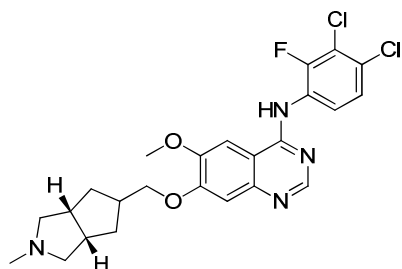
¹³² J. G. Christensen, *Annals of Oncology*, **2007**, 18, 3-10.

¹³³ D. D. Hu-Lowe et al., *Clinical Cancer Research*, **2008**, 14, 7272-7283.

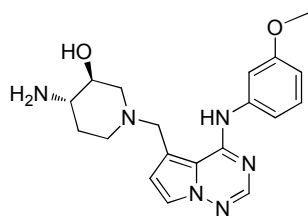
¹³⁴ T. W. Wong et al., *Clinical Cancer Research*, **2011**, 17, 4031-4041.

¹³⁵ M. C. Pietanza et al., *Journal of Thoracic Oncology*, **2012**, 7, 219-226.

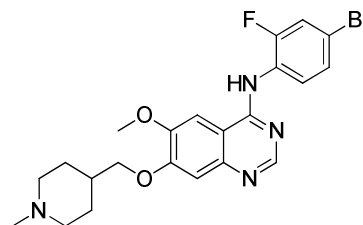
Caprelsa® dans le traitement du cancer médullaire de la thyroïde agressive chez les patients avec une maladie localement avancée non opérable ou métastatique. Il présente une structure commune aux inhibiteurs de l'EGFR : un motif quinazolinique substitué en position 6 et 7 par des chaînes éthers et par une aniline halogéné en position 4.



XL 647



BMS-690514



Vandétanib (Caprelsa®)

2.3. Effets secondaires des inhibiteurs de tyrosine kinase

Les effets secondaires des ITKs sont la plupart du temps modérés, mais ils peuvent parfois être sévères. La toxicité cutanée est fréquente avec les inhibiteurs d'EGFR.¹³⁶ Il existe également une toxicité digestive (mucite et diarrhées) ainsi qu'une toxicité hématologique avec la plupart des inhibiteurs qui nécessite le suivi de la numération de la formule sanguine.

Les inhibiteurs de l'angiogénèse provoquent une toxicité cardiovasculaire entraînant une hypertension artérielle parfois très sévère. Ces agents sont donc utilisés avec les plus grandes précautions, et sont contre-indiqués chez les patients présentant des facteurs de risques cardiovasculaires. L'inhibition de l'angiogénèse par des ITKs ou par des Acmo engendre des problèmes hémorragiques. Le traitement est donc arrêté 4 à 6 semaines avant un acte chirurgical important.

2.4. Résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase

La plupart des ITKs ne sont utilisés en clinique que depuis environ cinq ans mais très vite des résistances à ces agents sont apparues.¹³⁷ Plusieurs mécanismes peuvent être responsables de ces résistances comme des mutations ponctuelles dans le domaine kinase. Plusieurs mutations ont en effet été identifiées chez des patients qui ont été traités avec la plupart des ITKs approuvés. Par exemple, les patients traités pour un adénocarcinome du

¹³⁶ K. Chanprapaph *et al.*, *Dermatology Research and Practice*, **2014**, 2014, 1-8.

¹³⁷ M. Rebutti et C. Michiels, *Biochemical Pharmacology*, **2012**, 85, 1219-1226.

poumon avec des inhibiteurs de l'EGFR comme le gefitinib ou l'erlotinib, ont acquis une résistance à ces agents due à la mutation T790M de l'EGFR.¹³⁸

La surexpression du RTK constitue une autre cause de résistance. En effet, du fait de cette surexpression, la totalité de l'activité enzymatique ne peut pas être inhibée par l'ITK. De la même manière, l'augmentation de la sécrétion du facteur de croissance grâce à des mécanismes autocrines ou paracrines peut conférer une résistance.¹³⁹

En plus de ces mécanismes, la signalisation du RTK inhibé peut être compensée par l'activation d'autres récepteurs pour rétablir une signalisation intracellulaire « normale ». Aussi des mutations oncogéniques des protéines en aval du RTK peuvent conférer des résistances par activation continue des voies de signalisation intracellulaires. Parmi ces mutations oncogéniques, on peut citer les mutations de la phosphatase PTEN dans le cancer du poumon et les mutations activatrices de Raf.

A la différence de la résistance acquise décrite ci-dessus, la pharmacorésistance peut être causée par une variété de mécanismes empêchant ou réduisant la rencontre de l'inhibiteur avec sa cible. La concentration intracellulaire de l'ITK est dépendante de l'expression des protéines de transport qui assurent l'efflux de l'ITK de la cellule tumorale. Des études ont montré que la surexpression du gène de la multirésistance aux médicaments (MDR1) codant pour la glycoprotéine P (Pgp ou ABCB1) confère une résistance aux ITKs. Cependant ce dernier mécanisme n'est pas vrai pour tous les ITKs puisque des études récentes ont montré que certains d'entre eux inhibent ces pompes à efflux.^{140,141}

3. Thérapies ciblées et traitement individualisé

La médecine personnalisée est une des voies les plus prometteuses en cancérologie. Elle consiste à traiter chaque patient de façon individualisée en fonction des spécificités génétiques et biologiques de sa tumeur mais également en tenant compte de l'environnement du patient et de son mode de vie. Le but de cette médecine personnalisée est d'améliorer la

¹³⁸ G. Giaccone et Y. Wang, *Cancer Treatment Reviews*, **2011**, 37, 456-464.

¹³⁹ A. J. Lamontanara *et al.*, *Biochimica et Biophysica Acta*, **2013**, 1834, 1449-1459.

¹⁴⁰ A. K. Tiwari *et al.*, *Biochemical Pharmacology*, **2009**, 78, 153-161.

¹⁴¹ T. Kitazaki *et al.*, *Lung Cancer*, **2005**, 49, 337-343.

performance des soins, d'éviter des traitements inutiles et d'améliorer la qualité de vie des patients.¹⁴²

Les techniques actuelles d'immuno-histochimie permettent de déterminer de façon de plus en plus précise les caractéristiques de chaque tumeur afin de préciser le diagnostic et d'identifier des biomarqueurs propres aux cellules cancéreuses.¹⁴³ La recherche de ces biomarqueurs joue un rôle primordial pour prédire l'efficacité d'un médicament (Acmo ou ITK). En effet, un médicament dont l'efficacité globale peut être faible ou moyenne chez un ensemble de patients, peut s'avérer extrêmement efficace s'il est prescrit sur une population de malades sélectionnés par un test diagnostique. Les tests mis en œuvre à cet effet sont appelés « tests compagnons ». Ils permettent de déterminer le statut du patient vis-à-vis de biomarqueurs d'intérêt clinique.

Un des « tests compagnons » utilisés actuellement est le *Cobas® EGFR Mutation Test* qui permet d'identifier 41 mutations du gène EGFR. Ce nouveau test permet de prédire si les patients atteints d'un cancer du poumon sont susceptibles de tirer profit d'un traitement précoce par des inhibiteurs de l'EGFR. Par exemple, il a été démontré que 10 à 30% des patients avec un CBNPC ont une tumeur présentant des mutations activatrices de l'EGFR. Dans ces circonstances, les patients traités seront hautement sensibles à des inhibiteurs de l'EGFR tels que l'erlotinib (Tarceva®).¹⁴⁴

4. Thérapies associatives

En plus des associations avec la chimiothérapie cytotoxique ou la radiothérapie, des combinaisons avec les ITKs ont été envisagées, notamment avec d'autres agents de thérapie ciblée.

- Association Acmo/chimiothérapie cytotoxique

Des Acmo peuvent être associés à la chimiothérapie cytotoxique classique pour augmenter l'efficacité du traitement. Une preuve de ce concept est la commercialisation récente de la spécialité Kadcyła® dans le cancer du sein avec surexpression de HER-2. Cet anticorps conjugué est composé d'un anticorps monoclonal anti-HER-2 (trastuzumab) lié de façon covalente à un médicament de chimiothérapie appelé DM-1. Grâce à cette combinaison

¹⁴² R. Simon, *Frontiers in Oncology*, **2013**, doi: 10.3389/fonc.2013.00315.

¹⁴³ G.Gremel *et al.*, *Frontiers in Oncology*, **2013**, doi: 10.3389/fonc.2013.00271.

¹⁴⁴ H. Kimura *et al.*, *Lung Cancer*, **2014**, 83, 329-333.

avec un agent cytotoxique, le Kadcylla® montre une efficacité supérieure à celle du trastuzumab administré seul (Herceptin®).¹⁴⁵

- Association ITK/ chimiothérapie cytotoxique

De nombreuses études évaluent l'efficacité des ITK en présence de différents agents cytotoxiques. Dans la plupart des cas il a été démontré que les ITKs et les agents de chimiothérapie classiques agissent de façon additive dans plusieurs cancers. Cependant, la synergie entre ces deux classes n'est pas toujours observée. En effet, une étude portant sur la combinaison du gefitinib et d'une chimiothérapie à base de platine n'a montré aucun succès dans le cancer du poumon non à petites cellules.¹⁴⁶

- Association de deux agents de thérapie ciblée

La combinaison d'un ITK avec un Acmo visant le même récepteur a été évaluée dans plusieurs études. Par exemple, il a été démontré que l'association d'un anticorps monoclonal anti-EGFR (cétuximab) avec un ou deux ITKs de l'EGFR (Iressa® et Tarceva®), augmente l'efficacité des produits et permet une action synergique.^{147,148} L'inhibition simultanée de deux ou plusieurs récepteurs à activité tyrosine est également très étudiée. L'inhibition mixte des récepteurs à l'EGF et des récepteurs impliqués dans l'angiogenèse (VEGFR, PDGFR...) devient une thérapie efficace dans plusieurs types de cancer. Des études ont montré que l'association de deux anticorps monoclonaux anti-VEGF et anti-EGFR dans le cancer du côlon produit une synergie d'action par rapport à leur utilisation en monothérapie. Une autre étude concernant l'association de médicaments anti-VEGF et anti-EGFR dans le traitement du cancer du poumon non à petites cellules a été cliniquement positive.¹⁴⁹ De plus, l'inhibition simultanée des récepteurs EGFR et VEGFR est un concept utilisé en clinique avec le vandetanib (Caprelsa®) dans le cancer de la thyroïde. Le développement d'inhibiteurs multikinase est en plein essor et de nombreuses études ont prouvé leur efficacité.

L'objectif du laboratoire s'est porté sur le développement de tels composés, inhibiteurs multikinase EGFR, VEGFR, PDGFR et c-Kit. Leur conception est développée dans la partie suivante.

¹⁴⁵ H. A. Burris *et al.*, *Clinical Breast Cancer*, **2011**, 11, 275-282.

¹⁴⁶ M. Reck et L. Crinò, *Lung Cancer*, **2009**, 63, 1-9.

¹⁴⁷ S. Huang *et al.*, *Cancer Research*, **2004**, 64, 5355-5362.

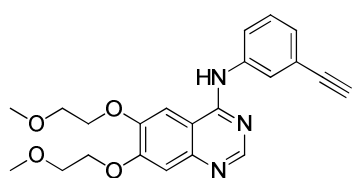
¹⁴⁸ A. Huether *et al.*, *Biochemical Pharmacology*, **2005**, 70, 1568-1578.

¹⁴⁹ N. A. Pennell et T. J. Jr. Lynch, *Oncologist*, **2009**, 14, 399-411.

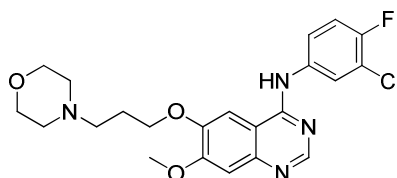
TRAVAUX
SUR LES INHIBITEURS
MULTIKINASE

La recherche d'inhibiteurs « multi-cible » ou « multikinase » intervenant sur différentes voies de signalisation impliquées dans le développement tumoral se présente comme une approche de choix pour développer de nouveaux agents anticancéreux. Cette approche permet d'envisager, avec une seule molécule thérapeutique, le blocage de plusieurs RTKs pour augmenter l'efficacité et diminuer les résistances.¹⁵⁰

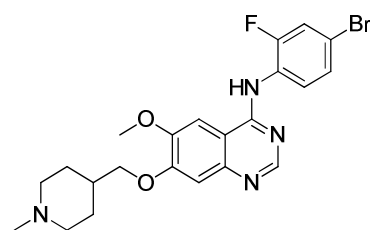
Les motifs quinazoliniques sont des hétérocycles largement représentés parmi les inhibiteurs de tyrosine kinase commercialisés (erlotinib, gefitinib, vandetanib). Ils ont fait l'objet du développement de plusieurs travaux de thèse au sein du laboratoire qui seront présentés dans la première partie de ce chapitre.



Erlotinib (Tarceva®)
inhibiteur EGFR



Géfitinib (Iressa®)
inhibiteur EGFR



Vandétanib (Caprelsa®)
inhibiteur EGFR/VEGFR

A partir des relations structure-activité issues de ces travaux du laboratoire, nous avons développé plusieurs composés agissant sur deux cibles pharmacologiques distinctes : sur les RTKs (EGFR, VEGFR, PDGFR et c-Kit) et sur l'ADN. L'étude de ces composés est divisée en trois parties dans ce chapitre :

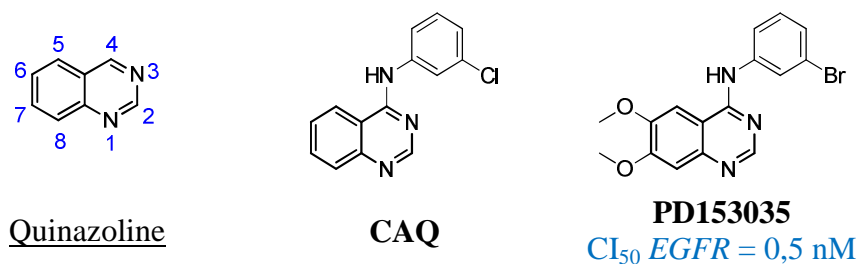
- Une première partie développera la conception, la synthèse et l'évaluation pharmacologique de 7-aminoalkoxyquinazolines, visant le VEGFR, le PDGFR et c-Kit et présentant un pouvoir anti-angiogénique.
- Une seconde partie portera sur la modulation de la position 2 de la quinazoline avec les travaux sur les 1,2,3-benzotriazines, les 2-aminoquinazolines et les 2-aminométhylquinazolines. Ces composés ont montré une action pharmacologique sur les RTKs mais aussi sur l'ADN pour certains d'entre eux.
- Enfin une dernière partie sera consacrée aux modulations de l'hétérocycle central quinazoline avec la conception, la synthèse et l'évaluation pharmacologique de dérivés thiényrimidiniques et thiazolotriaziniques.

¹⁵⁰ F. Broekman *et al.*, *World Journal of Clinical Oncology*, **2011**, 2, 80-93.

TRAVAUX ANTÉRIEURS
MENÉS AU SEIN DU LABORATOIRE

I. LA QUINAZOLINE AU CENTRE DES ITKS

La quinazoline représente un hétérocycle intéressant pour concevoir de nouveaux agents pharmaceutiques, notamment des inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase.¹⁵¹ L'un des premiers inhibiteurs synthétisés appartenant à la série des quinazolines fut le composé **CAQ**. A partir de cette 4-anilinoquinazoline fonctionnalisée en position 4 par une aniline chlorée, le composé **PD153035** a vu le jour. Ce dernier possède un pouvoir d'inhibition de l'EGFR remarquable ($CI_{50} = 0,50$ nM) malgré une faible cytotoxicité *in vitro*.



Depuis la découverte du **PD153035** par le groupe Parke-Davis, plusieurs molécules reprenant l'hétérocycle quinazoline ont été développées. De toutes les modifications structurales, plusieurs dérivés 4-anilinoquinazoliques ont permis d'aboutir à des ITKs de l'EGFR (géfitinib, erlotinib) ou à des ITKs mixtes EGFR/VEGFR comme le vandétanib. Ces composés présentent des CI_{50} sur l'EGFR plus faibles que le PD153035 mais leur cytotoxicité est nettement plus élevée.

Ces 4-anilinoquinazolines miment le noyau adénine de la molécule d'ATP et agissent selon un mode compétitif réversible. Les atomes d'azote en position 1 et 3 de l'hétérocycle permettent plusieurs liaisons hydrogène nécessaires à la stabilité de la molécule dans le site de fixation de l'ATP.

Suite à ces éléments et afin de développer de nouveaux ITKs, les travaux du laboratoire se sont orientés sur la synthèse de dérivés quinazoliques se différenciant par leurs substituants en position 4, 6 et 7. Les différentes modulations sont développées ci-après.

¹⁵¹ T. P. Selvam et P. V. Kumar, *Research in Pharmacy*, **2011**, 1, 1-21.

II. FONCTIONNALISATION DE LA QUINAZOLINE

L'essentiel des travaux de modulations s'est effectué en position 4 de la quinazoline. Celle-ci a été substituée par différentes anilines et anilines *N*-méthylées, ainsi que par différents groupements aryloxy.

1. Travaux de modulation de la position 4

L'analogue du vandétanib présentant des chaînes méthoxy en position 6 et 7 a été synthétisé au laboratoire (**P1**). Les analogues *N*-méthylé (**P2**) et aryloxy (**P3**) de ce composé ont également été envisagés afin d'évaluer l'importance du groupement NH en position 4. Les résultats d'inhibition enzymatique des trois produits sont repris dans le Tableau 3.

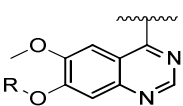
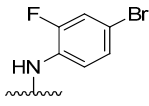
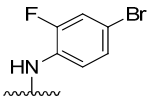
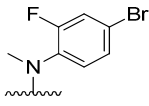
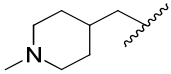
				
	vandétanib	P1	P2	P3
R		CH ₃	CH ₃	CH ₃
CI₅₀ EGFR	800 nM	5 700 nM	> 10 000 nM	5 900 nM
CI₅₀ VEGFR-2	70 nM	1 650 nM	> 10 000 nM	600 nM

Tableau 3 : Résultats enzymatiques (EGFR et VEGFR-2) des produits **P1** à **P3**

Le composé **P1** montre une inhibition mixte EGFR/VEGFR-2 avec des valeurs de CI_{50} supérieures à celle du vandétanib. La modulation de la chaîne du vandétanib par une chaîne méthoxy en position 7 fait chuter la valeur d'inhibition sur le VEGFR-2, ce qui montre l'importance d'une chaîne aminoalkoxy en position 7 pour inhiber le VEGFR-2. L'alkylation de l'aniline en position 4 a provoqué une perte d'affinité pour les deux récepteurs. Cependant le produit **P2** a montré une cytotoxicité intéressante sur plusieurs lignées cellulaires cancéreuses et des évaluations pharmacologiques ont permis de mettre en évidence son pouvoir intercalant de l'ADN. Cette modulation prouve l'importance du groupement NH pour inhiber l'EGFR et le VEGFR-2. L'aryloxyquinazoline **P3** inhibe les deux récepteurs avec une sélectivité pour le VEGFR *versus* l'EGFR, montrant la nécessité du groupement éther en position 4 pour inhiber le récepteur au VEGF.

Ces premières modulations de la position 4 ont permis de distinguer : un inhibiteur mixte EGFR/VEGFR-2 (**P1** : 4-anilinoquinazoline), un intercalant de l'ADN (**P2** : 4-*N*-

méthylanilinoquinazoline) et un inhibiteur sélectif VEGFR-2 *versus* EGFR (**P3** : 4-aryloxyquinazoline)

1.1. Les 4-anilinoquinazolines

A partir du composé **P1**, plusieurs produits ont été synthétisés dans le but de concevoir des ITKs mixtes EGFR/VEGFR-2. Les modulations se sont portées sur la nature (halogène, amide, carbamate, urée), le nombre et la position des substituants de l'aniline. Plusieurs conclusions ont pu être établies (Tableau 4).

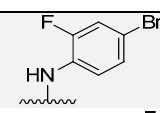
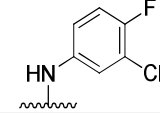
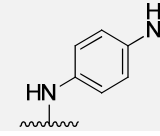
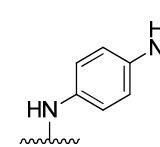
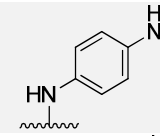
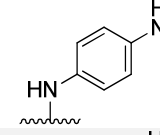
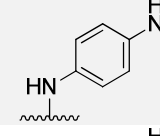
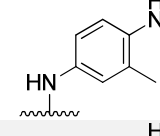
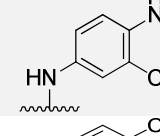
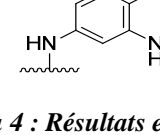
		<i>CI</i> ₅₀ EGFR	<i>CI</i> ₅₀ VEGFR-2
	vandétanib	800 nM	70 nM
	P1	5 700 nM	1 650 nM
	P4	400 nM	5 300 nM
	P5	> 10 000 nM	> 10 000 nM
	P6	8 600 nM	> 10 000 nM
	P7	> 10 000 nM	> 10 000 nM
	P8	> 10 000 nM	4 300 nM
	P9	> 10 000 nM	5 600 nM
	P10	900 nM	500 nM
	P11	900 nM	600 nM
	P12	900 nM	5 500 nM

Tableau 4 : Résultats enzymatiques (EGFR et VEGFR-2) des produits P4 à P12

Concernant les dérivés halogénés, une inhibition mixte est observée avec une sélectivité pour l'EGFR *versus* le VEGFR-2 pour le composé **P4** porteur d'un chlore en *méta* et d'un fluor en *para*. La substitution de l'aniline par des amides en *para* ne provoque pas ou peu d'inhibition (**P5** et **P6**). Les résultats obtenus avec les dérivés de type urée varient en fonction du substituant de l'urée. Le composé **P7**, fonctionnalisé par un motif pyrrolidinoéthyl ne présente aucune inhibition sur les deux enzymes alors que le produit **P8** porteur d'une urée aromatique halogénée montre une inhibition intéressante sur le VEGFR-2 ($CI_{50} = 4,30 \mu M$).

La substitution par un motif carbamate d'éthyle en *para* de l'aniline conduit à une inhibition mixte EGFR/VEGFR-2 lorsque l'aniline est disubstituée en *méta* par un méthyle ou un atome de chlore. Les composés **P10** et **P11** montrent en effet des inhibitions inférieures au micromolaire sur les deux récepteurs. L'isomérisie de position a été évaluée avec le produit **P12**. Elle provoque une perte d'affinité pour le VEGFR-2 bien que la CI_{50} sur l'EGFR reste identique. Un docking dans les deux sites actifs du composé **P11** a été réalisé pour établir les principales interactions mises en jeu (Figure 37).

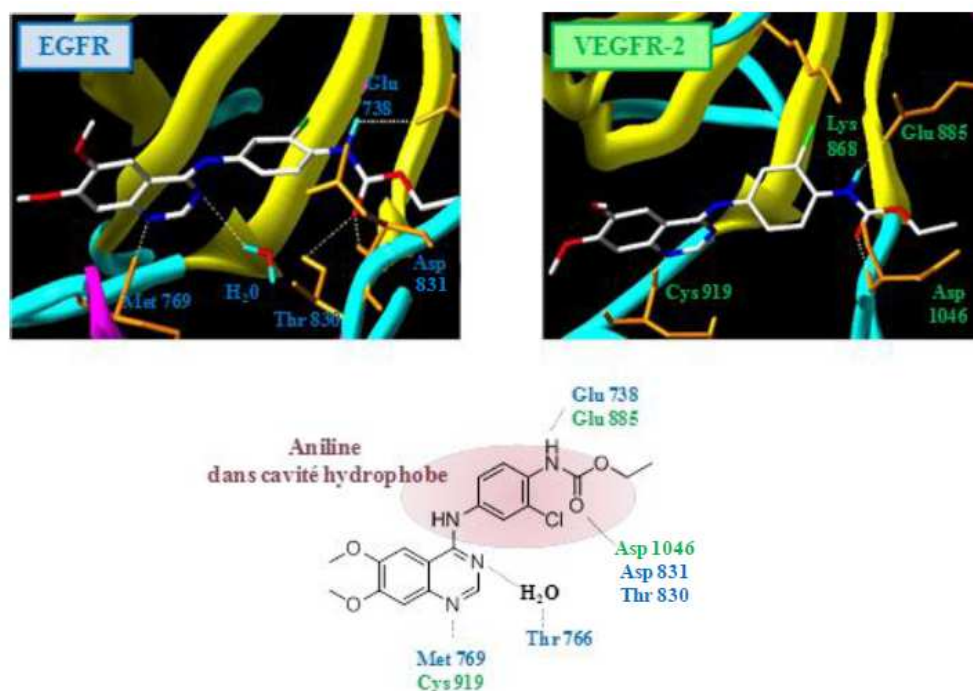


Figure 37 : Docking du composé **P11** dans le site actif de l'**EGFR** et du **VEGFR-2**

Plusieurs interactions ont été mises en évidence grâce au docking :

- une liaison hydrogène accepteur établie avec l'atome N1 de l'hétérocycle et les motifs amide des résidus Met₇₆₉ (EGFR) et Cys₉₁₉ (VEGFR-2),

- une liaison hydrogène accepteur établie avec l'atome N3 de l'hétérocycle avec la Thr₇₆₆ (EGFR) *via* une molécule d'eau,
- l'aniline se fixe dans une des poches hydrophobes des sites ATP de l'EGFR et VEGFR-2,
- le motif carbamate d'éthyle interagit, grâce à ces groupements NH et CO, par des liaisons hydrogène donneur-accepteur avec différents résidus des deux sites actifs.

Les 4-anilinoquinazolines substituées par des carbamates se sont révélées être des inhibiteurs mixtes EGFR/VEGFR-2 avec des valeurs d'inhibition intéressantes sur les deux enzymes et ont pu faire l'objet d'une publication.¹⁵²

1.2. Les 4-N-alkylanilinoquinazolines

La synthèse des dérivés *N*-méthylés au sein du laboratoire a commencé avec celle de l'**EBE-A22**, analogue du **PD153035** qui présente une très forte affinité et sélectivité pour le récepteur à l'EGF.



Contrairement au **PD153035**, le composé *N*-méthylé **EBE-A22** ne présente pas d'inhibition enzymatique de l'EGFR mais possède un profil cytotoxique intéressant sur différentes lignées cancéreuses. Plusieurs évaluations pharmacologiques, réalisées au sein de l'Institut de Recherche sur le Cancer de Lille (IRCL), ont prouvé que l'**EBE-A22** interagit par stacking avec les bases de l'ADN, avec une préférence pour les séquences riches en guanine et cytosine.¹⁵³

Des analogues *N*-méthylés et *N*-alkylés de l'**EBE-A22** ont par la suite été synthétisés au sein du laboratoire pour développer une nouvelle série d'agents intercalant de l'ADN.¹⁵⁴

¹⁵² A. Garofalo *et al.*, *MedChemComm*, **2011**, 2, 65-72.

¹⁵³ J. F. Goossens *et al.*, *Biochemistry*, **2001**, 40, 4663-4671.

¹⁵⁴ A. Garofalo *et al.*, *Journal of Medicinal Chemistry*, **2010**, 53, 8089-8103.

J'ai pu participer à ces travaux dans le cadre de mon stage de Diplôme Universitaire Techniques d'Elaboration et d'Analyse de Biomolécules.

Aucun des composés *N*-méthylés synthétisés n'a présenté d'inhibition enzymatique de l'EGFR à 10 μM . Tout comme l'EBE-A22, les composés se sont révélés être des intercalants de l'ADN. Quelques résultats des tests de dénaturation thermique de l'ADN et d'inhibition de la prolifération cellulaire sur HT29 (cancer du côlon) sont présentés dans le Tableau 5. Les valeurs de ΔT_m reflètent l'affinité des composés pour l'ADN.

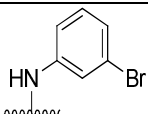
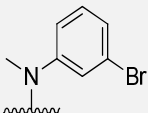
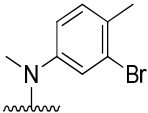
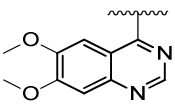
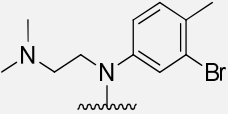
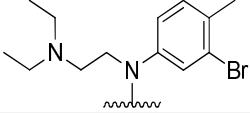
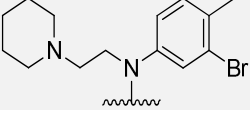
		ΔT_m en $^{\circ}\text{C}$ ctDNA	CI_{50} HT29 (côlon)	
		PD153035	0,2 $^{\circ}\text{C}$	10,1 μM
		EBE-A22	8,2 $^{\circ}\text{C}$	6,1 μM
		P13	8,4 $^{\circ}\text{C}$	6,3 μM
		P14	9,9 $^{\circ}\text{C}$	5,7 μM
		P15	14,0 $^{\circ}\text{C}$	5,7 μM
		P16	13,5 $^{\circ}\text{C}$	3,2 μM

Tableau 5: Résultats des tests de dénaturation thermique de l'ADN et d'inhibition de la prolifération cellulaire sur HT29 (cancer côlon) des produits P13 à P16

Le dérivé *N*-méthylé (**P13**) présente un pouvoir intercalant intéressant et une inhibition de la prolifération cellulaire de HT29. L'introduction d'une chaîne aminoalkyle (**P14-P16**) a permis d'améliorer la valeur de ΔT_m traduisant une meilleure intercalation avec l'ADN. Ceci peut s'expliquer par une possible liaison électrostatique entre les groupements phosphates de l'ADN et les amines tertiaires protonnées dans les conditions opératoires ce qui entraîne une meilleure interaction.

1.3. Les 4-aryloxyquinazolines

La substitution par différents groupements aryloxy en position 4 de la quinazoline a été envisagée pour synthétiser de nouveaux inhibiteurs sélectifs du VEGFR-2 *versus* EGFR. Les groupements aryloxy portés par la quinazoline se différencient par la nature et la position de leur substituant sur le groupement aromatique (halogène, amide, carbamate, urée). Les résultats d'inhibition de quatre composés sont repris dans le Tableau 6. Les analogues de chaque composé en série anilino sont également repris dans le tableau.

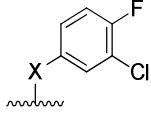
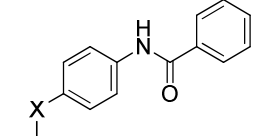
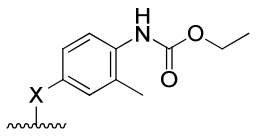
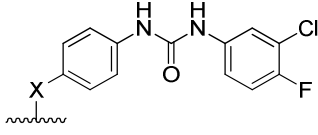
	X		CI ₅₀ EGFR	CI ₅₀ VEGFR-2
		vandétanib	800 nM	70 nM
	NH	P4	400 nM	5 300 nM
	O	P17	> 10 000 nM	9 500 nM
	NH	P6	8 600 nM	> 10 000 nM
	O	P18	> 10 000 nM	> 10 000 nM
	NH	P8	900 nM	500 nM
	O	P19	> 10 000 nM	600 nM
	NH	P10	> 10 000 nM	4 300 nM
	O	P20	> 10 000 nM	40 nM

Tableau 6 : Résultats enzymatiques (EGFR et VEGFR-2) des produits P17 à P20

Le remplacement du motif anilino par un motif phénoxy substitué par des halogènes (**P17**) conduit à une chute de l'inhibition sur les deux récepteurs. Le groupement amide est également néfaste pour l'inhibition des deux enzymes (CI₅₀ > 10 μM).

Contrairement au composé mixte **P8**, le composé phénoxy **P19** porteur d'un carbamate présente une nette sélectivité pour le VEGFR-2 *versus* l'EGFR. La substitution de l'aryloxy par un groupement plus volumineux comme une urée aromatique halogénée (**P20**) renforce cette sélectivité. Un docking dans le site actif du VEGFR-2 du composé **P20** a été réalisé pour établir les principales interactions mises en jeu (Figure 38).

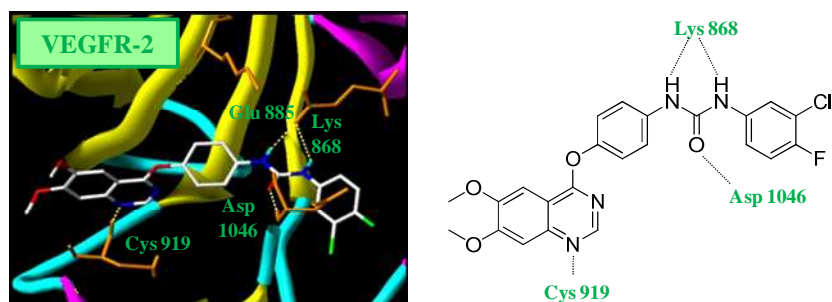


Figure 38 : Docking du composé P20 dans le site actif du VEGFR-2

Ce composé se lie au site actif *via* trois liaisons hydrogène. L'atome N1 de l'hétérocycle établit une liaison hydrogène accepteur avec le résidu Cys₉₁₉ et le motif urée interagit, grâce à ces groupements NH et CO, par des liaisons hydrogène donneur-accepteur avec différents résidus du site actif.

Suite aux résultats enzymatiques très encourageants du composé P20, une série de 4-aryloxyquinazolines substituées par des motifs de type urée a été développée afin d'augmenter l'inhibition sur le VEGFR-2.^{155,156} Tous les composés ont présentés des CI₅₀ > 10 μM sur l'EGFR et des CI₅₀ sur le VEGFR-2 de l'ordre du nanomolaire (Tableau 7).

		X	CI ₅₀ VEGFR-2
		vandétanib	70 nM
	H	P20	40 nM
	CH ₃	P21	6 nM
	Cl	P22	9 nM
	H	P23	6 nM
	CH ₃	P24	4 nM
	Cl	P25	8 nM
	H	P26	30 nM
	CH ₃	P27	20 nM
	Cl	P28	40 nM

Tableau 7 : Résultats enzymatiques (VEGFR-2) des produits P20 à P28

Afin de dresser un profil de sélectivité, trois de ces puissants inhibiteurs du VEGFR-2 (P23-P25) ont été choisis pour être évalués sur un panel de 7 kinases souvent inhibées de

¹⁵⁵ A. Garofalo *et al.*, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, **2011**, 2106-2112.

¹⁵⁶ A. Garofalo *et al.*, *Journal of Medicinal Chemistry*, **2012**, 55, 1189-1204.

manière concomitante avec le VEGFR-2. Parmi celles-ci, on retrouve les deux autres membres de la famille du VEGFR (VEGFR-1 et VEGFR-3), PDGFR- β , c-Kit, c-Met, Src et Raf (Tableau 8). Ces tests ont été réalisés par la société ProQinase. Les résultats d'un anti-angiogénique de référence (cédiranib) sont également repris dans le tableau.

	CI ₅₀ en nM						
	VEGFR-1	VEGFR-3	PDGFR- β	c-Kit	c-Met	Src	Raf
cédiranib	39	11	38	1530	967	156	> 10 000
P23	46	9	5	16	2 300	5 400	900
P24	35	15	89	100	> 10 000	> 10 000	2800
P25	18	15	20	38	2 000	3 100	100

Tableau 8: Résultats enzymatiques (VEGFR-1, VEGFR-3, PDGFR- β , c-Kit, c-Met, Src et Raf) des produits P23 à P25

Les composés **P23**, **P24** et **P25** présentent un profil de sélectivité identique. Les trois produits présentent de très bonnes CI₅₀ sur les membres de la famille du VEGFR, ainsi que sur les récepteurs PDGFR- β et c-Kit (CI₅₀ < 100 nM). Les valeurs d'inhibitions obtenues sur c-Met et Src restent supérieures au micromolaire. L'inhibition de Raf est proche du micromolaire à part pour le composé **P25** qui présente une CI₅₀ de 100 nM sur cette kinase.

Les études ont été complétées par des tests d'inhibition de la prolifération cellulaire sur trois lignées cellulaires cancéreuses (PC3, cancer de la prostate ; HT29, cancer du côlon et MCF7, cancer du sein) et sur des cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine qui surexpriment le VEGFR-2 (HUVEC) (Tableau 9).

	CI ₅₀ en μ M			
	PC3 (prostate)	HT29 (côlon)	MCF7 (sein)	HUVEC
cédiranib	> 10	1,6	7,9	0,3
P23	> 10	9,1	9,8	1,9
P24	> 10	> 10	> 10	0,7
P25	> 10	> 10	> 10	0,5

Tableau 9: Résultats d'inhibition de la prolifération (PC3, HT29, MCF7, HUVEC) des produits P23 à P25

Malgré de très bons résultats sur enzymes, les produits ne présentent pas ou peu d'inhibition de la prolifération cellulaire des cellules cancéreuses (CI_{50} proches ou supérieures à $10 \mu\text{M}$). A l'inverse, l'inhibition des HUVEC par les composés est très intéressante puisque les CI_{50} sont proches ou inférieures au micromolaire.

L'un des objectifs de nos travaux de thèse consiste en l'amélioration du potentiel cytotoxique de ces composés tout en gardant une inhibition enzymatique au nanomolaire.

Conclusion sur les travaux de modulation de la position 4

Les travaux entrepris au sein de notre équipe ont permis la découverte :

- de puissants inhibiteurs multikinase VEGFR, PDGFR et c-Kit qui ne présentent pas d'inhibition de la prolifération cellulaire cancéreuse,
- des agents intercalants montrant une cytotoxicité moyenne,
- et des inhibiteurs mixtes EGFR/VEGFR-2.

Les principales relations structure-activité issues des travaux de modulation en position 4 de la quinazoline sont reprises dans la Figure 39.

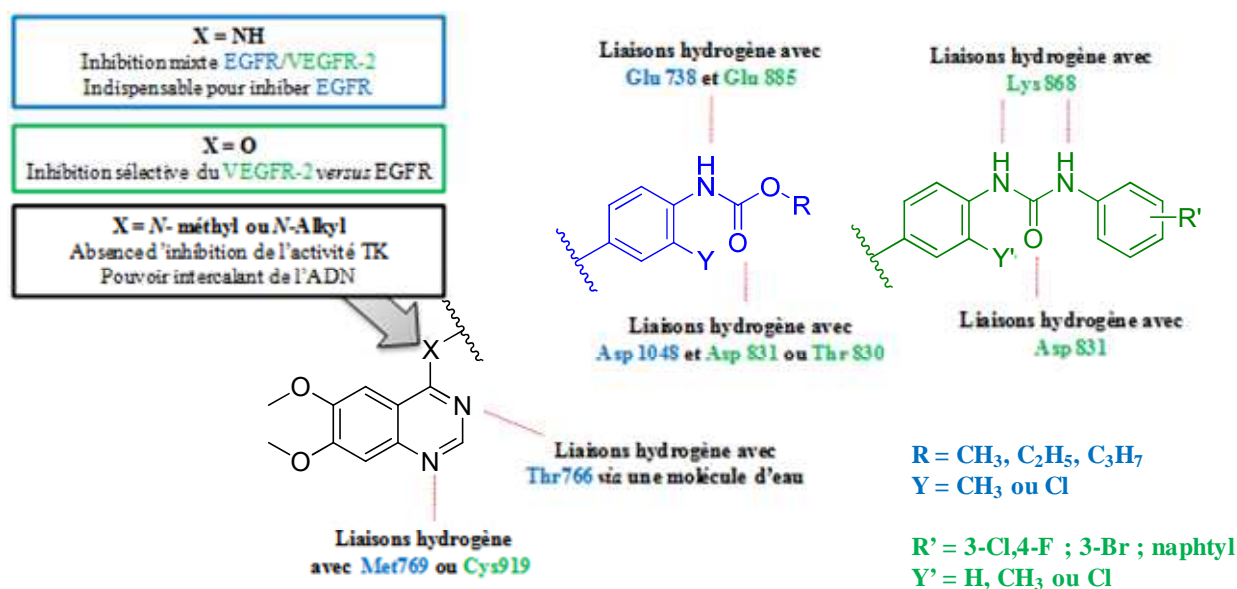


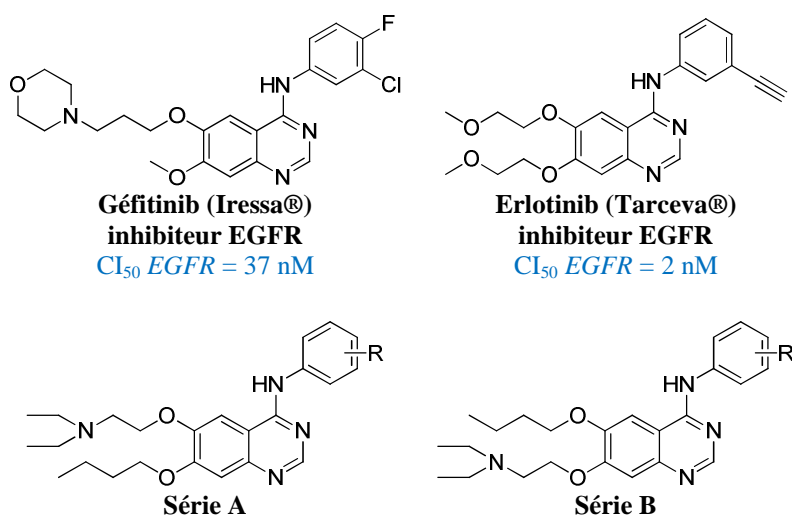
Figure 39 : Travaux de modulation autour de la position 4 de la quinazoline
 Interactions mises en évidence avec le site de l'EGFR en bleu
 Interactions mises en évidence avec le site du VEGFR-2 en vert

2. Travaux de modulation des chaînes en position 6 et 7

Plusieurs travaux de modulation ont été effectués sur les chaînes de type éther en position 6 et 7 de la quinazoline. Les études se sont portées sur des 4-anilinoquinazolines substituées par des halogènes ou par des groupements carbamate.

2.1. Modulations des chaînes sur les dérivés halogénés

Au sein du laboratoire, une quarantaine de composés, de type 4-anilinoquinazolinique, ont été synthétisés dans le but de concevoir des analogues de l'Iressa®.¹⁵⁷



Ces composés se différencient par leur aniline substituée en position *mé*ta et/ou *para* et par leur chaîne en position 6 et 7. La chaîne morpholinopropoxy en C-6 du géfitinib a été mimée par une chaîne diéthylaminoéthoxy et le groupement méthoxy en C-7 a été remplacé par une chaîne butoxy dans le but de mimer une des chaînes de l'erlotinib. L'isomérisation de position des chaînes diéthylaminoéthoxy et butoxy a été envisagée.

La série A a montré de meilleurs résultats sur l'EGFR avec des CI_{50} inférieures au micromolaire. Pour le VEGFR-2, la série B a présenté des résultats plus intéressants, bien que l'activité inhibitrice du VEGFR-2 reste faible. Ces molécules ont été évaluées pharmacologiquement et ont révélé une activité antiproliférative supérieure à celle du géfitinib.¹⁵⁸

¹⁵⁷ M. Desroses *et al.*, *Fundamental and Clinical Pharmacology*, **2004**, 18, 593-599.

¹⁵⁸ A. Telliez *et al.*, *ChemMedChem*, **2007**, 2, 318-332.

2.2. Modulations des chaînes sur les dérivés substitués par un carbamate

Suite à ces résultats, la modulation des chaînes de type éther a été envisagée sur les composés inhibiteurs mixtes EGFR/VEGFR-2. Les résultats d'inhibition enzymatique (EGFR et VEGFR-2) et d'inhibition de la prolifération cellulaire de PC3 (cancer de la prostate) des analogues du composé inhibiteur mixte **P11** sont repris dans le Tableau 10.

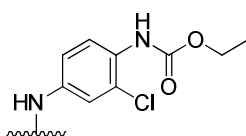
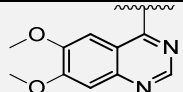
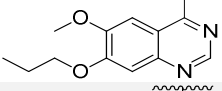
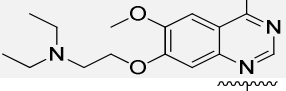
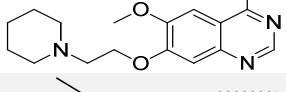
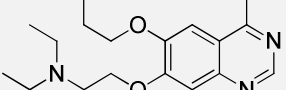
		CI_{50} EGFR	CI_{50} VEGFR-2	CI_{50} PC3 (prostate)
vandétanib		800 nM	70 nM	7,3 μ M
	P11	900 nM	600 nM	> 10 μ M
	P26	5 500 nM	500 nM	> 10 μ M
	P27	> 10 000 nM	3 400 nM	5,4 μ M
	P28	> 10 000 nM	800 nM	5,2 μ M
	P29	> 10 000 nM	4 800 nM	2,5 μ M

Tableau 10 : Résultats d'inhibition enzymatique (EGFR et VEGFR-2) et d'inhibition de la prolifération (PC3) des produits P26 à P29

L'inhibition de l'activité enzymatique de ces composés a été étudiée sur les deux récepteurs isolés. Les résultats permettent de conclure que l'ajout d'une chaîne alkyle (**P26**) ou aminoalkyle (**P27-P29**) en position 7 engendre une diminution de l'inhibition de l'EGFR. Cependant l'ajout de ces chaînes en position 7 a permis de garder une affinité correcte pour le VEGFR-2.

L'ajout d'une chaîne propoxy en position 7 de la quinazoline ne permet pas d'inhiber la prolifération cellulaire sur PC3. En revanche, l'introduction d'une chaîne aminoalkoxy en C-7 améliore l'activité cytotoxique. De plus, l'introduction d'une chaîne butoxy en position 6 (**P29**) du noyau quinazoline augmente cette activité antiproliférative sur PC3.

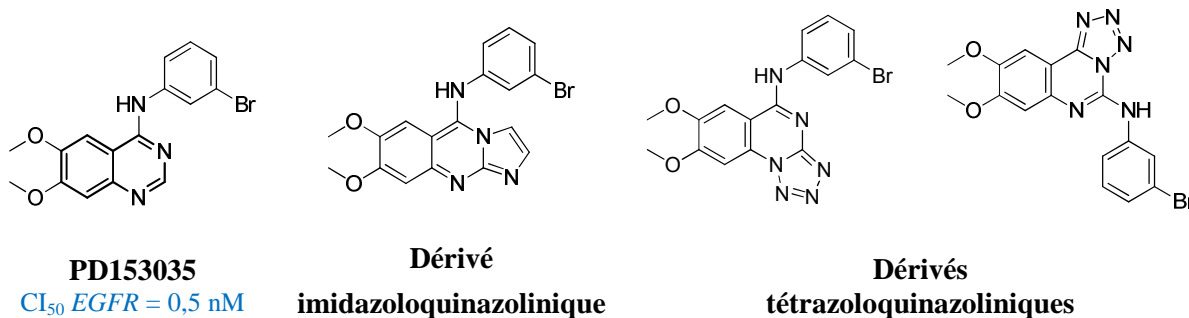
Conclusion sur les travaux de modulation des chaînes en position 6 et 7

De manière générale, l'ajout d'une chaîne aminoalkoxy en position 6 permet de garder une affinité intéressante pour l'EGFR. A l'inverse, l'introduction de cette chaîne en position 7 conduit à une perte de l'inhibition de l'EGFR mais permet de garder une affinité pour le VEGFR-2. Dans les deux cas, l'introduction des chaînes aminoalkoxy permet d'améliorer l'activité cytotoxique des composés.

3. Travaux de modulation de l'hétérocycle quinazolinique

3.1. Conception de dérivés tricycliques analogues du PD153035

D'autres travaux entrepris au laboratoire se sont dirigés vers la synthèse d'analogues originaux du composé **PD153035**.¹⁵⁹

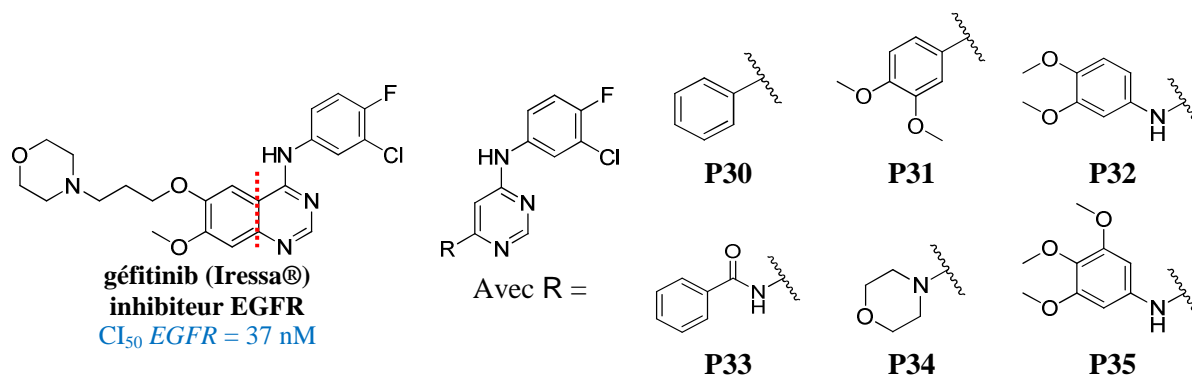


Les composés tricycliques (hétérocycles imidazolo- et tétrazoloquinazoliniques) issus de ces travaux se sont révélés être inactifs sur l'EGFR ainsi que sur plusieurs lignées cellulaires cancéreuses. L'encombrement créé par le troisième cycle empêche vraisemblablement ces composés de pénétrer dans le site actif.

3.2. Conception de dérivés pyrimidiniques analogues de l'Iressa

La pharmacomodulation de l'hétérocycle quinazolinique en dérivés pyrimidiniques analogues de l'Iressa® a également été entreprise au sein du laboratoire.

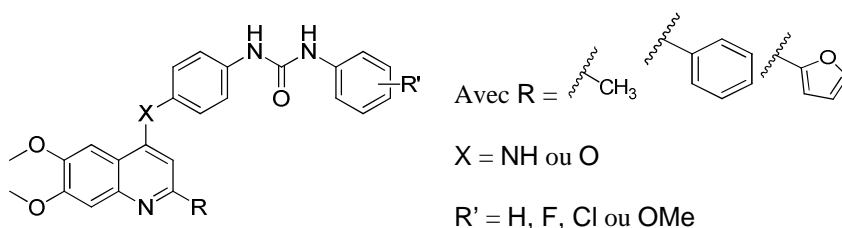
¹⁵⁹ E. Bouey-Bencteux *et al.*, *Anticancer Drug Design*, **1998**, 13, 893-922.



Malgré la présence des deux azotes inclus dans le cycle pyrimidinique, les composés synthétisés ont présenté de faibles affinités pour l'EGFR et le VEGFR-2. Seuls les composés **P32** et **P35** ont montré des CI_{50} d'environ $5 \mu\text{M}$ sur l'EGFR. Aucune inhibition de la prolifération cellulaire n'a été détectée avec ces composés ($CI_{50} > 10 \mu\text{M}$).

3.3. Conception de dérivés quinoléiniques

La conception de quinoléines substituées en position 2 par des groupements méthyle, phényle et furanyle a été envisagée.



L'étude de l'activité tyrosine kinase a été réalisée sur le récepteur isolé VEGFR-2 mais aussi EGFR. Cette étude n'a donné aucun résultat significatif sur les deux enzymes, les valeurs d'inhibition étant toujours supérieures à $10 \mu\text{M}$.

Conclusion sur les travaux de modulation de l'hétérocycle quinazolinique

Grâce à ces études, nous pouvons conclure sur l'importance d'un ensemble hétérocyclique bicyclique comportant au minimum deux azotes pour permettre le bon positionnement des composés au niveau du site enzymatique. *Les travaux entrepris au sein du laboratoire sur la pharmacomodulation de l'hétérocycle quinazolinique n'ont pas donné de résultats concluants. L'un de nos objectifs est de poursuivre ces efforts pour découvrir de nouveaux inhibiteurs présentant un ensemble hétérocyclique original.*

TRAVAUX PERSONNELS

LES 7-AMINOALKOXYQUINAZOLINES

- CONCEPTION

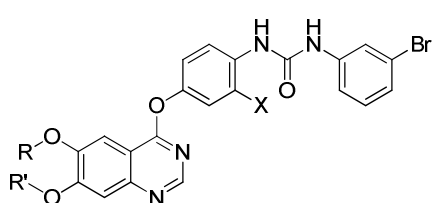
- EVALUATIONS PHARMACOLOGIQUES

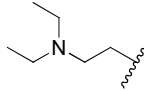
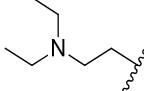
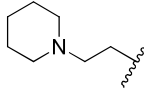
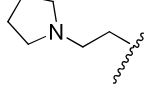
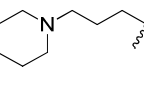
- STRATÉGIE DE SYNTHÈSE

I. CONCEPTION DES 7-AMINOALKOXYQUINAZOLINES

Les dérivés 4-aryloxyquinazoliniques substitués par des groupements de type urée volumineux se sont révélés être de puissants inhibiteurs du VEGFR, du PDGFR et de c-Kit. Malgré une inhibition très intéressante des cellules HUVEC, ces composés n'ont montré aucune inhibition de la prolifération cellulaire cancéreuse.^{160,161} L'un de nos objectifs est d'améliorer le pouvoir cytotoxique de ces produits tout en gardant de bonnes affinités pour le VEGFR, le PDGFR et c-Kit. D'après les travaux antérieurs, nous savons que le remplacement du groupe méthoxy par un groupe aminoalkoxy en position 7 du squelette quinazolinique est raisonnablement bien toléré par le VEGFR. De plus, l'incorporation de chaînes aminoalkoxy permet d'augmenter l'inhibition de la prolifération cellulaire cancéreuse.

A partir de ces observations, nous avons donc envisagé l'incorporation de chaînes aminoalkoxy en position 7 d'inhibiteurs multikinase VEGFR, PDGFR et c-Kit dans le but d'augmenter leur pouvoir cytotoxique. Le substituant porté en position 4 a été choisi en fonction des résultats obtenus en série 6,7-diméthoxyquinazolinique. Les composés **P23**, **P24** et **P25** fonctionnalisés par une urée aromatique bromée en *méta* ont présenté les meilleurs résultats sur le VEGFR-2. Nous avons donc sélectionné ce motif urée pour réaliser l'étude. Plusieurs chaînes aminoalkoxy se différenciant par leur longueur et par la nature de leur motif aminé ont été incorporées en position C-7. L'ajout simultané d'un motif butoxy en C-6 a également été envisagé. Au total, cinq séries (**A-E**) de composés ont été conçues, synthétisées et évaluées pharmacologiquement.



Série	R	R'	X		
			H	CH ₃	Cl
A	C ₄ H ₉		1	2	-
B	CH ₃		3	4	5
C	CH ₃		6	7	8
D	CH ₃		9	10	11
E	CH ₃		12	13	14

¹⁶⁰ A. Garofalo *et al.*, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, **2011**, 2106-2112.

¹⁶¹ A. Garofalo *et al.*, *Journal of Medicinal Chemistry*, **2012**, 55, 1189-1204.

II. EVALUATION PHARMACOLOGIQUE DES 7-AMINOALKOXY-QUINAZOLINES

1. Résultats d'inhibition enzymatique

Les composés ont été testés sur un panel de neuf kinases (EGFR, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR- β , c-Kit, c-Met, Src et Raf). J'ai pu mesurer l'activité enzymatique tyrosine kinase de l'EGFR et du VEGFR-2 en suivant l'incorporation de phosphate γ provenant d'ATP radiomarqué ($[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$) sur un substrat peptidique contenant des résidus tyrosine, le [Poly(Glu,Tyr) 4:1]. L'inhibition des autres kinases (VEGFR-1, VEGFR-3, PDGFR- β , c-Kit, c-Met, Src et Raf) a été réalisée par la société ProQinase également grâce à un test radioactif ($^{33}\text{PanQinase activity assay}$). Le **vandetanib** (inhibiteur mixte EGFR/VEGFR-2) et le **cédiranib** (inhibiteur VEGFR/PDGFR) ont été choisis comme composés de référence pour ces différents tests pharmacologiques. Les résultats obtenus sont exprimés en CI_{50} (nM) et présentés dans le Tableau 11.

Discussion

Les composés de la série **A**, présentant une chaîne *O*-butoxy en position 6, montrent des affinités pour le VEGFR, PDGFR- β et c-Kit plus faibles que les composés de la série 6,7-diméthoxyquinazolinique. Les composés de la série **B** (chaîne diéthylaminoéthoxy en C-7) présentent de meilleures CI_{50} que leurs analogues de la série **A** sur VEGFR, PDGFR- β et c-Kit. La cyclisation du motif diéthylaminoéthoxy en pipéridino- (série **C**) ou pyrrolidinoéthoxy (série **D**) est raisonnablement bien tolérée sur les trois kinases. Le remplacement de la chaîne pipéridinoéthoxy par une chaîne pipéridinopropoxy (série **E**) conduit à d'excellents résultats d'inhibition enzymatique sur VEGFR, PDGFR- β et c-Kit ($\text{CI}_{50} < 12$ nM). De plus l'allongement du linker carboné permet d'inhiber l'activité de l'EGFR avec des valeurs proches du micromolaire.

Pour les kinases c-Met, Src et Raf, les valeurs d'inhibition sont plus faibles pour tous les composés. Néanmoins quelques différences sont observées. Lorsque la position en *méta* du phénoxy est libre ($X = \text{H}$), les résultats sur c-Met and Src sont meilleurs que lorsque le phénoxy est substitué par un groupement méthyle ou un atome de chlore. A l'inverse, l'insertion d'un atome de chlore en *méta* de l'aryloxy conduit à une augmentation de l'affinité pour Raf.

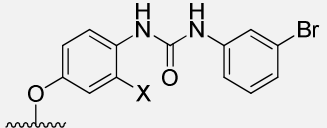
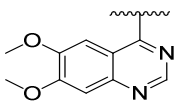
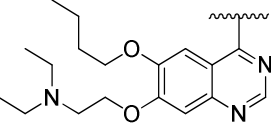
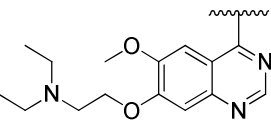
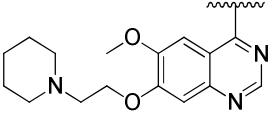
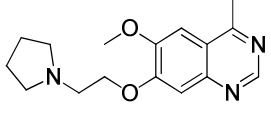
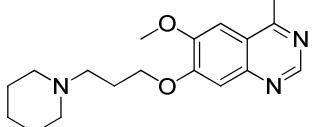
			CI ₅₀ en nM									
			EGFR	c-Met	Raf	Src	VEGFR -1	VEGFR -2	VEGFR -3	PDGFR -β	c-Kit	
cédiranib			2100	967	> 10 000	156	39	14	11	38	1530	
vandétanib			800	N.D.	N.D.	N.D.	150	69	260	5300	N.D.	
	X = H	P23	> 10 000	2310	930	5470	46	6	9	5	16	
	X = CH ₃	P24	> 10 000	> 10 000	2810	> 10 000	35	4	15	89	102	
	X = Cl	P25	> 10 000	2000	110	3130	18	8	15	20	38	
Série A		X = H	1	> 10 000	1770	308	1090	122	12	199	61	55
		X = CH ₃	2	> 10 000	3320	273	2130	59	44	112	395	168
Série B		X = H	3	> 10 000	963	245	232	7	1	22	7	
		X = CH ₃	4	> 10 000	1100	400	1900	19	8	12	98	91
		X = Cl	5	> 10 000	1420	60	283	4	4	13	15	9
Série C		X = H	6	> 10 000	977	356	262	11	4	26	8	12
		X = CH ₃	7	> 10 000	3440	114	604	6	2	19	51	25
		X = Cl	8	> 10 000	4710	119	654	5	3	17	64	22
Série D		X = H	9	> 10 000	706	205	239	5	3	23	4	6
		X = CH ₃	10	> 10 000	2870	103	548	5	2	14	36	13
		X = Cl	11	> 10 000	1850	63	254	5	1	8	17	13
Série E		X = H	12	9710	350	268	155	4	2	12	4	6
		X = CH ₃	13	2300	1390	120	126	5	4	8	9	9
		X = Cl	14	1930	619	73	66	3	1	6	5	5

Tableau 11: Résultats d'inhibition enzymatique des produits 1 à 14 (CI₅₀ entre 1-9 nM / CI₅₀ entre 10-99 nM / CI₅₀ entre 100-999 nM / CI₅₀ entre 1000-9999 nM)

Conclusion

L'ajout d'une chaîne aminoalkoxy en position 7 de la quinazoline a permis de garder une activité inhibitrice intéressante pour le VEGFR, le PDGFR et c-Kit. Les dérivés de la série **A**, substitués par une chaîne *O*-butoxy en position 6 de la quinazoline, présentent une affinité plus faible pour le VEGFR, le PDGFR et c-Kit que les composés des séries **B**, **C**, **D** et **E**. Une chaîne *O*-butoxy portée en position 6 de la quinazoline est donc défavorable à l'inhibition du VEGFR, du PDGFR et de c-Kit. Les dérivés de la série **E** montrent les meilleures valeurs d'inhibition pour le VEGFR, le PDGFR et c-Kit ($CI_{50} < 12$ nM). Cette observation permet d'affirmer que la longueur de la chaîne carbonée en position 7 influence les résultats enzymatiques. En effet, la chaîne pipéridinopropoxy (série **E**) permet d'augmenter l'affinité pour les kinases d'intérêt mais également pour l'EGFR.

Les modifications apportées aux inhibiteurs multikinase VEGFR, PDGFR et c-Kit ont permis de garder ou de renforcer l'affinité pour ces kinases. Afin d'évaluer le pouvoir cytotoxique des nouveaux composés, des tests d'inhibition de la prolifération ont été réalisés.

2. Résultats d'inhibition de la prolifération cellulaire

2.1. Inhibition de la prolifération de PC3, HT29, MCF7 et HUVEC

L'activité antiproliférative a été évaluée par Madame Amélie Barczyk au sein du laboratoire de pharmacologie de l'ICPAL sur différentes lignées cellulaires cancéreuses (PC3, prostate ; HT29, côlon ; MCF7, sein) ainsi que sur HUVEC grâce à un test MTS. Les résultats sont exprimés en CI_{50} (μ M) (Tableau 12).

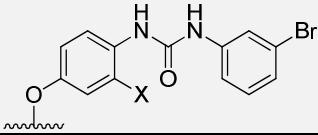
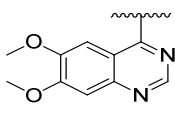
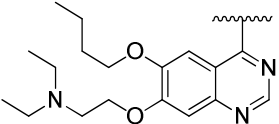
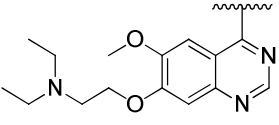
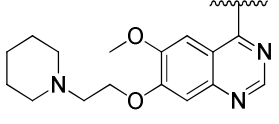
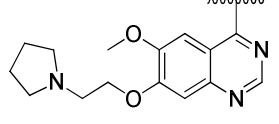
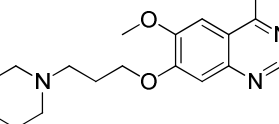
				CI ₅₀ en µM				
				PC3, prostate	HT29, côlon	MCF7, sein	HUVEC	
				> 10	1,61 ± 0,49	7,94 ± 1,91	0,27 ± 0,14	
vandétanib				7,30 ± 3,00	1,76 ± 0,78	9,57 ± 0,41	4,39 ± 1,60	
				X = H P23	> 10	7,26 ± 1,84	9,80 ± 0,90	0,97 ± 0,50
				X = CH ₃ P24	> 10	> 10	> 10	0,83 ± 0,21
				X = Cl P25	> 10	> 10	> 10	0,51 ± 0,10
Série A				X = H 1	3,77 ± 0	1,10 ± 0,09	0,91 ± 0,05	1,53 ± 0,73
				X = CH ₃ 2	3,94 ± 0,07	1,29 ± 0,54	1,45 ± 1,11	0,78 ± 0,22
Série B				X = H 3	2,76 ± 0,44	1,22 ± 0,66	3,83 ± 0,43	0,79 ± 0,17
				X = CH ₃ 4	> 10	4,84 ± 0,25	> 10	1,39 ± 0,60
				X = Cl 5	4,74 ± 1,00	1,19 ± 0,34	4,97 ± 1,75	0,34 ± 0,11
Série C				X = H 6	6,58 ± 1,17	1,60 ± 0,08	7,16 ± 1,06	0,33 ± 0,23
				X = CH ₃ 7	5,39 ± 1,03	1,54 ± 0,61	5,19 ± 1,09	0,49 ± 0,36
				X = Cl 8	7,03 ± 0,60	2,26 ± 0,53	5,48 ± 0	0,48 ± 0,06
Série D				X = H 9	5,32 ± 0,10	1,61 ± 0,08	3,90 ± 0,26	0,38 ± 0,03
				X = CH ₃ 10	6,59 ± 1,19	1,97 ± 1,11	6,79 ± 1,68	0,51 ± 0,26
				X = Cl 11	3,38 ± 0,16	1,46 ± 0,26	5,07 ± 1,35	0,48 ± 0,06
Série E				X = H 12	1,33 ± 0,20	1,08 ± 0,15	2,79 ± 1,54	0,12 ± 0,01
				X = CH ₃ 13	4,09 ± 0,13	1,00 ± 0,11	5,02 ± 1,19	0,33 ± 0,17
				X = Cl 14	1,94 ± 0,03	0,67 ± 0,01	2,78 ± 0,74	0,17 ± 0,02

Tableau 12: Résultats d'inhibition de la prolifération cellulaire des produits 1 à 14
 CI₅₀ < 1 µM / CI₅₀ entre 1 et 5 µM / CI₅₀ entre 5 et 10 µM / CI₅₀ > 10 µM

Discussion

L'introduction d'une chaîne aminoalkoxy en position 7 de la quinazoline conduit à une augmentation significative de l'inhibition de la prolifération cellulaire cancéreuse sur PC3, HT29 et MCF7. Les résultats cellulaires sont équivalents voire meilleurs que ceux des composés de référence (vandetanib et cediranib). Les inhibitions les plus intéressantes sont obtenues pour la lignée HT29 (cancer du côlon) avec des valeurs proches du micromolaire.

Les composés de la série **E** substitués par un motif pipéridinopropoxy sont les plus cytotoxiques.

L'ajout d'une chaîne aminoalkoxy en position 7 de la quinazoline permet également de garder des valeurs d'inhibition inférieures ou proches du micromolaire sur HUVEC. Les valeurs sont constantes quelle que soit la nature (diéthylamino-, pipéridino- ou pyrrolidino-) ou la longueur du linker (éthoxy ou propoxy). Les CI_{50} obtenues sur HUVEC sont plus faibles que celles obtenues sur les cellules cancéreuses car ces cellules endothéliales sont plus dépendantes du signal induit par le VEGF que les cellules cancéreuses.

Conclusion

L'ajout d'une chaîne aminoalkoxy en position 7 de la quinazoline a permis d'augmenter l'inhibition de la prolifération cellulaire cancéreuse sur PC3, HT29 et MCF7 ainsi que sur les cellules HUVEC. Les dérivés de la série E, fonctionnalisés par une chaîne pipéridinopropoxy en position 7 de la quinazoline montrent les meilleures valeurs d'inhibition de la prolifération cellulaire ($CI_{50} < 5,02 \mu\text{M}$ sur les lignées cellulaires cancéreuses et $CI_{50} < 0,33 \mu\text{M}$ sur HUVEC).

Grâce ces travaux, nous avons rempli un de nos objectifs qui consistait à améliorer le pouvoir cytotoxique des dérivés 4-aryloxyquinazoliniques, inhibiteurs du VEGFR, du PDGFR et de c-Kit. Suite à ces résultats enzymatiques et cellulaires très encourageants, d'autres tests pharmacologiques ont été entrepris.

2.2. Inhibition de la prolifération sur cellules saines de type MRC5

Nous avons vérifié la cytotoxicité de nos composés sur une lignée cellulaire saine. Pour cela, un test d'inhibition de la prolifération à $1 \mu\text{M}$ a été réalisé sur la lignée MRC5 (fibroblastes embryonnaires humains). La valeur de $1 \mu\text{M}$ a été fixé pour ce test afin d'être au plus proche des CI_{50} obtenues sur la lignée cancéreuse colorectale HT29. Le Figure 40 reprend les pourcentages d'inhibition obtenus pour chaque composé à $1 \mu\text{M}$ sur MRC5 et HT29.

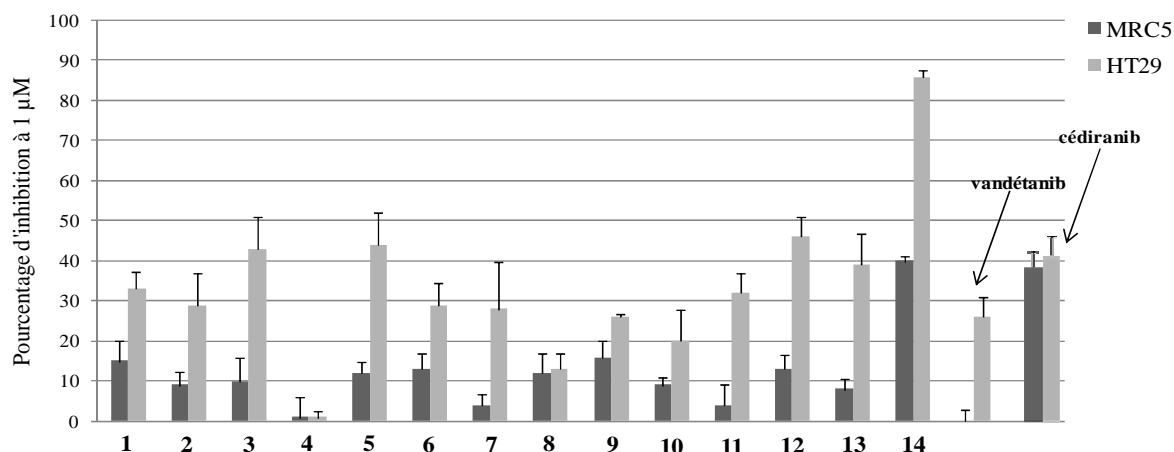


Figure 40 : Pourcentages d'inhibition à 1 μ M des produits 1 à 14 sur MRC5 et HT29

L'inhibition de la prolifération cellulaire à 1 μ M des produits **1** à **14** est considérablement plus élevée sur la lignée cellulaire cancéreuse HT29 que sur la lignée cellulaire saine MRC5. L'inhibition de MRC5 est toujours inférieure à 15%, sauf pour le composé **14** qui présente un pourcentage d'inhibition de 40%, traduisant sa forte cytotoxicité sur cellules saines. Grâce à ce test, nous avons pu mettre en évidence une sélectivité de nos composés pour les cellules tumorales *versus* les cellules saines.

2.3. Chaînes aminoalkoxy et cytotoxicité

L'ajout de chaînes aminoalkoxy en position 7 de la quinazoline permet d'augmenter l'inhibition de la prolifération cellulaire cancéreuse. Pour comprendre cette observation, nous nous sommes posé la question suivante : *En quoi l'ajout de telles chaînes aminoalkoxy permet d'inhiber la prolifération cellulaire cancéreuse ?*

Une première suggestion de réponse mettrait en jeu des protéines transmembranaires spécifiques. Les transporteurs d'efflux ABC (*ATP Binding-Cassette*) également appelés pompes à efflux sont surexprimés au sein des cellules tumorales. Une surexpression de ces pompes à la surface des cellules cancéreuses est souvent associée à un phénomène de résistance. Les pompes reconnaissent en effet le médicament comme étant un substrat et l'expulsent hors de la cellule cancéreuse.

Les transporteurs ABC agissent comme des pompes ATPase, c'est-à-dire comme des pompes capables d'expulser une molécule grâce à l'énergie fournie par l'ATP. Récemment, un nombre important d'études montre que les pompes à efflux sont responsables de l'efflux de thérapies ciblées tels que les ITKs. Paradoxalement, certains ITKs sont décrits comme inhibiteurs des mêmes transporteurs et jouent donc un rôle inverse. Parmi les ITKs qui inhibent les transporteurs ABC, on peut citer : le géfitinib, l'erlotinib ou le lapatinib.^{162,163}

Les analogues **P24** et **13**, inhibiteurs multikinase, pourraient agir de manière opposée sur les transporteurs ABC. Le composé **P24** pourrait être reconnu comme substrat, et être expulsé de la cellule tumorale, d'où son manque d'activité cytotoxique. Alors que le produit **13** pourrait bloquer la poche à ATP de la pompe à efflux, ce qui augmenterait sa concentration cellulaire et expliquerait son activité antiproliférative (Figure 41).

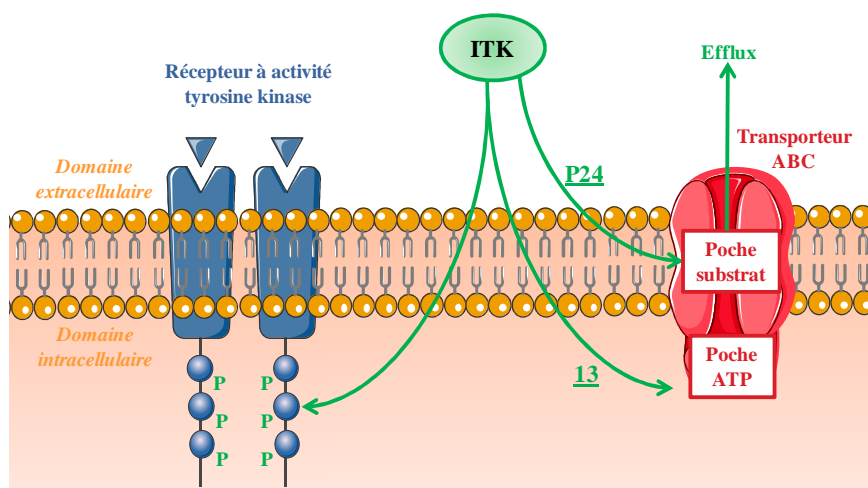
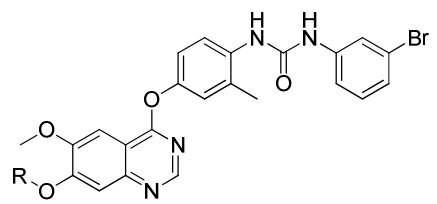


Figure 41 : Mécanisme potentiel des analogues P24 et 13

Afin de valider cette hypothèse, les deux composés ont été testés pour leur pouvoir inhibiteur sur deux transporteurs de la famille ABC : la protéine BCRP (*Breast Cancer Resistance Protein*) et la glycoprotéine P (P-gp). Le test d'inhibition a été réalisé par la société Cerep. Les pourcentages d'inhibition à 10 μ M des deux composés ainsi que les CI_{50} de deux références (KO 143 et vérapamil) sont repris dans le Tableau 13.

¹⁶² S. Shukla *et al.*, *Drug Resistance Updates*, **2012**, 15, 70-80.

¹⁶³ C. Ozvegy-Laczka *et al.*, *Drug Resistance Updates*, **2005**, 8, 15-26.



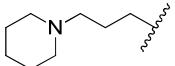
R	CI ₅₀ ou pourcentage d'inhibition à 10 µM	
	<i>BCRP</i>	<i>P-gp</i>
KO 143	0,08 µM	-
vérapamil	-	2,70 µM
CH ₃ P24	7%	8%
 13	40%	44%

Tableau 13 : Résultats d'inhibition (*BCRP* et *P-gp*) des produits **P24** et **13**

Le produit **P24** montre une inhibition inférieure à 10% à 10 µM sur les deux protéines. Le composé **13** présente des inhibitions de 40% sur la *BCRP* et de 44% sur la *P-gp*. Malgré la mise en évidence d'une différence entre les pourcentages d'inhibition des deux composés sur les deux transporteurs, l'inhibition de la *BCRP* et de la *P-gp* par le composé **13** ne peut pas expliquer son activité cytotoxique.

L'ajout d'une chaîne aminoalkoxy en position 7 de la quinazoline pourrait également augmenter la solubilité aqueuse des composés et permettre ainsi une meilleure inhibition de la prolifération cellulaire. En effet, il a été démontré l'importance de la présence de chaînes aminoalkoxy pour augmenter la solubilité aqueuse à pH 7,4 d'inhibiteurs du VEGFR.¹⁶⁴ Des études de solubilité ont donc été réalisées sur le composé **13** et son analogue **P24**, mais les résultats obtenus ne sont pas exploitables. Des études complémentaires seront effectuées ultérieurement.

A l'heure actuelle, le rôle des chaînes aminoalkoxy en position 7 de la quinazoline dans l'inhibition de la prolifération cellulaire cancéreuse n'a toujours pas été élucidé.

3. Inhibition de l'angiogenèse par les 7-aminoalkoxyquinazolines

Un des tests les plus fiables pour visualiser l'angiogenèse consiste en la mesure de la capacité des cellules endothéliales à former des structures tridimensionnelles (formation de capillaires). Afin d'évaluer et de comparer les différentes séries de 7-aminoalkoxyquinazolines, l'évaluation anti-angiogénique des composés **P24**, **2**, **4**, **7**, **10** et **13** a été réalisée à quatre concentrations (0,1 µM ; 1 µM ; 5 µM et 10 µM). Les résultats des 6 composés et du cédiranib (inhibiteur VEGFR/PDGFR) sont présentés dans la Figure 42.

¹⁶⁴ L. F. Hennequin *et al.*, *Journal of Medicinal Chemistry*, **2002**, 45, 1300-1312.

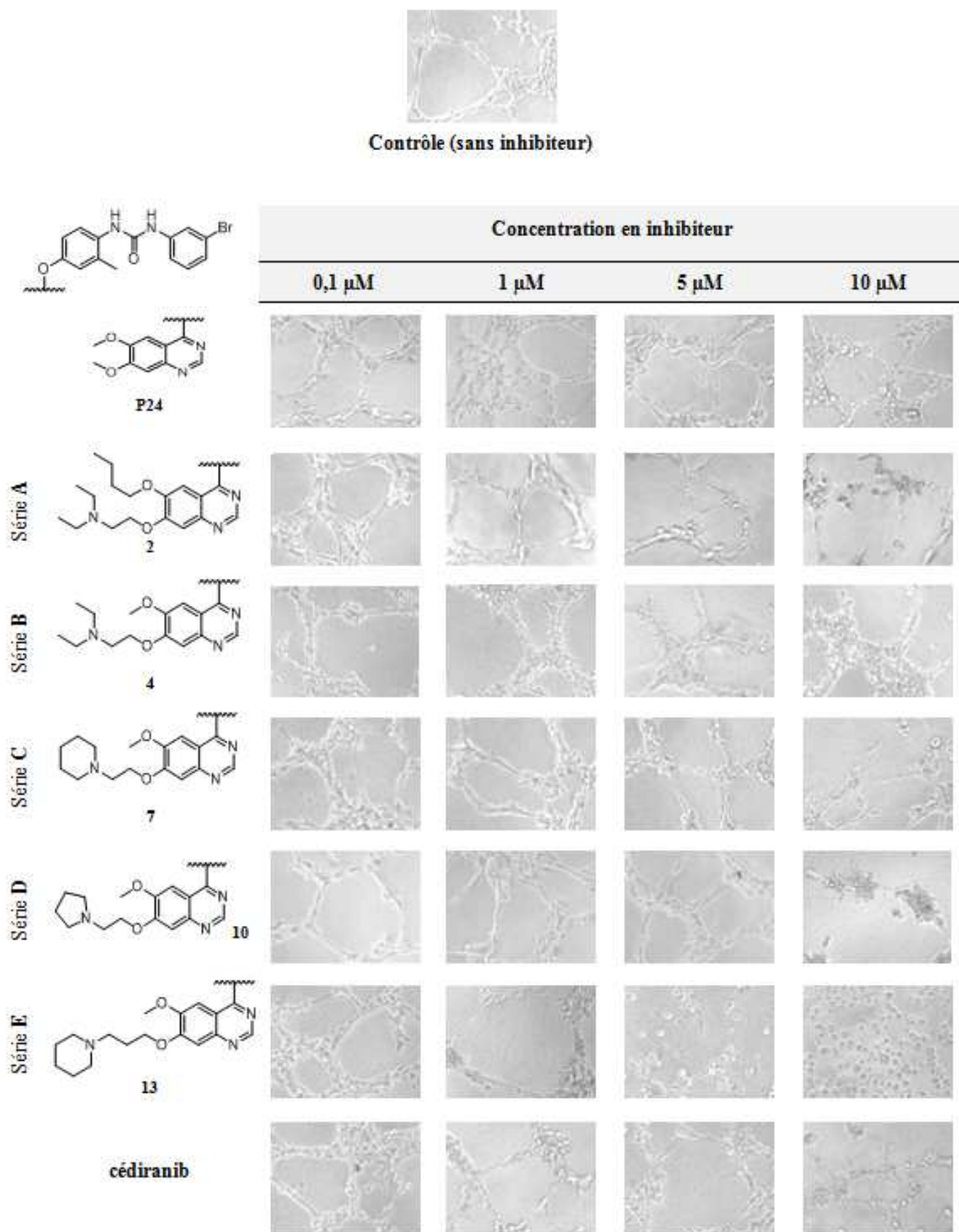


Figure 42 : Inhibition de la formation de capillaires par les produits P23, 2, 4, 7, 10 et 14

Après un certain temps d'incubation (dans notre test 6 heures) et en présence de Matrigel®, les cellules HUVEC forment des structures filamenteuses appelées capillaires (cf contrôle Figure 42). Si lors de l'incubation, un anti-angiogénique est ajouté au milieu, celui-ci freine la formation de ces capillaires.

D'après les photos de la Figure 42, on remarque que la formation des capillaires est dose-dépendante. En effet, l'organisation des capillaires est perturbée par quatre des molécules testées à 10 μM (**2**, **7**, **10** et **13**), alors qu'à 5 μM , seul le composé **13** empêche la formation des capillaires. Ce composé **13** appartenant à la série **E** présente un pouvoir anti-angiogénique intéressant et plus élevé que la référence (cédiranib).

4. Inhibition de l'invasion par les 7-aminoalkoxyquinazolines

Un test d'invasion en chambre de Boyden® a été réalisé sur les composés **P24**, **2**, **4**, **7**, **10** et **13** pour juger de leur capacité anti-migratoire. Les produits ainsi que la référence (cédiranib) ont été testés à trois concentrations (0,01 μM ; 0,1 μM et 1 μM) (Figure 43a).

La chambre de Boyden® est composée de deux compartiments séparés par un filtre muni de pores et recouvert d'une membrane basale (Matrigel®) à travers lequel les cellules HUVEC peuvent migrer. Après un temps donné, la membrane est récupérée et le nombre de cellules ayant pu la traverser est compté, ce qui permet de quantifier l'inhibition du pouvoir invasif des cellules (Figure 43b).

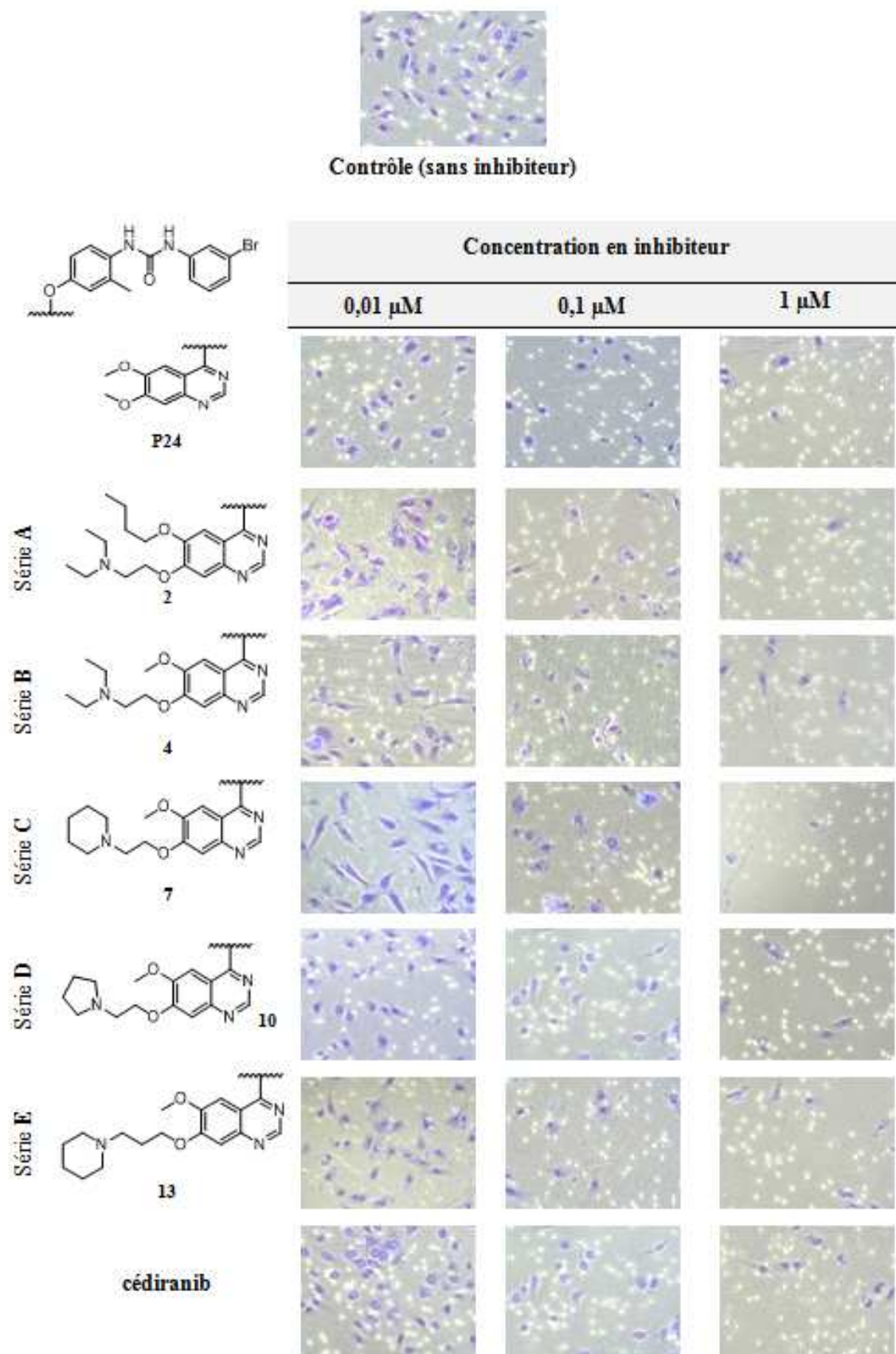


Figure 43a : Inhibition de l'invasion par les produits P23, 2, 4, 7, 10 et 14

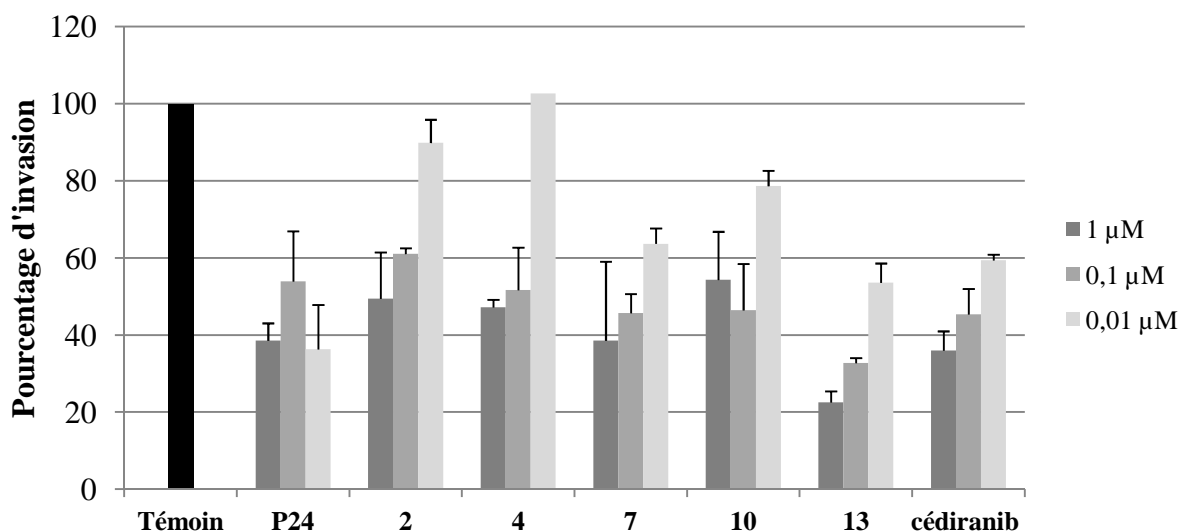
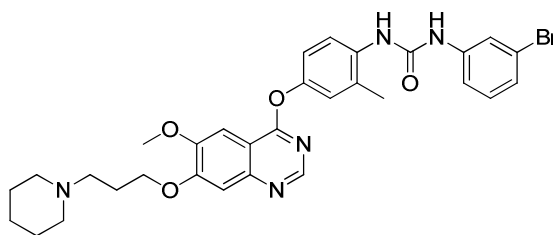


Figure 43b : Pourcentages d'invasion des produits P23, 2, 4, 7, 10 et 14

Le traitement de ces cellules HUVEC par les inhibiteurs a conduit à une diminution de l'invasion des cellules de manière dose-dépendante. Tous les composés testés présentent un pouvoir d'inhibition supérieur à 50% à 1 μM . A des doses plus faibles en inhibiteur (0,1 et 0,01 μM), le composé **13** présente un effet anti-migratoire équivalent voire supérieur au cédiranib.

Les différentes études pharmacologiques entreprises sur les 7-aminoalkoxyquinazolines ont permis de mettre en évidence un « hit » : le composé **13**.



Composé 13

Ce produit présente :

- des inhibitions sur VEGFR (1, 2 et 3), PDFR- β et c-Kit inférieures à 12 nM,
- des CI_{50} sur les lignées cellulaires cancéreuses PC3 (prostate), HT29 (côlon) et MCF7 (sein) de l'ordre du micromolaire et une CI_{50} sur HUVEC de 0,33 μM ,
- une sélectivité pour les cellules cancéreuses par rapport aux cellules saines MRC5,
- un pouvoir anti-angiogénique supérieur à celui du cédiranib,
- et un pouvoir anti-migratoire supérieur à celui du cédiranib.

Suite à la découverte de ce hit, nous avons souhaité approfondir les travaux autour de ce composé en étudiant notamment sa stabilité métabolique.

5. Etudes de stabilité du composé 13

La mesure des stabilités plasmatique et microsomiale du composé **13** et de son analogue **P24** ont été réalisées par Madame Catherine Piveteau au sein de la plateforme ADME du Pôle de Recherche Interdisciplinaire sur le Médicament (Lille).

5.1. Stabilité plasmatique

Les résultats de stabilité plasmatique sont représentés sur la Figure 44. Les produits **P24** et **13** présentent tous les deux une très bonne stabilité plasmatique aussi bien sur plasma murin que sur plasma humain. Leur temps de demi-vie est supérieur à 6 heures.

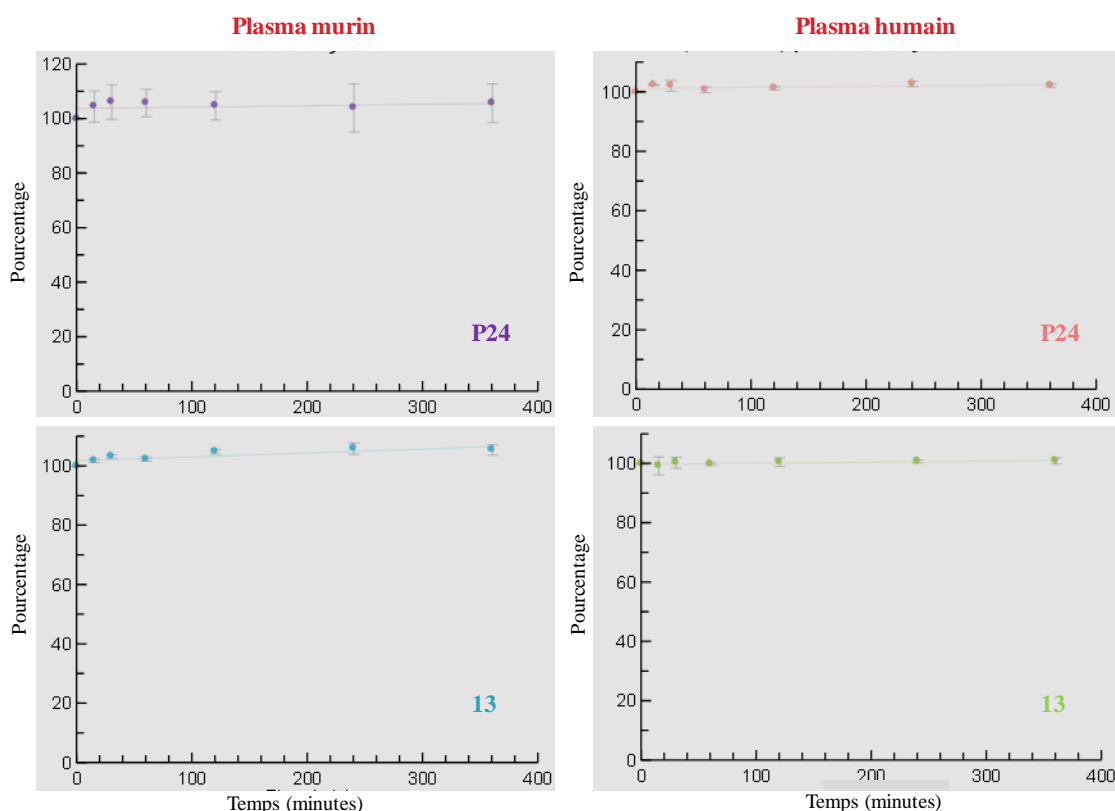


Figure 44 : Représentation graphique des résultats de stabilité plasmatique des composés P24 et 13

5.2. *Stabilité microsomiale*

Une seconde étude de stabilité a été réalisée sur microsomes de souris femelles et microsomes humains. Les résultats obtenus sont représentés sur la Figure 45.

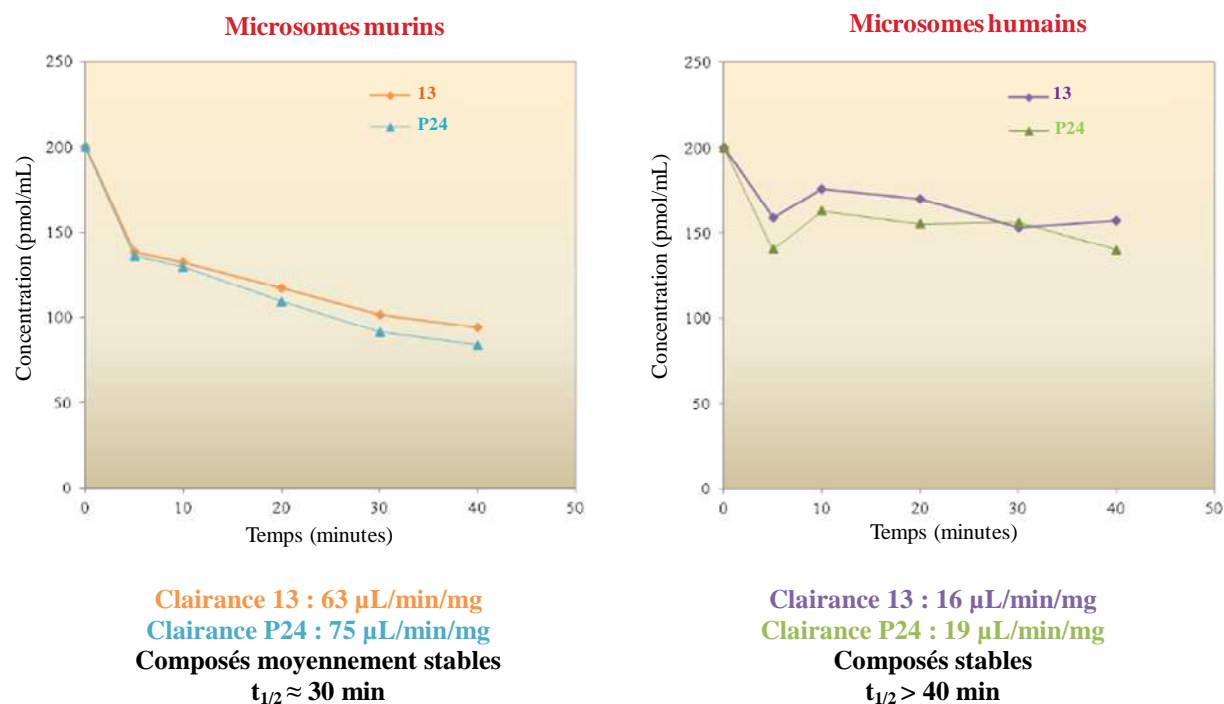


Figure 45 : Représentation graphique des résultats de stabilité microsomiale des composés P24 et 13

Les composés **P24** et **13** ont des clairances respectives de 75 et 63 $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ sur microsomes murins. Ces valeurs de clairance permettent d'affirmer que les deux produits sont moyennement stables sur microsomes murins. Leur temps de demi-vie est d'environ 30 minutes. Sur microsomes humains, les valeurs de clairance diminuent. Elles sont de 16 $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ pour le composé **13** et de 19 $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ pour le composé **P24**, ce qui indique que ces produits sont stables sur microsomes humains. Le temps de demi-vie des deux produits est supérieur à 40 minutes.

Conclusion

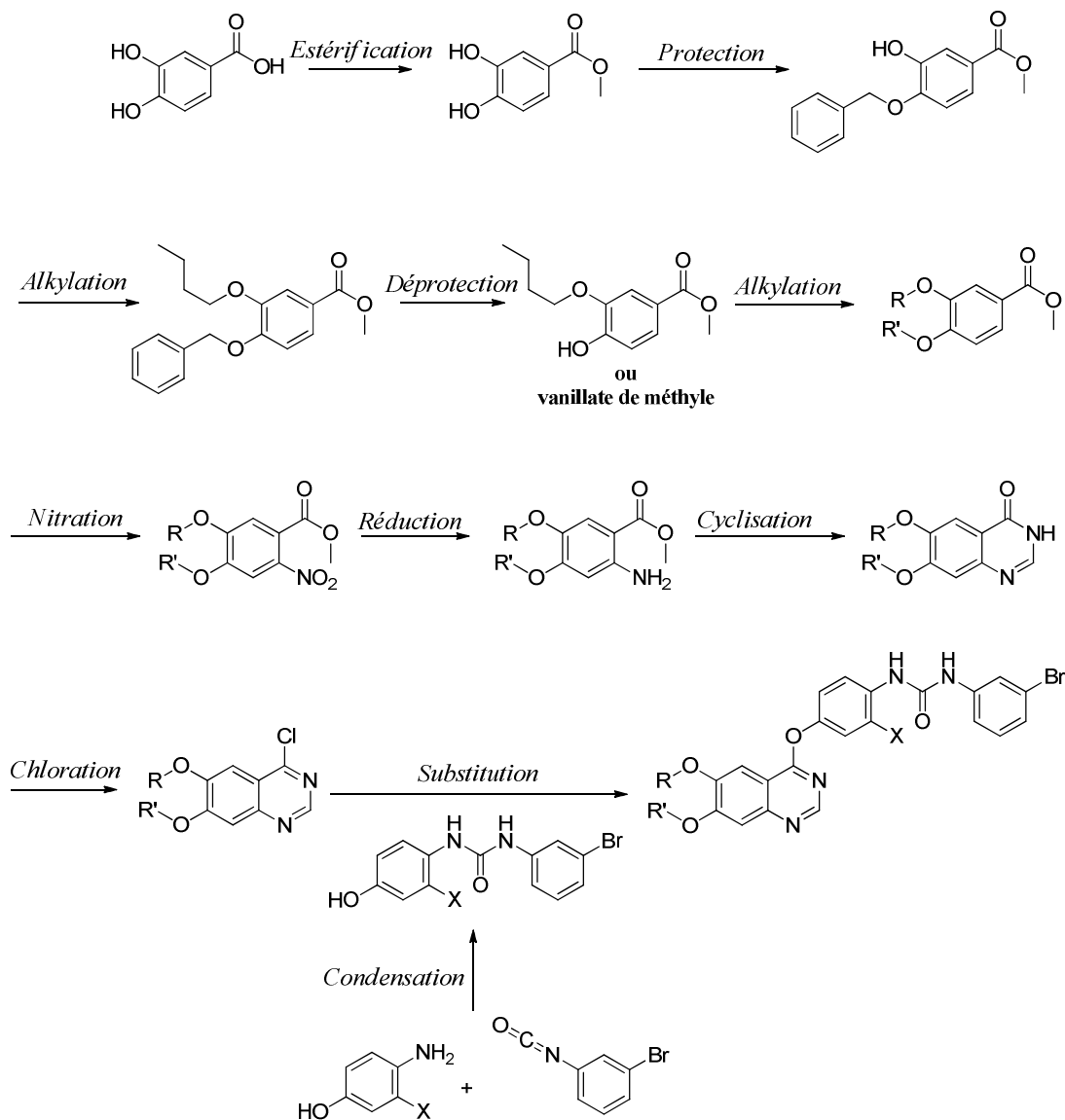
Les travaux sur les 7-aminoalkoxyquinazolines ont permis de découvrir de nouveaux inhibiteurs multikinase VEGFR, PDGFR et c-Kit possédant une activité antiproliférative de l'ordre du micromolaire sur trois lignées cellulaires cancéreuses. Les composés, et plus particulièrement le composé **13**, présentent des pouvoirs anti-angiogénique et anti-migratoire

équivalent au cédiranib, inhibiteur multikinase de référence. Le composé **13** est stable sur le plasma et les microsomes humains, ce qui fait de lui un candidat-médicament potentiel.

Le rôle des chaînes aminoalkoxy dans l'inhibition de la prolifération cellulaire cancéreuse reste toutefois à élucider.

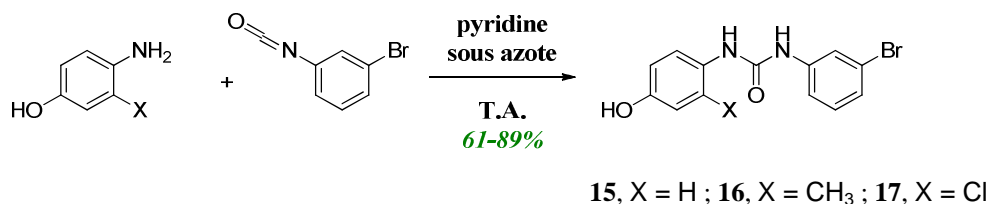
III. SYNTHÈSE DES COMPOSÉS DE TYPE 7-AMINOALKOXYQUINAZOLINIQUES

La synthèse des cinq séries de 7-aminoalkoxyquinazolines (A-E) suit le schéma général suivant :

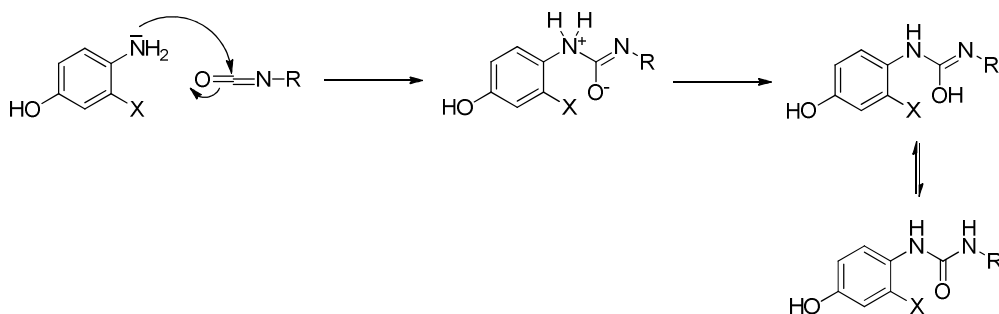


série A : R = OBU, R' = diéthylaminoéthoxy;
 série B : R = OMe, R' = diéthylaminoéthoxy;
 série C : R = OMe, R' = pipéridinoéthoxy;
 série D : R = OMe, R' = pyrrolidinoéthoxy;
 série E : R = OMe, R' = pipéridinoéthoxy.

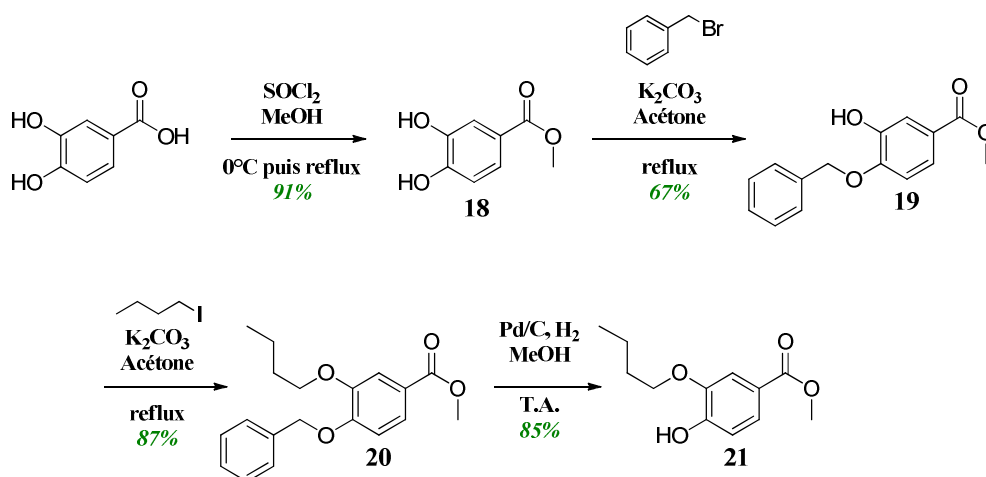
La première partie de cette stratégie de synthèse consiste à introduire les chaînes aminoalkoxy sur l'aromatique. Puis, après une étape d'hétérocyclisation formant la quinazolinone, le dérivé chloré en 4 est obtenu par une réaction de chloration. Enfin une étape de substitution permet d'obtenir les produits cibles.

1. Synthèse des phénols substitués par un motif urée (15-17)

Les motifs de type urée sont préparés à partir du dérivé aminophénol (1 éq) souhaité et du 3-bromophénylisocyanate (1 éq). La réaction de condensation se réalise à température ambiante dans la pyridine sous atmosphère inerte.¹⁶⁵ Les produits **15**, **16** et **17** sont obtenus avec des rendements respectifs de 71%, 89% et 61%.

Mécanisme réactionnel**2. Synthèse du 3-butoxy-4-hydroxybenzoate de méthyle (21)**

Le 3-butoxy-4-hydroxybenzoate de méthyle (**21**) s'obtient en 4 étapes à partir de l'acide 3,4-dihydroxybenzoïque commercial.



¹⁶⁵ H. M. Osborn et N. A. Williams, *Organic Letters*, **2004**, 6, 3111-3113.

- **Estérification**

La première étape de cette stratégie de synthèse consiste à réaliser l'estérification de l'acide 3,4-dihydroxybenzoïque. Cette étape est réalisée dans le méthanol en présence de chlorure de thionyle tout d'abord à 0°C puis à reflux.¹⁶⁶ L'ester **18** est obtenu avec un rendement de 91%.

- **Protection**

L'étape de protection sélective du groupement hydroxyle en position 4 est réalisée à l'aide du bromure de benzyle en présence de trois équivalents de carbonate de potassium dans l'acétone à reflux. Bien que la *O*-alkylation en *para* soit influencée par le groupement ester, le fait de diluer le milieu permet de multiplier le rendement de la réaction par deux. Le produit attendu **19** est ainsi obtenu avec un rendement de 67%.

- **Alkylation**

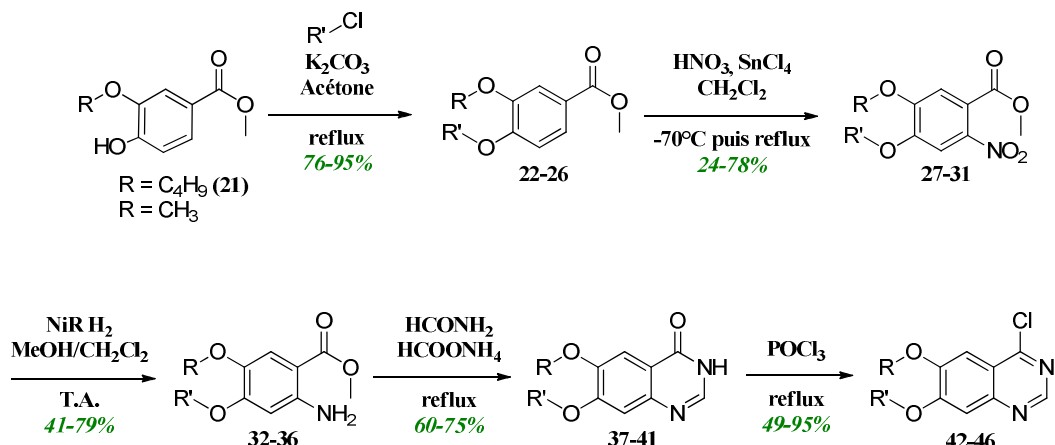
La *O*-alkylation de l'hydroxyle libre de l'intermédiaire **19** est effectuée à l'aide du 1-iodobutane, en présence de carbonate de potassium dans l'acétone à reflux (87%).

- **Déprotection**

Le 3-butoxy-4-hydroxybenzoate de méthyle **21** est obtenu par hydrogénolyse du groupe benzyle avec un rendement de 85%. Cette étape de déprotection est effectuée en présence de palladium activé sur charbon dans le méthanol à pression atmosphérique sous hydrogène.

¹⁶⁶ A. Hassner *et al.*, *Tetrahedron Letters*, **1978**, 19, 4475-4478.

3. Synthèse des dérivés chlorés (42-46)



série A : $\text{R} = \text{OBu}$, $\text{R}' = \text{diéthylaminoéthoxy}$;
 série B : $\text{R} = \text{OMe}$, $\text{R}' = \text{diéthylaminoéthoxy}$;
 série C : $\text{R} = \text{OMe}$, $\text{R}' = \text{pipéridinoéthoxy}$;
 série D : $\text{R} = \text{OMe}$, $\text{R}' = \text{pyrrolidinoéthoxy}$;
 série E : $\text{R} = \text{OMe}$, $\text{R}' = \text{pipéridinoéthoxy}$.

La synthèse des dérivés chlorés s'effectue en 5 étapes à partir du composé **21** ou du vanillate de méthyle commercial.

Alkylation

La première étape consiste en l'éthérisation du vanillate de méthyle ou de l'intermédiaire **21** en position 4. Cette étape est effectuée dans l'acétone à reflux durant 16 heures, en présence de quatre équivalents de carbonate de potassium, et d'un équivalent du dérivé aminé chloré approprié (Tableau 14).

Série	Produit de départ	Dérivé aminé chloré	Composé	Rdt
A	21	chlorhydrate de la 2-chloroéthyl- <i>N,N</i> -diéthylamine	22	92%
B	vanillate de méthyle	chlorhydrate de la 2-chloroéthyl- <i>N,N</i> -diéthylamine	23	76%
C	vanillate de méthyle	chlorhydrate de la 2-chloroéthyl-pipéridine	24	95%
D	vanillate de méthyle	chlorhydrate de la 2-chloroéthyl-pyrrolidine	25	89%
E	vanillate de méthyle	chlorhydrate de la 3-chloropropyl-pipéridine	26	94%

Tableau 14 : Rendements des produits 22 à 26

▪ Nitration

La nitration sélective en position 6 des dérivés **22** à **26** est réalisée dans le dichlorométhane durant 8 heures, en présence de tétrachlorure d'étain (3 éq) et d'acide nitrique fumant (3 éq).¹⁶⁷

Le tétrachlorure d'étain, acide de Lewis, agit avec l'un des doublets de l'oxygène de l'acide nitrique pour former l'ion nitronium. Une fois formé dans le milieu réactionnel, l'ion nitronium attaque sélectivement en position 6 du fait des effets électroniques des différents substituants du cycle benzénique.

La position du groupement nitro a été confirmée par l'analyse du spectre ¹H RMN. Les dérivés nitrés **27** à **31** sont obtenus avec des rendements de 24 à 78% selon les différentes séries.

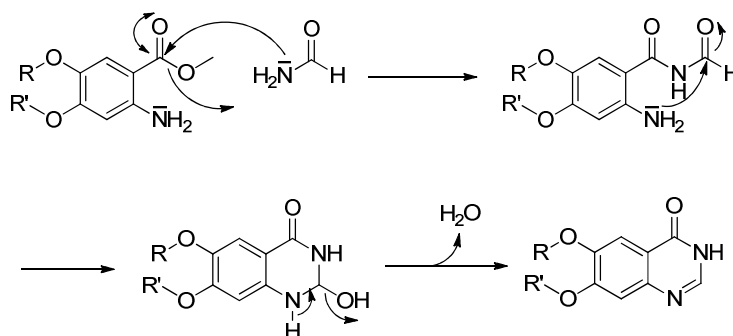
▪ Réduction

Les composés **32** à **36** sont ensuite obtenus par réduction du groupement nitro des composés **27** à **31**. Une réduction catalytique en présence de nickel de Raney sous hydrogène à température ambiante durant environ 5 heures a permis d'obtenir les dérivés désirés avec des rendements compris entre 41 et 79%.

▪ Cyclisation

L'hétérocyclisation des composés **32** à **36** est réalisée en présence de formamide (5 éq) et de formiate d'ammonium (3 éq) qui catalyse la réaction. Le milieu réactionnel est chauffé à 140°C pendant 16 heures.¹⁶⁸ Les quinazolinones formées (**37-41**) sont obtenues avec des rendements compris entre 60 et 75% après hydrolyse et neutralisation du milieu.

Mécanisme réactionnel

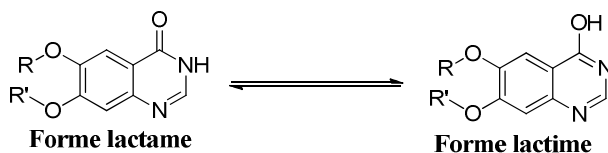


¹⁶⁷ D. E. Thurston *et al.*, *Journal of Organic Chemistry*, **1996**, 61, 8141-8147.

¹⁶⁸ M. Robba *et al.*, *Bulletin de la Société Chimique de France*, **1970**, 10, 3630-3636.

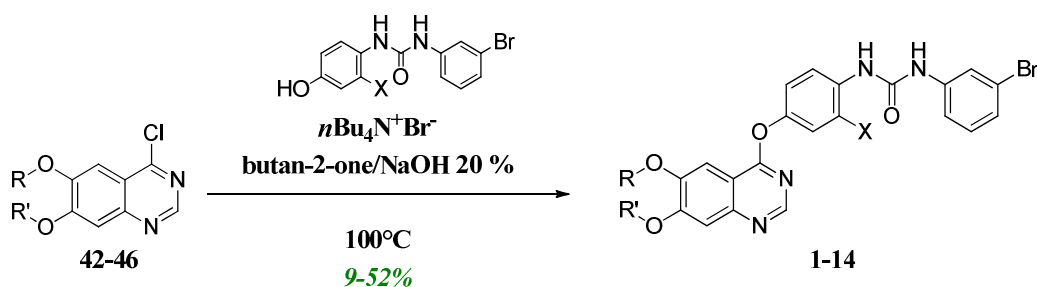
▪ Chloration

Les quinazolinones formées sont présentes dans le milieu sous deux formes tautomères : forme lactame et forme lactime. La forme lactime peut réagir avec des réactifs de chloration tels que l'oxychlorure de phosphore, pour donner un dérivé chloré.¹⁶⁹



Les composés **37** à **41** sont mis en réaction avec de l'oxychlorure de phosphore (plus de 20 éq) durant 2 heures. Après alcalinisation du milieu, les produits chlorés **42** à **46** sont obtenus avec des rendements de 49 à 95%.

4. Synthèse des produits cibles (1-14)

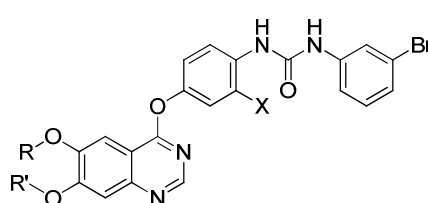


L'étape de substitution nucléophile est réalisée en présence d'un catalyseur de transfert de phase, le bromure de *N*-tétrabutylammonium.¹⁷⁰ Le mélange soude/butan-2-one ainsi que le catalyseur favorisent la formation du phénolate. Les différents produits cibles (**1-14**) sont obtenus avec des rendements relativement faibles (9 à 52%) (Tableau 15). Ces rendements sont causés par le manque de solubilité rendant la purification des produits difficile.

Les produits **6** et **13** sont obtenus sous forme de chlorhydrate par précipitation, à l'aide d'une solution d'isopropanol saturée en HCl 12N.

¹⁶⁹ A. L. Ruchelman *et al.*, *Journal of Medicinal Chemistry*, **2005**, 48, 792-804.

¹⁷⁰ T. Furuta *et al.*, *Journal of Medicinal Chemistry*, **2006**, 49, 2186-2192.



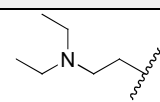
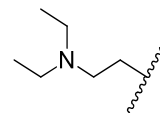
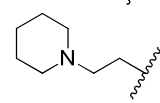
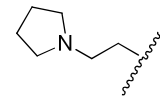
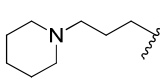
Série	R	R'	X		
			H	CH ₃	Cl
A	C ₄ H ₉		1 22%	2 52%	-
B	CH ₃		3 15%	4 28%	5 13%
C	CH ₃		6 (.HCl) 15%	7 12%	8 13%
D	CH ₃		9 24%	10 25%	11 9%
E	CH ₃		12 26%	13 (.HCl) 18%	14 21%

Tableau 15 : Rendements des produits cibles 1 à 14

MODULATION DE LA POSITION 2 DE LA QUINAZOLINE

1,2,3-BENZOTRIAZINES

2-AMINOQUINAZOLINES

2-MÉTHYLAMINOQUINAZOLINES

- CONCEPTION

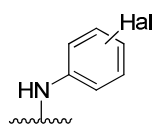
- ÉVALUATIONS PHARMACOLOGIQUES

- STRATÉGIE DE SYNTHÈSE

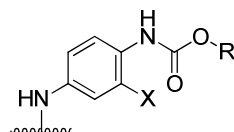
I. TRAVAUX DE MODULATION DE LA POSITION 2 DE LA QUINAZOLINE

Les travaux antérieurs menés au sein du laboratoire ont pu mettre en évidence les groupements essentiels à substituer en position 4 de la quinazoline afin d'inhiber l'EGFR et le VEGFR-2 à de faibles concentrations.

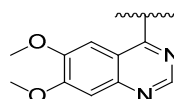
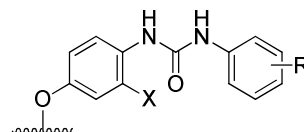
Inhibiteurs EGFR



Inhibiteurs mixtes EGFR/VEGFR-2



Inhibiteurs VEGFR-2



Peu de travaux ont été effectués en position 2 de la quinazoline, aussi bien au sein du laboratoire que dans la littérature. Nous avons donc choisi de moduler la quinazoline en cette position 2 tout en gardant les éléments pharmacophoriques nécessaires à l'inhibition de l'EGFR et/ou du VEGFR-2.

Dans un premier temps, nous avons envisagé d'ajouter un motif aminé en position 2 de la quinazoline. Le choix de la nature du substituant s'est fait en accord avec des travaux décrits dans la littérature sur des hétérocycles azotés de type indolopyrimidiniques et pyrrolopyrimidiniques.^{171, 172} Ces études montrent que l'inclusion d'un groupe amino en position 2 de tels hétérocycles améliore l'inhibition des RTK (EGFR et VEGFR-2) et augmente l'activité anti-angiogénique.¹⁷³

Nous avons également envisagé la conception de composés benzo-[d]-1,2,3-triaziniques (homologues inférieurs) et 2-aminométhylquinazoliniques (homologues supérieurs).

¹⁷¹ A. Gangjee *et al.*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2013**, 21, 1857-1864.

¹⁷² A. Gangjee *et al.*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2013**, 21, 1312-1323.

¹⁷³ A. Gangjee *et al.*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2010**, 20, 3177-3181.

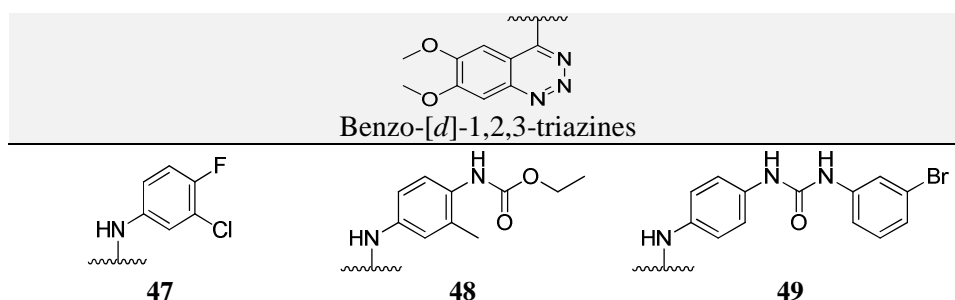
Ces nouveaux composés (2-aminoquinazolines, benzo-[*d*]-1,2,3-triazines et 2-aminométhylquinazolines) pourraient engendrer des liaisons hydrogène (donneur ou accepteur) supplémentaires avec les sites actifs des récepteurs.

Afin d'évaluer les variations entre chaque série chimique, nous avons sélectionné et fixé plusieurs groupements en position 4 :

- des motifs anilino ou aryloxy substitués par des halogènes,
- des motifs anilino ou aryloxy substitués par des groupements carbamate,
- des motifs anilino ou aryloxy substitués par des motifs urée aromatique.

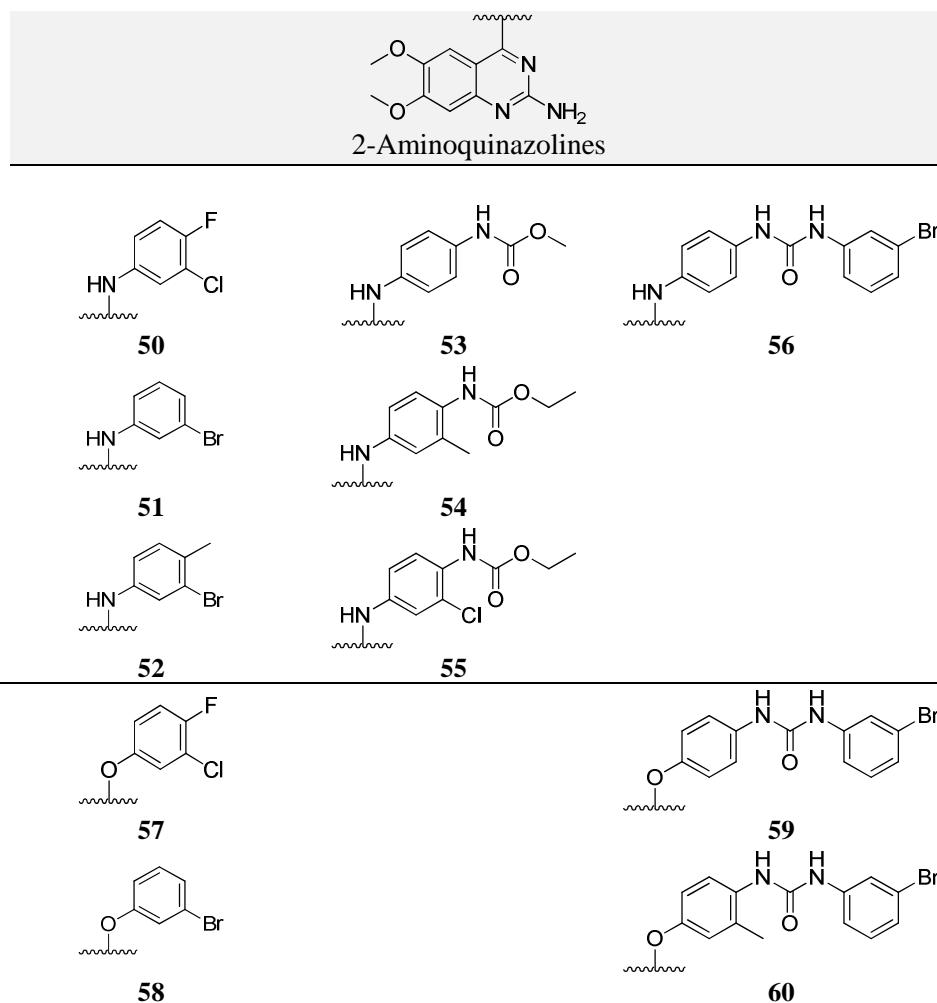
Trois séries (**F**, **G** et **H**) de composés ont donc été conçues, synthétisées et évaluées pharmacologiquement.

Série **F** :



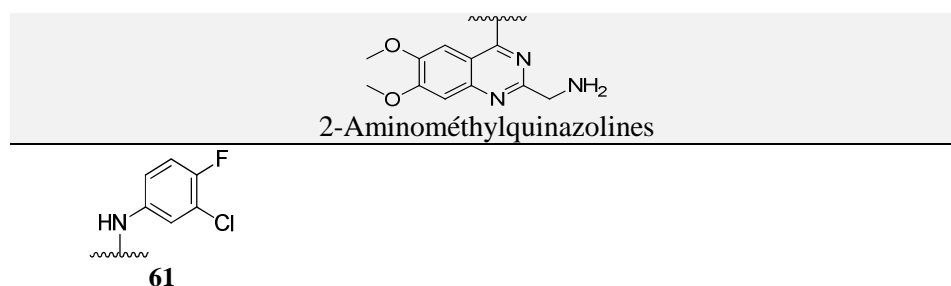
Les problèmes de synthèse rencontrés ne nous ont pas permis d'aboutir au 4-aryloxy-benzo-[*d*]-1,2,3-triazines.

Série G :



Les problèmes de synthèse rencontrés ne nous ont pas permis d'aboutir au 2-amino-4-aryloxyquinazolines substituées par un motif carbamate.

Série H :



Suite aux problèmes de synthèse rencontrés, nous n'avons obtenu à l'heure actuelle qu'un seul produit dans cette série chimique.

II. RÉSULTATS PHARMACOLOGIQUES

1. Résultats pharmacologiques des benzo-[d]-1,2,3-triazines

Trois composés (**47-49**) ont été évalués pharmacologiquement pour leur inhibition enzymatique (EGFR et VEGFR-2) et pour leur inhibition de la prolifération cellulaire (PC3, HT29, MCF7 et HUVEC). Les résultats des composés **47**, **48** et **49** ainsi que ceux de leurs analogues en série quinazolinique sont représentés dans le Tableau 16.

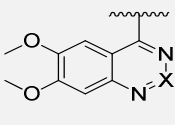
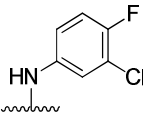
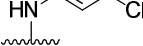
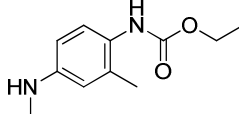
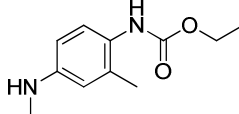
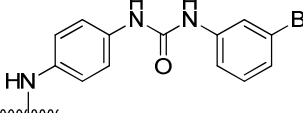
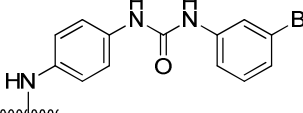
 X	CI ₅₀ en nM		CI ₅₀ en μM ou pourcentage d'inhibition à 10 μM			
	EGFR	VEGFR-2	PC3, prostate	HT29, côlon	MCF7, sein	HUVEC
vandétanib	800	70	7,3	1,8	9,6	4,4
 CH P4	400	5 300	6,6	6,7	4,9	N.D.
 N 47	70	> 10 000	> 10	> 10	> 10	> 10
 CH P10	900	500	> 10	> 10	> 10	> 10
 N 48	> 10 000	> 10 000	> 10	> 10	> 10	> 10
 CH P36	7 720	12	5,6	4,4	5,9	97%
 N 49	999	2 410	> 10	> 10	> 10	> 10

Tableau 16 : Résultats enzymatiques et cellulaires des produits **47**, **48** et **49**

Discussion

Le composé **47** présente une sélectivité pour l'EGFR *versus* VEGFR-2 avec une CI₅₀ sur EGFR très intéressante (CI₅₀ = 70 nM). Cependant, contrairement à son analogue **P4**, le composé **47** ne présente aucune inhibition de la prolifération cellulaire (CI₅₀ > 10 μM).

Le dérivé **48** substitué par un carbamate ne montre aucune inhibition enzymatique et cellulaire à 10 μM.

Le motif urée en série benzotriazinique permet, quant à lui, une inhibition mixte. En effet, contrairement au composé aryloxy **P36** présentant une sélectivité pour le VEGFR-2, le composé **49** présente des CI_{50} équivalentes sur l'EGFR et le VEGFR-2.

Conclusion

De manière générale, l'ajout d'un azote intracyclique est défavorable pour l'inhibition de la prolifération cellulaire ($CI_{50} > 10 \mu\text{M}$ pour les trois composés). Néanmoins, l'ajout de cet azote a permis d'obtenir des résultats intéressants sur les récepteurs. En effet, la substitution de la benzotriazine par une aniline halogénée a provoqué une excellente inhibition de l'EGFR (70 nM). D'autre part, la fonctionnalisation de la benzotriazine en position 4 par un motif anilino-urée aromatique permet une inhibition mixte EGFR/VEGFR-2 (composé **49**).

2. Résultats pharmacologiques des 2-aminoquinazolines

2.1. Résultats pharmacologiques des 2-amino-4-anilinoquinazolines

2.1.a. Résultats d'inhibitions enzymatique et cellulaire

Le pouvoir inhibiteur enzymatique (EGFR et VEGFR-2) et le pouvoir anti-prolifératif (PC3, HT29, MCF7, HUVEC) des 2-amino-4-anilinoquinazolines ont été évalués. Les résultats des composés **50** à **56** ainsi que ceux de leurs analogues en série quinazolinique sont représentés dans le Tableau 17.

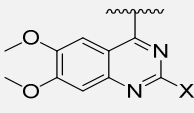
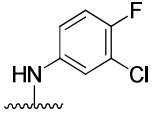
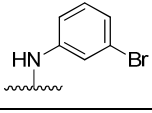
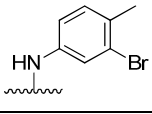
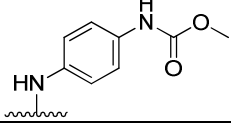
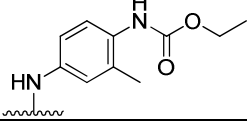
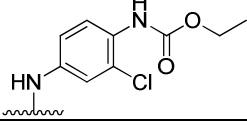
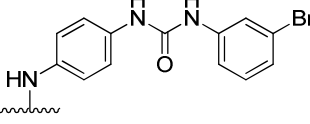
 X		CI ₅₀ en nM		CI ₅₀ en μM ou pourcentage d'inhibition à 10 μM				
		EGFR	VEGFR-2	PC3, prostate	HT29, côlon	MCF7, sein	HUVEC	
vandétanib		800	70	7,3	1,8	9,6	4,4	
	H	P4	400	5 300	6,6	6,7	4,9	N.D.
	NH ₂	50	130	> 10 000	> 10	6,2	4,6	95%
	H	PD153035	0,5	420	> 10	> 10	> 10	92%
	NH ₂	51	1 800	> 10 000	> 10	3,7	6,0	3,9
	H	P37	560	> 10 000	> 10	> 10	> 10	N.D.
	NH ₂	52	2 640	> 10 000	4,8	3,1	3,6	100%
	H	P38	6 900	5 810	> 10	> 10	> 10	> 10
	NH ₂	53	> 10 000	> 10 000	7,6	7,1	8,6	6,6
	H	P10	900	500	> 10	> 10	> 10	> 10
	NH ₂	54	> 10 000	> 10 000	> 10	7,2	7,0	> 10
	H	P11	900	600	9,8	> 10	> 10	> 10
	NH ₂	55	> 10 000	> 10 000	6,0	3,6	2,0	4,7
	H	P36	7 720	12	5,6	4,4	5,9	97%
	NH ₂	56	5 030	4 790	9,4	6,2	> 10	> 10

Tableau 17 : Résultats enzymatiques et cellulaires des produits 50 à 56

Discussion

Les composés halogénés **50**, **51** et **52** présentent une sélectivité pour l'EGFR *versus* VEGFR-2 comme leurs analogues respectifs **P4**, **PD153035** et **P37**. Cependant une forte diminution de l'activité inhibitrice de l'EGFR est observée pour le composé **51**. Ces 2-amino-4-anilinoquinazolines halogénées montrent une inhibition de la prolifération cellulaire intéressante avec des valeurs de CI₅₀ de l'ordre du micromolaire contrairement à leurs homologues quinazoliniques.

La substitution de la position 2 par une amine sur des quinazolines substituées par un motif carbamate (**53**, **54** et **55**) conduit à une chute de l'inhibition enzymatique sur EGFR et VEGFR-2 (CI₅₀ > 10 μM). Néanmoins, malgré leur manque d'affinité pour les deux enzymes,

ces composés montrent un pouvoir antiprolifératif intéressant sur les lignées cellulaires cancéreuses et sur HUVEC (les CI_{50} sont en cours de détermination sur cette lignée).

Le composé **56** inhibe l'EGFR et le VEGFR-2 avec des valeurs respectives de 5,03 et 4,79 μ M. Il montre une inhibition de la prolifération cellulaire plus faible que le produit **P36**.

Conclusion

L'ajout d'un motif amine en position 2 de la quinazoline a provoqué une diminution de l'inhibition de l'EGFR et du VEGFR-2. Cependant, les dérivés halogénés (**50-52**) gardent une inhibition de l'ordre du micromolaire sur l'EGFR et présentent des inhibitions de la prolifération cellulaire cancéreuse très intéressantes. La 2-aminoquinazoline **56** fonctionnalisée par une urée permet une inhibition mixte EGFR/VEGFR-2. Les dérivés fonctionnalisés par un carbamate (**53-55**) perdent, quant à eux, toute affinité pour les deux récepteurs. Leur pouvoir antiprolifératif reste malgré tout intéressant, laissant croire que ces 2-aminoquinazolines agissent sur une autre cible cellulaire.

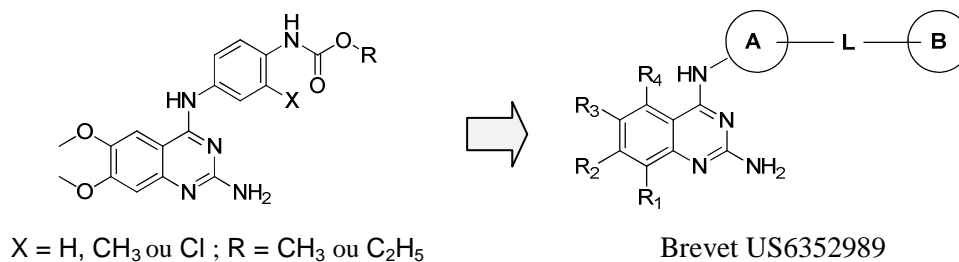
2.1.b. Identification de la cible des 2-amino-4-anilinoquinazolines **53**, **54** et **55**

▪ **Inhibition d'autres kinases**

La structure 4-anilinoquinazolinique étant largement représentée parmi les ITKs, nous avons pensé que les composés **53**, **54** et **55** pouvaient agir sur d'autres kinases que l'EGFR et le VEGFR-2. Afin de valider cette hypothèse, le composé présentant la plus forte cytotoxicité sur les trois lignées cellulaires cancéreuses, le produit **55**, a été testé sur un panel de sept kinases (VEGFR-1, VEGFR-2, PDGFR- β , c-Kit, Src, c-Met et Raf). Toutes les inhibitions de ces kinases se sont révélées être supérieures à 10 μ M.

▪ **Inhibition de phosphodiésterases**

Au vue de l'analogie entre nos structures et des inhibiteurs de phosphodiésterases décrits dans la littérature, nous avons testé nos molécules sur plusieurs isoformes de phosphodiésterases (PDEs).



Les PDEs sont codées par 21 gènes chez l'homme et sont divisées en 11 familles. Au cours de la transduction du signal intracellulaire, les PDEs jouent un rôle fondamental dans la régulation des nucléotides cycliques comme l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc). L'AMPc est connue pour avoir une action anti-mitogène sur la croissance des cellules. Une des stratégies utilisées pour augmenter l'action de l'AMPc consiste à augmenter sa concentration intracellulaire en inhibant sa dégradation par les PDEs. Les inhibiteurs de PDEs constituent donc de nouveaux agents dans le traitement du cancer (Figure 46).

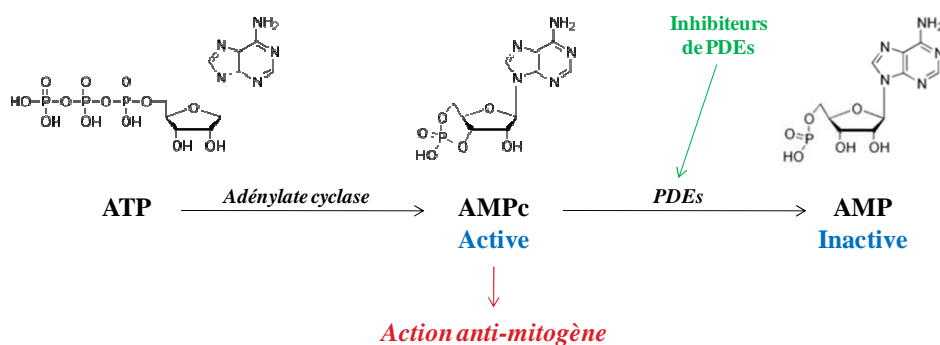


Figure 46 : Schéma simplifié de l'action des inhibiteurs de PDEs

L'inhibition des PDEs et plus spécifiquement des PDEs 4 se révèle avoir une action positive sur l'inhibition de la prolifération cellulaire.^{174,175,176} Les composés **53**, **54** et **55** ont donc été testés en tant qu'inhibiteurs sur les PDEs 4, mais aussi sur les isoformes 3 et 5. Afin de juger de l'importance de l'amine en position 2, leurs analogues **P38**, **P10** et **P11** ont également été testés. Les composés halogénés **51** et **PD153035** ont été ajoutés au testing pour évaluer le rôle du motif carbamate. Cette étude a été réalisée par nos soins au CNRS de Strasbourg grâce à un test radiomarqué (³H AMPc) (Tableau 18).

¹⁷⁴ P. Goldhoff *et al.*, *Clinical Cancer Research*, **2008**, 14, 7717-7725.

¹⁷⁵ M. Narita *et al.*, *Oncology Reports*, **2007**, 17, 1133-1139.

¹⁷⁶ R. Sengupta *et al.*, *Trends in Pharmacological Sciences*, **2011**, 32, 337-344.

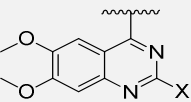
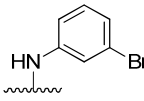
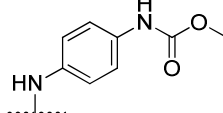
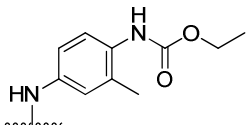
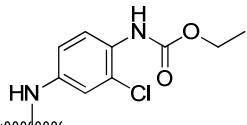
	X	Pourcentage d'inhibition à 10 μ M			
			<i>PDE3</i>	<i>PDE4</i>	<i>PDE5</i>
	H	PD153035	30%	26%	83%
	NH ₂	51	20%	18%	54%
	H	P38	10%	9%	7%
	NH ₂	53	14%	0%	14%
	H	P10	12%	17%	8%
	NH ₂	54	7%	2%	9%
	H	P11	13%	27%	28%
	NH ₂	55	15%	18%	16%

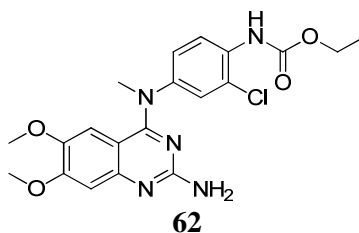
Tableau 18 : Résultats d'inhibition enzymatique des PDEs 3, 4 et 5

Les résultats d'inhibition à 10 μ M sont faibles traduisant une non-inhibition des PDEs par les composés testés. Sur l'isoforme PDE 5, les composés halogénés **51** et **PD153035** présentent cependant des inhibitions supérieures à 50%. Des CI₅₀ pour ces deux produits ont donc été calculées. Les produits présentent respectivement des CI₅₀ de 7,5 et 3,5 μ M sur le PDE 5.

Les résultats sur kinases et PDEs n'étant pas concluants, nous avons poursuivi la recherche de la cible en réalisant des tests d'interaction avec l'ADN. Ces derniers ont été effectués en collaboration avec Madame Baldeyrou (Inserm U837, Lille), ainsi qu'avec Madame Schifano et Monsieur Goossens (Faculté de Pharmacie, Lille).

▪ Interaction avec l'ADN

Les études antérieures menées au sein du laboratoire ont prouvé que la méthylation de l'aniline en position 4 provoque un gain du pouvoir intercalant de l'ADN. Ainsi, un nouveau composé méthylé (**62**) a été synthétisé afin d'évaluer l'influence de la méthylation en série 2-aminoquinazolinique sur l'ADN. Le composé **62** correspond à l'analogue du produit **55**.



L'interaction de nos composés avec l'ADN a été étudiée par des études qualitatives (dénaturation thermique de l'ADN et dichroïsme circulaire) et par des études quantitatives (étude par fluorescence).

Test de dénaturation thermique de l'ADN

Le test de dénaturation thermique consiste à enregistrer des variations des propriétés d'absorbance reflétant un changement conformationnel de la molécule d'ADN. La double hélice d'ADN possède une absorption propre qui est mesurée à 260 nm. L'étude de l'absorbance de la molécule d'ADN en fonction de la température permet de tracer une courbe dont la progression est sigmoïde. Le point d'inflexion de cette courbe appelé température de dénaturation correspond à la température pour laquelle l'ADN est présent à 50% sous la forme double hélice et à 50% sous la forme de deux brins séparés. Dans des conditions expérimentales fixées, cette valeur est voisine de 61°C pour le ctDNA (*calf thymus DNA*).

L'interaction d'un ligand avec l'ADN entraîne généralement une stabilisation de la double hélice, ce qui se traduit par une augmentation de la température de dénaturation. La différence entre la température de dénaturation de l'ADN seul et celle de l'ADN en présence de ligand est notée ΔT_m . En comparant les valeurs de ΔT_m de différentes molécules d'une série chimique, il est alors possible de caractériser leurs affinités respectives pour l'ADN (Figure 47).

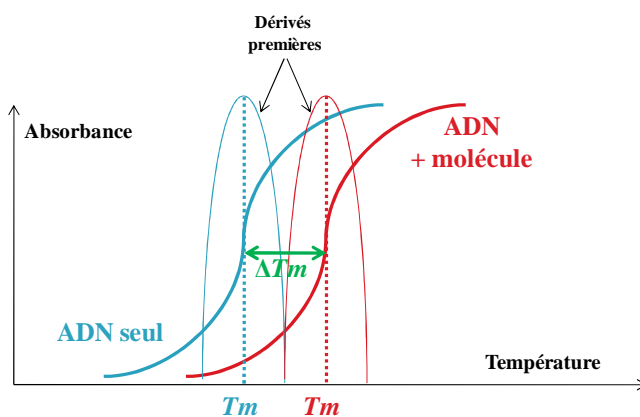


Figure 47 : Représentation schématique de la mesure d'absorbance de l'ADN ou du complexe ADN/ligand en fonction de la température

Le Tableau 19 ci-dessous représente les valeurs de ΔT_m obtenues à une concentration de 20 μM d'ADN. L'agent intercalant **EBE-A22** a été utilisé comme référence.

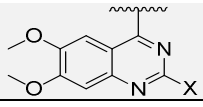
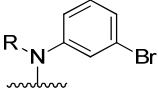
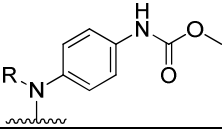
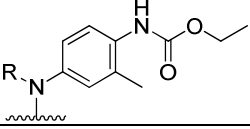
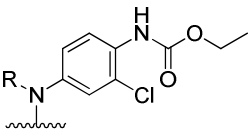
	R	X		ΔT_m en °C (r = 1)
EBE-A22				<i>ctDNA</i>
	H	H	PD153035	0,2
	H	NH ₂	51	1,0
	H	H	P38	0,1
	H	NH ₂	53	2,8 ± 0,3
	H	H	P10	0
	H	NH ₂	54	2,7 ± 0,3
	H	H	P11	0
	H	NH ₂	55	8,1 ± 0,8
	CH ₃	NH ₂	62	6,3 ± 0,6

Tableau 19 : Valeurs de ΔT_m obtenues pour les 2-amino-4-anilinoquinazolines

La valeur de ΔT_m obtenue pour le composé de référence **EBE-A22** est de 8,1°C. Les valeurs de ΔT_m mesurées pour les composés quinazoliniques sont égales ou proches de 0°C, démontrant aucune interaction de ces composés avec l'ADN. La 2-aminoquinazoline halogénée **51** n'interagit pas avec la double hélice comme le démontre son faible ΔT_m . A l'inverse, les dérivés 2-aminoquinazoliniques substitués par un motif carbamate (**53**, **54** et **55**) présentent des valeurs de ΔT_m supérieures à leur analogues quinazoliniques. Le composé **55** montre une affinité pour l'ADN équivalente à celle du composé de référence ($\Delta T_m \approx 8^\circ\text{C}$). Cette étude met en évidence l'importance de la présence d'un motif carbamate sur l'hétérocycle 2-aminoquinazolinique pour permettre une interaction avec les bases de l'ADN. Contrairement à la série quinazolinique, la méthylation en position 4 des 2-aminoquinazolines conduit à une diminution de l'affinité pour l'ADN, comme le montre la valeur de ΔT_m du composé **62**.

Malgré la forte homologie de structure entre les composés **P11**, **55** et **62**, les résultats obtenus lors du test de dénaturation thermique de l'ADN sont différents. Afin de confirmer l'interaction des composés **55** et **62** avec l'ADN, une seconde étude spectrale a été réalisée.

Etude spectrale UV-visible

La Figure 48 présente les mesures d'absorption UV-visible enregistrées lors de l'ajout de concentrations constantes d'ADN dans une solution tamponnée contenant soit le composé de référence **EBE-A22**, soit les produits **P11**, **55** et **62**.

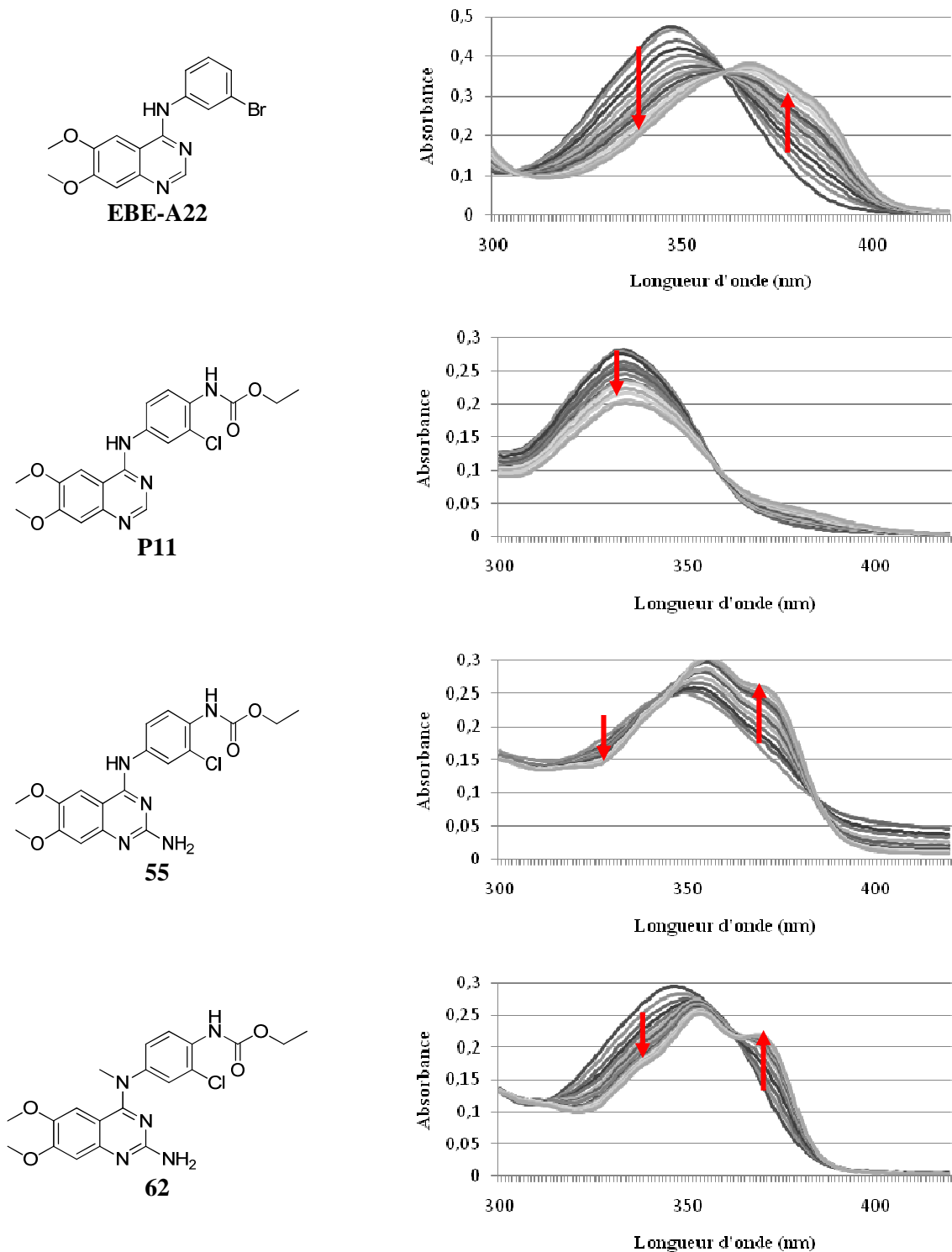


Figure 48 : Etude spectrale des composés EBE-A22, P11, 55 et 62

L'addition d'ADN induit des variations du spectre d'absorption de l'**EBE-A22**. En effet, on note une diminution de l'absorbance entre 310 et 365 nm et une augmentation entre 365 et 400 nm. La présence d'un point isobestique à 365 nm et l'effet de saturation caractérisent une interaction unique du composé **EBE-A22** avec l'ADN.

Le composé **P11**, choisi comme contrôle négatif ne provoque aucun changement caractéristique du spectre d'absorption ; la diminution d'absorbance est due à la dilution du composé dans la solution tamponnée.

A l'inverse, l'addition d'ADN induit des variations des spectres d'absorption des composés **55** et **62**. Pour le produit **55**, on observe une diminution de l'absorbance entre 310 et 350 nm et une augmentation de l'absorbance entre 350 et 387 nm. Le produit **62** provoque, quant à lui, une diminution de l'absorbance entre 310 et 365 nm et une augmentation de l'absorbance entre 365 et 380 nm.

Cette étude a permis de confirmer l'interaction des composés **55** et **62** avec l'ADN.

Etude du dichroïsme circulaire

L'étude du dichroïsme circulaire (DC) permet d'analyser et d'évaluer le mode de liaison des molécules à l'ADN au niveau du grand ou du petit sillon. Le DC résulte de l'activité optique d'une solution traversée par une lumière polarisée circulairement. Il est défini par la différence d'absorbance entre deux faisceaux : $\Delta A = A_g - A_d$ où A_g représente l'absorbance en lumière polarisée circulairement gauche et A_d l'absorbance en lumière polarisée circulairement droite. Dans le cas présent, la méthode est basée sur la différence d'absorption observée pour l'ADN seul (qui possède son propre DC dû aux interactions entre bases voisines) et pour l'ADN en présence du ligand étudié. La fixation du ligand perturbe la structure de la double hélice et crée des effets d'écran entre les bases, ce qui modifie les absorbances résultantes. La grandeur d'absorbance permet de mesurer l'ellipticité molaire θ grâce à des polariseurs. Cette ellipticité est un angle (θ exprimé en millidegré) correspondant à la forme de la polarisation de la lumière. En définissant cette ellipticité molaire, mesurée en fonction de la longueur d'onde, la relation directe entre la valeur θ et le dichroïsme circulaire est obtenue.

Aucune modification de l'ellipticité n'est observée sur le spectre dichroïque de l'ADN entre 320 et 420 nm. En règle générale, la fixation d'une molécule dans le petit sillon de l'ADN se traduit par l'apparition d'un signal dichroïque positif ($\Delta A > 0$) alors que les agents

intercalant donnent lieu à un signal dichroïque négatif ($\Delta A < 0$). Des solutions d'ADN en présence des composés **EBE-A22**, **P11**, **55** et **62** ont été analysés par DC et les spectres obtenus sont représentés dans la Figure 49.

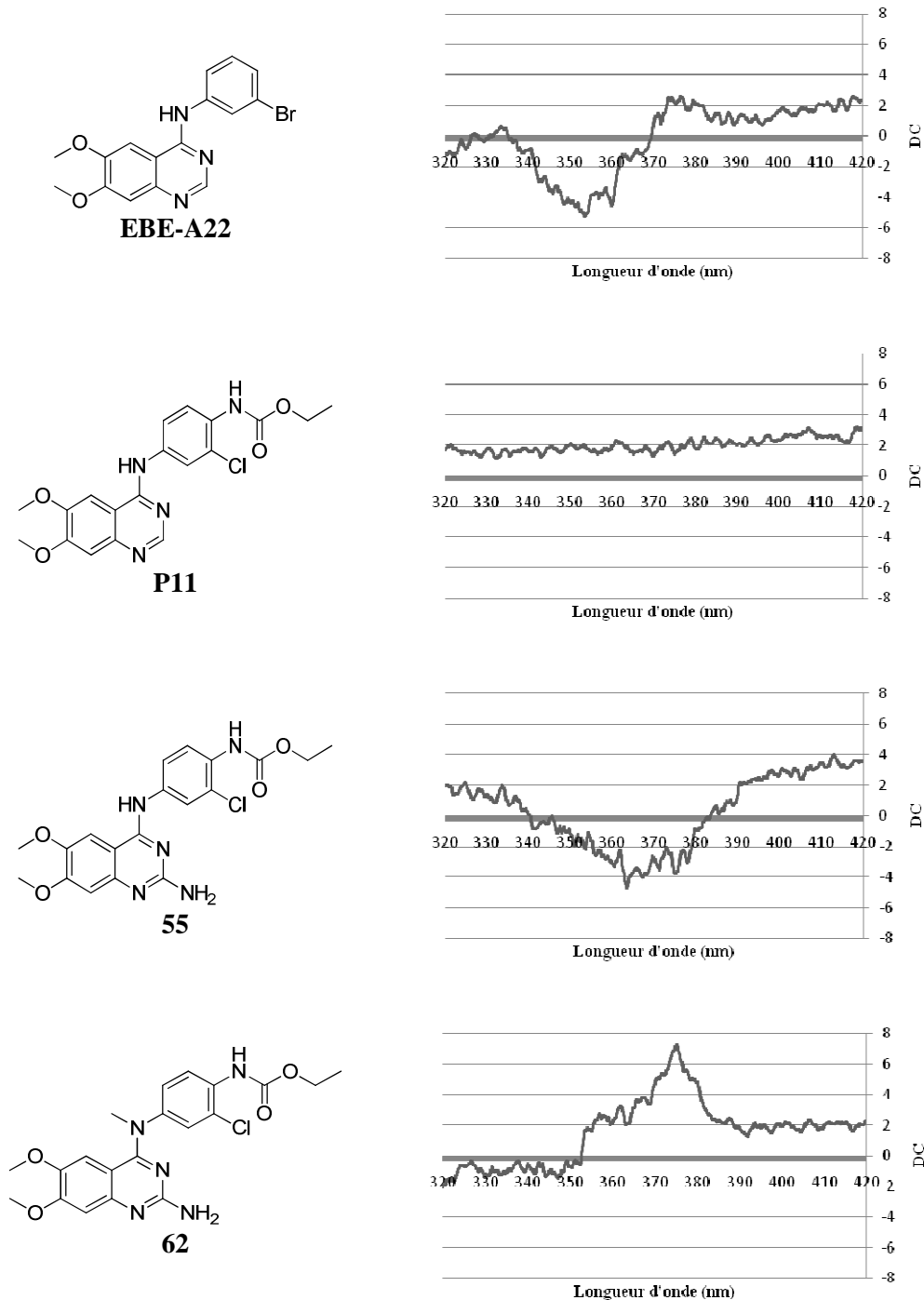


Figure 49 : Etude du dichroïsme circulaire des composés **EBE-A22**, **P11**, **55** et **62**

Aucune variation de l'ellipticité n'a été observée sur le spectre du composé **P11**. A l'inverse, l'addition des molécules **55**, **62** et **EBE-A22** provoque une modification de l'ellipticité. En effet, les spectres de l'**EBE-A22** et du composé **55** montrent des bandes négatives similaires centrées respectivement à 352 et 362 nm. Ce signal dichroïque négatif est souvent associé à un mode de liaison de type intercalation. Afin de valider cette hypothèse la mesure de la constante d'affinité pour l'ADN du composé **55** a été mesurée.

Concernant le dérivé méthylé **62**, on observe une bande positive centrée à 375 nm. Cette variation positive de l'intensité peut être le résultat d'une interaction entre le composé **62** et le petit sillon de l'ADN. Cette hypothèse devra être confirmée par d'autres techniques, comme le dichroïsme linéaire électrique.

Mesure de la constante d'affinité pour l'ADN

Les études de fluorescence permettent de quantifier l'interaction des composés pour l'ADN. La méthode consiste à mesurer la fluorescence du BET (Bromure d'Éthidium, intercalant puissant de l'ADN) en présence d'ADN aux concentrations constantes (1,26 μM / 1 μM). Le ligand est testé à des concentrations variables (1 μM à 30 μM). Si le ligand testé à un pouvoir intercalant, il chasse le BET, ce dernier est alors éteint par l'oxygène du milieu et on observe une diminution de la fluorescence. La mesure de l'intensité de la fluorescence BET est enregistrée à différentes longueurs d'onde d'émission pour différentes concentrations en ligand (Figure 50).

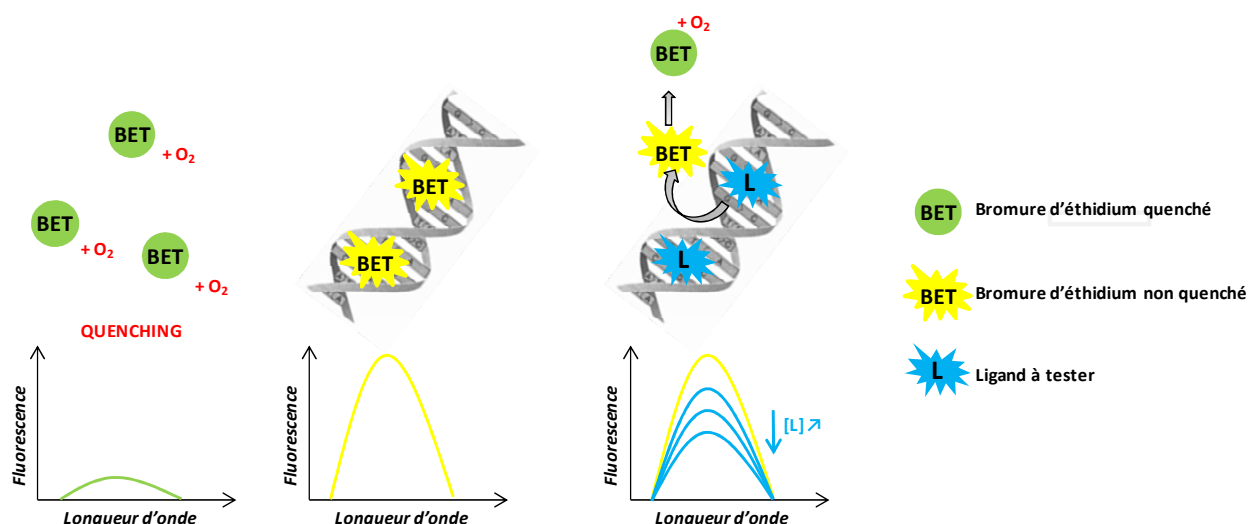
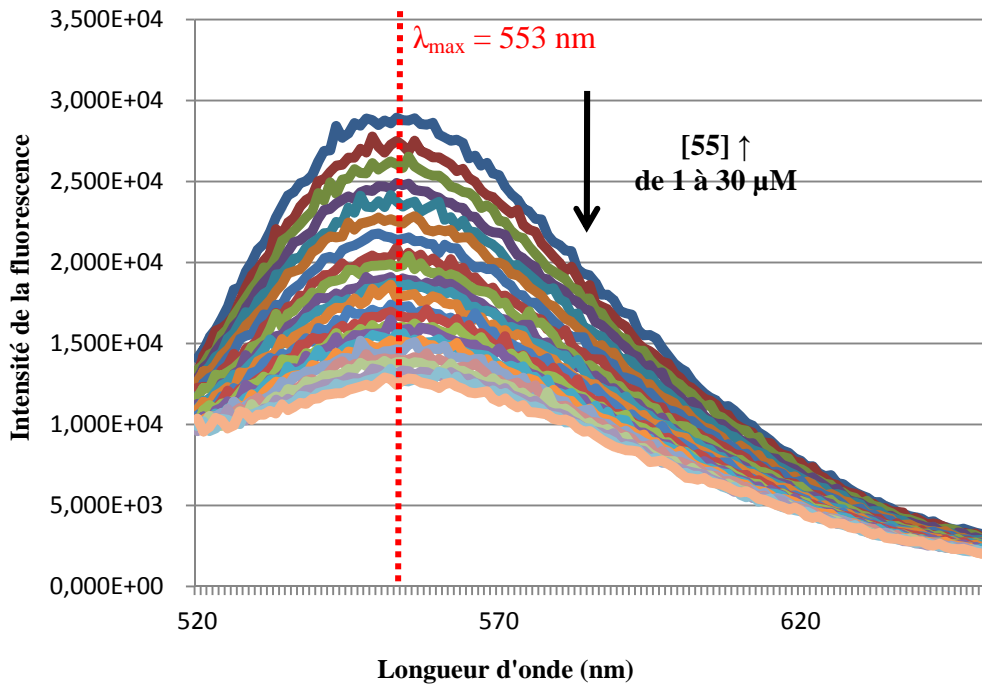
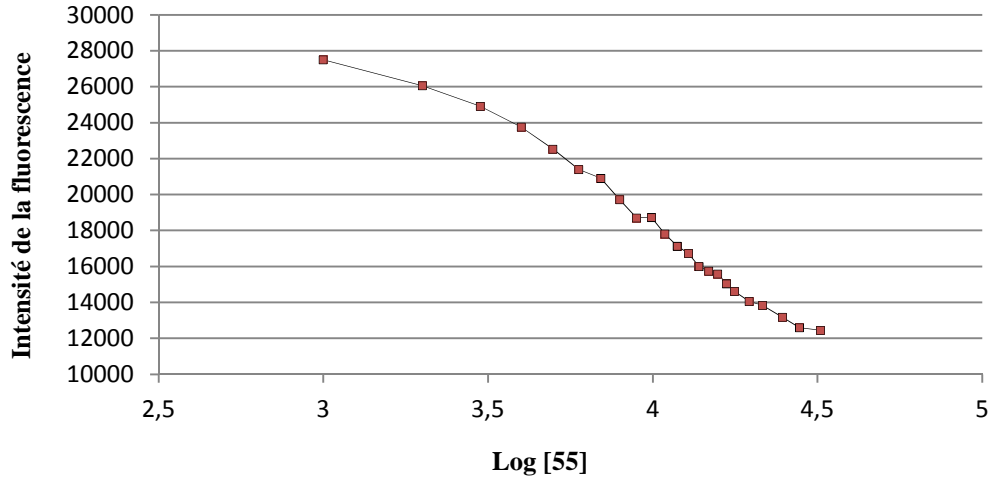


Figure 50 : Principe de l'étude de fluorescence par compétition avec le BET



A. Complexation ADN/BET/55 par fluorescence en fonction de la longueur d'onde



B. Constante apparente K_{app} du composé 55 à la longueur d'onde 553 nm

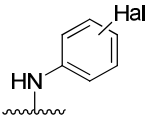
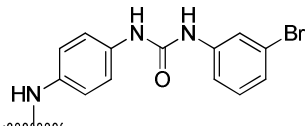
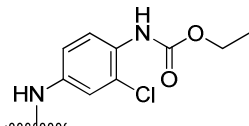
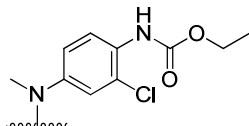
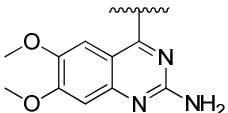
Figure 51 : Mesure de la constante d'affinité pour l'ADN du composé 55

Grâce à cette méthode, nous avons confirmé le pouvoir intercalant du composé **55** et nous avons pu déterminer sa valeur de constante apparente :

$$K_{app} = 1,39 \cdot 10^6 \pm 0,07 \cdot 10^6$$

Les différentes études entreprises (test de dénaturation thermique de l'ADN, étude spectrale UV-visible, étude du DC, mesure de la constante d'affinité pour l'ADN) permettent de conclure sur le mode d'action du composé **55**. Cette 2-aminoquinazoline substituée par un carbamate exerce son effet cytotoxique par intercalation avec l'ADN. Ces études ont également permis de mettre en évidence une interaction entre l'ADN et le composé **62**. Cependant, le mode d'action précis de ce composé n'a pu être déterminé à l'heure actuelle.

Conclusion générale sur les 2-amino-4-anilinoquinazolines

Cible : Kinases		Cible : ADN	
Inhibiteurs sélectifs EGFR	Inhibiteur mixte EGFR/VEGFR-2	Intercalant de l'ADN	?
			
			

2.2. Résultats pharmacologiques des 2-amino-4-aryloxyquinazolines

Les 2-amino-4-aryloxyquinazolines ont été évaluées pharmacologiquement pour leur inhibition enzymatique (EGFR et VEGFR-2) et pour leur inhibition de la prolifération cellulaire (PC3, HT29, MCF7 et HUVEC). Les résultats des composés **57** à **60** ainsi que ceux de leurs analogues en série quinazolinique sont représentés dans le Tableau 20.

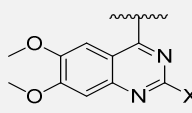
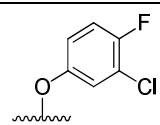
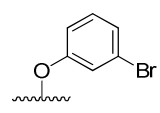
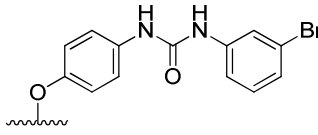
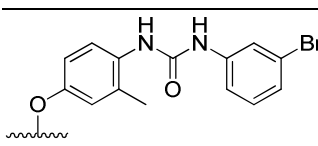
 X	CI ₅₀ en nM		CI ₅₀ en μM ou pourcentage d'inhibition à 10 μM				
	<i>EGFR</i>	<i>VEGFR-2</i>	PC3, prostate	HT29, côlon	MCF7, sein	HUVEC	
vandétanib	800	70	7,3	1,8	9,6	4,4	
 H	P17	> 10 000	9 500	> 10	> 10	> 10	N.D.
	NH ₂	57	> 10 000	8 080	> 10	> 10	> 10
 H	P39	> 10 000	7 600	> 10	> 10	> 10	N.D.
	NH ₂	58	> 10 000	2 950	> 10	> 10	> 10
 H	P23	> 10 000	6	> 10	7,26	9,80	0,97
	NH ₂	59	> 10 000	37	> 10	> 10	> 10
 H	P24	> 10 000	4	> 10	> 10	> 10	0,83
	NH ₂	60	> 10 000	99	> 10	> 10	7,76

Tableau 20 : Résultats enzymatiques et cellulaires des produits 57 à 60

Discussion

Les 2-amino-4-aryloxyquinazolines halogénées **57** et **58** ne présentent aucune inhibition de l'EGFR à 10 μM et une inhibition de l'ordre du micromolaire sur VEGFR-2. Le remplacement des halogènes par un motif urée permet de renforcer l'activité pour le VEGFR-2. Les composés **59** et **60** montrent en effet des CI₅₀ intéressantes sur cette enzyme (CI₅₀ = 37 et 99 nM). Les quatre composés testés ne présentent pas ou peu d'inhibition de la prolifération cellulaire cancéreuse, seul le dérivé **60** montre une CI₅₀ de 7,8 μM sur la lignée MCF7. Sur les cellules HUVEC, les pourcentages d'inhibition à 10 μM sont intéressants pour les composés **57** et **59**.

Conclusion

L'ajout d'une amine en position 2 des composés 4-aryloxyquinazoliniques a permis de garder une sélectivité pour VEGFR-2 *versus* EGFR. Les résultats restent similaires pour le VEGFR-2 pour les composés halogénés mais une légère diminution de l'inhibition est

observée pour les composés substitués par un motif urée. L'incorporation de l'amine sur ce type de produits n'a pas permis d'augmenter le pouvoir cytotoxique.

3. Résultats pharmacologiques des 2-aminométhylquinazolines

Le composé **61**, de type 2-aminométhyl-4-anilinoquinazolinique n'a pu être testé ni sur enzyme, ni sur cellules. Ces tests seront réalisés dans un avenir proche.

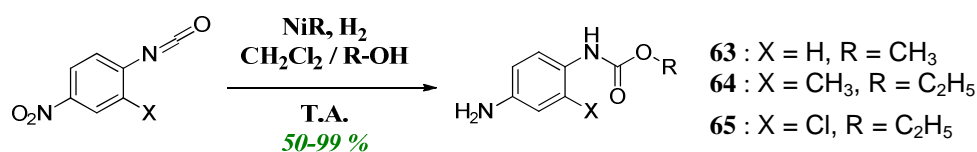
III. STRATÉGIE DE SYNTHÈSE

La synthèse des benzo-[d]-1,2,3-triazines, des 2-aminoquinazolines et des 2-aminométhylquinazolines s'effectue par réaction entre l'hétérocycle central portant un groupement partant et des intermédiaires de type aniline ou phénol. La synthèse des dérivés phénols substitués par un motif urée (**15-17**) étant présentée dans la partie **III.1.**, seule la synthèse des dérivés anilino sera décrite dans ce chapitre.

1. Synthèse des intermédiaires de type anilino

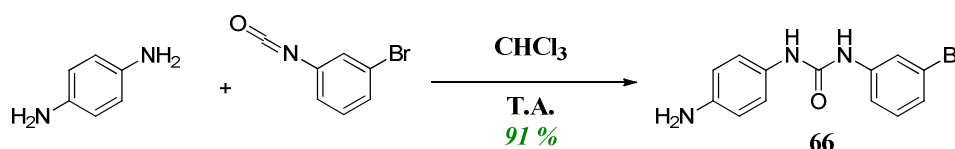
1.1. Synthèse des dérivés de type anilino-carbamate

Les dérivés de type-anilino-carbamate (**63-65**) ont été obtenus à partir de 4-nitro-phénylisocyanate substitués par un groupement méthyle ou un atome de chlore en *ortho* de l'isocyanate.¹⁷⁷



La condensation en motif carbamate est réalisée en présence d'un excès de l'alcool choisi sous condition d'hydrogénation catalytique ce qui permet de réduire, de manière concomitante, le motif nitro en amine. Le composé **63** a été obtenu par déshalogénéation de l'atome de chlore en *ortho* de l'isocyanate.

1.2. Synthèse du dérivé de type anilino-urée (**66**)



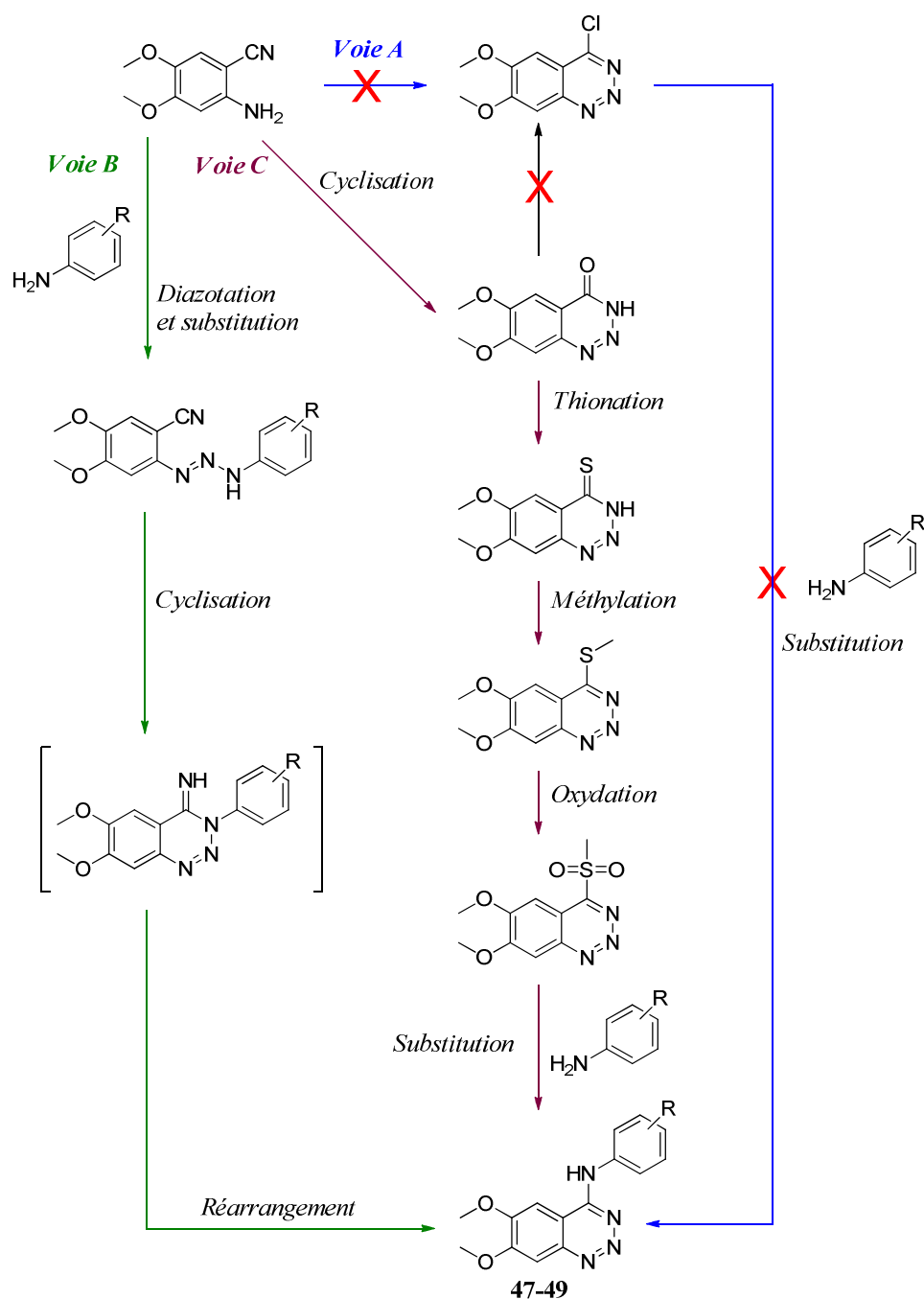
La réaction de monocondensation est réalisée dans une grande quantité de chloroforme. La *para*-phénylènediamine est mise en solution et le 3-bromoisocyanate

¹⁷⁷ A. Garofalo et al., *Synthetic Communications*, **2011**, 41, 2007-2011.

préalablement dilué dans du chloroforme est ajouté goutte à goutte au milieu réactionnel. Le composé **66** est obtenu par précipitation avec un rendement de 91%.

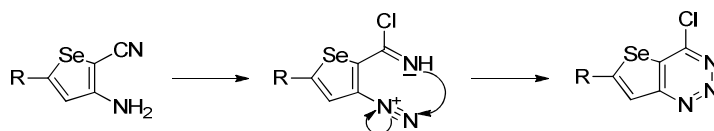
2. Stratégies de synthèse des benzo-[d]-1,2,3-triazines (Série F)

Suite aux problèmes de synthèse rencontrés, plusieurs stratégies ont été envisagées pour concevoir les benzo-[d]-1,2,3-triazines (cf schéma de synthèse général).

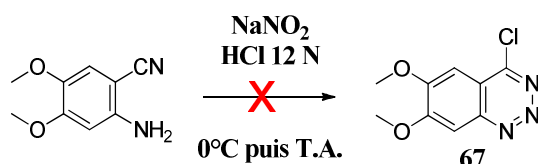


2.1. Synthèse de la 4-chlorobenzod-[d]-1,2,3-triazine (voie A)

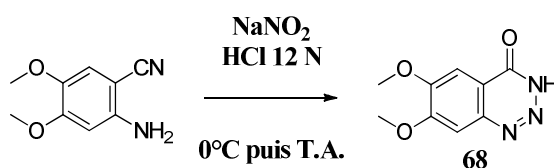
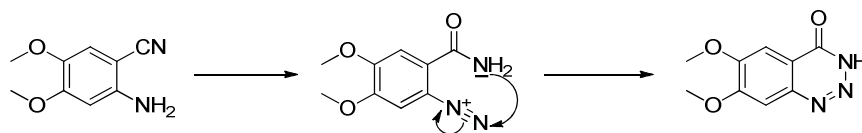
Une méthode décrite dans la littérature autour de dérivés sélénotriaziniques permet de cycliser et de chlorer « one-pot » des dérivés cyano-aminés afin d'obtenir des 4-chlorotriazines. Ces dernières sont obtenues par diazotation du dérivé cyano-aminé avec le nitrite de sodium dans l'acide chlorhydrique concentré selon le mécanisme suivant.¹⁷⁸



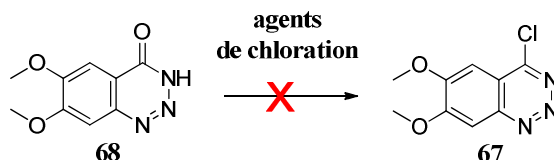
Nous avons testé cette méthode sur le 2-amino-4,5-diméthoxybenzonitrile commercial afin d'obtenir la 4-chloro-6,7-diméthoxybenzo-[d]-1,2,3-triazine **67** en une étape.



Le composé **67** n'a pas été obtenu. Le traitement par le nitrite de sodium en présence d'acide chlorhydrique concentré a conduit à la formation de la benzotriazinone **68**.

Mécanisme réactionnel

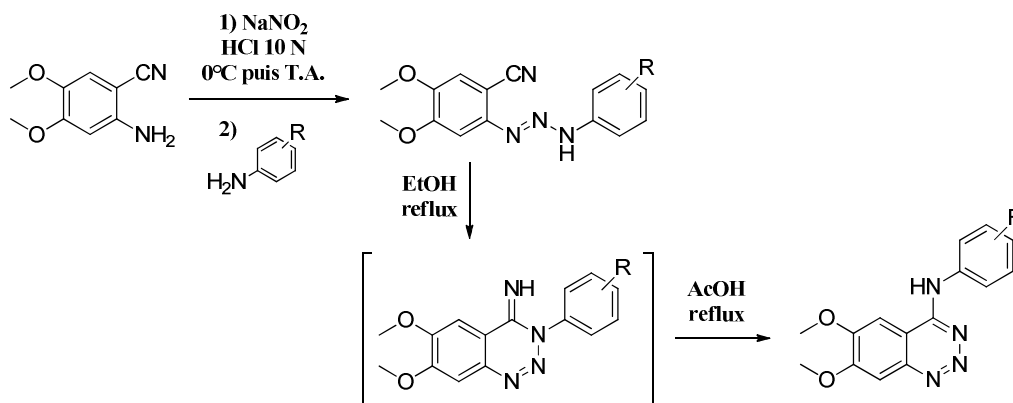
¹⁷⁸ E. Perspicace *et al.*, *Synthesis*, **2009**, 20, 3472-3476.



Par la suite, nous avons donc envisagé d'obtenir la 4-chlorobenzotriazine **67** à partir du dérivé **68**. Cependant, malgré l'utilisation de plusieurs réactifs de chloration (POCl_3 , SOCl_2 , PCl_5), le composé chloré **67** n'a pas été obtenu. Une étude de 1967 décrit la difficulté à obtenir la 4-chlorobenzotriazine car ce produit se dégraderait.¹⁷⁹ Une autre publication, plus récente, décrit le même phénomène.¹⁸⁰ Nous avons donc opté pour une nouvelle voie de synthèse.

2.2. Obtention des produits cibles par la voie B

La voie B, représentée ci-dessous, est une méthode « one-pot » originale pour obtenir les composés cibles.¹⁸¹ Dans cette synthèse décrite dans la littérature, le 2-amino-4,5-diméthoxybenzonitrile commercial est tout d'abord diazoté, puis couplé par substitution avec l'aniline souhaitée. Les intermédiaires obtenus sont ensuite cyclisés dans l'éthanol à reflux et un réarrangement de Dimroth permet d'obtenir les composés cibles.



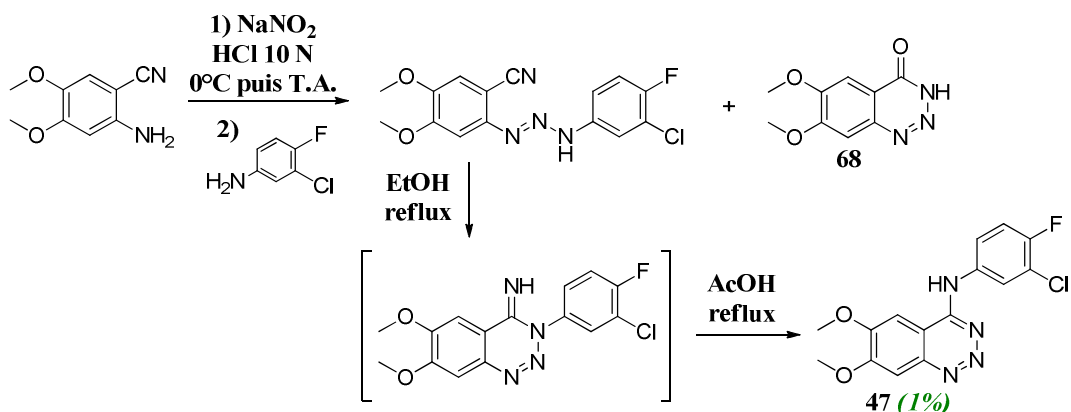
La première étape de diazotation est semblable à la réaction utilisée pour obtenir la benzotriazinone **68**. La seule différence est la concentration de l'acide chlorhydrique utilisé (12 N pour la benzotriazinone et 10 N pour cette stratégie).

¹⁷⁹ C. A. Grob et P. W. Schiess, *Angewandte Chemie*, **1967**, 1, 1-106.

¹⁸⁰ J. Campbell *et al.*, *Journal of the Chemical Society*, **1983**, 1344-1346.

¹⁸¹ J. L. Lv *et al.*, *Molecules*, **2008**, 13, 1427-1440.

Cette méthode a été envisagée avec aniline halogénée commerciale.

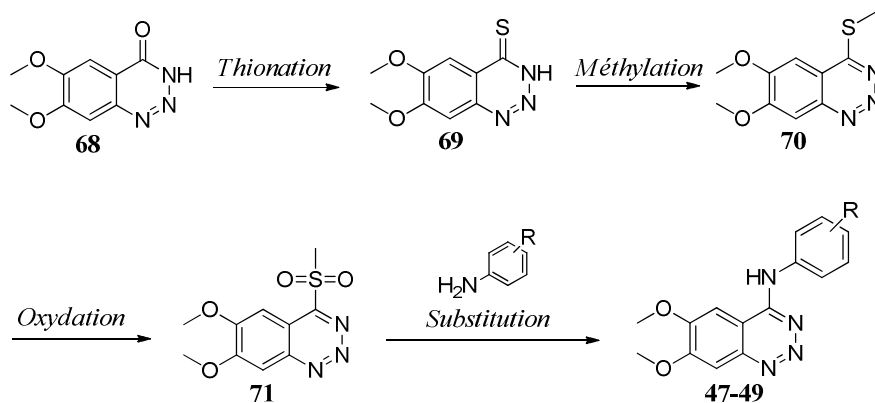


Le 2-amino-4,5-diméthoxybenzonitrile réagit avec le nitrite de sodium en présence d'acide chlorhydrique 10 N pendant 6 heures à température ambiante. L'aniline halogénée est ensuite ajoutée au milieu réactionnel qui est préalablement neutralisé. Le dérivé triazénique obtenu est isolé par filtration et chauffé à reflux dans l'éthanol pendant 16 heures. Le résidu obtenu par évaporation du milieu réactionnel est chauffé à reflux dans l'acide acétique. Enfin, après hydrolyse du milieu, le composé **47** est obtenu avec un très faible rendement (1%). Ce dernier peut s'expliquer par l'obtention en grande majorité du composé **68** lors de la première étape.

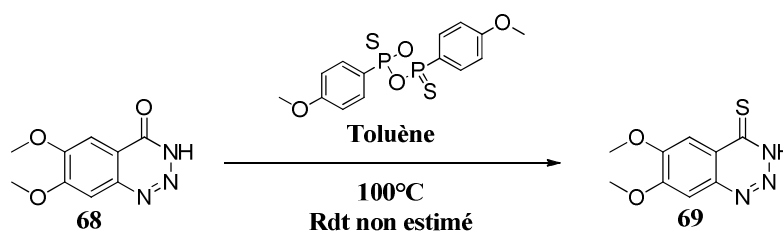
2.3. Obtention des produits cibles par la voie C

Les deux premières voies de synthèse ne nous ont pas permis d'obtenir les composés désirés avec de bons rendements. Une nouvelle voie a donc été envisagée à partir de la benzotriazinone **68**. L'insertion d'un groupement partant de type SO₂Me en position 4 de la benzotriazine a été réalisée.

Grâce à cette voie, les produits cibles sont obtenus en quatre étapes à partir de la benzotriazinone **68**.

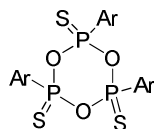


▪ Thionation



La benzotriazinone **68** réagit avec le réactif de Lawesson dans le toluène pour donner le dérivé soufré **69** avec un rendement non estimé.¹⁸² La masse du produit brut obtenue est supérieure à la masse théorique, un produit secondaire n'a pas pu être éliminé du fait de la faible solubilité des deux composés. Le produit brut a donc été remis en réaction sans purification préalable

D'après les travaux de M. P. Cava et M. I. Levinson¹⁸³, la structure probable du produit secondaire pourrait être celle du trimère suivant :

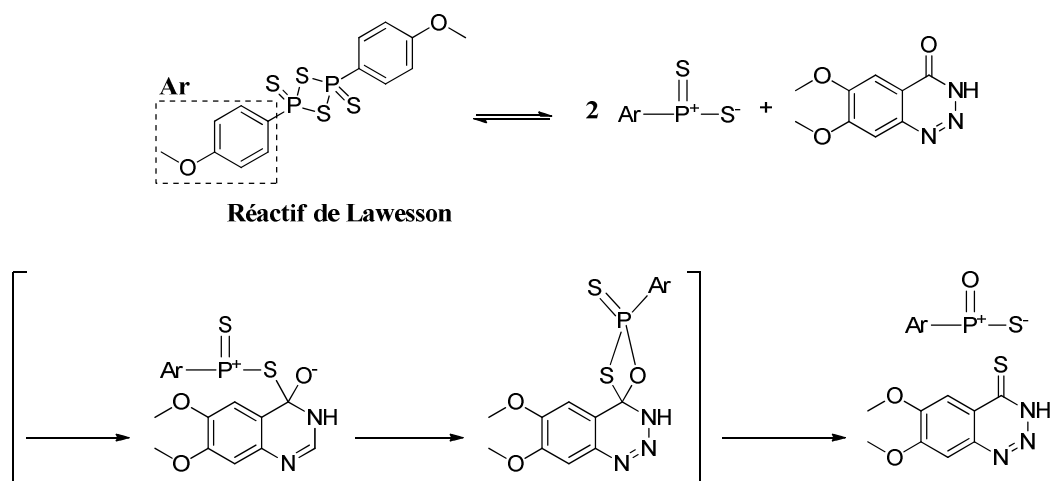


Ce produit se formerait lorsque plus de 0,5 eq de réactif de Lawesson sont utilisés.

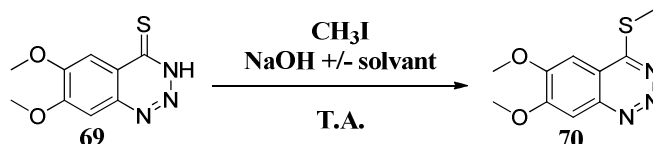
¹⁸² Y. Nomoto *et al.*, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **1990**, 38, 2178-2183.

¹⁸³ M. P. Cava et M. I. Levinson, *Tetrahedron*, **1985**, 41, 5061-5087.

Mécanisme réactionnel



▪ Méthylation



Solvant	Produit obtenu	Température	Rdt
NaOH/MeOH (5 : 5)		T.A.	N.D.
NaOH	70	T.A.	7%
NaOH	Dégradation	70°C	N.D.
NaOH/ACN	Aucune réaction	T.A.	N.D.
NaOH/ACN	Dégradation	70°C	N.D.
NaOH/isopropanol	70	T.A.	30%
NaOH/isopropanol	Dégradation	70°C	N.D.

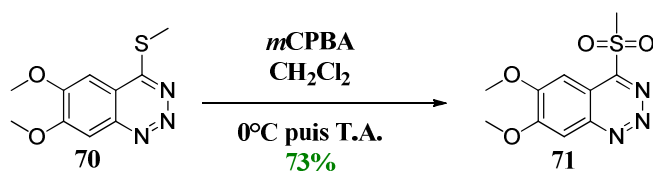
Tableau 21 : Optimisation de la réaction de S-méthylation

N.D. non déterminé

La S-méthylation est décrite par Y. Nomoto *et al.*¹⁸² dans un mélange NaOH/MeOH (5 : 5). Lors de la réaction du composé **69** dans les mêmes conditions, le dérivé **70** n'a pas été obtenu et un produit secondaire a été formé : la 4,6,7-triméthoxybenzotriazine. Nous avons donc réitéré la manipulation en faisant varier les solvants (Tableau 21).

Sans méthanol, il n'y a pas de formation du produit secondaire cependant le rendement n'est que de 7%. Dans un mélange NaOH/acétonitrile, aucune réaction n'a lieu à température ambiante ou à 70°C. Le mélange NaOH/isopropanol permet d'obtenir le produit désiré **70** avec un rendement de 30%.

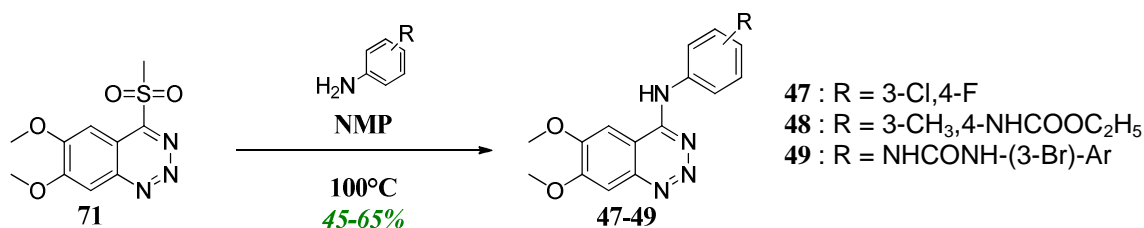
▪ Oxydation



La dérivé sulfonique **71** est obtenu à partir du dérivé **70** par oxydation grâce à l'acide *mé*ta-chloroperbenzoïque (*m*CPBA).¹⁸⁴ La réaction se déroule à température ambiante pendant 30 minutes et le dérivé **71** est isolé avec un rendement de 73%.

La réaction se déroule en deux étapes, le dérivé **70** réagit tout d'abord avec le *m*CPBA pour former l'intermédiaire sulfoxyde qui, à son tour, réagit à nouveau avec le 2^{ème} équivalent de *m*CPBA pour donner la sulfone.

▪ Substitution



La substitution nucléophile est réalisée dans la *N*-méthyl-2-pyrrolidone à 100°C en présence de l'aniline choisie. Les rendements obtenus sont repris dans le Tableau 22.

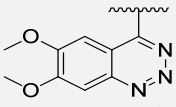
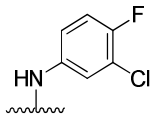
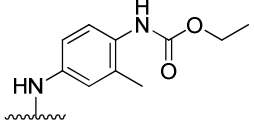
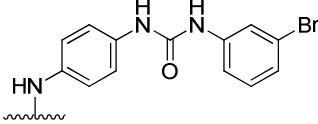
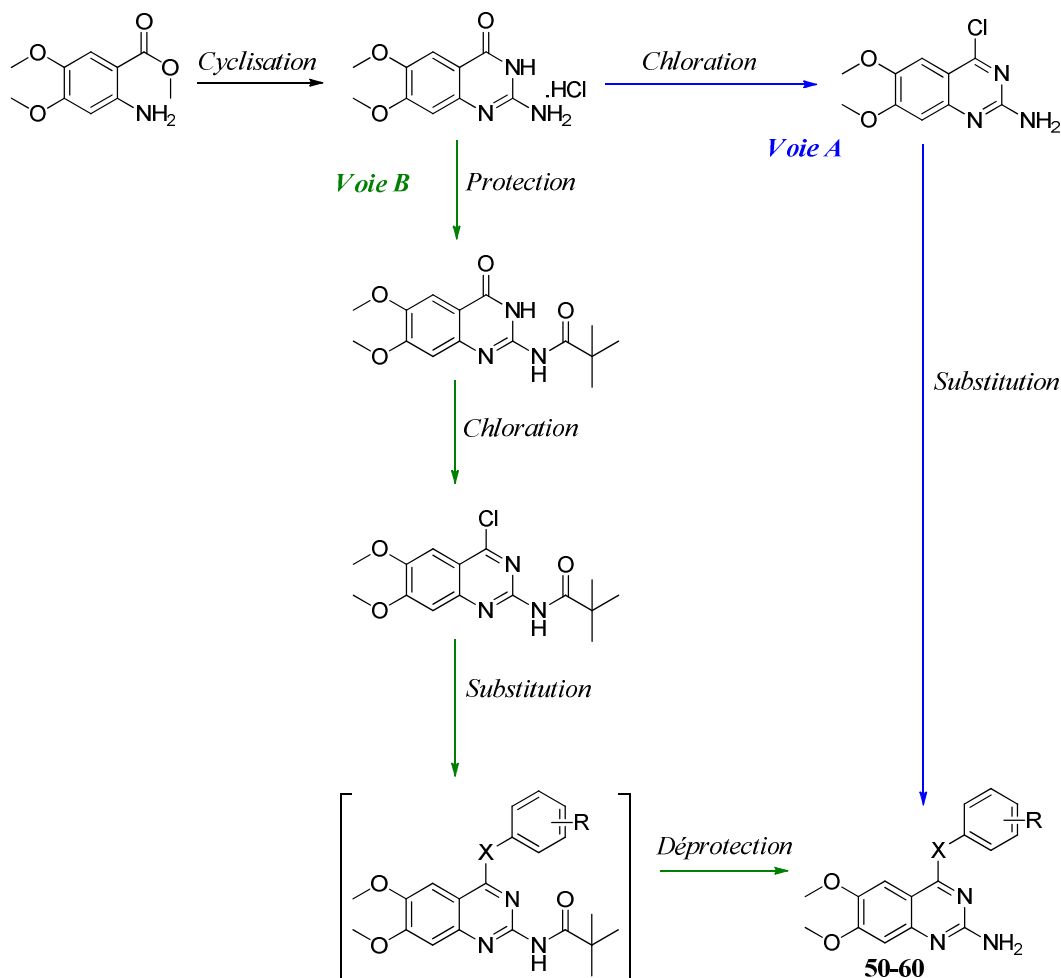
 Benzo-[<i>d</i>]-1,2,3-triazines		
 47 45%	 48 65%	 49 49%

Tableau 22 : Rendements des produits cibles de type benzo-[*d*]-1,2,3-triaziniques

¹⁸⁴ M. Y. Jang *et al.*, *Journal of Medicinal Chemistry*, **2011**, 54, 655-668.

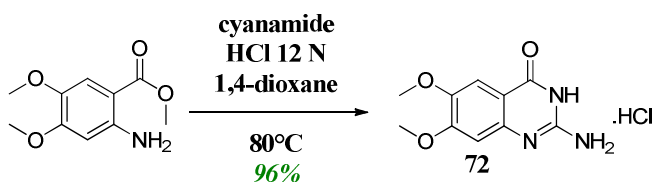
3. Stratégies de synthèse des 2-aminoquinazolines (Série G)

Les 2-aminoquinazolines (**50** à **60**) ont été obtenues en suivant le plan de synthèse suivant :



Les 2-amino-4-anilinoquinazolines ont été synthétisées à partir des voies A et B alors que les 2-amino-4-aryloxyquinazolines n'ont été obtenues qu'à partir de la voie B.

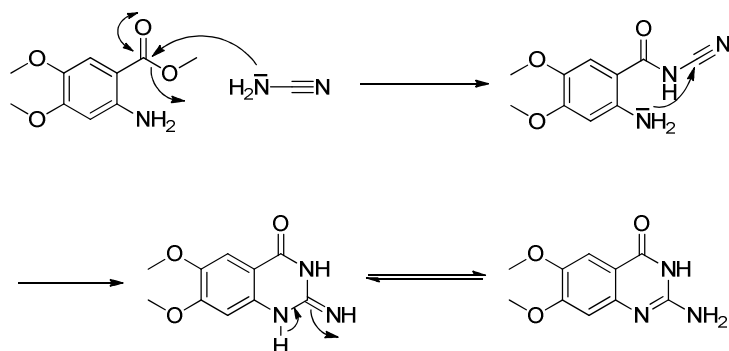
3.1. Synthèse du chlorhydrate de la 2-amino-6,7-diméthoxyquinazolin-4-one



Le 2-amino-4,5-diméthoxybenzoate de méthyle est cyclisé en présence de cyanamide dans le dioxane à 80°C. Quelques gouttes d'acide chlorhydrique concentré sont ajoutées au

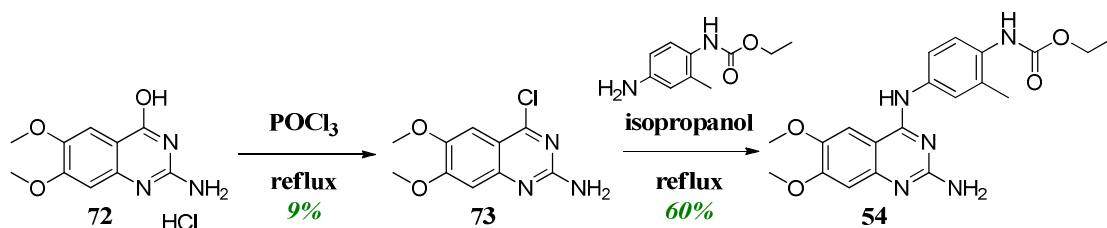
milieu réactionnel pour catalyser la réaction.¹⁸⁵ La 2-amino-4,5-diméthoxyquinazolinone **72** est obtenue sous forme chlorhydrate avec un rendement de 96%.

Mécanisme réactionnel



3.2. Obtention du produit cible 54 par la voie A

Afin d'obtenir le composé **54**, la quinazolinone **72** a tout d'abord été chlorée et le produit obtenu a été mis en réaction avec l'aniline **64** préalablement préparée.



▪ Chloration

La forme lactime du dérivé **72** réagit avec l'oxychlorure de phosphore pendant 6 heures à reflux pour donner après neutralisation du milieu, l'intermédiaire chloré **73** avec un rendement faible de 9%.

▪ Substitution

La substitution se réalise dans l'isopropanol à reflux en présence du motif anilino-carbamate **64** durant 3 heures. Un traitement par une solution de soude 2 N permet d'obtenir le composé **54** sous sa forme base avec un rendement de 60%.

¹⁸⁵ A. Bridges *et al.*, *Journal of Medicinal Chemistry*, **1996**, 39, 267-276.

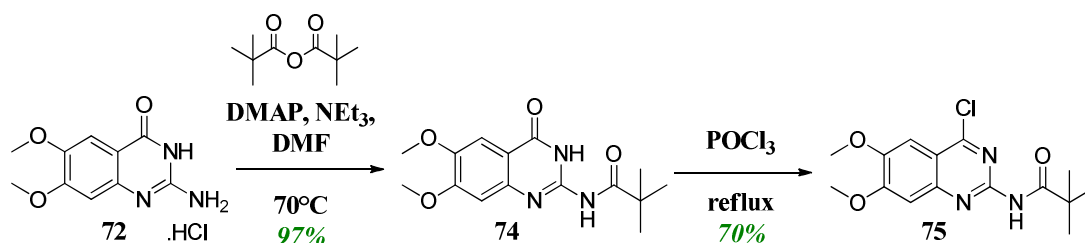


Rendement global = 5%

Cette première voie de synthèse a permis d'obtenir un produit cible. Cependant le rendement global est très faible à cause de l'étape de chloration. Afin d'augmenter le rendement, la protection de l'amine en position 2 (qui semble interagir avec l'agent de chloration) a été envisagée dans la voie B.

3.3. Synthèse de la 2-tert-butylamido-4-chloroquinazoline (75)

Le composé chloré **75** est synthétisé en deux étapes à partir du dérivé **72**.¹⁸¹



▪ Protection de l'amine en position 2

L'amine a été protégée sous forme amide, protection stable dans des conditions acides (étape de chloration) contrairement à la protection classique des amines avec le groupement *tert*-butyloxycarbonyl (Boc).

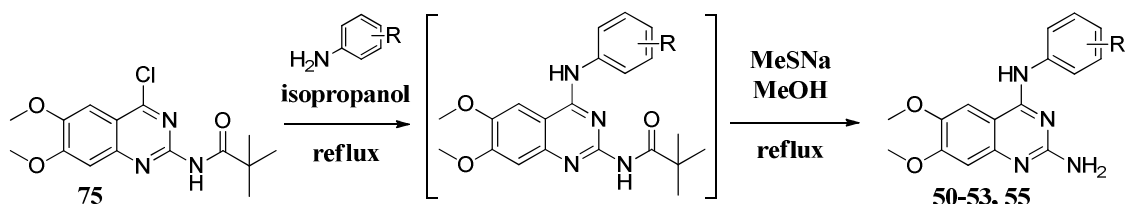
La protection se réalise avec l'anhydride pivalique en présence de 4-diméthylaminopyridine et de triéthylamine dans le *N,N*-diméthylformamide. Le milieu réactionnel est chauffé à 70°C pendant deux heures.¹⁸¹ Après alcalinisation du milieu, le produit protégé **74** est obtenu avec un rendement de 92%.

▪ Chloration

La chloration du dérivé **74** s'effectue dans les mêmes conditions que la chloration du composé **72**. L'action de l'oxychlorure de phosphore permet d'obtenir le produit **75** avec un rendement de 70% après neutralisation du milieu. La protection de l'amine permet d'augmenter le rendement de l'étape de chloration d'un facteur 8.

L'intermédiaire clé chloré **75** permet d'aboutir aux produits cibles par substitution nucléophile avec les dérivés de type aniline ou phénol préalablement synthétisés.

3.4. Obtention des 2-amino-4-anilinoquinazolines par la voie B

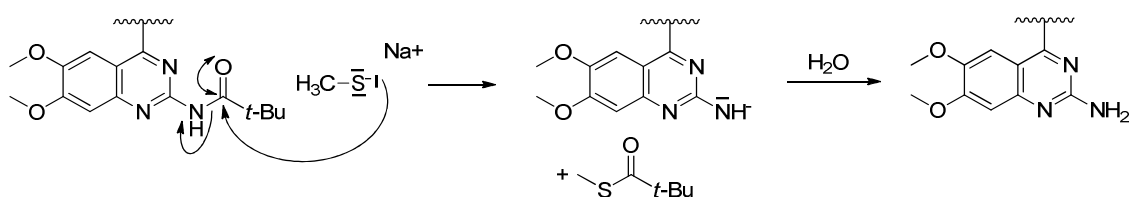


		Rdt SN + déprotection	Rdt global			Rdt SN + déprotection	Rdt global
50		88%	57%	53		90%	58%
51		91%	59%	55		65%	42%
52		85%	55%	56		60%	39%

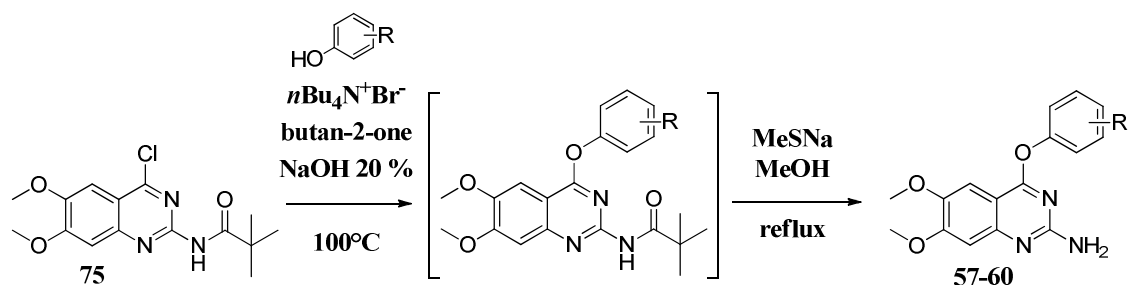
La substitution nucléophile s'effectue dans l'isopropanol à reflux en présence de l'aniline choisie, durant deux heures. Les intermédiaires substitués obtenus sont isolés par filtration et réagissent aussitôt avec le méthane thiolate de sodium dans le méthanol pour donner les produits 2-aminoquinazoliques désirés avec des rendements sur deux étapes compris entre 60 et 91%. On peut noter que plus l'aniline est volumineuse, plus les rendements sont faibles.

La protection de l'amine en position 2 a permis d'augmenter considérablement les rendements globaux. De 5% sans protection, les rendements globaux passent à environ 50% grâce à la protection de l'amine.

Mécanisme réactionnel de la déprotection

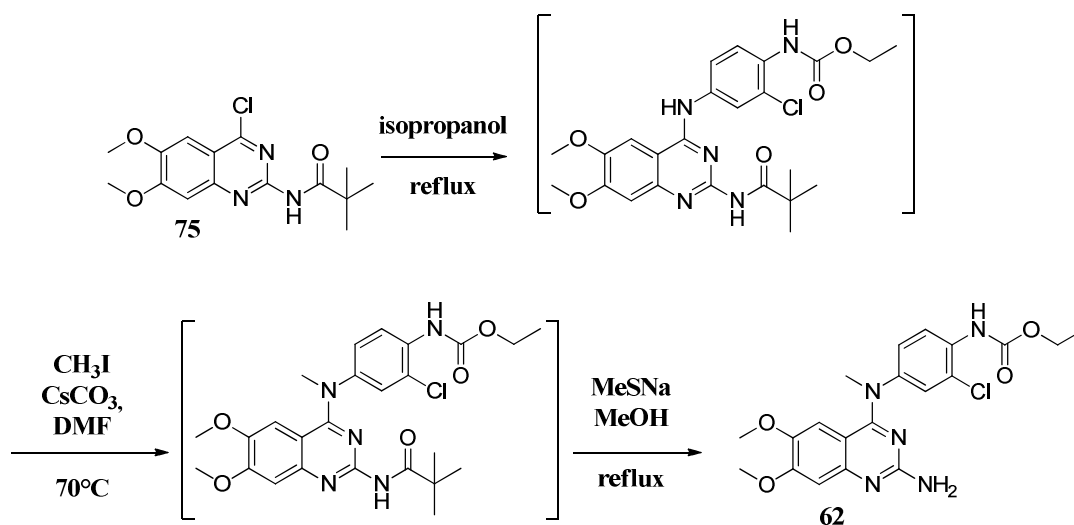


3.5. Obtention des 2-amino-4-aryloxyquinazolines par la voie B



		Rdt SN + déprotection	Rdt global			Rdt SN + déprotection	Rdt global
57		41%	26%	59		30%	19%
58		38%	25%	60		32%	20%

L'étape de substitution nucléophile entre le dérivé chloré **75** et les phénols est réalisée en présence d'un catalyseur de transfert de phase, le bromure de *N*-tétrabutylammonium. Le mélange soude/butan-2-one ainsi que le catalyseur favorisent la formation du phénolate. Après 30 minutes de réaction, les intermédiaires de type phénoxy obtenus sont isolés et réagissent avec le méthane thiolate de sodium dans le méthanol. Les 2-amino-4-aryloxyquinazolines (**57-60**) sont obtenues avec des rendements sur deux étapes compris entre 30 et 41%. Ces rendements sont plus faibles qu'en série anilino à cause d'une purification des produits cibles plus difficile.

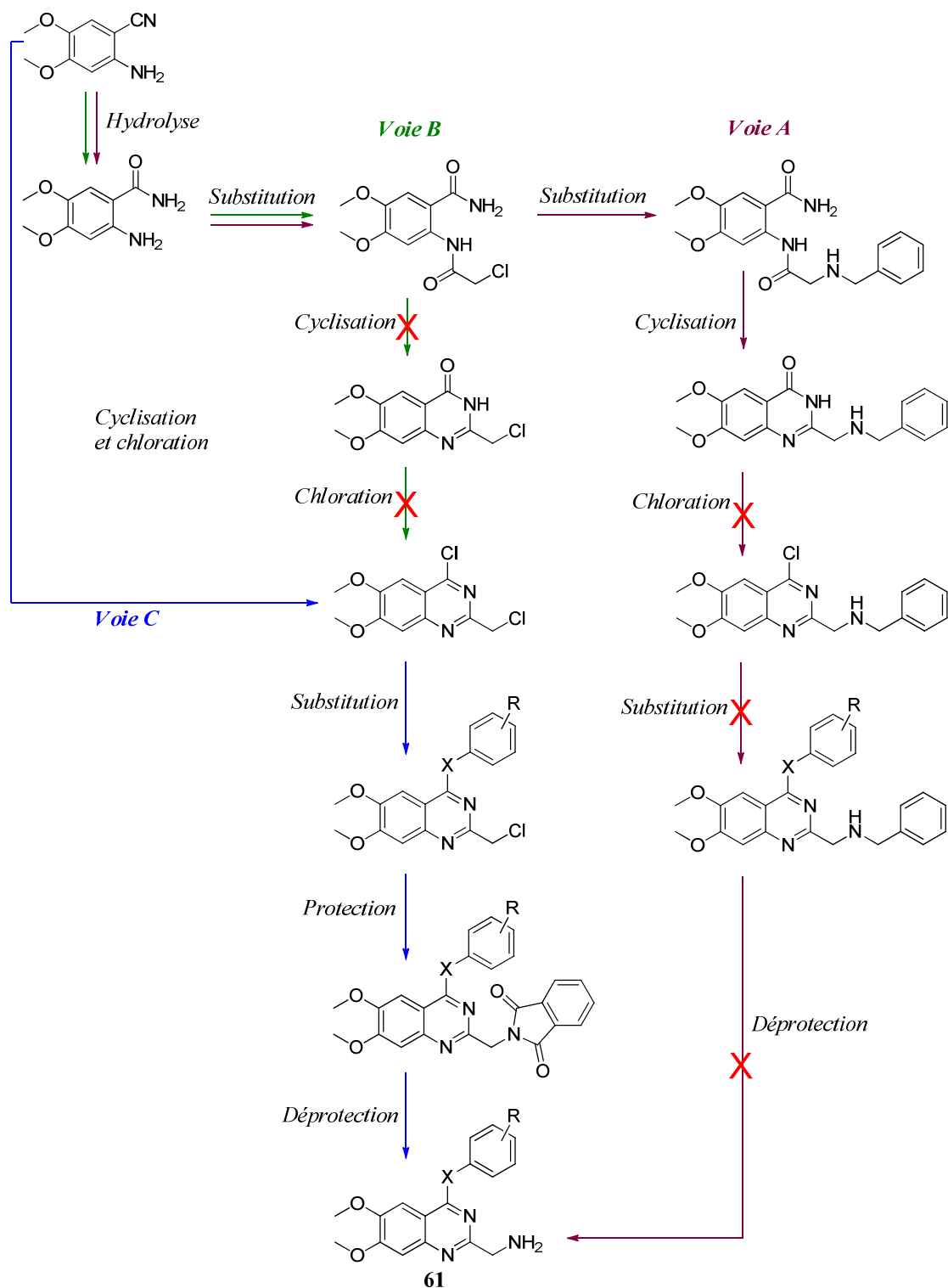
3.6. Obtention de la 2-amino-4-*N*-méthylanilinoquinazoline 62

La synthèse du dérivé *N*-méthylé **62** débute par une substitution nucléophile pour obtenir l'intermédiaire substitué. La *N*-méthylation de cet intermédiaire s'effectue avec l'iodure de méthyle en présence d'une base faible mais volumineuse, le carbonate de césium, dans le *N,N*-diméthylformamide à 70°C . Le composé *N*-méthylé est ensuite déprotégé en présence de méthane thiolate de sodium dans le méthanol. Ces trois étapes ont permis l'obtention du composé **62** avec un rendement de 20% (soit un rendement global de 13%).

L'alkylation avec des chaînes chlorées aminoalkyles a été envisagée mais aucune réaction n'a eu lieu malgré l'utilisation d'une base plus forte, l'hydrure de sodium.

4. Stratégies de synthèse des 2-aminométhylquinazolines (Série H)

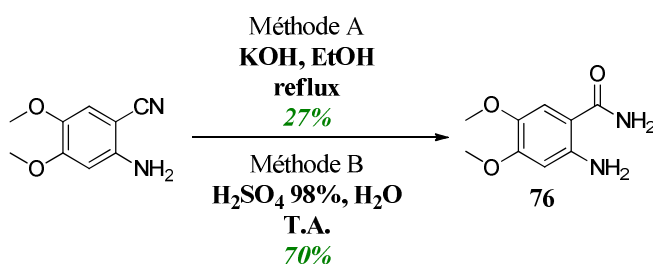
Trois voies de synthèse ont été envisagées afin d'obtenir les composés de la série H à partir du 2-amino-4,5-diméthoxybenzonitrile commercial.



4.1. Synthèse du 2-amino-4,5-diméthoxybenzamide (76)

Les nitriles s'hydrolysent en milieu acide ou en milieu basique pour donner l'acide carboxylique correspondant. Pour les nitriles aromatiques, l'hydrolyse (acide ou basique) peut être arrêtée au stade de l'amide.

L'hydrolyse du 2-amino-4,5-diméthoxybenzonitrile a été réalisée en conditions basique (méthode A) et acide (méthode B).

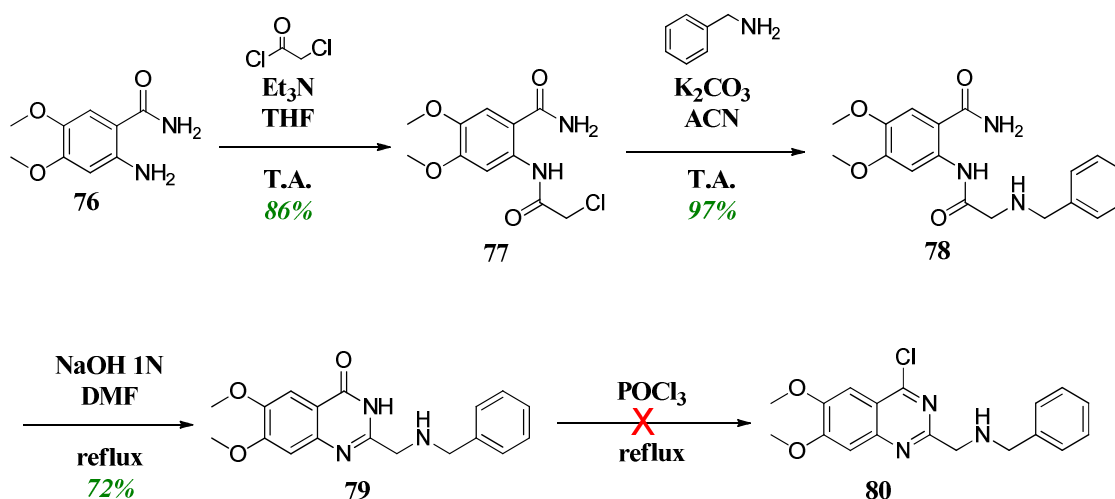


L'hydrolyse ménagée du nitrile en présence d'hydroxyde de potassium dans l'éthanol à reflux a permis l'obtention du produit **76** avec un rendement de 27% (méthode A). Dans des conditions acides (acide sulfurique concentré), le rendement est nettement meilleur. En effet grâce à la méthode B, l'amide **76** a été obtenu avec un rendement de 70%.

4.2. Obtention des produits cibles par la voie A

La première partie de la voie **A** consiste à synthétiser le dérivé chloré benzylé (**80**) en 4 étapes à partir du produit **76**.¹⁸⁶

¹⁸⁶ M. I. Crespo *et al.*, *Journal of Medicinal Chemistry*, **1998**, 41, 4021-4035.



▪ Acylation

L'insertion du groupement chloroacétyle sur l'amine en position 2 du benzonitrile est réalisée à partir du chlorure de chloroacétyle en présence de triéthylamine dans le THF à température ambiante. Les conditions opératoires ont permis l'obtention du dérivé **77** avec un rendement de 86%.

▪ Substitution nucléophile

La substitution avec la benzylamine sur le produit **77** est réalisée dans des conditions basiques (carbonate de potassium) dans l'acétonitrile. Le produit **78** est ainsi obtenu avec un rendement de 97%.

▪ Cyclisation

Le produit non cyclisé **78** est ensuite mis en réaction dans un mélange soude 1 N / *N,N*-diméthylformamide. Après 30 minutes de réaction à reflux, le produit cyclisé **79** est obtenu avec un bon rendement (72%).

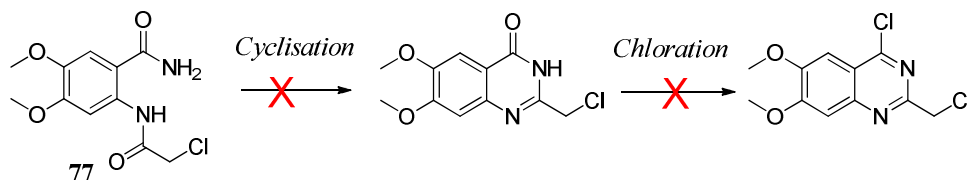
▪ Chloration

La chloration du produit benzylé **79** a été réalisée dans l'oxychlorure de phosphore à reflux. Les nombreux produits secondaires formés lors de la réaction ne nous a pas permis d'isoler le produit chloré **80**.

Pour palier à ce problème, une nouvelle voie de synthèse a été envisagée.

4.3. Obtention des produits cibles par la voie B

Cette voie de synthèse consiste à préparer un dérivé dichloré à partir du produit **77** (préalablement obtenu) en 2 étapes.



Le produit non cyclisé **77** est mis en réaction dans un mélange soude 1 N / *N,N*-diméthylformamide. Après 30 minutes de réaction à reflux, plusieurs produits secondaires se sont formés empêchant la synthèse du composé cyclisé. Suite à ces échecs, la synthèse du dérivé dichloré a été envisagée par une autre méthode.

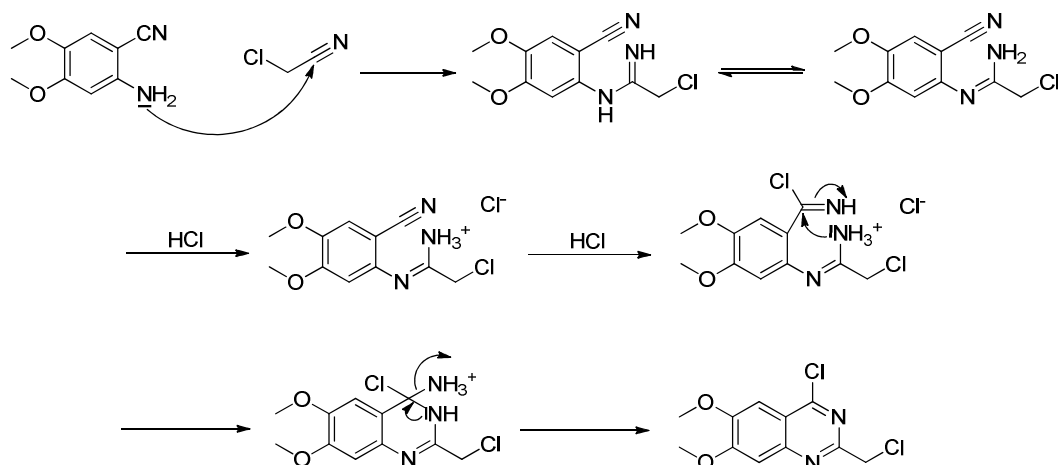
4.4. Obtention des produits cibles par la voie C

La voie de synthèse C se divise en deux grandes parties : la synthèse du dérivé dichloré **81** et la synthèse des produits cibles à partir de ce dernier.

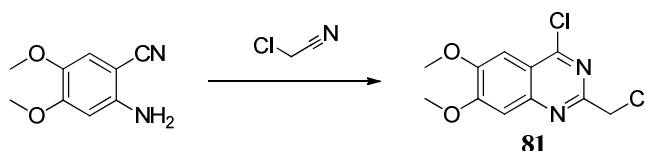
4.4.a. Synthèse du dérivé dichloré (81)

Lors de cette stratégie, les efforts se sont portés sur la synthèse du dérivé dichloré **81**. D'après les travaux de Shishoo *et al.*,¹⁸⁷ le dérivé chloré peut s'obtenir en une étape à partir du 2-amino-4,5-diméthoxybenzonnitrile selon le mécanisme suivant :

¹⁸⁷ C. J. Shishoo *et al.*, *Journal of Heterocyclic Chemistry*, **1990**, 27, 119-126.



Afin d'obtenir le composé **81** avec un rendement optimal, plusieurs conditions ont été envisagées (Tableau 23) :



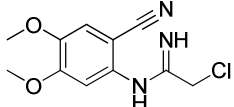
	HCl	Solvant	Température	Produit isolé	Rdt
1	HCl 12N	1,4-dioxane	T.A. ($\approx 20^\circ\text{C}$)	-	-
2	HCl gaz (dioxane barboté 10 min)	1,4-dioxane	0°C	-	-
3	HCl gaz (dioxane barboté 10 min)	1,4-dioxane	T.A. ($\approx 20^\circ\text{C}$)	 intermédiaire	7%
4	HCl gaz (dioxane barboté 10 min)	1,4-dioxane	50°C	81	14%
5	HCl gaz (dioxane barboté 10 min)	1,4-dioxane	200°C	dégradation	-
6	HCl gaz (dioxane barboté 10 min)	THF	50°C	-	-
7	HCl gaz (dioxane barboté 10 min)	MeOH	50°C	-	-
8	HCl gaz (dioxane barboté 6 heures)	1,4-dioxane	T.A. ($\approx 20^\circ\text{C}$)	81	17%

Tableau 23 : Optimisation de la synthèse du produit **81**

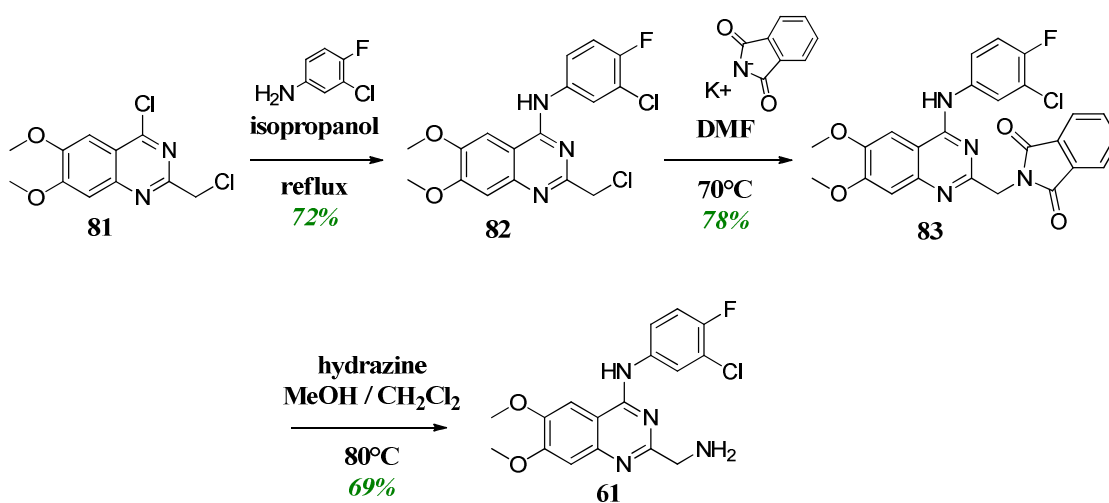
La *condition 8* permet d'obtenir le meilleur rendement (17%). Cette méthode consiste à faire barboter de manière continue de l'HCl gazeux dans le dioxane à température ambiante. Le fait de diminuer le temps de barbotage à 10 min (*condition 3*) réduit considérablement la cinétique de réaction car seul l'intermédiaire de synthèse a été obtenu (7%). La *condition 4* permet d'obtenir le composé **81** avec un rendement de 14% en ne barbotant que 10 minutes mais en chauffant à 50°C . Le fait de chauffer au-delà de 50°C provoque une dégradation du

milieu réactionnel (*condition 5*). La variation du solvant a été réalisée dans les conditions 6 et 7 (THF ou MeOH) mais aucun produit n'a été formé malgré une solubilisation complète. Dans toutes les conditions réactionnelles, le produit de départ n'ayant pas réagi a pu être récupéré sous sa forme chlorhydrate.

Malgré un rendement faible, la *condition 8* nous a permis d'obtenir le dérivé chloré souhaité. Celui a donc pu être utilisé pour poursuivre la synthèse.

4.4.b. Synthèse du produit cible (**61**)

La synthèse du composé **61** se déroule en 3 étapes. Tout d'abord, une substitution nucléophile permet de fixer l'aniline halogénée en position 4, puis une seconde substitution permet de greffer le motif phthalimide sur la chaîne en position 2. Enfin une étape finale de déprotection permet d'obtenir le produit désiré.



▪ Substitution nucléophile aromatique

Le dérivé chloré **81** est mis en solution dans l'isopropanol avec l'aniline halogénée commerciale. Après 2 heures de réaction, le produit formé est isolé par filtration (72%).¹⁸⁸

Une synthèse de Gabriel a ensuite été envisagée afin de générer l'amine primaire sur la chaîne portée en position 2 de la quinazoline.

¹⁸⁸ A. Gazit *et al.*, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **1996**, 4, 1203-1207.

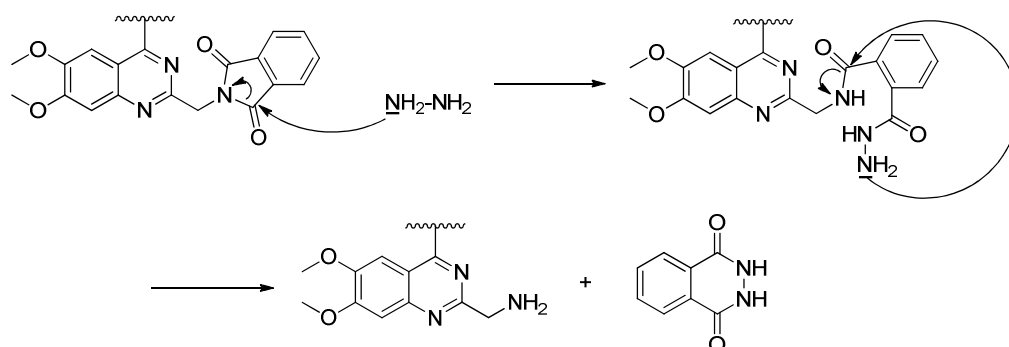
▪ Substitution nucléophile

Le produit **82** réagit avec deux équivalents de phtalimide potassé commercial dans le *N,N*-diméthylformamide. Le milieu réactionnel est porté à 70°C et après 4 heures le composé protégé **83** est obtenu avec un rendement de 83%.

▪ Déprotection

La déprotection du phtalimide s'effectue en présence d'hydrazine monohydrate dans un mélange dichlorométhane / méthanol, mélange nécessaire à la solubilisation du composé **83**. Après 18 heures de réaction à reflux, une purification par chromatographie sur gel de silice élimine le phtalhydrazide et permet d'obtenir le composé cible **61** avec un rendement de 69%.

Mécanisme réactionnel



Les produits cibles de type 2-aminométhylquinazoliniques sont en cours de synthèse grâce à la voie C. L'optimisation de la réaction « one pot » de cyclisation/chloration est également en cours.

MODULATION DE L'HÉTÉROCYCLE

THIAZOLOTRIAZINES

THIÉNOPYRIMIDINES

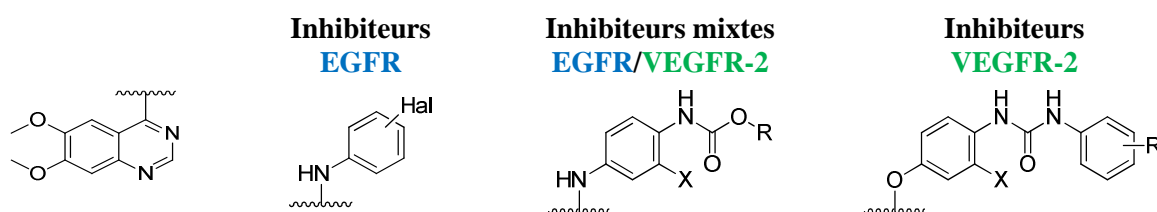
- CONCEPTION

- EVALUATIONS PHARMACOLOGIQUES

- STRATÉGIE DE SYNTHÈSE

I. CONCEPTION DES THIAZOLOTRIAZINES ET DES THIÉNOPYRIMIDINES

Afin de développer de nouveaux inhibiteurs potentiels de l'activité tyrosine kinase, nos travaux se sont portés sur le remplacement de la quinazoline par des hétérocycles azotés peu rencontrés parmi les ITKs conventionnels : des thiazolotriazines et des thiénoypyrimidines. Nous avons appliqué nos relations structure-activité sur ces hétérocycles afin d'évaluer le potentiel inhibiteur des nouvelles molécules synthétisées.

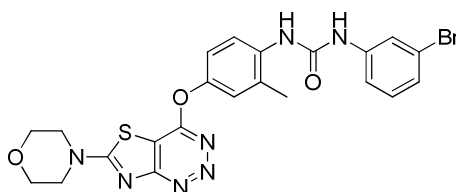


Modulation de la quinazoline :



- Les **thiazolotriazines** présentent un hétérocycle central portant deux atomes d'azote, nécessaires au bon positionnement dans les sites actifs de l'EGFR et du VEGFR-2, en position 1 et 3. Tout comme pour les benzotriazines, l'ajout d'un azote intracyclique en position 2 pourrait permettre de nouvelles liaisons hydrogène. Le motif thiazole accolé à la pyrimidine pourrait également favoriser des interactions avec la région charnière des sites actifs. Le groupement R (morpholine ou pipéridine) substitué sur le thiazole pourrait augmenter les paramètres de biodisponibilité en augmentant la solubilité des composés.

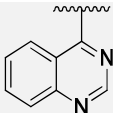
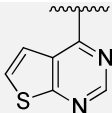
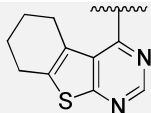
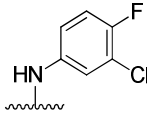
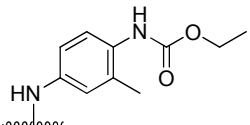
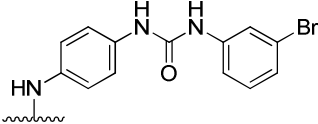
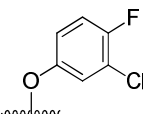
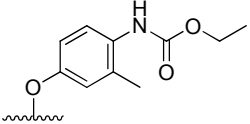
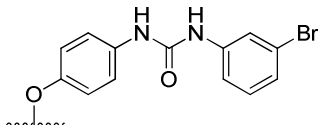
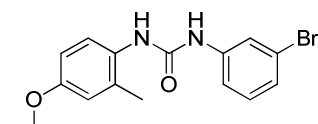
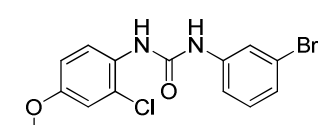
Suite aux problèmes de synthèse rencontrés, un seul composé a été obtenu dans cette série. Il s'agit du produit **84** représenté ci-dessous.



84

- Comme les thiazolotriazines, les **dérivés thiénoypyrimidiques** permettent de garder les atomes d'azotes essentiels en position 1 et 3. Le groupement aryle de la quinazoline est remplacé par un de ces bioisostères, le thiophène. Deux séries de thiénoypyrimidines ont été envisagées afin d'examiner le rôle d'un cyclohexane accolé à l'hétérocycle central : des thiénoypyrimidines non fonctionnalisées sur le thiophène (**91-98**) et des tétrahydrobenzo-thiénoypyrimidines (**99-105**).

Aussi, afin de pouvoir comparer les différentes séries chimiques entre elles, les analogues quinazoliques non substitués en position 6 et 7 ont été synthétisés (**85-90**).

			
	85	91	99
	86	92	100
	87	93	101
	88	94	102
	89	95	-
	90	96	103
	-	97	104
	-	98	105

II. RÉSULTATS PHARMACOLOGIQUES

1. Résultats pharmacologiques du composé 84

La thiazolotriazine **84** a été évaluée pharmacologiquement sur EGFR et VEGFR-2 et sur plusieurs lignées cellulaires (PC3, HT29, MCF7 et HUVEC). Les résultats sont représentés dans le Tableau 24.

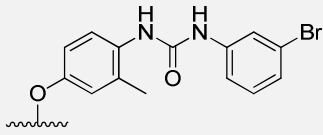
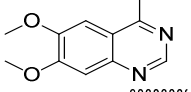
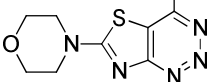
	CI ₅₀ en nM ou % d'inhibition		CI ₅₀ en μM			
	EGFR	VEGFR-2	PC3, prostate	HT29, côlon	MCF7, sein	HUVEC
vandétanib	800	70	7,3	1,8	9,6	4,4
 P24	> 10 000	4	> 10	> 10	> 10	0,8
 84	> 10 000	54% à 10 μM	> 10	> 10	> 10	> 10

Tableau 24 : Résultats enzymatiques et cellulaires du composé 84

Discussion

Le composé **84** présente une valeur d'inhibition supérieure à 10 μM sur l'EGFR tout comme son analogue **P24**. Sur le VEGFR-2, le pourcentage d'inhibition de l'activité enzymatique n'est que de 54% à 10 μM. Sur les différentes lignées cellulaires testées, aucune activité antiproliférative n'est détectée pour le composé **84**.

Conclusion

La modulation de la quinazoline sur des dérivés de type 4-aryloxy en motif thiazolotriazinique conduit à une chute de l'affinité pour le VEGFR-2. La synthèse des autres composés de cette famille ne sera donc pas réalisée.

2. Résultats pharmacologiques des thiényrimidines et des quinazolines

2.1. Résultats enzymatiques (EGFR et VEGFR-2) et cellulaires

L'inhibition enzymatique, ainsi que le pouvoir antiprolifératif des composés **85** à **105** ont été évalués *in vitro*. Les résultats sont représentés dans les Tableaux 25, 26 et 27.

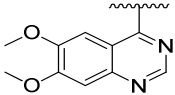
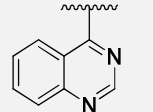
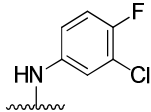
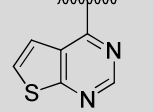
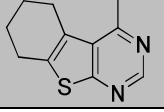
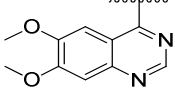
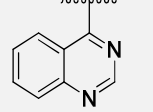
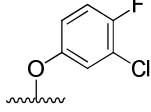
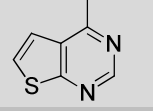
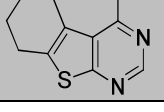
Hétérocycle	Substituant	CI ₅₀ en nM		CI ₅₀ en μM				
		<i>EGFR</i>	<i>VEGFR</i>	PC3, prostate	HT29, côlon	MCF7, sein	HUVEC	
		vandétanib	800	70	7,3	1,8	9,6	4,4
		P4	400	5 300	6,6	5,7	4,9	N.D.
		85	30	> 10 000	> 10	> 10	> 10	> 10
		91	2 980	> 10 000	> 10	> 10	> 10	> 10
		99	1 330	> 10 000	> 10	> 10	> 10	> 10
		P17	> 10 000	9 500	> 10	> 10	> 10	N.D.
		88	590	> 10 000	> 10	> 10	> 10	> 10
		94	> 10 000	> 10 000	> 10	> 10	> 10	> 10
		102	> 10 000	3 500	> 10	> 10	> 10	> 10

Tableau 25 : Résultats enzymatiques et cellulaires des dérivés halogénés en série anilino et aryloxy

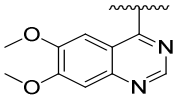
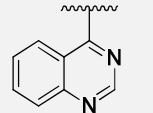
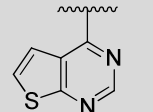
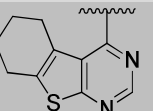
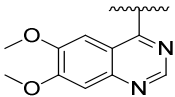
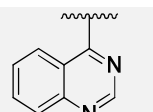
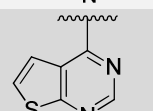
Hétérocycle	Substituant	CI ₅₀ en nM		CI ₅₀ en μM			
		EGFR	VEGFR	PC3, prostate	HT29, côlon	MCF7, sein	HUVEC
	vandétanib	800	70	7,3	1,8	9,6	4,4
	P8	900	500	> 10	> 10	> 10	N.D.
	86	> 10 000	3 820	> 10	> 10	> 10	> 10
	92	> 10 000	> 10 000	> 10	> 10	> 10	> 10
	100	> 10 000	3 140	> 10	> 10	> 10	> 10
	P19	> 10 000	600	> 10	> 10	> 10	N.D.
	89	> 10 000	710	> 10	> 10	> 10	> 10
	95	> 10 000	1 140	> 10	> 10	> 10	> 10

Tableau 26 : Résultats enzymatiques et cellulaires des dérivés substitués par un carbamate en série anilino et aryloxy

Hétérocycle	Substituant	X	CI ₅₀ en nM		CI ₅₀ en μM ou pourcentage d'inhibition à 10 μM				
			EGFR	VEGFR	PC3, prostate	HT29, côlon	MCF7, sein	HUVEC	
			vandétanib	800	70	7,3	1,8	9,6	4,4
		H	P36	7 710	12	5,6	4,4	5,9	97%
		H	87	> 10 000	91	> 10	> 10	> 10	94%
		H	93	> 10 000	1 160	> 10	> 10	> 10	93%
		H	101	3 950	310	> 10	> 10	5,1	50%
		H	P23	> 10 000	6	> 10	7,3	9,8	0,9
		CH ₃	P24	> 10 000	4	> 10	> 10	> 10	0,8
		Cl	P25	> 10 000	8	> 10	> 10	> 10	0,5
		H	90	> 10 000	8	> 10	5,8	> 10	82%
		H	96	> 10 000	18	> 10	> 10	> 10	60%
		CH ₃	97	> 10 000	16	> 10	> 10	> 10	17%
		Cl	98	> 10 000	9	> 10	> 10	> 10	57%
		H	103	> 10 000	1 110	> 10	> 10	6,7	78%
		CH ₃	104	3 290	34	8,9	> 10	6,2	95%
	Cl	105	1 260	15	> 10	> 10	> 10	87%	

Tableau 27 : Résultats enzymatiques et cellulaires des dérivés substitués par une urée en série anilino et aryloxy

Discussion

Quelle que soit la série chimique (quinazoline, thiénopyrimidine ou tétrahydrobenzo-thiényrimidine), les valeurs d'inhibition de la prolifération cellulaire cancéreuse restent faibles ($CI_{50} > 10 \mu\text{M}$). Cependant, plusieurs différences sont observées quant aux inhibitions enzymatiques des différents composés.

- Dérivés halogénés (Tableau 25)

La substitution des différents hétérocycles par une aniline halogénée conduit à une sélectivité EGFR *versus* VEGFR-2. La non-substitution de la quinazoline par des chaînes méthoxy en position 6 et 7 permet d'augmenter l'inhibition enzymatique sur EGFR (CI_{50} **85** = 30 nM). Le remplacement de la quinazoline par des motifs thiényrimidiniques permet de garder des inhibitions intéressantes sur l'EGFR (CI_{50} **91** et **99** $\approx \mu\text{M}$).

En série aryloxy, la quinazoline **88** montre une bonne affinité pour l'EGFR (CI_{50} = 0,59 μM). La thiényrimidine **94** obtient des résultats d'inhibition enzymatique équivalents à son analogue 6,7-diméthoxyquinazolinique **P17**, alors que la tétrahydrobenzo-thiényrimidine **102** présente une valeur d'inhibition importante sur le VEGFR-2 (CI_{50} = 3,50 μM).

- Dérivés substitués par un carbamate (Tableau 26)

Les modulations du motif 6,7-diméthoxyquinazoline par une quinazoline, une thiényrimidine ou une tétrahydrobenzo-thiényrimidine conduisent à une diminution de l'activité mixte EGFR/VEGFR-2. La quinazoline **86** et la thiényrimidine **106** présentent néanmoins des valeurs au micromolaire sur le VEGFR-2.

Les dérivés 4-aryloxy **89** et **95** montrent une sélectivité VEGFR-2 *versus* EGFR équivalente à leur homologue 6,7-diméthoxyquinazolinique **P19**.

- Dérivés substitués par une urée (Tableau 27)

En série anilino, on observe une sélectivité pour le VEGFR-2 *versus* EGFR. Cependant la modulation de l'hétérocycle provoque une légère diminution de l'affinité pour le VEGFR-2 par rapport aux composés quinazoliniques. La tétrahydrobenzo-thiényrimidine **101** présente également une valeur d'inhibition intéressante sur l'EGFR (CI_{50} = 3,95 μM).

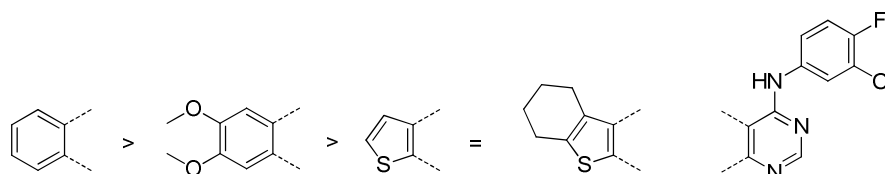
En série aryloxy, la modulation du motif 6,7-diméthoxyquinazoline par une quinazoline, une thiényrimidine ou une tétrahydrobenzo-thiényrimidine a permis de garder une sélectivité pour le VEGFR-2 avec d'excellentes valeurs d'inhibition. Les dérivés quinazoliques et thiényrimidiniques gardent des affinités proches de leurs analogues 6,7-diméthoxyquinazoliques alors que l'hétérocycle tétrahydrobenzo-thiényrimidinique conduit à une diminution de cette affinité. Cependant les tétrahydrobenzo-thiényrimidines **104** et **105** présentent, en plus de leur affinité pour le VEGFR-2, des CI_{50} au micromolaire sur EGFR.

On peut également noter que les composés substitués par un motif urée présentent des CI_{50} ou des pourcentages d'inhibition intéressant sur la lignée HUVEC

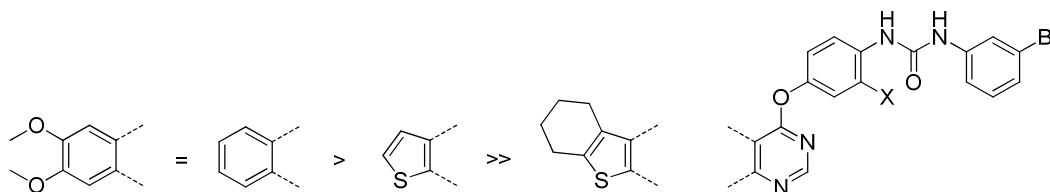
Conclusion

Le remplacement du motif 6,7-diméthoxyquinazolique par des hétérocycles thiényrimidiniques a permis de mettre en évidence des inhibiteurs de l'EGFR et du VEGFR-2. Grâce aux différents résultats de relations structure-activité, des pharmacophores pour les deux kinases ont pu être établis.

Inhibiteurs EGFR



Inhibiteurs VEGFR-2



L'inhibition de la prolifération cellulaire cancéreuse de ces nouveaux inhibiteurs est supérieure à 10 μ M. Des modulations chimiques sont donc à envisager, comme l'insertion de chaînes aminoalkoxy sur ces nouvelles structures.

2.2. Résultats enzymatiques des dérivés substitués par un motif urée

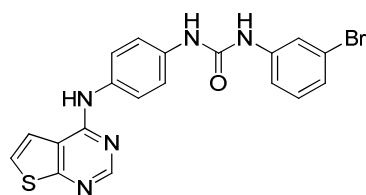
La 6,7-diméthoxyquinazoline **P23** ayant montré des résultats très intéressants sur les kinases PDGFR et c-Kit, nous avons envisagé d'évaluer ses analogues thiénoypyrimidiques et quinazoliniques sur un panel de neuf kinases (EGFR, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR- β , c-Kit, c-Met, Src et Raf). Les résultats sont représentés dans le Tableau 28.

La modulation de l'hétérocycle a provoqué une chute de l'affinité pour les kinases Met, Raf, VEGFR (1, 2 et 3) et PDGFR. Une diminution de l'inhibition est également observée sur Src pour les quinazolines (**87** et **90**) et les thiénoypyrimidines (**93** et **96**). Les tetrahydrobenzo-thiénoypyrimidines **101** et **103** permettent quant à elles de garder une affinité pour la kinase Src. La non substitution par des chaînes méthoxy en position 6 et 7 de la quinazoline fait chuter l'activité sur le PDGFR et VEGFR-1, mais permet de garder des inhibitions correctes sur VEGFR-2 et 3 ainsi que sur c-Kit.

La modulation de l'hétérocycle a essentiellement permis d'augmenter ou de garder des inhibitions de c-Kit très intéressantes. En effet, les six nouveaux composés testés présentent des CI_{50} inférieures à 17 nM sur cette kinase. Il est également intéressant de noter que les dérivés anilino **87**, **93** et **101** présentent de meilleures inhibitions que leurs homologues aryloxy **90**, **96** et **103**. De plus les composés **93** et **101** montrent une excellente sélectivité pour c-Kit vis-à-vis des autres kinases testées.

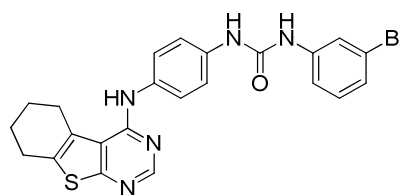
Conclusion

Le remplacement de la quinazoline par de nouveaux hétérocycles a conduit à une diminution de l'affinité pour les kinases VEGFR et PDGFR. Cependant la modulation de l'hétérocycle quinazolinique en thiénoypyrimidine a permis la découverte de nouveaux inhibiteurs sélectifs de c-Kit (**93** et **101**).



93

CI_{50} c-Kit = 1 nM



101

CI_{50} c-Kit = 6 nM

	X	CI ₅₀ en nM									
		EGFR	c-Met	Raf	Src	VEGFR-1	VEGFR-2	VEGFR-3	PDGFR-β	c-Kit	
cédiranib		2100	967	> 10 000	156	39	14	11	38	1530	
	O	P23	> 10 000	2310	930	5470	46	6	9	5	16
	NH	87	> 10 000	> 10 000	> 10 000	> 10 000	5750	91	47	850	1
	O	90	> 10 000	> 10 000	6220	> 10 000	650	8	7	320	14
	NH	93	> 10 000	> 10 000	4020	> 10 000	> 10 000	1160	1980	2120	1
	O	96	> 10 000	> 10 000	> 10 000	> 10 000	1080	18	6	570	11
	NH	101	3950	> 10 000	> 10 000	7640	7150	310	420	2820	6
	O	103	> 10 000	> 10 000	5840	8460	1700	1110	1020	2300	17

Tableau 28: Résultats d'inhibition enzymatique des dérivés substitués par une urée
 CI₅₀ entre 1-9 nM / CI₅₀ entre 10-99 nM / CI₅₀ entre 100-999 nM / CI₅₀ entre 1000-9999 nM

Intérêt des inhibiteurs sélectifs de c-Kit en oncologie

Les tumeurs stromales digestives sont définies comme des tumeurs mésoenchymateuses exprimant le récepteur c-Kit. La liaison c-Kit/SCF est responsable d'une activation d'effecteurs intracellulaires impliqués dans la survie, la prolifération, la différenciation et l'adhésion cellulaires. Une mutation du gène c-Kit peut engendrer une phosphorylation du récepteur indépendante du ligand, ce qui aboutit à une activation continue du récepteur. Les tumeurs stromales présentent ce type de mutations activatrices. L'imatinib est un inhibiteur de l'activité tyrosine kinase de c-kit ayant prouvé son efficacité dans les tumeurs stromales. La justification de son utilisation est liée à son action inhibitrice de la protéine c-Kit activée indépendamment de son ligand.¹⁸⁹

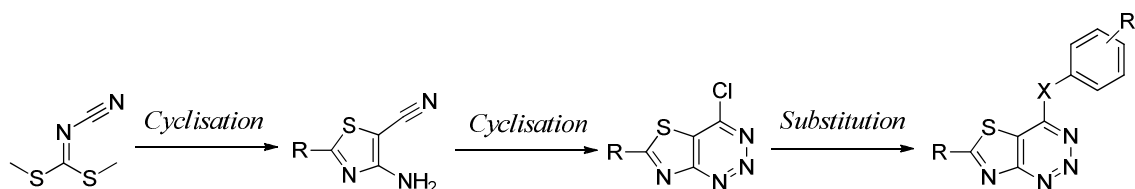
Les ITKs ciblant le récepteur c-Kit sont également à l'étude dans différents cancers exprimant une mutation ou une suractivation du récepteur. Parmi ces cancers, on peut citer la leucémie myéloblastique, la leucémie à mastocytes, le cancer du poumon à petites cellules, le cancer testiculaire et le neuroblastome.

¹⁸⁹ M. Linch *et al.*, *OncoTargets and Therapy*, **2013**, 30, 1011-1023.

III. STRATÉGIE DE SYNTHÈSE

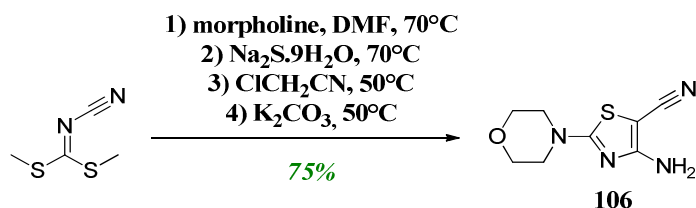
1. Synthèse des thiazolotriazines

Les produits cibles de type thiazolotriaziniques sont obtenus à partir d'un intermédiaire clé chloré.



1.1. Synthèse de l'intermédiaire chloré 107

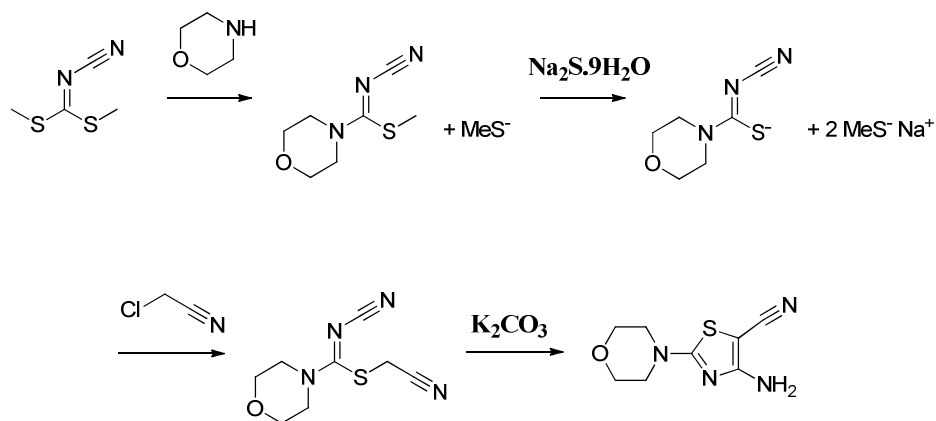
La synthèse du dérivé chloré a été mise au point par Thomae *et al.* Cette synthèse passe par l'obtention de l'intermédiaire **106**.¹⁹⁰



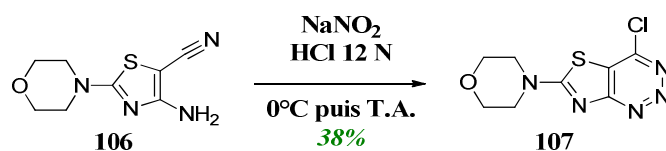
Le diméthylcyanodithioimidocarbonate commercial réagit avec la morpholine dans le *N,N*-diméthylformamide à 70°C. Après une heure de réaction, le sulfure de sodium est ajouté pour former le thiolate de sodium associé. Le chloroacétonitrile et du carbonate de potassium sont ensuite ajoutés au milieu réactionnel pour cycliser le produit précédemment formé. Le composé **106** est obtenu avec un rendement de 75%.

Les étapes de la réaction sont développées ci-après.

¹⁹⁰ Thomae D. *et al.*, Tetrahedron, **2008**, 64, 9309-9314.



Le dérivé **107** est ensuite cyclisé et chloré « one-pot » à partir du composé **106**.¹⁹¹

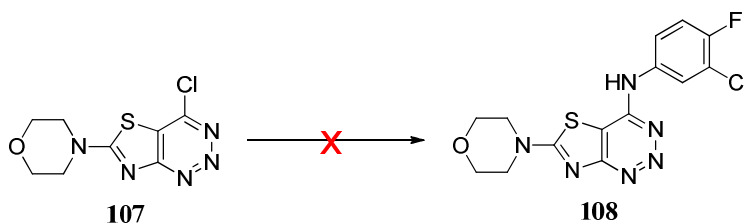


Le dérivé **106** est traité par le nitrite de sodium en présence d'acide chlorhydrique concentré pour donner le dérivé chloré **107** avec un rendement de 38%.

1.2. Synthèse des 4-anilino-thiazolotriazines

Plusieurs méthodes ont été utilisées pour synthétiser les 4-anilinothiazolotriazines à partir du dérivé chloré **107**, mais aucune d'entre elles n'a permis l'obtention des produits cibles (Tableau 29).

¹⁹¹ Thomae D. et al., Tetrahedron, **2009**, 65, 2982-2988.



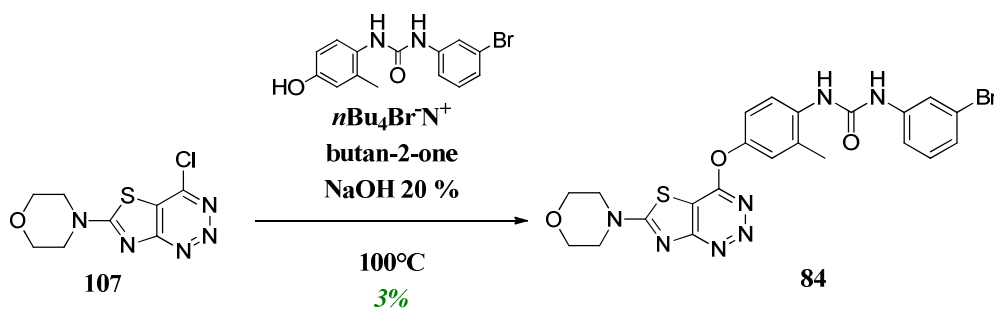
	Solvant	Base	Température	Temps de réaction	Résultats
1	isopropanol	/	T.A. puis reflux	48 h	Aucune évolution
2	isopropanol	/	reflux	48 h	Aucune évolution
3	isopropanol	DIEA	80°C	36 h	Aucune évolution
4	DMF	/	70°C	48 h	Aucune évolution
5	DMF	K ₂ CO ₃	70°C	24 h	Aucune évolution
6	NMP	/	100 °C	24 h	Aucune évolution
7	2-butoxyéthanol	/	130°C	24 h	Dégradation
8	ACN	Et ₃ N	60°C, tube scellé	48 h	Aucune évolution
9	NMP	K ₂ CO ₃ , Et ₃ N	135 °C	4 h	Dégradation

Tableau 29 : Différentes conditions utilisées pour l'obtention du produit 108

Aucune évolution n'a été observée malgré les changements de solvant (isopropanol, *N,N*-diméthylformamide, *N*-méthyl-2-pyrrolidone...) et de base (K₂CO₃, DIEA, Et₃N...). Dans les conditions 7 et 9, le chauffage au-delà de 100°C a provoqué une dégradation du milieu réactionnel.

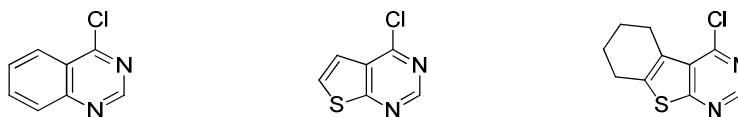
1.3. Synthèse de la 4-aryloxy-thiazolotriazine 84

La 4-aryloxythiazolotriazine **84** a été obtenue grâce à un transfert de phase en présence du dérivé chloré et du phénol correspondant préalablement synthétisé. La purification du produit **84** a été difficile du fait de sa faible solubilité dans les solvants organiques engendrant un rendement faible 3%.



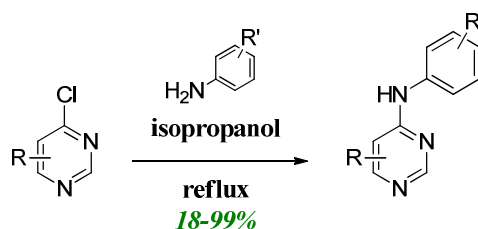
2. Synthèse des thiénoypyrimidines et des quinazolines

La synthèse de dérivés thiénoypyrimidiniques et quinazolines a été réalisée à partir des dérivés chlorés commerciaux suivants :



2.1. Synthèse des produits cibles « anilino »

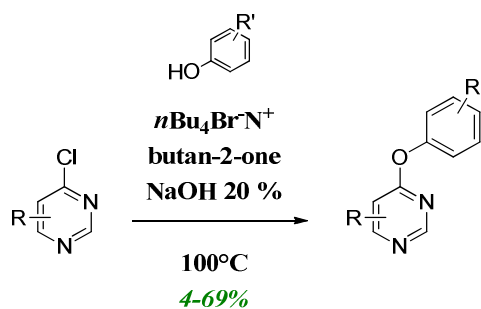
Les substitutions nucléophiles aromatiques réalisées dans l'isopropanol à reflux ont permis d'obtenir neuf composés cibles sous forme base après alcalinisation avec des rendements compris entre 18 et 99%.



	85 99%	91 55%	99 33%
	86 82%	92 74%	100 18%
	87 99%	93 48%	101 65%

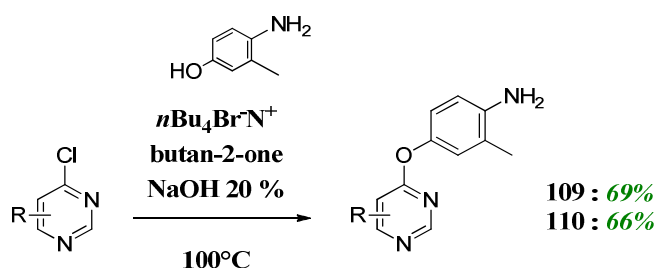
2.2. Synthèse des produits cibles « aryloxy »

Les produits cibles « aryloxy » substitués par des halogènes et des motifs de type urée sont obtenus par substitution nucléophile en présence d'un catalyseur de transfert de phase, le bromure de *N*-tétrabutylammonium dans un mélange soude/butan-2-one. Les rendements des produits obtenus varient entre 4 et 69%.



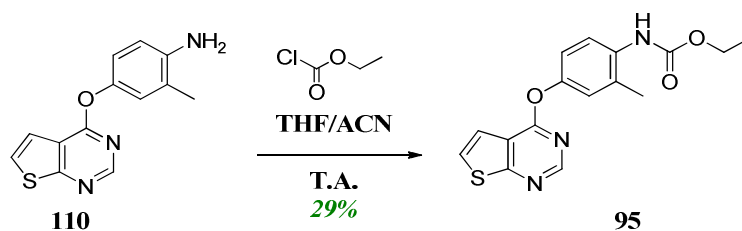
	88 4%	94 40%	102 29%
	90 12%	96 36%	103 69%
	-	97 57%	104 64%
	-	98 11%	105 13%

Les produits cibles « aryloxy » substitués par des carbamates sont obtenus en deux étapes.



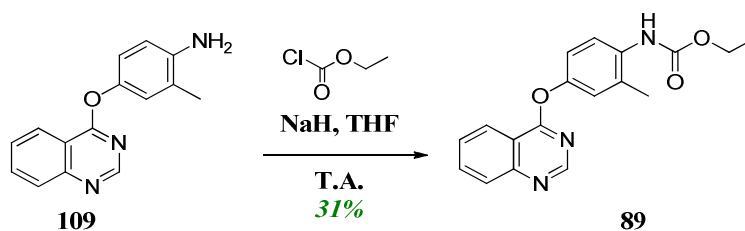
La première étape consiste en la substitution du *mé*ta 4-amino-crésol sur le dérivé chloré approprié à l'aide d'un transfert de phase. La quinazoline **109** et la thienopyrimidine **110** sont obtenues avec des rendements respectifs de 69 et 66%.

La seconde étape correspond à la formation du motif carbamate. Les composés cibles **89** et **95** ont été synthétisés *via* deux méthodes différentes.

Méthode A

Le composé **110** est mis en réaction dans un mélange tétrahydrofuranne / acétonitrile (5 : 5) en présence du chloroformiate d'éthyle. Après 24h à température ambiante, le produit **95** est obtenu avec un rendement de 29%.

Le rendement obtenu étant assez faible, nous avons opté pour la méthode B pour synthétiser le composé **89**.

Méthode B

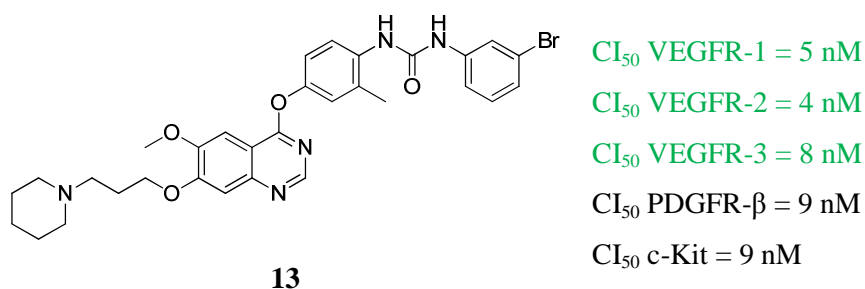
Le composé **109** est mis en réaction dans le tétrahydrofuranne en présence d'hydrure de sodium pendant 30 minutes, puis le chloroformiate d'éthyle est ajouté. Après 3h à température ambiante, le produit **89** est obtenu avec un rendement de 31%.

Le rendement n'a pas été augmenté grâce à cette méthode, cependant le temps de réaction a pu être diminué.

CONCLUSIONS
& PERSPECTIVES

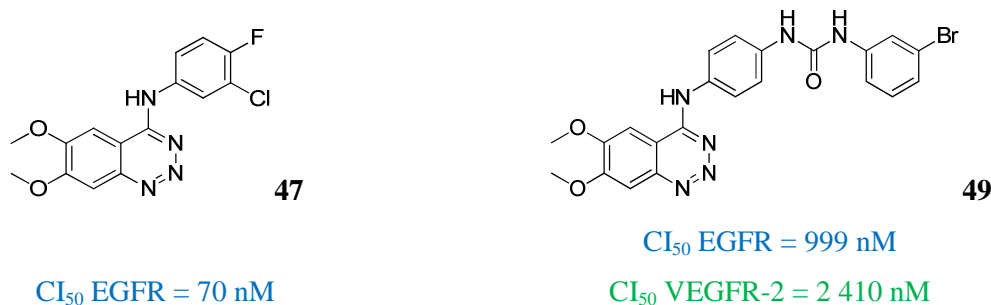
L'objectif de nos travaux consistait à synthétiser des nouveaux composés, inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase. La conception de molécules a donc été envisagée à partir des travaux antérieurs menés au sein du laboratoire. Grâce à différentes voies de synthèse mises au point, une soixantaine de composés originaux ont pu être obtenus.

La première partie de nos travaux s'est consacrée à l'**augmentation du pouvoir cytotoxique de composés 4-aryloxyquinazoliniques**, inhibiteurs multikinase VEGFR, PDGFR et c-Kit. L'incorporation de chaînes aminoalkoxy en position 7 de ces dérivés a permis de répondre à l'objectif. De plus, les composés ont présenté un pouvoir anti-migratoire et anti-angiogénique très intéressant et comparable à celui du cédiranib, inhibiteur de référence. Les études de stabilité sur le composé le plus prometteur (**13**) ont prouvé que le produit était stable aussi bien dans le plasma que sur microsomes humains.

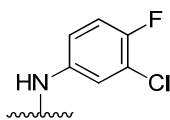
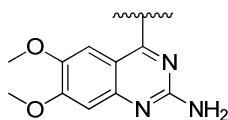
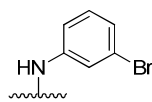
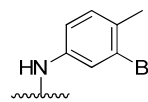
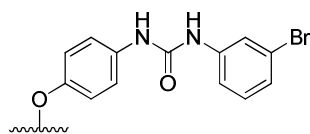
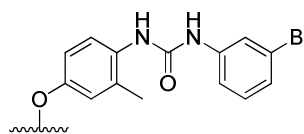


Notre second objectif portait sur la **modulation de la position 2 de la quinazoline**. Dans ce but, des 2-aminoquinazolines, des benzo-[d]-1,2,3-triazines et des 2-aminométhylquinazolines ont été synthétisées et évaluées pharmacologiquement.

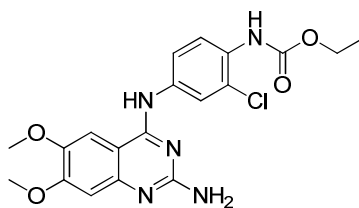
L'ajout d'un azote intracyclique en position 2 pour former les **benzo-[d]-1,2,3-triazines** a conduit à des nouveaux ITKs. En effet, le composé halogéné **47** s'est révélé être un puissant inhibiteur de l'EGFR et le composé **49** substitué par une urée a montré une inhibition mixte de l'EGFR et du VEGFR-2.



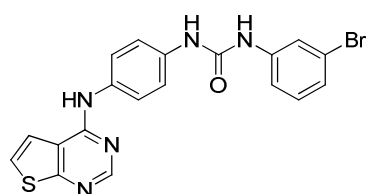
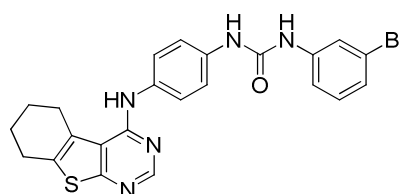
Les évaluations pharmacologiques effectuées sur les **2-aminoquinazolines** ont mis en évidence de nouvelles structures inhibitrices de l'activité tyrosine kinase. Les 2-aminoquinazolines substituées par des anilines halogénées (**50-52**) ont présenté une inhibition de l'ordre du micromolaire sur l'EGFR. De plus, la fonctionnalisation par un motif phénoxy-urée en position 4 de 2-aminoquinazolines (**59, 60**) a permis de mettre en évidence des molécules présentant une forte affinité pour le VEGFR-2.

**50** CI_{50} EGFR = 130 nM**51** CI_{50} EGFR = 1800 nM**52** CI_{50} EGFR = 2640 nM**59** CI_{50} VEGFR-2 = 37 nM**60** CI_{50} VEGFR-2 = 99 nM

La cible et le mode d'action des 2-aminoquinazolines substituées par un motif carbamate ont pu être déterminés grâce à différentes études (dénaturation thermique de l'ADN, dichroïsme circulaire, étude par fluorescence). Ainsi, nous avons pu prouver que le composé le plus cytotoxique de cette classe (**55**) présente un pouvoir intercalant de l'ADN.

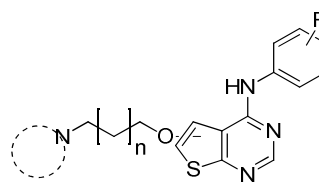
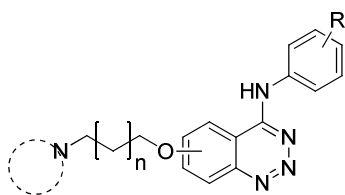
**55** : Intercalant de l'ADN

Dans la troisième partie de nos travaux de thèse, la modulation de l'hétérocycle quinazolinique central a été envisagée avec la synthèse de dérivés **thiazolotriaziniques** et **thiénopyrimidiniques**. Les évaluations pharmacologiques entreprises sur un panel de neuf kinases ont permis de mettre en avant de nouveaux inhibiteurs sélectifs du récepteur c-Kit (**93** et **101**).

**93**CI₅₀ c-Kit = 1 nM**101**CI₅₀ c-Kit = 6 nM

Malgré des résultats sur enzymes très intéressants, la plupart des molécules synthétisées (benzotriazines, 2-aminoquinazolines et thiénopyrimidines) ont présenté un pouvoir antiprolifératif assez faible sur les lignées cellulaires cancéreuses (PC3, prostate ; HT29, côlon ; MCF7, sein). Une des perspectives à envisager est l'incorporation de chaînes aminoalkoxy sur ces composés. En effet, nous avons prouvé l'importance de ces chaînes sur les quinazolines pour favoriser l'inhibition de la prolifération dans la première partie de notre travail.

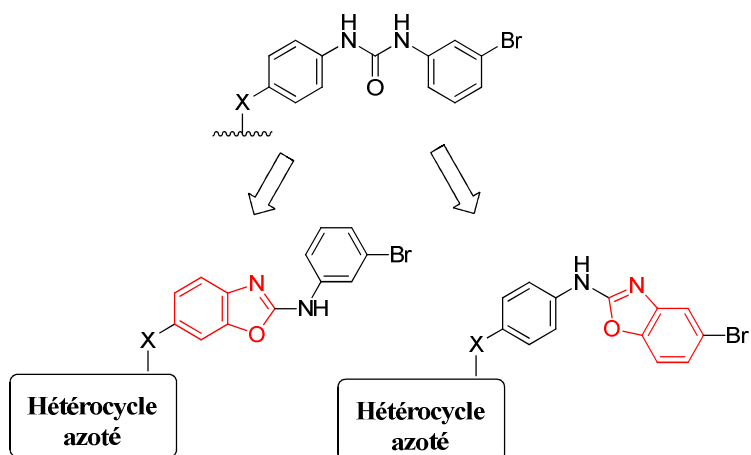
Inhibiteurs potentiels



Aussi, il serait intéressant de déterminer le rôle exact de ces chaînes dans l'inhibition de la prolifération cellulaire cancéreuse.

Nous pourrions également envisager la modulation du motif urée pour découvrir de nouveaux inhibiteurs originaux. Le motif urée pourrait en effet être rigidifié en motif

benzoxazole, groupement renfermant les hétéroatomes essentiels à l'interaction avec les sites actifs.



PARTIE
EXPÉRIMENTALE

PROTOCOLES BIOLOGIQUES

- INHIBITION DE LA PROLIFÉRATION CELLULAIRE

- INHIBITION DE L'ACTIVITÉ TYROSINE KINASE

- ÉTUDE DU POUVOIR ANTI-ANGIOGÉNIQUE
 - ÉTUDE DU POUVOIR INVASIF

- TEST DE DÉNATURATION THERMIQUE DE L'ADN
 - ÉTUDE DE L'ABSORPTION UV-VISIBLE

 - ÉTUDE DU DICHROÏSME CIRCULAIRE

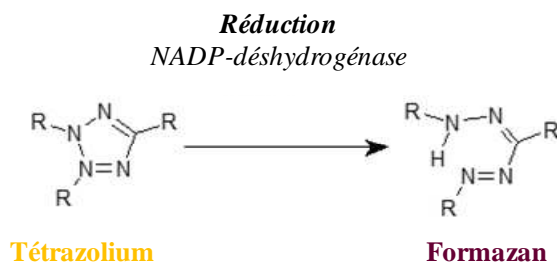
INHIBITION DE LA PROLIFÉRATION CELLULAIRE

L'inhibition de la prolifération cellulaire des composés inhibiteurs de tyrosine kinase a été réalisée par Madame Amélie Barczyk, au sein du laboratoire de pharmacologie de l'Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol. L'activité antiproliférative a été effectuée sur trois lignées cellulaires cancéreuses humaines : la lignée cellulaire **PC3** (cancer de la prostate) ; la lignée cellulaire **MCF7** (cancer du sein) et la lignée cellulaire **HT29** (cancer colorectal). L'inhibition de la prolifération cellulaire a également été réalisée sur la lignée cellulaire **HUVEC** qui surexprime le VEGFR et sur la lignée cellulaire saine **MRC5** (fibroblastes). Les composés de référence utilisés sont le vandetanib et le cédiranib achetés chez Selleck chemicals.

CULTURE CELLULAIRE : Les cellules sont cultivées en monocouche dans un milieu de culture (Life Technologies) supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal (SVF) et contenant des antibiotiques tels que la pénicilline (100 UI/mL) et la streptomycine (100 µg.mL⁻¹) (RPMI-1640, pour la lignée prostatique **PC3** ; MEM, pour les lignées **MCF7** et **MRC5** ; DMEM, pour la lignée colorectale **HT29**). Les cellules **HUVEC** sont cultivées dans un milieu de culture Medium 200 supplémenté avec du LVE.

Les cellules sont placées dans une étuve à 37°C sous atmosphère humide contrôlée et enrichie à 5% de CO₂.

PRINCIPE DU TEST : Le test MTS est un test colorimétrique basé sur la capacité des mitochondries fonctionnelles des cellules à réduire le produit MTS (dérivé tétrazolium) en cristaux de formazan *via* une enzyme mitochondriale, la NADP-déshydrogénase. Cette réduction entraîne un changement de couleur de la molécule qui passe du jaune au pourpre. Le pourcentage de cellules vivantes peut donc être déterminé par la lecture de l'absorbance.



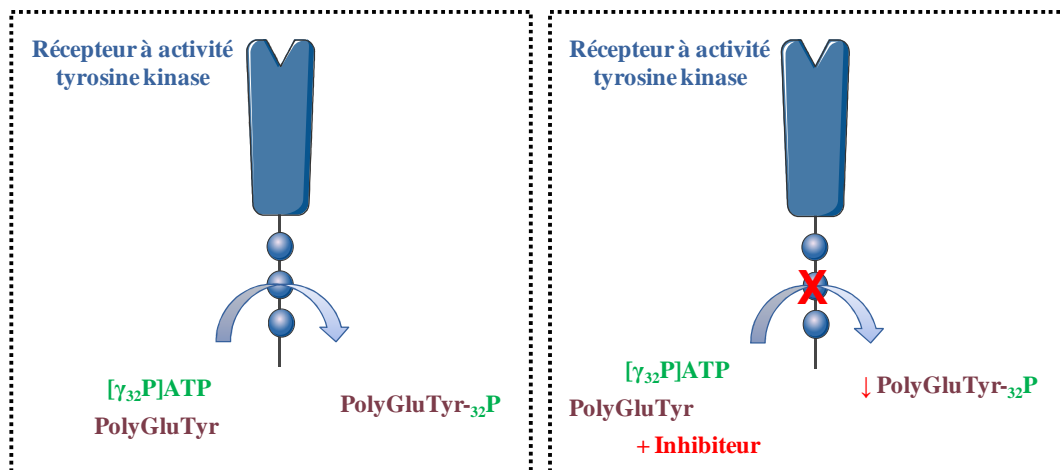
L'augmentation de l'absorbance est le marqueur de la prolifération cellulaire. En effet, plus il reste de cellules vivantes, plus il se forme de dérivés formazan de couleur pourpre. Ainsi, plus l'absorbance augmente, moins l'inhibiteur est efficace.

PROTOCOLE : Les cellules sontensemencées dans des plaques 96 puits (3000 cellules par puits). Elles sont ensuite cultivées pendant 24 heures dans leur milieu de culture et traitées par les composés à étudier. Les solutions-mères de composés sont préparées dans le DMSO à une concentration de 10^{-2} M. Ces solutions sont ensuite diluées dans du milieu de culture pour obtenir des concentrations finales en DMSO inférieures à 1 %, compatibles avec la croissance cellulaire. Après 72 heures d'incubation les cellules sont mises en contact avec 20 μ L d'une solution de MTS. Après 1 à 4 heures d'incubation, l'absorbance est mesurée grâce à un lecteur de microplaques Power wave XS (Biotek) à 490 nM. Chaque expérience est réalisée en triplicate pour chaque concentration de composé. Les résultats obtenus sont traités par le logiciel Gen5 et sont exprimés suivant une courbe effet dose traduisant le pourcentage de cellules vivantes en fonction de la concentration de la molécule étudiée. Cette courbe permet de déterminer la CI_{50} qui correspond à la concentration de la molécule pour laquelle on observe une réduction de 50% de la viabilité cellulaire par rapport à un contrôle n'ayant subi aucun traitement.

INHIBITION DE L'ACTIVITÉ TYROSINE KINASE

Les mesures de l'activité tyrosine kinase de l'**EGFR** (issus de membranes purifiées des cellules A431) et du **VEGFR-2** (protéine recombinante) sont réalisées à la Plateforme de Binding de l'ICPAL par Madame Amélie Barczyk et moi-même.

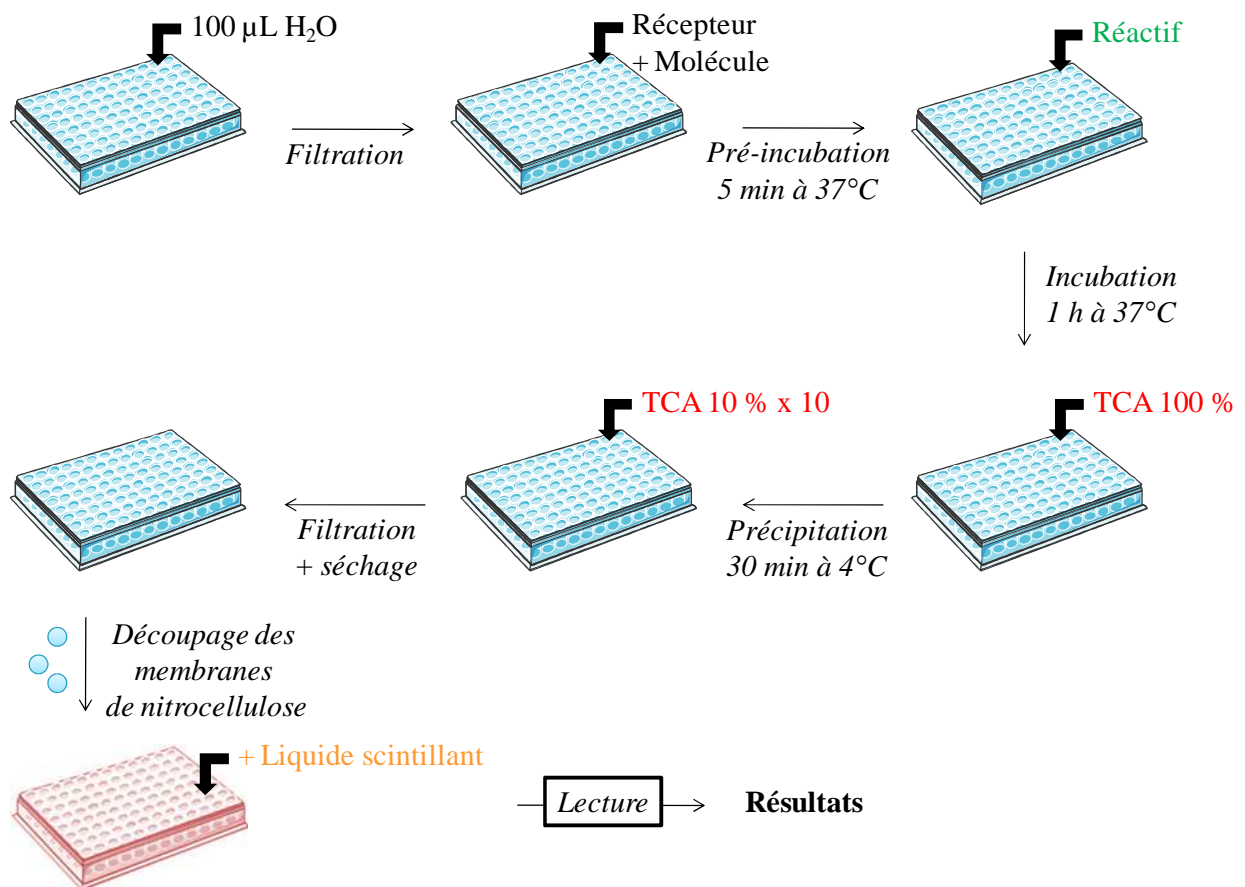
PRINCIPE DU TEST : Les activités enzymatiques tyrosine kinase des deux récepteurs sont mesurées en suivant l'incorporation de phosphate γ provenant d'ATP radioactif ($[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$) sur un substrat peptidique contenant des résidus tyrosine, le PolyGluTyr. La radioactivité mesurée représente la quantité de substrats PolyGluTyr phosphorylés sous l'action de l'activité tyrosine kinase du récepteur.



PROTOCOLE : La réaction se déroule dans une plaque 96 puits « Multiscreen Durapore » (Millipore). Les puits sont pré-mouillés avec 100 μL d'eau. Après filtration de l'eau, les récepteurs sont pré-incubés (20 ng d'EGFR et 10 ng de VEGFR-2) en présence ou non de la molécule à tester pendant 5 minutes à 37°C. La réaction pour l'activité du récepteur isolé débute après l'ajout de 50 μL du réactif suivant :

- pour l'**EGFR** : HEPES 50 mM pH 7,5 ; BSA 0,1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; MnCl_2 5 mM ; Na_3VO_4 100 μM ; DTT 0,5mM ; PolyGluTyr 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; ATP 5 μM ; $[\gamma^{32}\text{P}]$ ATP 0,5 μCi
- pour le **VEGFR-2** : Tris 50 mM pH 7,5 ; BSA 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; MnCl_2 1,5 mM ; MgCl_2 10 mM ; Na_3VO_4 100 μM ; DTT 2,5 mM ; PolyGluTyr 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; ATP 5 μM ; $[\gamma^{32}\text{P}]$ ATP 0,5 μCi ; β -glycérophosphate 5 mM

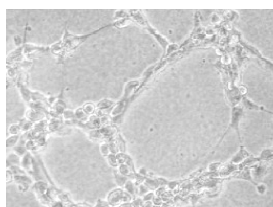
Après 1h à 37°C, la réaction est arrêtée par 20 µL d'acide trichloroacétique 100% (TCA) et la précipitation dure 30 minutes à 4°C. Le système multiscreen (Millipore) est utilisé pour la filtration des puits et une dizaine de lavage (300 µL de TCA à 10%) sont réalisés avant de sécher puis de découper les membranes de nitrocellulose situées au fond de chaque puits. Le comptage de la radioactivité est effectué dans une plaque 96 puits avec 150 µL de liquide scintillant. La radioactivité contenue dans chaque puits est mesurée à l'aide d'un compteur (Top count, Perkin Elmer). Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition par rapport au témoin (absence d'inhibiteur).



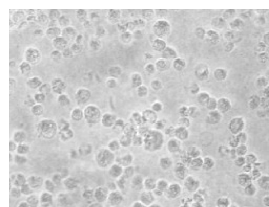
L'étude du pouvoir anti-angiogénique et l'étude du pouvoir invasif des composés inhibiteurs de tyrosine kinase a été réalisée par Madame Amélie Barczyk, au sein du laboratoire de pharmacologie de l'Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol.

ÉTUDE DU POUVOIR ANTI-ANGIOGÉNIQUE

PRINCIPE DU TEST : Les cellules HUVEC, au contact de Matrigel®, sont capables de former des structures filamenteuses appelées microtubes (cf photo contrôle). L'ajout d'un anti-angiogénique au milieu freine la formation de ces microtubes (cf photo inhibiteur). Plus la capacité anti-angiogénique de l'inhibiteur sera élevée, plus la formation des microtubes sera ralentie



Contrôle



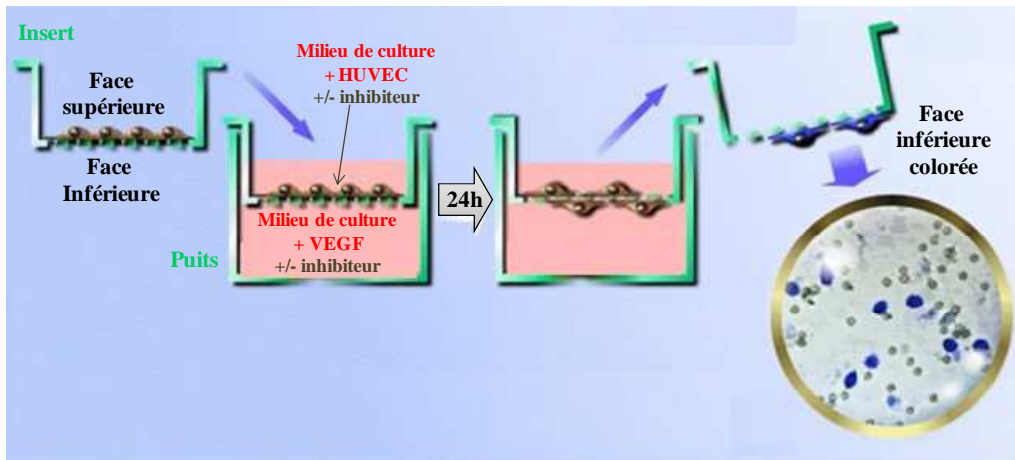
Inhibiteur

PROTOCOLE : Le Matrigel® est décongelé durant une nuit à 4°C, puis 50 sont déposés dans les puits d'une plaque 96 puits. Les plaques sont ensuite incubées à 37°C pendant une heure pour assurer une gélification complète de la matrice. Les cellules HUVEC sont ensuiteensemencées dans la plaque 96 puits (20 000 cellules par puits) et les inhibiteurs sont ajoutés à différentes concentrations (0,1 ; 1 ; 5 et 10 μ M). Après six heures d'incubation à 37°C, les modifications morphologiques des cellules et la formation de microtubes (ou capillaires) sont observées sous microscope inversé et photographiées avec un système Moticom®.

ÉTUDE DU POUVOIR INVASIF

PRINCIPE DU TEST : L'étude du pouvoir invasif a été réalisée en utilisant des chambres de culture compartimentées. Ces chambres sont constituées d'inserts formés d'une membrane en polyéthylène de 8 μ m de porosité et recouverts par une fine couche de Matrigel®. Le Matrigel® est une membrane basale reconstituée *in vitro* permettant d'obstruer les pores de la membrane et d'empêcher les cellules non-invasives de migrer. Les cellules

dités invasives sont, quant à elles, attirées par les facteurs de croissance (VEGF) et migrent au travers de la membrane de l'insert.



Au contact de l'inhibiteur, les cellules perdent leur capacité à migrer, ce qui se traduit par une diminution des cellules colorées présentes sur la face inférieure de l'insert.

PROTOCOLE : L'étude du pouvoir invasif est réalisée avec des chambres de culture compartimentées de 6,4 mm de diamètre (BD Biotec). Les puits comportent le milieu de culture supplémenté avec 20 ng/mL de VEGF ; et les inserts sont ensemencés avec le milieu de culture (sans facteurs de croissance) et les cellules HUVEC (10 000 cellules par puits). Les inhibiteurs sont insérés à différentes concentrations (0,01 ; 0,1 et 1 μ M) dans l'insert et dans le puits. Après 24 heures d'incubation à 37°C, l'excès de cellules sur la face supérieure est éliminé par grattage. Les cellules de la face inférieure sont fixées avec du méthanol et colorées avec du cristal violet à 0,05%. Le nombre de cellules est alors quantifié par comptage manuel et photographié avec un système Moticom®. Le pourcentage de cellules ayant migrées est exprimé en fonction des puits de contrôle (sans inhibiteur).

Le test de dénaturation thermique de l'ADN, l'étude de l'absorption UV-visible et l'étude du dichroïsme circulaire ont été réalisés au sein de l'Institut de la Recherche Contre le Cancer de Lille, sous la tutelle de Madame Brigitte Baldeyrou.

TEST DE DÉNATURATION THERMIQUE DE L'ADN

Il est établi que l'interaction de substances avec l'ADN (par intercalation ou liaison à l'un des sillons de l'ADN) entraîne une stabilisation de la double hélice d'ADN vis-à-vis de la dénaturation thermique. Ainsi, la différence entre la température de fusion de l'ADN complexé au ligand et celle de l'ADN seul, T_m (melting temperature), caractérise le pouvoir de stabilisation du ligand étudié.

$$\Delta T_m = T_m_{(\text{complexe ligand-ADN})} - T_m_{(\text{ADN seul})}$$

Par ailleurs, les valeurs de ΔT_m obtenues sur des ADN de compositions variables permettent d'estimer le degré de sélectivité du ligand. Le test de dénaturation thermique consiste à enregistrer des variations des propriétés d'absorbance reflétant un changement conformationnel de la molécule d'ADN. En effet, l'augmentation de température induit un désappariement des bases de l'ADN et une hyperchromicité de la molécule. Pour cela, la densité optique (DO) à 260 nm, d'une solution d'ADN soumise à une augmentation de température progressive de 20 à 100°C (augmentation de 1°C/min), est mesurée toutes les 60 secondes. Les courbes de dénaturation thermique de l'ADN sont enregistrées avec un spectrophotomètre Uvikon XL (logiciel Lab Power Jr) couplé à un ThermoSystem (technologie Peltier piloté à l'aide du thermosystem control). La température de fusion d'un fragment d'ADN (T_m) correspond à la température à laquelle 50% de l'ADN se retrouve sous forme dénaturée et 50% sous forme double brin. Pour chaque série de mesure, 10 échantillons et 2 références sont déposés dans des cuves en quartz (10 mm). Les analyses sont réalisées dans un tampon BPE (6 mM Na₂HPO₄, 2 mM NaH₂PO₄, 1 mM EDTA, pH 7). La concentration expérimentale en ctADN est fixée par la loi de Beer-Lambert et la concentration en ligand est fixée pour un ratio (R) ligand/ADN de 1 (20 µM ligand / 20 µM ctADN ; R=1).

$$A = \varepsilon \times C \times l$$

A = absorbance ou densité optique
 ε = absorptivité molaire (L.mol⁻¹.cm⁻¹)
 C = concentration molaire de la solution (mol.L⁻¹)
 l = longueur du trajet optique dans la solution (cm)

ÉTUDE DE L'ABSORPTION UV-VISIBLE

Les spectres d'absorption sont réalisés en utilisant un spectrophotomètre Uvikon XL couplé à un ThermoSystem. Les composés sont mis en solution (20 μM) dans 1 mL de tampon BPE (6 mM Na_2HPO_4 , 2 mM NaH_2PO_4 , 1 mM EDTA, pH 7) avant d'être scannés de 300 nm à 420 nm à température ambiante (20° C) dans des cuves en quartz (10 mm). Plusieurs scans ont ensuite été réalisés après ajout de volumes constants d'une solution de ctDNA concentré (5 mM). La concentration en ADN varie de 0 à 250 μM .

ÉTUDE DU DICHROÏSME CIRCULAIRE

Les spectres de dichroïsme circulaire sont réalisés en utilisant le spectromètre Jasco J-810 couplé à un ordinateur. Les composés sont mis en solution (50 μM) dans 1 mL de tampon cacodylate (1mM, pH = 7) avant d'être scannés de 320 nm à 420 nm à température ambiante (20° C) dans des cuves en quartz (10 mm). Un deuxième scan est réalisé après addition de 40 μL de ctADN concentré (5 mM). Pour chaque mesure, quatre scans sont accumulés et automatiquement moyennés.

ÉTUDE DE FLUORESCENCE

L'étude de la fluorescence a été réalisée au sein de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille, sous la tutelle du Docteur Nadège Schifano et du Professeur Jean-François Goossens.

Les valeurs de fluorescence ont été enregistrées à température ambiante en utilisant un fluoromètre SPEX Fluorolog. Les composés à tester montrant de faibles fluorescences intrasèques, les études ont été réalisées par déplacement du bromure d'éthidium de l'ADN. La longueur d'excitation est fixée à 546 nm et l'émission de fluorescence est suivie entre 520 et 650 nm. Une solution contenant le complexe bromure d'éthidium/ADN (1,26 μM /1 μM) dans un tampon BPE est tout d'abord scannée seule. Des volumes constants de composés sont ensuite ajoutés pour obtenir une gamme de concentrations en composé de 0,1 à 32 μM et les différents spectres obtenus sont superposés. Les valeurs de titration de fluorescence sont converties en constantes apparentes en utilisant le logiciel de conversion PRISM 3.0., selon la formule :

$$K_{\text{app}} = (1,26/C_{50}) K_{\text{ethidium}} \text{ avec } K_{\text{ethidium}} = 10^7 \text{ M}^{-1}$$

CHEMICAL METHODS

- GENERAL CHEMISTRY

- SYNTHESIS OF ANILINO DERIVATIVES

- SYNTHESIS OF ARYLOXY DERIVATIVES

- SYNTHESIS OF 7-AMINOALKOXYQUINAZOLINES
 - SYNTHESIS OF BENZOTRIAZINES

 - SYNTHESIS OF 2-AMINOQUINAZOLINES

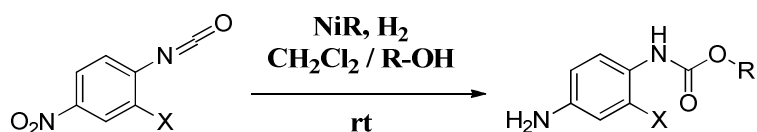
- SYNTHESIS OF QUINAZOLINES AND THIENOPYRIMIDINES

GENERAL CHEMISTRY

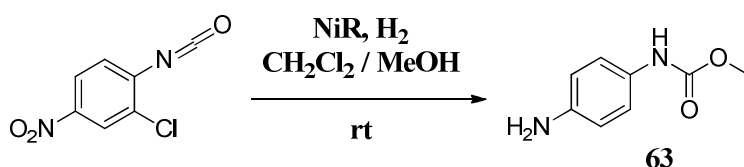
- * Macherey Nagel Polygram sil G/UV254 commercial plates were used for analytical TLC as well as UV light and/or with iodine or nihydrine to follow the course of the reaction.
- * Chromatography was performed with silica gel Macherey Nagel Si (Si 60, 0,04-0,063 mm, 230-240 mesh) at atmospheric pressure.
- * Melting points (Mp, °C) were determined with a BÜCHI SMP 20 capillary melting point apparatus and are uncorrected.
- * The structure of each compound was confirmed by:
 - IR (Bruker FT-IR spectrometer “alpha”),
 - ^1H and ^{13}C NMR (300 MHz, Bruker AC300P spectrometer). The spectra were performed in the LaRMN (Laboratoire d'Application de Résonance Magnétique Nucléaire, Lille). Chemicals shifts (δ) are reported in parts per million (ppm) down field from TMS (trimethylsilane). *J* values are in hertz, and the splitting patterns are abbreviated as follows: s, singlet; d, doublet; t, triplet; q, quartet; m, multiplet.
- * The purity of the compounds was performed in the CUMA laboratory (Centre Universitaire de Mesures et d'Analyses, Lille) and was tested by:
 - HPLC separation followed by APCI⁺ (atmospheric pressure chemical ionization) mass spectral detection on an LC-MS system, Thermo Electron Surveyor MSQ, and was > 95%,
 - HRMS experiments were performed on Q Exactive Benchtop LC-MS/MS (Thermo Scientific).

SYNTHESIS OF ANILINO DERIVATIVES

General procedure for (aminophenyl)carbamic acid esters (63-65)



Protocol: To a solution of corresponding commercial *para*-nitrophenyl isocyanate (1 g) in 50 mL of a mixture of alcohol (MeOH or EtOH) and dichloromethane (5 : 5), was added Raney[®] nickel. After 18 h at room temperature in hydrogen atmosphere, the mixture was filtered on celite. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by FC (CH₂Cl₂/AcOEt, 9:1).

N-(4-aminophenyl)carbamic acid methyl ester (63)

Beige solid (50%)

C₈H₁₀N₂O₂

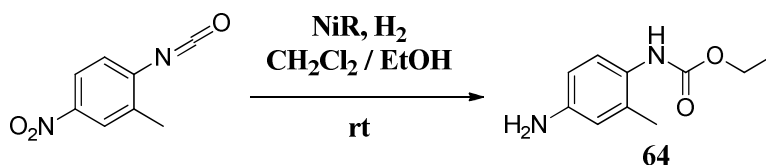
MW = 166.18 g.mol⁻¹

Mp: 81-83°C

IR (cm⁻¹): 3385 (NH₂), 1711 (C=O), 1265 (NH)

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ ppm 3.60 (s, 3H, OCH₃), 4.70 (s, 2H, NH₂), 6.50 (d, 2H, *J* = 8.2 Hz, 2 ArH), 7.00 (d, 2H, *J* = 8.2 Hz, 2 ArH), 9.00 (s, 1H, NH)

LC-MS (APCI⁺): calcd for C₈H₁₀N₂O₂, *m/z*: 167 [(M + H)⁺]

N-(3-methyl-4-aminophenyl)carbamic acid ethyl ester (64)

Brown solid (99%)

C₁₀H₁₄N₂O₂

MW = 194.23 g.mol⁻¹

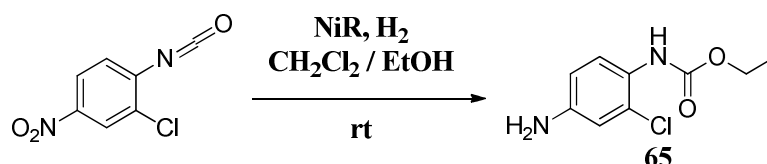
Mp: 90-92°C

IR (cm⁻¹): 3382 (NH₂), 1710 (C=O), 1265 (NH)

$^1\text{H NMR}$ (DMSO-*d*₆): δ ppm 1.22 (t, 3H, $J = 7.3$ Hz, CH₃), 2.19 (s, 3H, CH₃), 4.11 (q, 2H, $J = 7.3$ Hz, CH₂), 5.33 (s, 2H, NH₂), 7.12 (m, 2H, 2 ArH), 7.45 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz, ArH), 8.97 (s, 1H, NH)

LC-MS (APCI⁺): calcd for C₁₀H₁₄N₂O₂, m/z : 195 [(M + H)⁺]

***N*-(3-chloro-4-aminophenyl)carbamic acid ethyl ester (65)**



Beige solid (84%)

C₉H₁₁ClN₂O₂

MW = 214.65 g.mol⁻¹

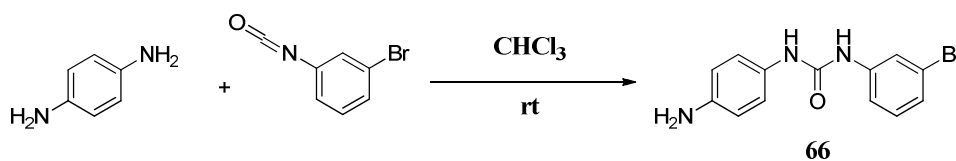
Mp: 109-111°C

IR (cm⁻¹): 3385 (NH₂), 1711 (C=O), 1264 (NH)

$^1\text{H NMR}$ (DMSO-*d*₆): δ ppm 1.28 (t, 3H, $J = 7.3$ Hz, CH₃), 4.05 (q, 2H, $J = 7.3$ Hz, CH₂), 5.30 (s, 2H, NH₂), 6.46 (dd, 1H, $J = 2.3$ and 8.7 Hz, ArH), 6.61 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz, ArH), 6.97 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz, ArH), 8.52 (s, 1H, NH)

LC-MS (APCI⁺): calcd for C₉H₁₁ClN₂O₂, m/z : 215 [(M + H)⁺ for ³⁵Cl] and 217 [(M + H)⁺ for ³⁷Cl].

***N*-(4-aminophenyl)-*N'*-(3-bromophenyl)urea (66)**



White solid (91%)

C₁₃H₁₂BrN₃O

MW = 306.16 g.mol⁻¹

Protocol: To a solution of *para*-phenylenediamine (0.5 g, 4.6 mmol) in 20 mL of CHCl₃, was added dropwise a solution of 3-bromophenylisocyanate (0.63 mL, 5.06 mmol) in CHCl₃ (20 mL). The mixture was stirred for 2 h and the precipitated was collected by filtration.

Mp: 220-222°C

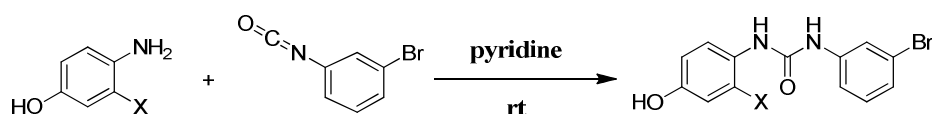
IR (cm⁻¹): 3287 (NH), 3286 (NH₂), 1627 (C=O)

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ ppm 4.80 (s, **2H**, NH₂), 6.49 (d, **2H**, $J = 6.8$ Hz, 2 ArH), 7.05 (d, **2H**, $J = 6.8$ Hz, 2 ArH), 7.08 (m, **3H**, 3 ArH), 7.82 (m, **1H**, ArH), 8.20 (s, **1H**, NH), 8.68 (s, **1H**, NH)

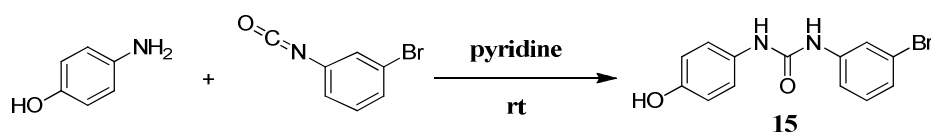
LC-MS (APCI⁺): calcd for C₁₃H₁₂BrN₃O, m/z: 306 [(M + H)⁺ for ⁷⁹Br] and 308 [(M + H)⁺ for ⁸¹Br].

SYNTHESIS OF ARYLOXY DERIVATIVES

General procedure for urea derivatives (15-17)



Protocol: To a stirred solution of aminophenol derivatives (1 eq) in pyridine was added 3-bromophenyl isocyanate (1 eq). After 1 h at room temperature under inert atmosphere, the solvent was removed under reduced pressure. The residue was washed by CH_2Cl_2 and recrystallized.

N-(3-Bromophenyl)-*N'*-(4-hydroxyphenyl)urea (15)

White solid (71%)

 $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{BrN}_2\text{O}_2$ MW = 307.14 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

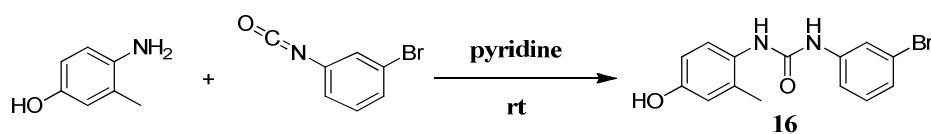
Crystallization from acetonitrile gave pure **15**.

Mp: 227-229°C

IR (cm^{-1}): 3301 (OH), 1635 (C=O)

^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$): δ (ppm) 6.68 (m, **2H**, ArH), 7.08–7.30 (m, **5H**, ArH), 7.82 (m, **1H**, ArH), 8.38 (s, **1H**, NH), 8.71 (s, **1H**, NH), 9.10 (s, **1H**, OH)

LC-MS (APCI⁺): m/z calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{BrN}_2\text{O}_2$ 307 [(M + H)⁺ for ^{79}Br], 309 [(M + H)⁺ for ^{81}Br]

N-(3-Bromophenyl)-*N'*-(3-methyl-4-hydroxyphenyl)urea (16)

Beige solid (89%)

 $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{BrN}_2\text{O}_2$ MW = 321.17 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Crystallization from acetonitrile gave pure **16**.

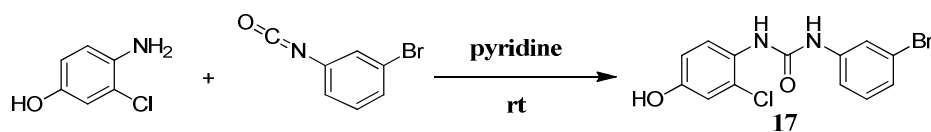
Mp: 204-206°C

IR (cm^{-1}): 3288 (OH), 1635 (C=O)

^1H NMR (DMSO- d_6): δ (ppm) 2.15 (s, **3H**, CH_3), 6.55 (dd, **1H**, $J = 2.7$ Hz and $J = 9.0$ Hz, ArH), 6.61 (d, **1H**, $J = 2.7$ Hz, ArH), 7.08–7.33 (m, **4H**, ArH), 7.75 (s, **1H**, NH), 7.89 (m, **1H**, ArH), 8.95 (s, **1H**, NH), 9.12 (s, **1H**, OH)

LC-MS (APCI $^+$): m/z calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{BrN}_2\text{O}_2$ 321 [(M + H) $^+$ for ^{79}Br], 323 [(M + H) $^+$ for ^{81}Br]

***N*-(3-Bromophenyl)-*N'*-(3-chloro-4-hydroxyphenyl)urea (**17**)**



Beige solid (61%)

$\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{BrClN}_2\text{O}_2$

MW = 341.59 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Crystallization from acetonitrile gave pure **17**.

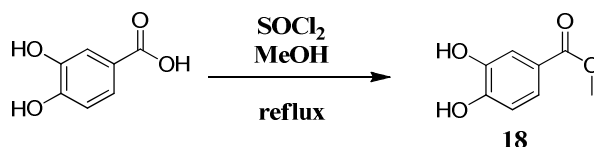
Mp: 178-180°C

IR (cm^{-1}): 3283 (OH), 1643 (C=O)

^1H NMR (DMSO- d_6): δ (ppm) 6.72 (dd, **1H**, $J = 2.4$ Hz and $J = 9.1$ Hz, ArH), 6.84 (d, **1H**, $J = 2.4$ Hz, ArH), 7.09–7.32 (m, **3H**, ArH), 7.77 (m, **2H**, ArH), 8.07 (s, **1H**, NH), 9.34 (s, **1H**, NH), 9.64 (s, **1H**, OH)

LC-MS (APCI $^+$): m/z calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{BrClN}_2\text{O}_2$ 340 [(M + H) $^+$ for $^{35}\text{Cl}/^{79}\text{Br}$], 342 [(M + H) $^+$ for $^{35}\text{Cl}/^{81}\text{Br}$], 342 [(M + H) $^+$ for $^{37}\text{Cl}/^{79}\text{Br}$], 344 [(M + H) $^+$ for $^{37}\text{Cl}/^{81}\text{Br}$]

SYNTHESIS OF 7-AMINOALKOXYQUINAZOLINES

Methyl 3,4-dihydroxybenzoate (**18**)

White solid (91%)

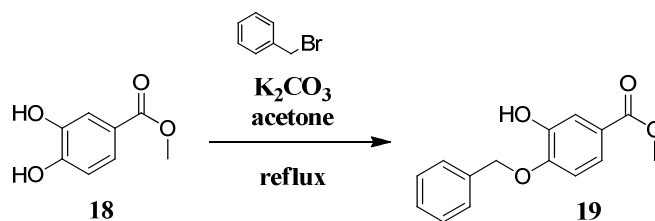
 $C_8H_8O_4$ MW = 168.15 g.mol⁻¹

Protocol: To a solution of 3,4-dihydroxybenzoic acid (30 g, 0,195 mmol) in methanol (310 mL), was added thionyl chloride (43 mL, 0.585 mmol), while maintaining the temperature at 0°C. After 3 h at reflux, the solvent was removed under reduced pressure and the residue was washed with petroleum ether. Crystallization with toluene gave pure **18** as white solid.

Mp: 130-132°C**IR** (cm⁻¹): 3450 and 3244 (OH), 1687 (C=O)

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 3.90 (s, **3H**, OCH₃), 6.05 (s, **2H**, 2 OH), 6.90 (d, **1H**, *J* = 8.7 Hz, ArH), 7.55 (dd, **1H**, *J* = 8.7 and 2.0 Hz, ArH), 7.64 (d, **1H**, *J* = 2.0 Hz, ArH)

LC-MS (APCI⁺): *m/z* calcd for C₈H₈O₄ 169 [(M + H)⁺]

Methyl 4-benzyloxy-3-hydroxybenzoate (**19**)

White solid (67%)

 $C_{15}H_{14}O_4$ MW = 258.27 g.mol⁻¹

Protocol: To a solution of methyl 3,4-dihydroxybenzoate **18** (10 g, 60 mmol) in acetone (400 mL), were added potassium carbonate (180 mmol) and benzyl bromide (8.79 mL, 72 mmol). After 48 h at room temperature, the mixture was filtered. The solvent was removed under reduced pressure and the residue dissolved in water. The precipitated was collected by filtration, washed with H₂O and petroleum ether. Crystallization with diisopropyl ether gave pure **19** as white solid (67%).

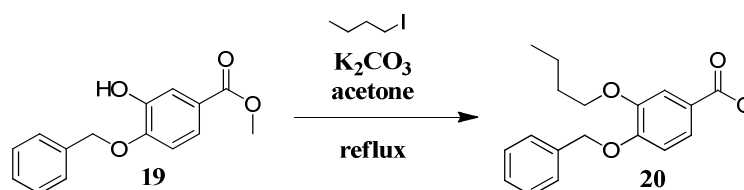
Mp: 127-129°C

IR (cm⁻¹): 3391 (OH), 1693 (C=O),

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 3.89 (s, **3H**, OCH₃), 5.19 (s, **2H**, CH₂), 5.80 (s, **1H**, OH), 6.92 (d, **1H**, *J* = 8.1 Hz, ArH), 7.26-7.46 (m, **5H**, ArH), 7.58-7.67 (m, **2H**, ArH)

LC-MS (APCI⁺): *m/z* calcd for C₁₅H₁₄O₄ 259 [(M + H)⁺]

Methyl 4-benzyloxy-3-butoxybenzoate (**20**)



White solid (87%)

C₁₉H₂₂O₄

MW = 314.38 g.mol⁻¹

Protocol: To a solution of methyl 4-benzyloxy-3-hydroxybenzoate **19** (5 g, 19 mmol) in acetone (200 mL), were added potassium carbonate (13.31 g, 97 mmol) and butyl iodide (1.41 mL, 23 mmol). After 16 h at reflux, the mixture was filtered. The solvent was removed under reduced pressure and the residue dissolved in petroleum ether. The precipitated was collected by filtration. Crystallization with ethanol gave pure **20** as white solid.

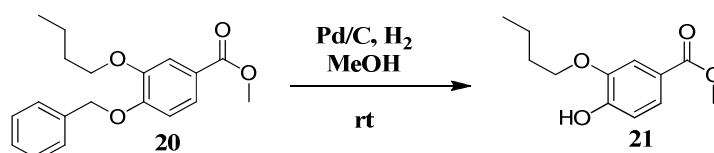
Mp: 55-57°C

IR (cm⁻¹): 1716 (C=O)

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 1.01 (t, **3H**, *J* = 7.2 Hz, CH₃), 1.40-1.60 (m, **2H**, CH₂), 1.75-1.90 (m, **2H**, CH₂), 3.89 (s, **3H**, OCH₃), 4.11 (t, **2H**, *J* = 6.8 Hz, CH₂), 5.15 (s, **2H**, CH₂), 6.85 (d, **1H**, *J* = 8.4 Hz, ArH), 7.30-7.50 (m, **5H**, ArH), 7.58-7.70 (m, **2H**, ArH)

LC-MS (APCI⁺): *m/z* calcd for C₁₉H₂₂O₄ 315 [(M + H)⁺]

Methyl 3-butoxy-4-hydroxybenzoate (**21**)



White solid (85%)

C₁₂H₁₆O₄

MW = 224.25 g.mol⁻¹

Protocol: To a solution of methyl 4-benzyloxy-3-butoxybenzoate **20** (5 g, 16 mmol) in methanol (100 mL), was added palladium on carbon (1 g, 20%). After 18 h at room temperature in hydrogen atmosphere, the mixture was filtered and the solvent was removed under reduced pressure. Crystallization with cyclohexane/diisopropyl ether gave pure **21** as white solid.

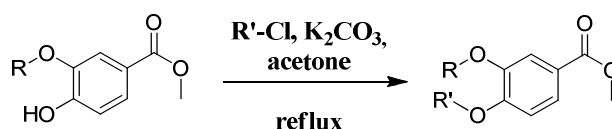
Mp: 61-63°C

IR (cm⁻¹): 3409 (OH), 1701 (C=O)

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 0.99 (t, **3H**, *J* = 7.3 Hz, CH₃), 1.50 (m, **2H**, CH₂), 1.82 (m, **2H**, CH₂), 3.88 (s, **3H**, OCH₃), 4.10 (t, **2H**, *J* = 6.8 Hz, CH₂), 5.70 (s, **1H**, OH), 6.93 (d, **1H**, *J* = 8.3 Hz, ArH), 7.54 (s, **1H**, ArH), 7.62 (m, **1H**, ArH)

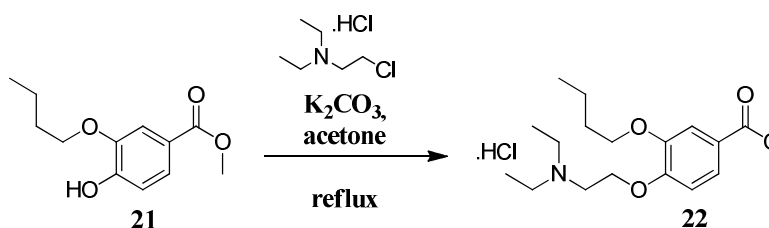
LC-MS (APCI⁺): *m/z* calcd for C₁₂H₁₆O₄ 225 [(M + H)⁺]

General procedure for aminoalkoxy derivatives (22-26)



Protocol: To a solution of methyl vanillate (1 eq) or compound **21** (1 eq) in acetone (100 mL), were added the appropriate chloroalkane (1.5 eq) and potassium carbonate (5 eq). After 5 h at reflux, the mixture was cooled to room temperature and filtered. The solvent was removed under reduced pressure.

Methyl 3-butoxy-4-diethylaminoethoxybenzoate hydrochloride (22)



White solid (92%)
 C₁₈H₂₉NO₄.HCl
 MW = 359.89 g.mol⁻¹

Crystallization from toluene gave pure **22**.

Mp: 116-118°C

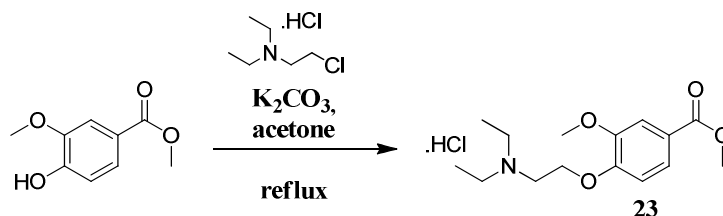
IR (cm⁻¹): 2457 (NH⁺), 1719 (C=O)

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 0.98 (t, **3H**, *J* = 7.1 Hz, CH₃), 1.35-1.55 (m, **8H**, 2 CH₃ + CH₂), 1.67-1.80 (m, **2H**, CH₂), 3.25 (m, **4H**, 2 CH₂), 3.50 (m, **2H**, CH₂), 3.89 (s, **3H**, OCH₃),

3.98-4.10 (m, **2H**, CH₂), 4.50 (t, **2H**, $J = 4.6$ Hz, CH₂), 7.68 (d, **1H**, $J = 8.6$ Hz, ArH), 7.50 (d, **1H**, $J = 2.0$ Hz, ArH), 7.58 (dd, **1H**, $J = 2.0$ and 8.6 Hz, ArH), 12.30 (s, **1H**, NH⁺)

LC-MS (APCI⁺): m/z calcd for C₁₈H₂₉NO₄ 324 [(M + H)⁺]

Methyl 3-methoxy-4-diethylaminoethoxybenzoate hydrochloride (**23**)



White solid (76%)
C₁₅H₂₃NO₄.HCl
MW = 317.81 g.mol⁻¹

Crystallization from toluene gave pure **23**.

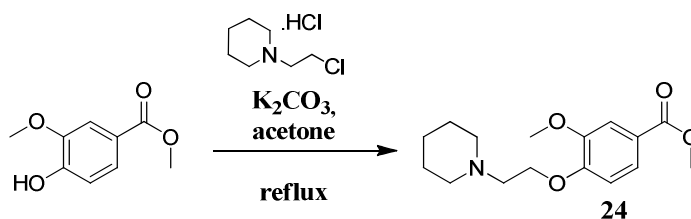
Mp: 90-92°C

IR (cm⁻¹): 2466 (NH⁺), 1710 (C=O)

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 1.25 (t, **6H**, $J = 7.1$ Hz, 2 CH₃), 3.21 (q, **4H**, $J = 7.1$ Hz, 2 CH₂), 3.51 (t, **2H**, $J = 4.6$ Hz, CH₂), 3.81 (s, **3H**, CH₃), 3.84 (s, **3H**, OCH₃), 4.47 (t, **2H**, $J = 4.6$ Hz, CH₂), 7.15 (d, **1H**, $J = 8.7$ Hz, ArH), 7.47 (d, **1H**, $J = 2.0$ Hz, ArH), 7.62 (dd, **1H**, $J = 2.0$ and 8.7 Hz, ArH), 12.18 (s, **1H**, NH⁺)

LC-MS (APCI⁺): m/z calcd for C₁₅H₂₃NO₄ 282 [(M + H)⁺]

Methyl 3-methoxy-4-piperidinoethoxybenzoate (**24**)



Brown oil (95%)
C₁₆H₂₃NO₄
MW = 293.36 g.mol⁻¹

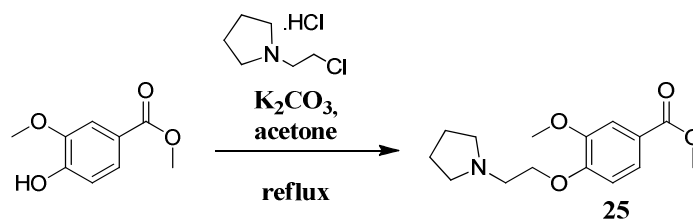
The residue was dissolved in a 10 % solution of K₂CO₃. The aqueous solution was extracted with EtOAc, dried over MgSO₄ and the solvent was removed under reduced pressure to give **24** as brown oil.

IR (cm⁻¹): 2933 (piperidine), 1713 (C=O)

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 1.40-1.47 (m, **2H**, CH_2), 1.57-1.65 (m, **4H**, 2 CH_2), 2.51-2.54 (m, **4H**, 2 CH_2), 2.84 (t, **2H**, $J = 6.2 \text{ Hz}$, CH_2), 3.90 (s, **3H**, CH_3), 3.91 (s, **3H**, CH_3), 4.21 (t, **2H**, $J = 6.2 \text{ Hz}$, CH_2), 6.90 (d, **1H**, $J = 8.1 \text{ Hz}$, ArH), 7.54 (d, **1H**, $J = 1.8 \text{ Hz}$, ArH), 7.66 (dd, **1H**, $J = 8.1$ and 1.8 Hz , ArH)

LC-MS (APCI $^+$): m/z calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{NO}_4$ 294 [(M + H) $^+$]

Methyl 3-methoxy-4-pyrrolidinoethoxybenzoate (**25**)



Brown oil (89%)

$\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{NO}_4$

MW = 279.33 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

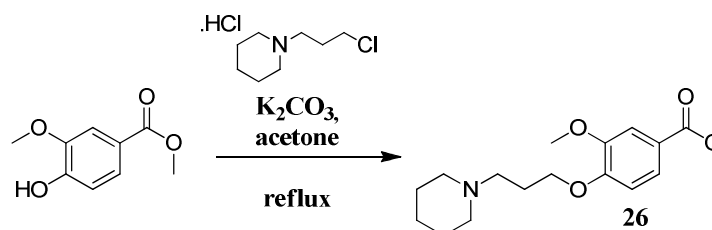
The residue was dissolved in a 10% solution of K_2CO_3 . The aqueous solution was extracted with EtOAc, dried over MgSO_4 and the solvent was removed under reduced pressure to give **25** as brown oil.

IR (cm^{-1}): 2950 (pyrrolidine), 1711 ($\text{C}=\text{O}$)

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 1.81 (m, **4H**, 2 CH_2), 2.64 (m, **4H**, 2 CH_2), 2.99 (t, **2H**, $J = 6.0 \text{ Hz}$, CH_2), 3.89 (s, **3H**, CH_3), 3.91 (s, **3H**, CH_3), 4.21 (t, **2H**, $J = 6.0 \text{ Hz}$, CH_2), 6.90 (d, **1H**, $J = 8.4 \text{ Hz}$, ArH), 7.54 (d, **1H**, $J = 1.8 \text{ Hz}$, ArH), 7.65 (dd, **1H**, $J = 8.4$ and 1.8 Hz , ArH)

LC-MS (APCI $^+$): m/z calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{NO}_4$ 280 [(M + H) $^+$]

Methyl 3-methoxy-4-piperidinopropoxybenzoate (**26**)



Brown oil (94%)

$\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{NO}_4$

MW = 307.38 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

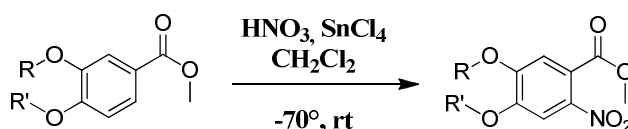
The residue was dissolved in a 10% solution of K_2CO_3 . The aqueous solution was extracted with EtOAc, dried over $MgSO_4$ and the solvent was removed under reduced pressure to give **26** as brown oil.

IR (cm^{-1}): 2935 (piperidine), 1709 (C=O)

1H NMR (DMSO- d_6): δ (ppm) 1.37-1.48 (m, **2H**, CH_2), 1.51-1.60 (m, **4H**, 2 CH_2), 2.03 (m, **2H**, CH_2), 2.37-2.41 (m, **4H**, 2 CH_2), 2.46 (t, **2H**, $J = 7.4$ Hz, CH_2), 3.88 (s, **3H**, CH_3), 3.90 (s, **3H**, CH_3), 4.12 (t, **2H**, $J = 7.0$ Hz, CH_2), 6.90 (d, **1H**, $J = 8.4$ Hz, ArH), 7.53 (d, **1H**, $J = 1.9$ Hz, ArH), 7.63 (dd, **1H**, $J = 8.5$ and 2.0 Hz, ArH)

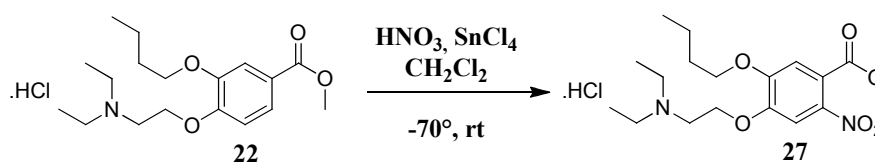
LC-MS (APCI $^+$): m/z calcd for $C_{17}H_{25}NO_4$ 308 [(M + H) $^+$]

General procedure for nitro derivatives (27-31)



Protocol: To a stirred mixture of aminoalkoxy derivatives (**22-26**) (1 eq) in dichloromethane (100 mL), a mixture of nitric acid (3 eq) and tin tetrachloride (3 eq) diluted in 20 mL of dichloromethane was slowly added, while maintaining the temperature at -70°C . After the addition, the mixture was stirred for an additional 4 h at room temperature. The mixture was neutralized by 10% K_2CO_3 solution and then the aqueous solution was extracted with dichloromethane, dried over $CaCl_2$ and the solvent was removed under reduced pressure.

Methyl 2-nitro-4-diethylaminoethoxy-5-butoxybenzoate hydrochloride (27)



White solid (67%)

$C_{18}H_{28}N_2O_6 \cdot \text{HCl}$

MW = 404.89 $g \cdot mol^{-1}$

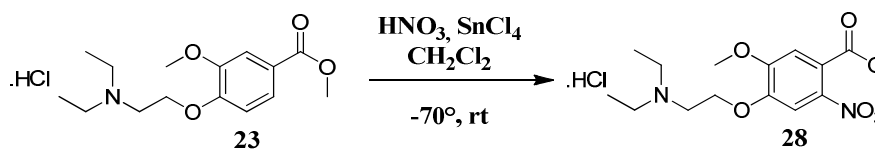
Mp: 116-118 $^\circ\text{C}$

IR (cm^{-1}): 2454 (NH^+), 1694 (C=O), 1531 (NO_2)

1H NMR (DMSO- d_6): δ (ppm) 0.90 (t, **3H**, $J = 7.6$ Hz, CH_3), 1.40-1.50 (m, **8H**, 2 CH_3 + CH_2), 1.70-1.85 (m, **2H**, CH_2), 3.20-3.40 (m, **4H**, 2 CH_2), 3.45-3.60 (m, **2H**, CH_2), 3.75 (s, **3H**, OCH_3), 4.00 (t, **2H**, $J = 6.6$ Hz, CH_2), 4.58-4.68 (m, **2H**, CH_2), 7.20 (s, **1H**, ArH), 7.50 (s, **1H**, ArH), 12.45 (s, **1H**, NH^+)

LC-MS (APCI⁺): m/z calcd for C₁₈H₂₈N₂O₆ 369 [(M + H)⁺]

Methyl 2-nitro-4-diethylaminoethoxy-5-methoxybenzoate hydrochloride (28)



Yellow solid (88%)

C₁₅H₂₂N₂O₆.HCl

MW = 362.81 g.mol⁻¹

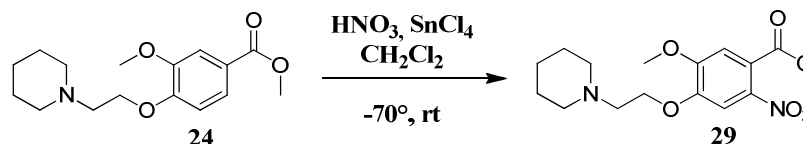
Mp: 128-131°C

IR (cm⁻¹): 2465 (NH⁺), 1711 (C=O), 1510 (NO₂)

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 1.10 (t, **6H**, $J = 7.2$ Hz, 2 CH₃), 2.65 (q, **4H**, $J = 7.2$ Hz, 2 CH₂), 2.97 (t, **2H**, $J = 4.6$ Hz, CH₂), 3.89 (s, **3H**, OCH₃), 3.94 (s, **3H**, OCH₃), 4.19 (t, **2H**, $J = 4.6$ Hz, CH₂), 7.05 (s, **1H**, ArH), 7.52 (s, **1H**, ArH), 11.88 (s, **1H**, NH⁺)

LC-MS (APCI⁺): m/z calcd for C₁₅H₂₂N₂O₆ 327 [(M + H)⁺]

Methyl 2-nitro-4-piperidinoethoxy-5-methoxybenzoate (29)



Yellow oil (58%)

C₁₆H₂₂N₂O₆

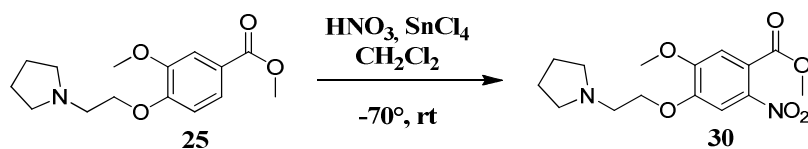
MW = 338.36 g.mol⁻¹

IR (cm⁻¹): 2485 (piperidine), 1730 (C=O), 1522 (NO₂)

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 1.45 (m, **2H**, CH₂), 1.62-1.69 (m, **4H**, 2 CH₂), 2.55-2.59 (m, **4H**, 2 CH₂), 2.85 (t, **2H**, $J = 9.0$ Hz, CH₂), 3.90 (s, **3H**, OCH₃), 3.94 (s, **3H**, OCH₃), 4.24 (t, **2H**, $J = 9.0$ Hz, CH₂), 7.07 (s, **1H**, ArH), 7.52 (s, **1H**, ArH)

LC-MS (APCI⁺): m/z calcd for C₁₆H₂₂N₂O₆ 339 [(M + H)⁺]

Methyl 2-nitro-4-pyrrolidinoethoxy-5-methoxybenzoate (30)



Yellow oil (24%)

$\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_6$

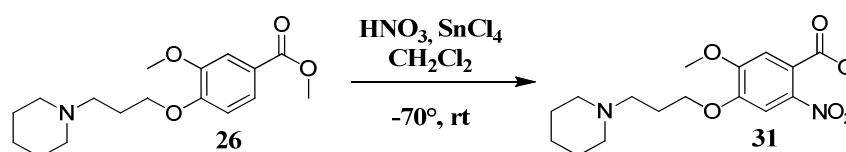
MW = 324.33 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

IR (cm^{-1}): 2470 (pyrrolidine), 1709 (C=O), 1531 (NO_2)

^1H NMR ($\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) 3.34 (m, **4H**, 2 CH_2), 3.45-3.47 (m, **2H**, CH_2), 3.58-3.77 (m, **4H**, 2 CH_2), 3.84 (s, **3H**, CH_3), 3.96 (s, **3H**, OCH_3), 4.53 (t, **2H**, $J = 5.7$ Hz, CH_2), 7.39 (s, **1H**, ArH), 7.78 (s, **1H**, ArH).

LC-MS (APCI⁺): m/z calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_6$ 325 [(M + H)⁺]

Methyl 2-nitro-4-piperidinopropoxy-5-methoxybenzoate (31)



Yellow oil (78%)

$\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_6$

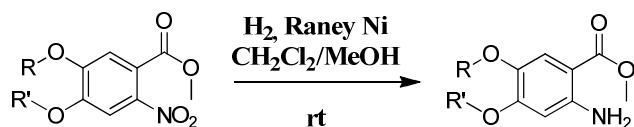
MW = 352.38 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

IR (cm^{-1}): 2435 (piperidine), 1731 (C=O), 1520 (NO_2)

^1H NMR ($\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) 1.38-1.49 (m, **2H**, CH_2), 1.54-1.65 (m, **4H**, 2 CH_2), 2.05 (m, **2H**, CH_2), 2.37-2.45 (m, **4H**, 2 CH_2), 2.49 (t, **2H**, $J = 7.3$ Hz, CH_2), 3.90 (s, **3H**, OCH_3), 3.90 (s, **3H**, OCH_3), 4.16 (t, **2H**, $J = 7.3$ Hz, CH_2), 7.07 (s, **1H**, ArH), 7.48 (s, **1H**, ArH)

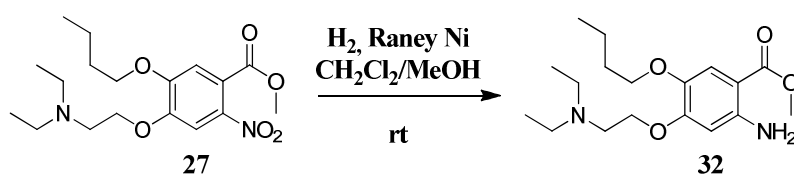
LC-MS (APCI⁺): m/z calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_6$ 353 [(M + H)⁺]

General procedure for methyl-2-amino-benzoate derivatives (32-36)



Protocol: To a solution of nitro derivatives (27-31) in 100 mL of a mixture of methanol and dichloromethane (5 : 5), was added Raney nickel. After 18 h at room temperature in hydrogen atmosphere, the mixture was filtered. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by FC (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1).

Methyl 2-amino-4-diethylaminoethoxy-5-butoxybenzoate (32)



Brown oil (79%)

C₁₈H₃₀N₂O₄

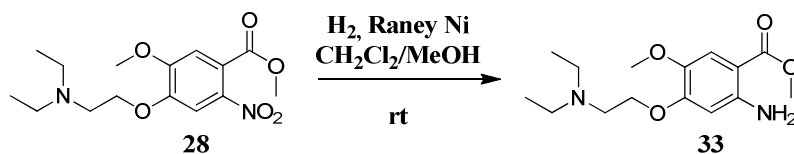
MW = 338.44 g.mol⁻¹

IR (cm⁻¹): 3385 (NH₂), 1685 (C=O)

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 0.91 (t, **3H**, *J* = 7.2 Hz, CH₃), 1.01 (t, **6H**, *J* = 7.2 Hz, 2 CH₃), 1.40-1.55 (m, **2H**, CH₂), 1.68-1.80 (m, **2H**, CH₂), 2.58-2.68 (m, **4H**, 2 CH₂), 2.88 (t, **2H**, *J* = 6.3 Hz, CH₂), 3.85 (s, **3H**, OCH₃), 3.88 (t, **2H**, *J* = 6.6 Hz, CH₂), 4.00 (t, **2H**, *J* = 6.6 Hz, CH₂), 5.50 (s, **2H**, NH₂), 6.10 (s, **1H**, ArH), 7.30 (s, **1H**, ArH)

LC-MS (APCI⁺): *m/z* calcd for C₁₈H₃₀N₂O₄ 339 [(M + H)⁺]

Methyl 2-amino-4-diethylaminoethoxy-5-methoxybenzoate (33)



Brown oil (66%)

C₁₅H₂₄N₂O₄

MW = 296.36 g.mol⁻¹

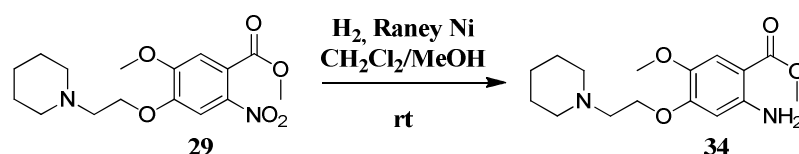
Mp > 250 °C

IR (cm⁻¹): 3385 (NH₂), 1703 (C=O)

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 1.25 (t, **6H**, $J = 7.1$ Hz, 2 CH_3), 3.22 (q, **4H**, $J = 7.1$ Hz, 2 CH_2), 3.43 (t, **2H**, $J = 4.6$ Hz, CH_2), 3.92 (s, **3H**, OCH_3), 3.94 (s, **3H**, OCH_3), 4.32 (t, **2H**, $J = 4.6$ Hz, CH_2), 6.45 (s, **1H**, ArH), 6.54 (s, **2H**, NH_2), 7.19 (s, **1H**, ArH)

LC-MS (APCI $^+$): m/z calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_4$ 297 [(M + H) $^+$]

Methyl 2-amino-4-piperidinoethoxy-5-methoxybenzoate (**34**)



Brown oil (79%)

$\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_4$

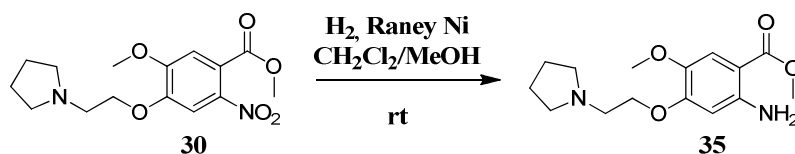
MW = 308.37 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

IR (cm^{-1}): 3442 (NH_2), 1663 ($\text{C}=\text{O}$)

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 1.33-1.40 (m, **2H**, CH_2), 1.42-1.52 (m, **4H**, 2 CH_2), 2.37-2.45 (m, **4H**, 2 CH_2), 2.65 (t, **2H**, $J = 6.0$ Hz, CH_2), 3.63 (s, **3H**, OCH_3), 3.74 (s, **3H**, OCH_3), 4.01 (t, **2H**, $J = 6.0$ Hz, CH_2), 6.37 (s, **2H**, NH_2), 6.40 (s, **1H**, ArH), 7.12 (s, **1H**, ArH)

LC-MS (APCI $^+$): m/z calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_4$ 309 [(M + H) $^+$]

Methyl 2-amino-4-pyrrolidinoethoxy-5-methoxybenzoate (**35**)



Brown oil (51%)

$\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_4$

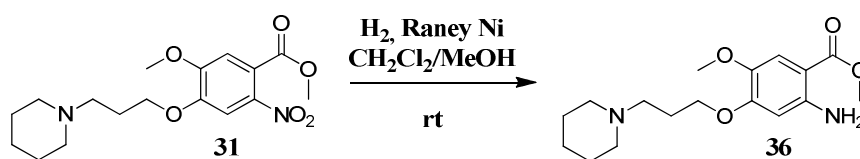
MW = 294.35 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

IR (cm^{-1}): 3534 (NH_2), 1684 ($\text{C}=\text{O}$)

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 1.79-2.05 (m, **4H**, 2 CH_2), 2.99-3.24 (m, **4H**, 2 CH_2), 3.57 (t, **2H**, $J = 5.5$ Hz, CH_2), 3.66 (s, **3H**, OCH_3), 3.74 (s, **3H**, OCH_3), 4.32 (t, **2H**, $J = 5.1$ Hz, CH_2), 6.41 (s, **1H**, ArH), 6.46 (s, **2H**, NH_2), 7.17 (s, **1H**, ArH)

LC-MS (APCI $^+$): m/z calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_4$ 295 [(M + H) $^+$]

Methyl 2-amino-4-piperidinopropoxy-5-methoxybenzoate (36)



Yellow oil (41%)

 $C_{17}H_{26}N_2O_4$ MW = 322.40 g.mol⁻¹IR (cm⁻¹): 3424 (NH₂), 1678 (C=O)

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 1.35-1.83 (m, **6H**, 3 CH₂), 2.15-2.24 (m, **2H**, CH₂), 2.71-3.19 (m, **4H**, 2 CH₂), 3.35 (m, **2H**, CH₂), 3.67 (s, **3H**, OCH₃), 3.75 (s, **3H**, OCH₃), 4.01 (t, **2H**, *J* = 5.8 Hz, CH₂), 6.39 (s, **1H**, ArH), 6.46 (s, **2H**, NH₂), 7.14 (s, **1H**, ArH)

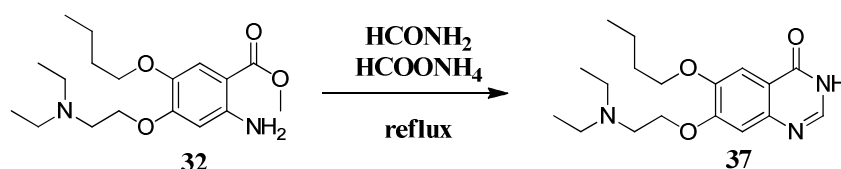
LC-MS (APCI⁺): *m/z* calcd for C₁₇H₂₆N₂O₄ 323 [(M + H)⁺]

General procedure for quinazolin-4-one derivatives (37-41)



Protocol: To a solution of methyl-2-amino-benzoate derivatives (**32-36**) (1 eq) in formamide was added ammonium formate (3 eq). The reaction mixture was stirred for 24 h under reflux conditions. The reaction was quenched by water and the mixture was alkalinized by 10% K₂CO₃ solution. The precipitated was collected by filtration, washed with H₂O and dried in vacuo.

6-Butoxy-7-diethylaminoethoxyquinazolin-4-one (37)



Beige solid (60%)

 $C_{18}H_{27}N_3O_3$ MW = 334.43 g.mol⁻¹

Mp: 180-182°C

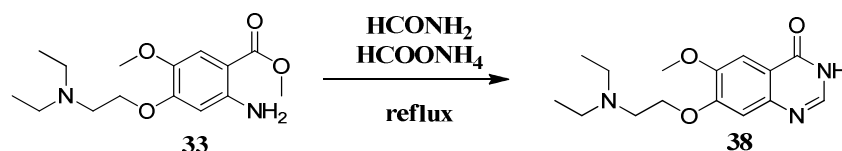
IR (cm⁻¹): 1689 (C=O)

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 0.95 (t, **3H**, *J* = 7.2 Hz, CH₃), 1.06 (t, **6H**, *J* = 7.00 Hz, 2 CH₃), 1.45-1.57 (m, **2H**, CH₂), 1.80-1.89 (m, **2H**, CH₂), 2.64 (q, **4H**, *J* = 7.2 Hz, 2 CH₂), 2.96

(t, **2H**, $J = 6.1$ Hz, CH₂), 4.08 (t, **2H**, $J = 6.5$ Hz, CH₂), 4.17 (t, **2H**, $J = 6.1$ Hz, CH₂), 7.11 (s, **1H**, ArH), 7.54 (s, **1H**, ArH), 8.01 (s, **1H**, ArH), 9.45 (s, **1H**, NH)

LC-MS (APCI⁺): m/z calcd for C₁₈H₂₇N₃O₃ 334 [(M + H)⁺]

6-Methoxy-7-diethylaminoethoxyquinazolin-4-one (38)



Beige solid (68%)

C₁₅H₂₁N₃O₃

MW = 291.35 g.mol⁻¹

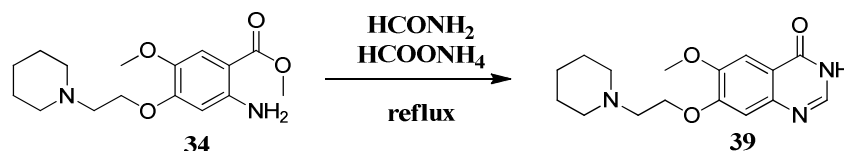
Mp: 178-180°C

IR (cm⁻¹): 1690 (C=O)

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 1.05 (t, **6H**, $J = 7.2$ Hz, 2 CH₃), 2.71 (q, **4H**, $J = 7.2$ Hz, 2 CH₂), 3.02 (t, **2H**, $J = 4.5$ Hz, CH₂), 3.95 (s, **3H**, OCH₃), 4.22 (t, **2H**, $J = 4.5$ Hz, CH₂), 7.12 (s, **1H**, ArH), 7.52 (s, **1H**, ArH), 8.01 (s, **1H**, ArH), 12.21 (s, **1H**, NH)

LC-MS (APCI⁺): m/z calcd for C₁₅H₂₁N₃O₃ 292 [(M + H)⁺]

6-Methoxy-7-piperidinoethoxyquinazolin-4-one (39)



White solid (59%)

C₁₆H₂₁N₃O₃

MW = 303.36 g.mol⁻¹

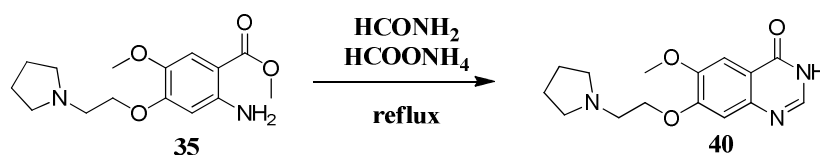
Mp: 155-157°C

IR (cm⁻¹): 1650 (C=O)

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 1.33-1.45 (m, **2H**, CH₂), 1.46-1.55 (m, **4H**, 2 CH₂), 2.42-2.51 (m, **4H**, 2 CH₂), 2.72 (t, **2H**, $J = 5.4$ Hz, CH₂), 3.86 (s, **3H**, OCH₃), 4.20 (t, **2H**, $J = 5.3$ Hz, CH₂), 7.15 (s, **1H**, ArH), 7.44 (s, **1H**, ArH), 7.94 (s, **1H**, ArH), 7.98 (s, **1H**, NH)

LC-MS (APCI⁺): m/z calcd for C₁₆H₂₁N₃O₃ 304 [(M + H)⁺]

6-Methoxy-7-pyrrolidinoethoxyquinazolin-4-one (40)



Beige solid (75%)

$C_{15}H_{19}N_3O_3$

MW = 289.33 g.mol⁻¹

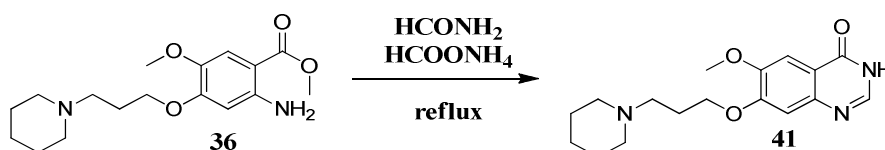
Mp: 182-184°C

IR (cm⁻¹): 1658 (C=O)

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 1.82-1.87 (m, 4H, 2 CH₂), 2.70-2.79 (m, 4H, 2 CH₂), 3.07 (t, 2H, *J* = 6.2 Hz, CH₂), 3.97 (s, 3H, OCH₃), 4.31 (t, 2H, *J* = 6.0 Hz, CH₂), 7.15 (s, 1H, ArH), 7.55 (s, 1H, ArH), 8.00 (s, 1H, ArH), 8.01 (s, 1H, NH)

LC-MS (APCI⁺): *m/z* calcd for C₁₅H₁₉N₃O₃ 290 [(M + H)⁺]

6-Methoxy-7-piperidinopropoxyquinazolin-4-one (41)



Beige solid (75%)

$C_{17}H_{23}N_3O_3$

MW = 317.38 g.mol⁻¹

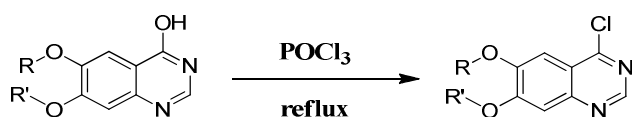
Mp: 172-174°C

IR (cm⁻¹): 1662 (C=O)

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 1.31-1.42 (m, 2H, CH₂), 1.43-1.53 (m, 4H, 2 CH₂), 1.91 (m, 2H, CH₂), 2.33-2.36 (m, 4H, 2 CH₂), 2.37 (t, 2H, *J* = 7.1 Hz, CH₂), 3.85 (s, 3H, OCH₃), 4.11 (t, 2H, *J* = 7.1 Hz, CH₂), 7.04 (s, 1H, ArH), 7.42 (s, 1H, ArH), 7.96 (s, 1H, ArH), 8.00 (s, 1H, NH)

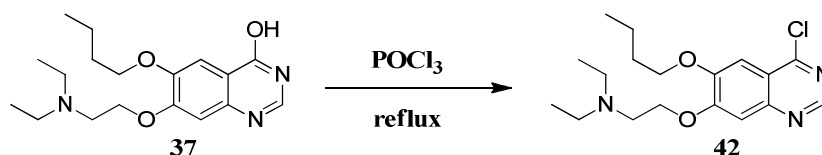
LC-MS (APCI⁺): *m/z* calcd for C₁₇H₂₃N₃O₃ 318 [(M + H)⁺]

General procedure for 4-chloroquinazoline derivatives (42-46)



Protocol: A solution of quinazolin-4-one derivatives (**37-41**) (1 eq) in phosphorus oxychloride (20 eq) was refluxed for 6 h. After removal of the solvent, the residue was dissolved in ice-water and the mixture was neutralized by 10% K_2CO_3 solution. The precipitate was collected by filtration and dissolved in CH_2Cl_2 (100 mL). The organic layer was washed with a 10% K_2CO_3 solution, brine and dried over $CaCl_2$, and the solvent was removed under reduced pressure.

4-Chloro-6-butoxy-7-diethylaminoethoxyquinazoline (**42**)



Beige solid (75%)

$C_{18}H_{26}ClN_3O_2$

MW = 351.87 $g \cdot mol^{-1}$

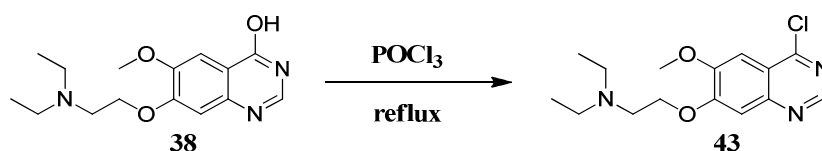
Mp: 145-147°C

IR (cm^{-1}): 1086 (C-Cl)

1H NMR (DMSO- d_6): δ (ppm) 0.95-1.10 (m, **9H**, 2 CH_3 + CH_3), 1.45-1.50 (m, **2H**, CH_2), 1.75-1.80 (m, **2H**, CH_2), 2.65 (q, **4H**, $J = 7.2$ Hz, 2 CH_2), 2.92 (t, **2H**, $J = 6.1$ Hz, CH_2), 4.11 (t, **2H**, $J = 6.4$ Hz, CH_2), 4.28 (t, **2H**, $J = 6.1$ Hz, CH_2), 7.38 (s, **1H**, ArH), 7.42 (s, **1H**, ArH), 8.82 (s, **1H**, ArH)

LC-MS (APCI $^+$): m/z calcd for $C_{18}H_{26}ClN_3O_2$ 352 [(M + H) $^+$ for ^{35}Cl], 354 [(M + 2 + H) $^+$ for ^{37}Cl]

4-Chloro-6-methoxy-7-diethylaminoethoxyquinazoline (**43**)



Beige solid (95%)

$C_{15}H_{20}ClN_3O_2$

MW = 309.79 $g \cdot mol^{-1}$

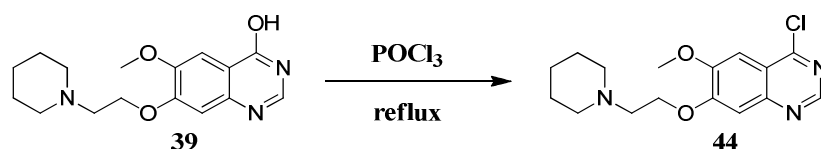
Mp: 152-154°C

IR (cm^{-1}): 1086 (C-Cl)

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 1.49 (t, **6H**, $J = 7.3$ Hz, 2 CH₃), 3.19 (q, **4H**, $J = 7.3$ Hz, 2 CH₂), 3.45 (t, **2H**, $J = 4.5$ Hz, CH₂), 4.04 (s, **3H**, OCH₃), 4.63 (t, **2H**, $J = 4.5$ Hz, CH₂), 7.45 (m, **2H**, 2 ArH), 8.89 (s, **1H**, ArH)

LC-MS (APCI⁺): m/z calcd for C₁₅H₂₀ClN₃O₂ 310 [(M + H)⁺ for ³⁵Cl], 312 [(M + 2 + H)⁺ for ³⁷Cl]

4-Chloro-6-methoxy-7-piperidinoethoxyquinazoline (44)



Beige solid (71%)

C₁₆H₂₀ClN₃O₂

MW = 321.80 g.mol⁻¹

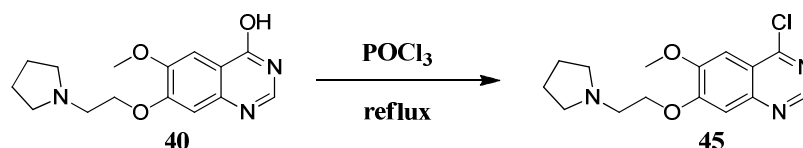
Mp: 132-134°C

IR (cm⁻¹): 1087 (C-Cl)

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 1.44-1.50 (m, **2H**, CH₂), 1.59-1.67 (m, **4H**, 2 CH₂), 2.55-2.58 (m, **4H**, 2 CH₂), 2.93 (t, **2H**, $J = 6.0$ Hz, CH₂), 4.06 (s, **3H**, OCH₃), 4.35 (t, **2H**, $J = 6.0$ Hz, CH₂), 7.35 (s, **1H**, ArH), 7.39 (s, **1H**, ArH), 8.87 (s, **1H**, ArH)

LC-MS (APCI⁺): m/z calcd for C₁₆H₂₀ClN₃O₂ 322 [(M + H)⁺ for ³⁵Cl], 324 [(M + 2 + H)⁺ for ³⁷Cl]

4-Chloro-6-methoxy-7-pyrrolidinoethoxyquinazoline (45)



Beige solid (49%)

C₁₅H₁₈ClN₃O₂

MW = 307.78 g.mol⁻¹

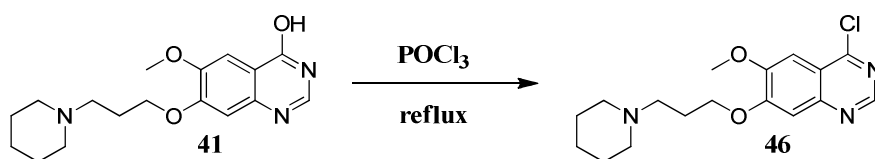
Mp: 155-157°C

IR (cm⁻¹): 1090 (C-Cl)

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 1.70 (m, **4H**, 2 CH₂), 2.51-2.57 (m, **4H**, 2 CH₂), 2.90 (t, **2H**, $J = 6.0$ Hz, CH₂), 4.00 (s, **3H**, OCH₃), 4.32 (t, **2H**, $J = 6.0$ Hz, CH₂), 7.38 (s, **1H**, ArH), 7.47 (s, **1H**, ArH), 8.87 (s, **1H**, ArH)

LC-MS (APCI⁺): m/z calcd for C₁₅H₁₈ClN₃O₂ 308 [(M + H)⁺ for ³⁵Cl], 310 [(M + 2 + H)⁺ for ³⁷Cl]

4-Chloro-6-methoxy-7-piperidinopropoxyquinazoline (46)



Beige solid (70%)

$C_{17}H_{22}ClN_3O_2$

MW = 335.83 g.mol⁻¹

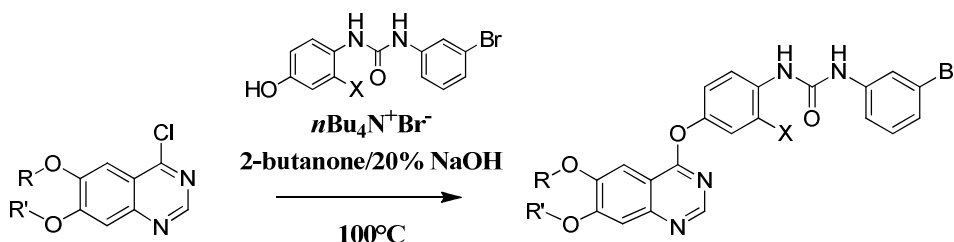
Mp: 151-153°C

IR (cm⁻¹): 1086 (C-Cl)

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 1.35-1.42 (m, 2H, CH₂), 1.44-1.55 (m, 4H, 2 CH₂), 1.92 (m, 2H, CH₂), 2.30-2.34 (m, 4H, 2 CH₂), 2.41 (t, 2H, *J* = 6.3 Hz, CH₂), 4.00 (s, 3H, OCH₃), 4.26 (t, 2H, *J* = 6.2 Hz, CH₂), 7.40 (s, 1H, ArH), 7.46 (s, 1H, ArH), 8.88 (s, 1H, ArH)

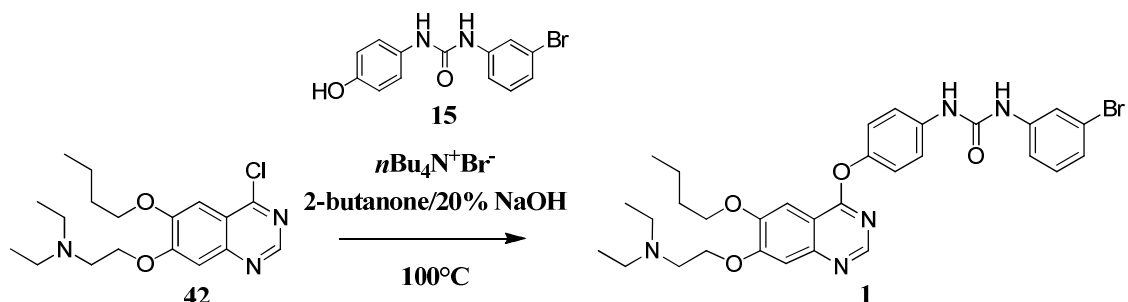
LC-MS (APCI⁺): *m/z* calcd for C₁₇H₂₂ClN₃O₂ 336 [(M + H)⁺ for ³⁵Cl], 338 [(M + 2 + H)⁺ for ³⁷Cl]

General procedure for the obtention of 7-aminoalkoxyquinazolines (1-14)



Protocol: To a stirred solution of chloro derivative (**42-46**) (1 eq) and tetrabutylammonium bromide in 10 mL of a mixture of 20% NaOH and 2-butanone (1 : 2) were added phenol (1 eq) (**15-17**). After 1 h at room temperature, the reaction was quenched by water, and then the aqueous solution was extracted with EtOAc (3 x 10 mL), washed with a solution of NaOH 1N, and dried over MgSO₄. The solvent was removed under reduced pressure.

***N*-(3-Bromophényl)-
N'-{4-[(6-butoxy-7-diethylaminoethoxyquinazolin-4-yl)oxy]-phenyl}urea (1)**



White solid (22%)

 $C_{31}H_{36}BrN_5O_4$ MW = 622.55 g.mol⁻¹Compound **1** was obtained by filtration from MeOH.**Mp:** 187-189 °C**IR** (cm⁻¹): 1650 (C=O)

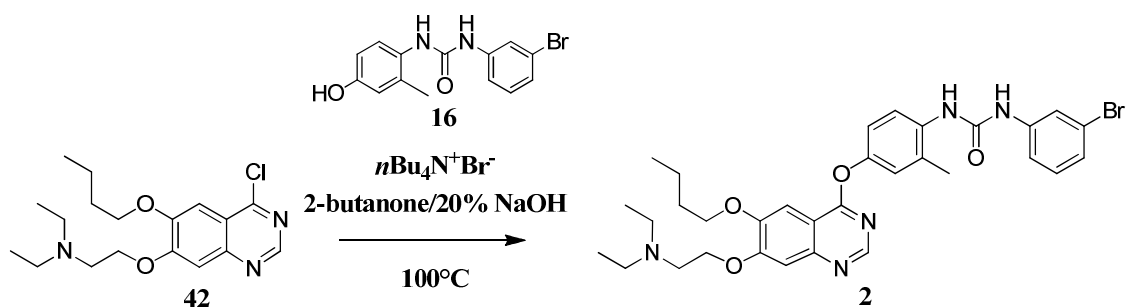
¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 0.98-1.05 (m, **9H**, 3CH₃), 1.48-1.53 (m, **2H**, CH₂), 1.82-1.85 (m, **2H**, CH₂), 2.62-2.65 (m, **4H**, 2CH₂), 2.90-2.95 (m, **2H**, CH₂), 4.10-4.30 (m, **4H**, 2 CH₂), 7.12 (m, **1H**, ArH), 7.25 (m, **3H**, 3 ArH), 7.40 (m, **2H**, 2 ArH), 7.52 (m, **3H**, 3 ArH), 7.91 (s, **1H**, ArH), 8.52 (s, **1H**, ArH), 8.88 (s, **1H**, NH), 8.99 (s, **1H**, NH)

¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 14.24, 19.01, 19.25, 31.22, 47.84, 51.09, 68.99, 101.92, 108.02, 110.26, 117.32, 120.12, 120.35, 122.58, 123.47, 124.38, 124.62, 131.05, 131.27, 135.57, 143.59, 148.45, 149.85, 150.04, 152.70, 153.22, 155.26, 165.47

LC-MS (APCI⁺): *m/z* calcd for C₃₁H₃₆BrN₅O₄ 622 [(M+H)⁺ for ⁷⁹Br], 624 [(M+H)⁺ for ⁸¹Br]

HRMS (ESI (M+H)⁺ *m/z*) calcd for C₃₁H₃₆BrN₅O₄ 622.2023 found 622.1999

***N*-(3-Bromophényl)-
N'-{3-methyl-4-[(6-butoxy-7-diethylaminoethoxyquinazolin-4-yl)oxy]-phenyl}urea (2)**



Beige solid (52%)

 $C_{32}H_{38}BrN_5O_4$ MW = 636.58 g.mol⁻¹

Compound **2** was obtained by crystallization from acetonitrile.

Mp: 169-171°C

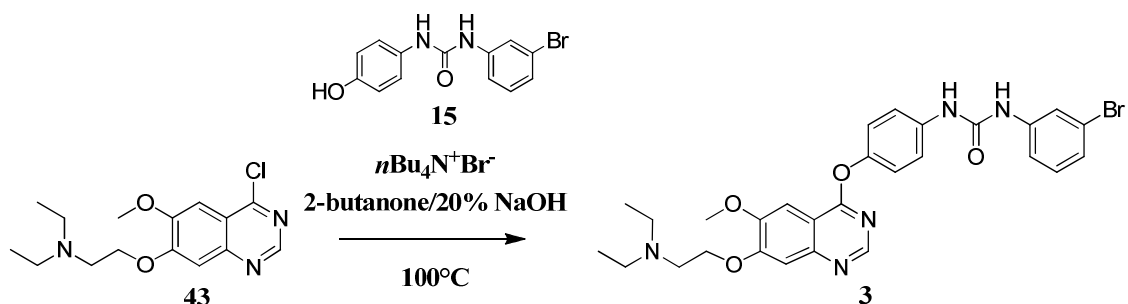
IR (cm⁻¹): 1699 (C=O)

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 0.98-1.05 (m, **9H**, 3 CH₃), 1.50 (m, **2H**, CH₂), 1.75 (m, **2H**, CH₂), 2.36 (s, **3H**, CH₃), 2.63 (m, **4H**, 2 CH₂), 2.91 (m, **2H**, CH₂), 4.10-4.15 (m, **4H**, 2 CH₂), 6.99-7.15 (m, **3H**, 3 ArH), 7.15-7.38 (m, **3H**, 3 ArH), 7.51 (s, **1H**, ArH), 7.82 (m, **1H**, ArH), 7.91 (s, **1H**, ArH), 8.20 (s, **1H**, NH), 8.52 (s, **1H**, ArH), 9.48 (s, **1H**, NH)

¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 12.01, 14.19, 18.44, 19.22, 31.14, 47.75, 50.89, 68.67, 101.81, 107.78, 110.21, 117.16, 120.08, 120.56, 122.23, 123.04, 124.01, 124.59, 130.49, 131.20, 135.07, 142.14, 148.09, 149.08, 149.98, 152.69, 153.17, 155.42, 165.42

LC-MS (APCI⁺): *m/z* calcd for C₃₂H₃₈BrN₅O₄ 636 [(M+H)⁺ for ⁷⁹Br], 638 [(M+H)⁺ for ⁸¹Br]
HRMS (ESI (M+H)⁺ *m/z*): calcd for C₃₂H₃₈BrN₅O₄ 636.2179 found 636.2157

***N*-(3-Bromophenyl)-*N'*'-{4-[(6-methoxy-7-diethylaminoethoxyquinazolin-4-yl)oxy]-phenyl}urea (**3**)**



White solid (15%)

C₂₈H₃₀BrN₅O₄

MW = 580.47 g.mol⁻¹

Compound **3** was obtained by filtration from MeOH.

Mp: 144-146°C

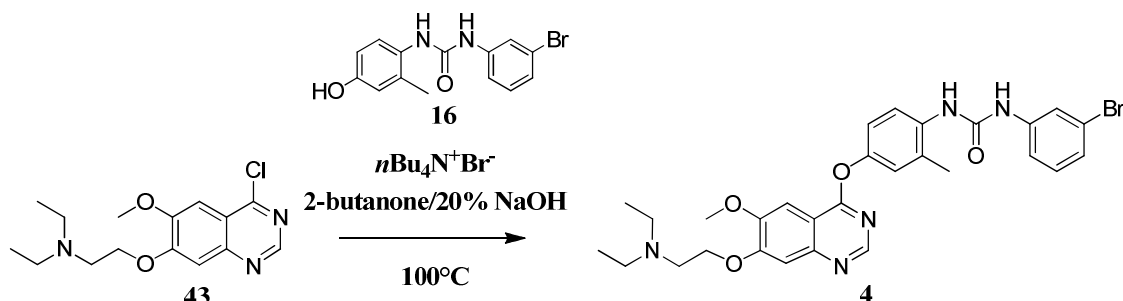
IR (cm⁻¹): 1699 (C=O)

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 1.02 (m, **6H**, CH₃), 2.69 (m, **4H**, CH₂), 2.98 (m, **2H**, CH₂), 3.98 (s, **3H**, OCH₃), 4.30 (m, **2H**, CH₂), 7.11-7.62 (m, **9H**, ArH), 7.88 (s, **1H**, ArH), 8.51 (s, **1H**, ArH), 8.92 (s, **1H**, NH), 9.00 (s, **1H**, NH)

¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 12.31, 47.48, 51.42, 56.48, 97.74, 101.18, 107.82, 110.07, 118.22, 121.85, 122.03, 122.28, 122.74, 123.27, 123.52, 125.18, 131.27, 133.92, 142.02, 148.13, 149.32, 151.33, 152.41, 152.49, 156.01, 165.32

LC-MS (APCI⁺): m/z calcd for C₂₈H₃₀BrN₅O₄ 580 [(M + H)⁺ for ⁷⁹Br], 582 [(M+H)⁺ for ⁸¹Br]
HRMS (ESI (M+H)⁺ m/z): calcd for C₂₈H₃₀BrN₅O₄ 580.1553 found 580.1514

***N*'-(3-Bromophenyl)-*N*'-{3-methyl-4-[(6-methoxy-7-diethylaminoethoxyquinazolin-4-yl)oxy]-phenyl}urea (4)**



White solid (28%)
 C₂₉H₃₂BrN₅O₄
 MW = 594.50 g.mol⁻¹

Compound **4** was obtained by filtration from CH₂Cl₂.

Mp: 128-130°C

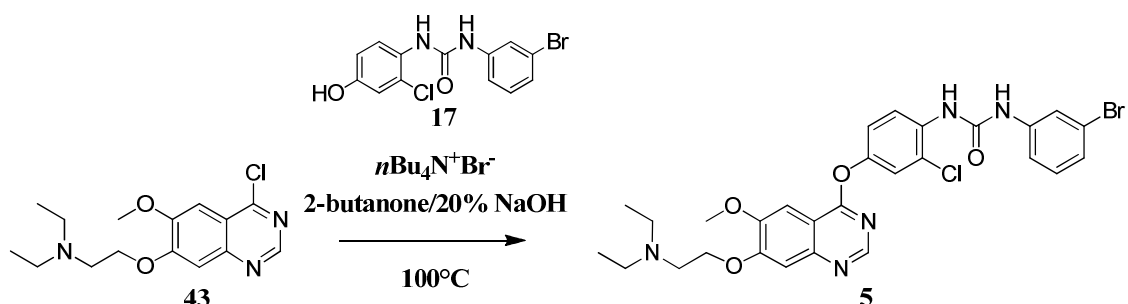
IR (cm⁻¹): 1640 (C=O)

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 1.00 (m, **6H**, 2 CH₃), 2.31 (s, **3H**, CH₃), 2.62 (m, **4H**, CH₂), 2.92 (m, **2H**, CH₂), 3.98 (s, **3H**, OCH₃), 4.26 (m, **2H**, CH₂), 7.05-7.42 (m, **6H**, ArH), 7.52 (s, **1H**, ArH), 7.80-7.90 (m, **2H**, ArH), 8.53 (s, **1H**, ArH), 8.59 (s, **1H**, NH), 10.05 (s, **1H**, NH)

¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 10.19, 18.81, 47.61, 50.11, 56.61, 66.08, 101.43, 108.13, 110.45, 116.88, 119.92, 120.25, 122.14, 122.70, 123.92, 124.31, 130.32, 131.12, 135.30, 142.41, 147.79, 149.01, 150.44, 152.85, 153.41, 154.68, 165.50

LC-MS (APCI⁺): m/z calcd for C₂₉H₃₂BrN₅O₄ 594 [(M+H)⁺ for ⁷⁹Br], 596 [(M+H)⁺ for ⁸¹Br]
HRMS (ESI (M+H)⁺ m/z): calcd for C₂₉H₃₂BrN₅O₄ 594.1710 found 594.1686

***N*'-(3-Bromophenyl)-*N'*-{3-chloro-4-[(6-methoxy-7-diethylaminoethoxy)quinazolin-4-yl]oxy}-phenyl}urea (5)**



White solid (13%)

$C_{28}H_{29}BrClN_5O_4$

MW = 614.92 g.mol⁻¹

Compound **4** was obtained by filtration from MeOH.

Mp: 157-159°C

IR (cm⁻¹): 1648 (C=O)

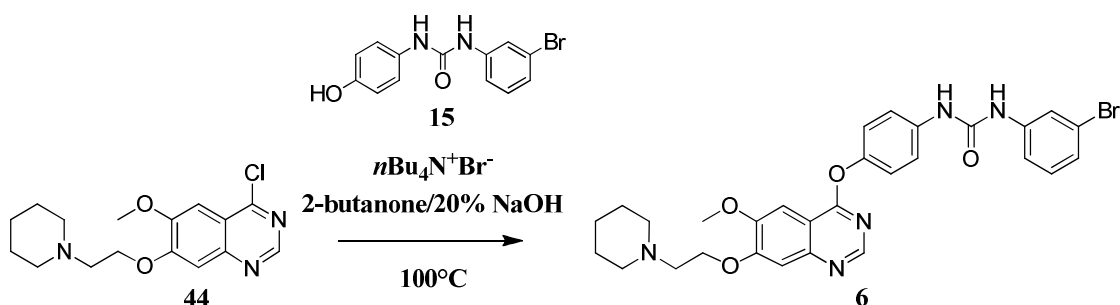
¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 1.00 (t, **6H**, *J* = 6.8 Hz, 2 CH₃), 2.59 (m, **4H**, CH₂), 2.88 (t, **2H**, *J* = 5.9 Hz, CH₂), 3.95 (s, **3H**, OCH₃), 4.13 (t, **2H**, *J* = 5.9 Hz, CH₂), 7.28-7.58 (m, **7H**, ArH), 7.90 (m, **1H**, ArH), 8.19 (m, **1H**, ArH), 8.47 (s, **1H**, NH), 8.59 (s, **1H**, ArH), 9.61 (s, **1H**, NH)

¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 12.32, 47.45, 51.36, 56.51, 68.08, 101.17, 107.80, 109.97, 117.43, 120.84, 122.00, 122.26, 122.80, 123.24, 123.58, 125.10, 131.26, 133.80, 141.58, 147.75, 149.33, 150.65, 152.55, 152.57, 155.53, 165.10

LC-MS (APCI⁺): *m/z* calcd for C₂₈H₂₉BrClN₅O₄ 614 [(M + H)⁺ for ³⁵Cl/⁷⁹Br], 616 [(M+H)⁺ for ³⁵Cl/⁸¹Br], 616 [(M+H)⁺ for ³⁷Cl/⁷⁹Br], 618 [(M+H)⁺ for ³⁷Cl/⁸¹Br]

HRMS (ESI (MH)⁺ *m/z*) calcd for C₂₈H₂₉BrClN₅O₄ 616.1134 found 616.1090

***N*'**-{4-[(6-methoxy-7-piperidinoethoxyquinazolin-4-yl)oxy]-phenyl}urea
hydrochloride (**6**)



Pink solid (15%)

$C_{29}H_{30}BrN_5O_4$

MW = 592.48 $g \cdot mol^{-1}$

Compound **6** was collected by precipitation in a mixture of diethyl ether/hydrochloric acid 6 N in isopropanol.

Mp: 222-224°C

IR (cm^{-1}): 2380 (NH⁺), 1707 (C=O)

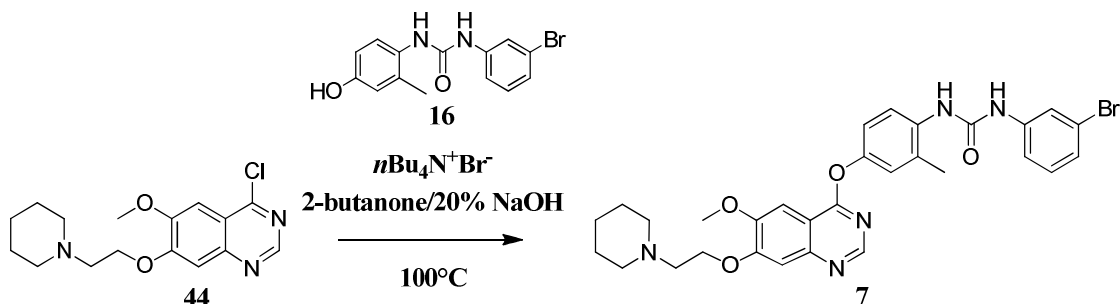
¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 0.92-1.06 (m, **2H**, CH₂), 1.28-1.41 (m, **4H**, 2 CH₂), 1.69-1.75 (m, **4H**, 2CH₂), 3.59-3.62 (m, **4H**, 2 CH₂), 4.02 (s, **3H**, OCH₃), 7.13-7.37 (m, **5H**, 5 ArH), 7.50-7.58 (m, **3H**, 3ArH), 7.66 (s, **1H**, ArH), 7.86 (s, **1H**, ArH), 8.67 (s, **1H**, ArH), 9.44 (s, **1H**, NH), 9.53 (s, **1H**, NH), 10.51 (s, **1H**, NH⁺)

¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 24.32, 26.17, 54.62, 56.47, 57.58, 68.12, 102.17, 107.92, 111.10, 116.18, 120.12, 120.72, 122.34, 123.22, 124.12, 124.67, 130.72, 131.20, 135.10, 142.10, 148.18, 149.22, 151.62, 152.73, 153.32, 155.08, 165.50

LC-MS (APCI⁺): *m/z* calcd for C₂₉H₃₀BrN₅O₄ 592 [(M+H)⁺ for ⁷⁹Br], 594 [(M+2+H)⁺ for ⁸¹Br]

HRMS (ESI (M+H)⁺*m/z*) calcd for C₂₉H₃₀BrN₅O₄ 592.1553 found 592.1532

***N*'-(3-Bromophenyl)-
N''-{3-methyl-4-[(6-methoxy-7-piperidinoethoxyquinazolin-4-yl)oxy]-phenyl}urea (7)**



White solid (12%)

$C_{30}H_{32}BrN_5O_4$

MW = 606.51 $g \cdot mol^{-1}$

Compound **7** was obtained by filtration from MeOH.

Mp: 206-208°C

IR (cm^{-1}): 2935 (piperidine), 1643 (C=O)

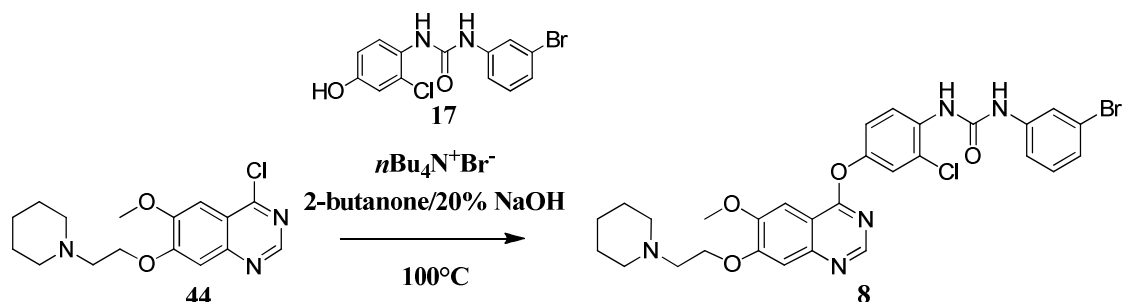
1H NMR (DMSO- d_6): δ (ppm) 1.34-1.42 (m, **2H**, CH_2), 1.45-1.56 (m, **4H**, 2 CH_2), 2.28 (s, **3H**, CH_3), 2.46-2.50 (m, **4H**, 2 CH_2), 2.75 (t, **2H**, $J = 6.6$ Hz, CH_2), 3.97 (s, **3H**, OCH_3), 4.29 (t, **2H**, $J = 6.6$ Hz, CH_2), 7.01-7.16 (m, **3H**, 3ArH), 7.21-7.32 (m, **2H**, 2ArH), 7.41 (s, **1H**, ArH), 7.54 (s, **1H**, ArH), 7.81-7.91 (m, **2H**, 2 ArH), 8.10 (s, **1H**, NH), 8.53 (s, **1H**, ArH), 9.24 (s, **1H**, NH)

^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ (ppm) 18.29, 24.37, 26.02, 54.88, 56.46, 57.50, 67.36, 101.23, 107.97, 110.12, 117.26, 120.08, 120.67, 122.22, 123.24, 124.01, 124.65, 130.66, 131.18, 135.00, 142.06, 148.20, 149.21, 150.55, 152.72, 153.10, 155.39, 165.42

LC-MS (APCI $^+$): m/z calcd for $C_{30}H_{32}BrN_5O_4$ 606 [(M+H) $^+$ for ^{79}Br], 608 [(M+2+H) $^+$ for ^{81}Br]

HRMS (ESI (M+H) $^+$ m/z) calcd for $C_{30}H_{32}BrN_5O_4$ 606.1710 found 606.1686

***N*'-(3-Bromophenyl)-*N*'-{3-chloro-4-[(6-methoxy-7-piperidinoethoxy)quinazolin-4-yl]oxy]-phenyl}urea (8)**



White solid (13%)

$C_{29}H_{29}BrClN_5O_4$

MW = 626.93 g.mol⁻¹

Compound **8** was obtained by crystallization from acetonitrile.

Mp: 204-206°C

IR (cm⁻¹): 2935 (piperidine), 1649 (C=O)

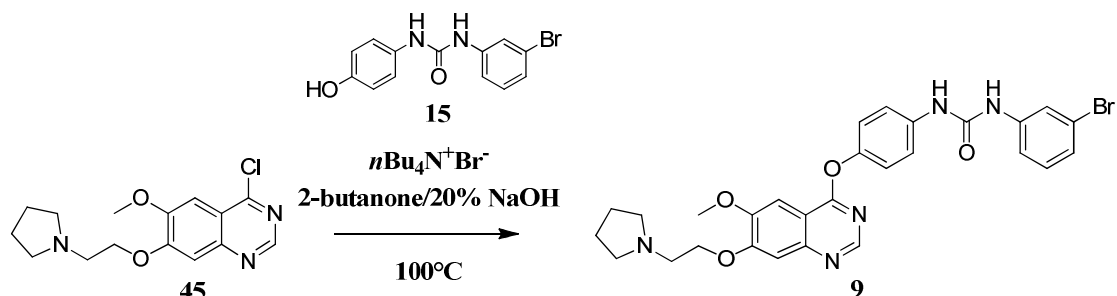
¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 1.32-1.42 (m, **2H**, CH₂), 1.44-1.58 (m, **4H**, 2CH₂), 2.49 (m, **4H**, 2CH₂), 2.74 (t, **2H**, *J* = 6.0 Hz, CH₂), 3.97 (s, **3H**, OCH₃), 4.29 (t, **2H**, *J* = 6.0 Hz, CH₂), 7.29–7.37 (m, **3H**, 3 ArH), 7.41 (m, **1H**, ArH), 7.53-7.57 (m, **2H**, 2ArH), 7.84 (dd, **1H**, *J* = 9.6 and 2.4 Hz, ArH), 8.16 (d, **1H**, *J* = 9.6 Hz, ArH), 8.43 (s, **1H**, ArH), 8.51 (s, **1H**, ArH), 8.56 (s, **1H**, NH), 9.58 (s, **1H**, NH)

¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 24.30, 26.11, 54.58, 56.52, 57.65, 68.07, 101.92, 106.99, 111.12, 116.20, 120.32, 120.41, 122.40, 123.18, 124.10, 124.70, 131.81, 132.21, 135.12, 142.15, 148.27, 149.21, 151.70, 152.71, 153.08, 155.68, 165.13

LC-MS (APCI⁺): *m/z* calcd for C₂₉H₂₉BrClN₅O₄ 626 [(M+H)⁺ for ³⁵Cl/⁷⁹Br], 628 [(M+H)⁺ for ³⁵Cl/⁸¹Br], 628 [(M+H)⁺ for ³⁷Cl/⁷⁹Br], 630 [(M+H)⁺ for ³⁷Cl/⁸¹Br]

HRMS (ESI (M+H)⁺ *m/z*) calcd for C₂₉H₂₉BrClN₅O₄ 628.2714 found 628.2783

***N*'-(3-Bromophenyl)-*N'*'-{4-[(6-methoxy-7-pyrrolidinoethoxyquinazolin-4-yl)oxy]-phenyl}urea (9)**



White solid (24%)

$C_{28}H_{28}BrN_5O_4$

MW = 578.46 g.mol⁻¹

Compound **9** was obtained by filtration from MeOH.

Mp: 179-181°C

IR (cm⁻¹): 2950 (pyrrolidine), 1503 (C=O)

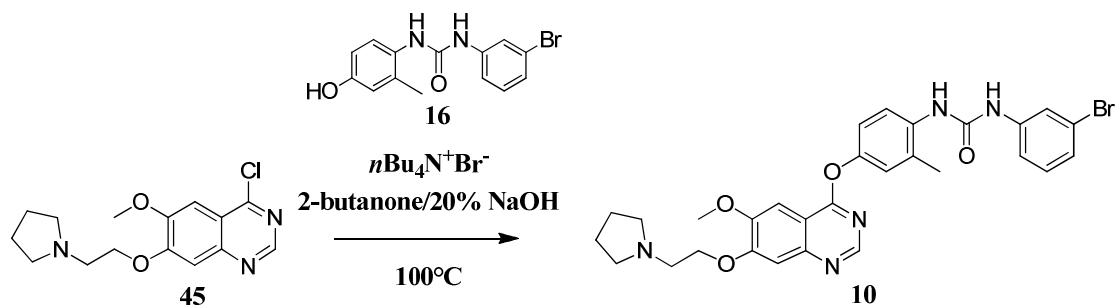
¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 1.64-1.82 (m, **4H**, 2CH₂), 2.54-2.62 (m, **4H**, 2CH₂), 2.93 (m, **2H**, CH₂), 3.98 (s, **3H**, OCH₃), 4.30 (m, **2H**, CH₂), 7.12-7.15 (m, **2H**, 2ArH), 7.20-7.23 (m, **2H**, 2ArH), 7.35 (m, **1H**, ArH), 7.40 (m, **1H**, ArH), 7.56 (m, **3H**, 3ArH), 7.87 (s, **1H**, ArH), 8.54 (s, **1H**, ArH), 8.94 (s, **1H**, NH), 8.99 (s, **1H**, NH)

¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 23.58, 54.35, 54.49, 56.46, 68.18, 101.24, 107.81, 110.14, 117.48, 119.91, 119.92, 120.85, 122.15, 122.81, 122.82, 124.70, 131.09, 137.44, 141.98, 147.35, 149.16, 150.51, 152.68, 152.94, 155.27, 165.40

LC-MS (APCI⁺): *m/z* calcd for C₂₈H₂₈BrN₅O₄ 578 [(M+H)⁺ for ⁷⁹Br], 580 [(M+2+H)⁺ for ⁸¹Br]

HRMS (ESI (M+H)⁺ *m/z*) calcd for C₂₈H₂₈BrN₅O₄ 578.1397 found 578.1372

***N*'**-**(3-Bromophenyl)-**
N'-**{3-methyl-4-[(6-methoxy-7-pyrrolidinoethoxyquinazolin-4-yl)oxy]-phenyl}urea (10)**



White solid (25%)

$C_{29}H_{30}BrN_5O_4$

MW = 592.48 $g \cdot mol^{-1}$

Compound **10** was obtained by filtration from MeOH.

Mp: 193-197°C

IR (cm^{-1}): 2950 (pyrrolidine), 1651 (C=O)

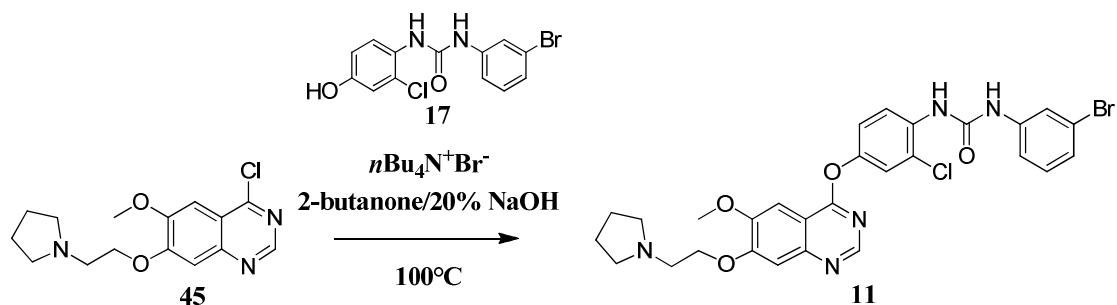
1H NMR (DMSO- d_6): δ (ppm) 1.70-1.72 (m, **4H**, 2CH₂), 2.28 (s, **3H**, CH₃), 2.51-2.55 (m, **4H**, 2 CH₂), 2.90 (t, **2H**, $J = 6.1$ Hz, CH₂), 3.99 (s, **3H**, OCH₃), 4.30 (t, **2H**, $J = 6.1$ Hz, CH₂), 7.08-7.35 (m, **6H**, 6ArH), 7.41 (s, **1H**, ArH), 7.56 (s, **1H**, ArH), 7.81-7.84 (m, **1H**, ArH), 8.11 (s, **1H**, NH), 8.58 (s, **1H**, ArH), 9.30 (s, **1H**, NH)

^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ (ppm) 18.30, 23.62, 54.43, 54.49, 56.44, 68.37, 101.19, 107.77, 110.11, 117.26, 120.08, 120.68, 122.22, 123.25, 124.00, 124.63, 130.65, 131.15, 135.00, 142.07, 148.20, 149.19, 150.52, 152.70, 153.11, 155.34, 165.41

LC-MS (APCI⁺): m/z calcd for $C_{29}H_{30}BrN_5O_4$ 592 [(M+H)⁺ for ^{79}Br], 594 [(M+H)⁺ for ^{81}Br]

HRMS (ESI (M+H)⁺ m/z) calcd for $C_{29}H_{30}BrN_5O_4$ 592.1553 found 592.1534

***N*'-(3-Bromophenyl)-
N'-{3-chloro-4-[(6-methoxy-7-pyrrolidinoethoxy)quinazolin-4-yl]oxy}-phenyl}urea (11)**



Beige solid (9%)

$C_{28}H_{27}BrClN_5O_4$

MW = 612.90 $g \cdot mol^{-1}$

Compound **11** was obtained by filtration from MeOH.

Mp: 187-189 °C

IR (cm^{-1}): 2950 (pyrrolidine), 1645 (C=O)

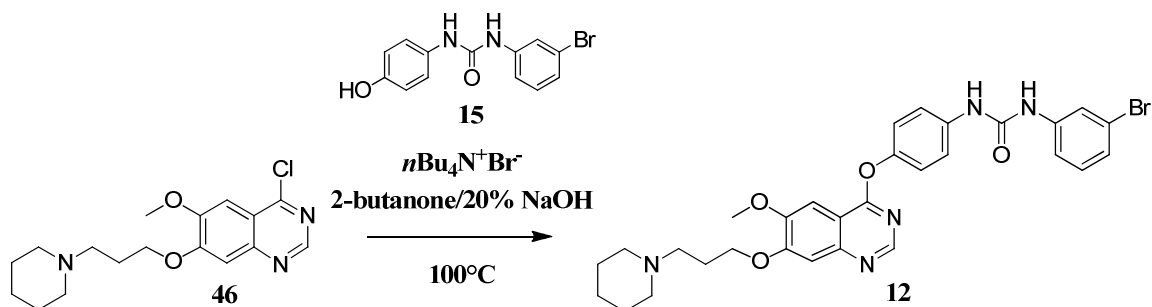
1H NMR (DMSO- d_6): δ (ppm) 1.70 (m, **4H**, 2 CH_2), 2.60-2.65 (m, **4H**, 2 CH_2), 2.90 (t, **2H**, $J = 6.7$ Hz, CH_2), 4.00 (s, **3H**, OCH_3), 4.32 (t, **2H**, $J = 6.7$ Hz, CH_2), 7.12-7.48 (m, **5H**, 5 ArH), 7.55-7.62 (m, **2H**, 2 ArH), 7.91 (s, **1H**, ArH), 8.12-8.20 (m, **1H**, ArH), 8.48 (s, **1H**, NH), 8.60 (s, **1H**, ArH), 9.61 (s, **1H**, NH)

^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ (ppm) 23.58, 54.37, 54.42, 56.36, 68.37, 101.12, 107.84, 111.02, 117.52, 120.05, 120.08, 120.92, 122.33, 122.80, 122.86, 124.72, 131.13, 137.54, 141.99, 147.33, 148.98, 150.37, 152.71, 152.91, 155.31, 165.37

LC-MS (APCI $^+$): m/z calcd for $C_{28}H_{27}BrClN_5O_4$ 612 [(M+H) $^+$ for $^{35}Cl/^{79}Br$], 614 [(M+H) $^+$ for $^{35}Cl/^{81}Br$], 614 [(M+H) $^+$ for $^{37}Cl/^{79}Br$], 616 [(M+H) $^+$ for $^{37}Cl/^{81}Br$]

HRMS (ESI (M+H) $^+$ m/z) calcd for $C_{28}H_{27}BrClN_5O_4$ 614.0978 found 614.0955

***N*'**-{(3-Bromophenyl)-*N'*'-{4-[(6-methoxy-7-piperidinopropoxyquinazolin-4-yl)oxy]-phenyl}urea (**12**)



White solid (26%)

$C_{30}H_{32}BrN_5O_4$

MW = 606.51 $g \cdot mol^{-1}$

Compound **12** was obtained by crystallization from acetonitrile.

Mp: 179-181°C

IR (cm^{-1}): 2935 (piperidine), 1712 (C=O)

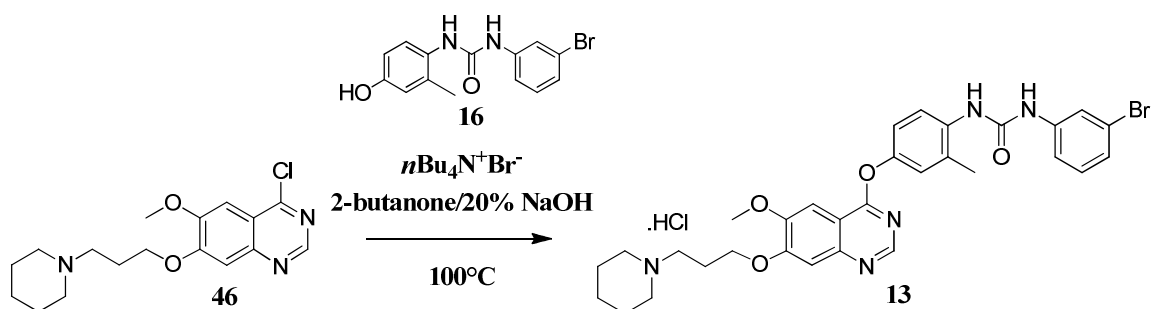
1H NMR (DMSO- d_6): δ (ppm) 1.68-1.73 (m, **4H**, 2 CH_2), 2.15-2.25 (m, **4H**, 2 CH_2), 2.75-2.78 (m, **2H**, CH_2), 2.93-2.99 (m, **2H**, CH_2), 3.05-3.17 (m, **2H**, CH_2), 4.00 (s, **3H**, OCH_3), 4.15-4.21 (m, **2H**, CH_2), 7.13-7.32 (m, **6H**, 6 ArH), 7.62 (m, **2H**, 2 ArH), 7.68 (s, **1H**, ArH), 7.75 (s, **1H**, ArH), 8.27 (s, **1H**, NH), 8.37 (s, **1H**, ArH), 9.30 (s, **1H**, NH)

^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ (ppm) 24.62, 26.07, 26.42, 54.77, 56.02, 56.50, 67.48, 100.89, 107.52, 110.81, 116.38, 120.87, 121.03, 122.91, 122.99, 123.20, 123.66, 125.13, 125.18, 132.03, 133.95, 142.64, 147.71, 149.30, 151.69, 153.03, 157.60, 165.37

LC-MS (APCI $^+$): m/z calcd for $C_{30}H_{32}BrN_5O_4$ 606 [(M+H) $^+$ for ^{79}Br], 608 [(M+H) $^+$ for ^{81}Br]

HRMS (ESI (M+H) $^+$ m/z) calcd for $C_{30}H_{32}BrN_5O_4$ 606.1701 found 606.17017

***N*'-(3-Bromophenyl)-
N'-{3-methyl-4-[(6-methoxy-7-piperidinopropoxyquinazolin-4-yl)oxy]-phenyl}urea
hydrochloride (13)**



Beige solid (18%)
 $\text{C}_{31}\text{H}_{34}\text{BrN}_5\text{O}_4 \cdot \text{HCl}$
 MW = 657.00 g.mol⁻¹

Compound **13** was collected by precipitation in a mixture of diethyl ether/hydrochloric acid 6 N in isopropanol.

Mp > 250°C

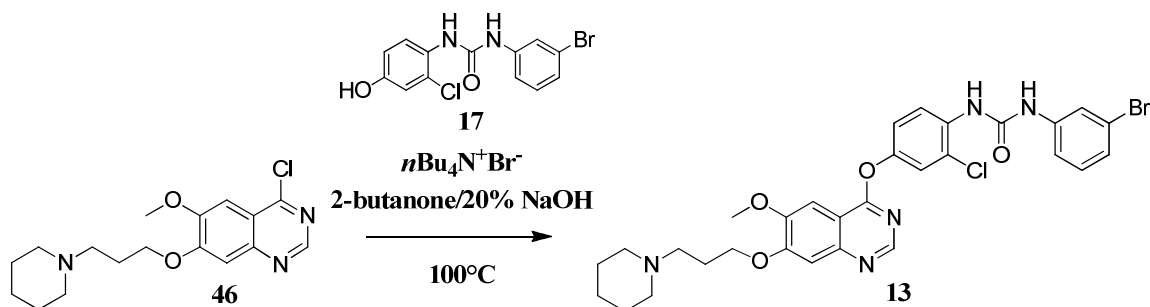
IR (cm⁻¹): 2510 (NH⁺), 1705 (C=O)

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 1.70-1.80 (m, **4H**, 2 CH₂), 2.22-2.31 (m, **4H**, 2 CH₂), 2.94-2.98 (m, **2H**, CH₂), 3.10-3.16 (m, **2H**, CH₂), 3.21-3.29 (m, **2H**, CH₂), 4.01 (s, **3H**, OCH₃), 4.27-4.30 (m, **2H**, CH₂), 4.33 (s, **3H**, CH₃), 7.03-7.51 (m, **5H**, 5 ArH), 7.47 (m, **2H**, 2 ArH), 7.61 (s, **1H**, ArH), 7.88 (s, **1H**, ArH), 8.54 (s, **1H**, NH), 8.69 (s, **1H**, ArH), 9.99 (s, **1H**, NH), 10.17 (s, **1H**, NH⁺)

¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 24.54, 27.01, 27.05, 53.98, 56.32, 56.59, 68.50, 101.32, 107.57, 110.83, 114.03, 120.02, 121.38, 122.47, 122.91, 123.05, 123.47, 125.32, 125.87, 132.04, 133.48, 143.05, 149.15, 149.73, 152.99, 153.05, 158.02, 165.48

LC-MS (APCI⁺): *m/z* calcd for C₃₁H₃₄BrN₅O₄ 620 [(M + H)⁺ for ⁷⁹Br], 622 [(M+H)⁺ for ⁸¹Br]
HRMS (ESI (M+H)⁺*m/z*) calcd for C₃₁H₃₄BrN₅O₄ 620.1866 found 620.1842

***N*'**-**(3-Bromophenyl)-**
N'-**{3-chloro-4-[(6-methoxy-7-piperidinopropoxy)quinazolin-4-yl]oxy}**-phenyl}urea (**14**)



White solid (21%)

$C_{30}H_{31}BrClN_5O_4$

MW = 640.96 g.mol⁻¹

Compound **14** was obtained by filtration from MeOH.

Mp: 198-200°C

IR (cm⁻¹): 2935 (piperidine), 1708 (C=O)

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 1.69-1.78 (m, **4H**, 2 CH₂), 2.15-2.28 (m, **4H**, 2 CH₂), 2.68-2.72 (m, **2H**, CH₂), 3.01-3.12 (m, **2H**, CH₂), 3.15-3.23 (m, **2H**, CH₂), 3.99 (s, **3H**, OCH₃), 4.20-4.25 (m, **2H**, CH₂), 7.10-7.15 (m, **5H**, 5 ArH), 7.36-7.42 (m, **2H**, 2 ArH), 7.56 (s, **1H**, ArH), 7.78 (s, **1H**, ArH), 8.34 (s, **1H**, NH), 8.43 (s, **1H**, ArH), 9.27 (s, **1H**, NH)

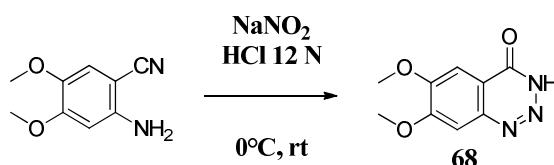
¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 24.59, 26.06, 26.46, 54.56, 55.44, 56.47, 67.69, 101.15, 107.67, 109.93, 117.43, 120.85, 121.98, 122.27, 122.77, 123.21, 123.56, 125.05, 125.10, 131.25, 133.80, 141.57, 147.73, 149.33, 150.62, 152.55, 155.59, 165.09

LC-MS (APCI⁺): *m/z* calcd for C₃₀H₃₁BrClN₅O₄ 640 [(M+H)⁺ for ³⁵Cl/⁷⁹Br], 642 [(M+H)⁺ for ³⁵Cl/⁸¹Br], 642 [(M+H)⁺ for ³⁷Cl/⁷⁹Br], 644 [(M+H)⁺ for ³⁷Cl/⁸¹Br]

HRMS (ESI (M+H)⁺*m/z*) calcd for C₃₀H₃₁BrClN₅O₄ 640.1299 found 640.1304

SYNTHESIS OF BENZOTRIAZINES

6,7-Dimethoxy-benzo-[d]-1,2,3-triazin-4-one (68)



Brown solid (95%)

 $\text{C}_9\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_3$ MW = $207.19 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

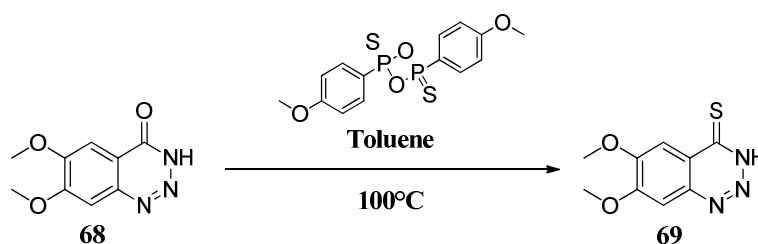
Protocol: A solution of sodium nitrite (1.4 eq) in H_2O was added over 15 min to a suspension of a 2-amino-4,5-dimethoxybenzonnitrile (1 eq) at 0°C in concentrated HCl . The resulting mixture was stirred at 0°C for a further 40 min and then allowed to stand at room temperature overnight. The reaction mixture was poured into H_2O and the aqueous layer was extracted with EtOAc . The organic layers were washed with a solution of HCl 1N , and dried over MgSO_4 . The solvent was removed under reduced pressure and the precipitated was collected as a brown solid (95%).

Mp: $224\text{--}225^\circ\text{C}$ IR (cm^{-1}): 1627 (C=O)

$^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) 3.96 (s, 3H, OCH_3), 3.99 (s, 3H, OCH_3), 7.50 (s, 1H, ArH), 7.61 (s, 1H, ArH)

LC-MS (APCI $^+$): m/z calcd for $\text{C}_9\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_3$ 208 [(M + H) $^+$]

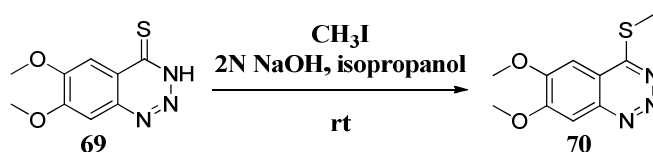
6,7-Dimethoxy-benzo-[d]-1,2,3-triazin-4-thione (69)



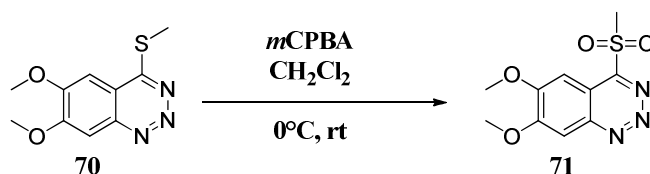
Brown solid

 $\text{C}_9\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$ MW = $223.25 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Protocol: A solution of 6,7-dimethoxy-benzo-[d]-1,2,3-triazin-4-one **68** (1 eq) and Lawesson's reagent (0.5 eq) in toluene was stirred at 100°C for 6 h. The precipitated was filtered and the residu was washed by acetonitrile to give product **69** as a brown solid.

Mp > 250°C**IR** (cm⁻¹): 1281 (C=S)**¹H NMR** (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 4.00 (s, **3H**, OCH₃), 4.04 (s, **3H**, OCH₃), 7.61 (s, 1H, ArH), 7.85 (s, 1H, ArH)**LC-MS** (APCI⁺): *m/z* calcd for C₉H₉N₃O₂S 224 [(M + H)⁺]**4-Methylthio-6,7-dimethoxy-benzo-[d]-1,2,3-triazine (70)**

Brown solid (30%)

C₁₀H₁₁N₃O₂SMW = 237.28 g.mol⁻¹**Protocol:** A solution of 6,7-dimethoxy-benzo-[d]-1,2,3-triazin-4-one **69** (1 eq) and methyl iodide (1 eq) in a mixture of 2N NaOH and isopropanol (5 : 5) was stirred at room temperature for 2 h. The precipitated was filtered and the residu was washed by isopropanol to give product **70** as a brown solid (30%).**Mp:** 220-222°C**¹H NMR** (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 2.71 (s, **3H**, CH₃), 4.05 (s, **3H**, OCH₃), 4.06 (s, **3H**, OCH₃), 7.14 (s, **1H**, ArH), 7.70 (s, **1H**, ArH)**LC-MS** (APCI⁺): *m/z* calcd for C₁₀H₁₁N₃O₂S 238 [(M + H)⁺]**4-Methylsulfonyl-6,7-dimethoxy-benzo-[d]-1,2,3-triazine (71)**

Brown solid (73%)

C₁₀H₁₁N₃O₄SMW = 269.28 g.mol⁻¹**Protocol:** A solution of *m*CPBA (2.5 eq) in CH₂Cl₂ was added over 10 min to a suspension of 4-methylthio-6,7-dimethoxy-benzo-[d]-1,2,3-triazine **70** (1 eq) in CH₂Cl₂ at 0°C. The resulting mixture was stirred at room temperature for a further 30 min. The mixture was washed with a 10% K₂CO₃ solution and the organic layer was dried over MgSO₄. The solvent

was removed under reduced pressure and the precipitated was collected by filtration in a mixture of CH₂Cl₂ / petroleum ether (1 : 9) as a brown solid (73%).

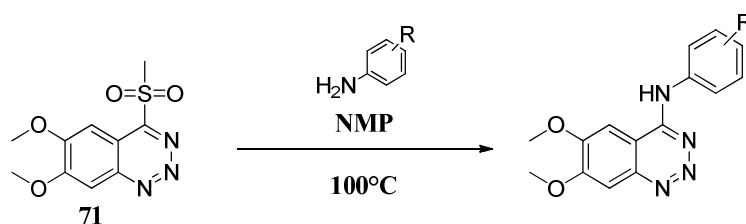
Mp: 182-184°C

IR (cm⁻¹): 1141 and 1305 (SO₂Me)

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 3.70 (s, **3H**, CH₃), 4.10 (s, **3H**, OCH₃), 4.20 (s, **3H**, OCH₃), 7.80 (s, **1H**, ArH), 7.95 (s, **1H**, ArH)

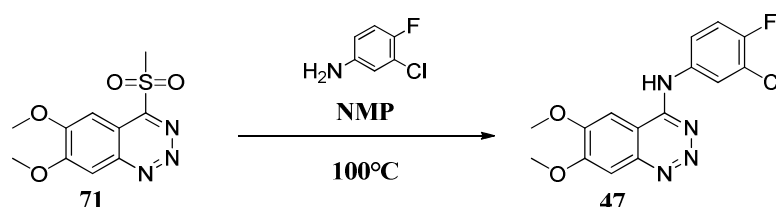
LC-MS (APCI⁺): *m/z* calcd for C₁₀H₁₁N₃O₄S 270 [(M + H)⁺]

General procedure 4-anilino-6,7-dimethoxy-benzo-[d]-1,2,3-triazines (47-49)



Protocol: To a solution of 4-methylsulfonyl-6,7-dimethoxy-benzo-[d]-1,2,3-triazine **71** (1 eq) in *N*-methyl-2-pyrrolidone was added aniline (1.2 eq). After 2 h at 100°C, the reaction was quenched by water, and the precipitated obtained was filtered.

4-(3-Chloro-4-fluoroanilino)-6,7-dimethoxy-benzo-[d]-1,2,3-triazines (47)



White solid (45%)

C₁₅H₁₂ClF N₄O₂

MW = 334.73 g.mol⁻¹

Compound **47** was obtained by filtration from diethyl ether.

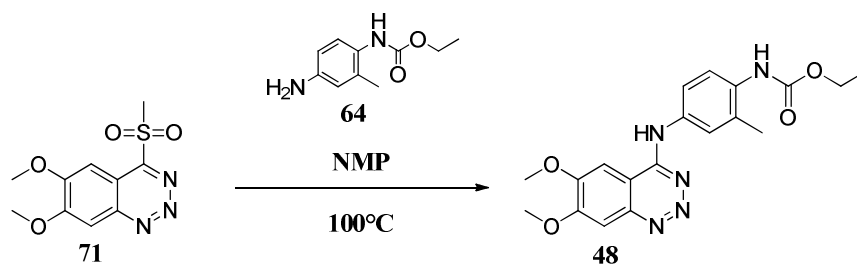
Mp: 237-239°C

IR (cm⁻¹): 3087 (NH)

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 4.00 (s, **3H**, OCH₃), 4.01 (s, **3H**, OCH₃), 7.38-8.38 (m, **5H**, 5 ArH), 9.67 (s, **1H**, NH)

LC-MS (APCI⁺): *m/z* calcd for C₁₅H₁₂ClF N₄O₂ 335 [(M+H)⁺ for ³⁵Cl], 337 [(M+H)⁺ for ³⁷Cl]

***N*-(3-Methyl-4-(6,7-dimethoxy-benzo-*d*]-1,2,3-triazin)-4-ylaminophenyl)-
carbamic acid ethyl ester (48)**



White solid (65%)

$C_{19}H_{21}N_5O_4$

MW = 383.40 $g \cdot mol^{-1}$

Compound **48** was obtained by filtration from acetonitrile.

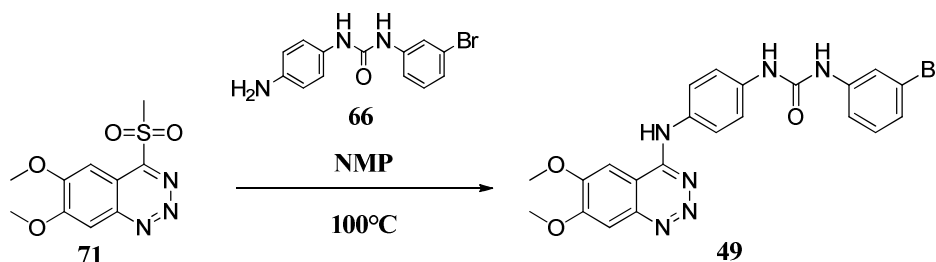
Mp: 242-244°C

IR (cm^{-1}): 3090 (NH), 1710 (C=O)

1H NMR (DMSO- d_6): δ (ppm) 1.25 (t, **3H**, $J = 7.3$ Hz, CH_3), 2.20 (s, **3H**, CH_3), 4.00 (s, **3H**, OCH_3), 4.04 (s, **3H**, OCH_3), 4.10 (q, **2H**, $J = 7.3$ Hz, CH_2), 7.12 (m, **2H**, 2 ArH), 7.45 (d, **1H**, $J = 9.0$ Hz, ArH), 7.80 (s, **1H**, ArH), 7.95 (s, **1H**, ArH), 8.97 (s, **1H**, NH), 9.60 (s, **1H**, NH)

LC-MS (APCI $^+$): m/z calcd for $C_{19}H_{21}N_5O_4$ 384 [(M+H) $^+$]

***N*-(3-Bromophenyl)-
N'-{4-[(6,7-dimethoxy-benzo-*d*]-1,2,3-triazin)-4-ylamino]-phenyl}urea (49)**



White solid (49%)

$C_{22}H_{19}Br N_6O_3$

MW = 495.33 $g \cdot mol^{-1}$

Compound **49** was obtained by filtration from acetonitrile.

Mp: 210-212°C

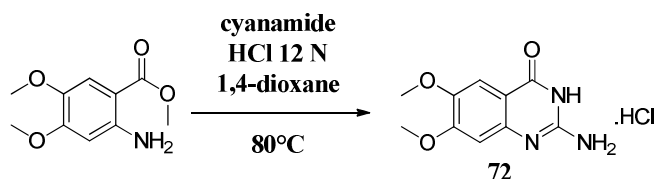
IR (cm^{-1}): 3292 (NH), 1620 (C=O)

1H NMR (DMSO- d_6): δ (ppm) 3.98 (s, **3H**, OCH_3), 4.02 (s, **3H**, OCH_3), 6.49 (d, **2H**, $J = 6.8$ Hz, 2 ArH), 7.05 (d, **2H**, $J = 6.8$ Hz, 2 ArH), 7.08 (m, **3H**, 3 ArH), 7.75 (s, **1H**, ArH), 7.82 (m, **1H**, ArH), 7.87 (s, **1H**, ArH), 8.88 (s, **1H**, NH), 8.95 (s, **1H**, NH), 9.58 (s, **1H**, NH)

LC-MS (APCI $^+$): m/z calcd for $C_{22}H_{19}Br N_6O_3$ 495 [(M+H) $^+$ for ^{79}Br], 497 [(M+H) $^+$ for ^{81}Br]

SYNTHESIS OF 2-AMINOQUINAZOLINES

2-Amino-6,7-dimethoxyquinazolin-4-one hydrochloride (72)



White solid (96%)

 $C_{10}H_{11}N_3O_3 \cdot HCl$ MW = 257.67 g.mol⁻¹

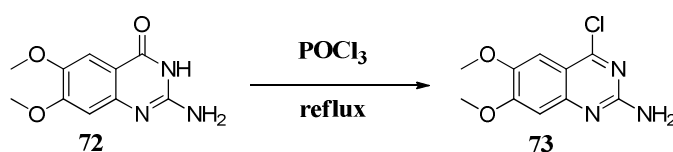
Protocol: Concentrated HCl (0.05 mL) was added dropwise to a solution of methyl 2-amino-4,5-dimethoxybenzoate (1 g, 4.73 mmol) and cyanamide (0.32 g, 7.57 mmol) in dioxane (40 mL) at room temperature. The mixture was heated at 80°C for 24 h and then cooled to room temperature. The precipitated was collected by filtration as a white solid (96%).

Mp > 250°C**IR** (cm⁻¹): 3193 (NH₃⁺), 1634 (C=O)

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 3.80 (s, 3H, OCH₃), 3.85 (s, 3H, OCH₃), 6.82 (s, 1H, ArH), 7.21 (s, 2H, NH₂), 7.28 (s, 1H, ArH), 12.00 (s, 1H, NH⁺)

LC-MS (APCI⁺): *m/z* calcd for C₁₀H₁₁N₃O₃ 222 [(M + H)⁺]

2-Amino-4-chloro-6,7-dimethoxyquinazoline (73)



White solid (9%)

 $C_{10}H_{10}ClN_3O_2$ MW = 239.66 g.mol⁻¹

Protocol: A solution of 2-amino-6,7-dimethoxyquinazolin-4-one hydrochloride **72** (1 g, 3.88 mmol) in phosphorus oxychloride (20 mL) was refluxed for 6 h. After removal of the solvent, the residue was dissolved in ice-water (50 mL) and the mixture was neutralized by 10% K₂CO₃ solution. The precipitate was collected by filtration and dissolved in CH₂Cl₂ (100 mL). The organic layer was washed with 10% K₂CO₃ solution, brine and dried over CaCl₂, and the solvent was removed under reduced pressure to give **73** as a white solid (7%).

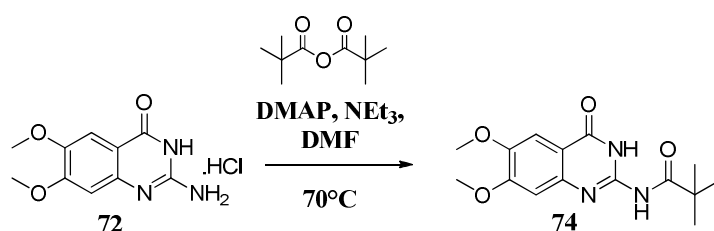
Mp: 194-196°C

IR (cm⁻¹): 3105 (NH₂)

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 4.00 (s, **3H**, OCH₃), 4.05 (s, **3H**, OCH₃), 5.10 (s, **2H**, NH₂), 6.95 (s, **1H**, ArH), 7.25 (s, **1H**, ArH)

LC-MS (APCI⁺): *m/z* calcd for C₁₀H₁₀ClN₃O₂ 240 [(M + H)⁺ for ³⁵Cl] and 242 [(M + H)⁺ for ³⁷Cl]

2-Pivaloylamino-6,7-dimethoxyquinazolin-4-one (**74**)



White solid (97%)

C₁₅H₁₉N₃O₄

MW = 305.33 g.mol⁻¹

Protocol: To a solution of 2-amino-6,7-dimethoxyquinazolin-4-one hydrochloride **72** (2 g, 9.04 mmol) in DMF (40 mL) were added pivalic anhydride (5.05 g, 27.1 mmol), DMAP (0.05 g, 0.45 mmol), Et₃N (4.57g, 45.2 mmol). The mixture was stirred at 70°C for 2 h and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was dissolved in water and the mixture was neutralized by 10% K₂CO₃. The precipitate was collected by filtration and dried in vacuo to give **74** as a white solid (92%).

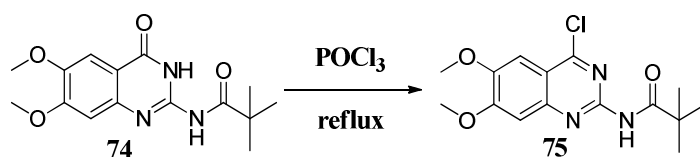
Mp: 159-161°C

IR (cm⁻¹): 3050 (NH), 1672 (C=O)

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 1.30 (s, **9H**, *t*-Bu), 3.80 (s, **3H**, OCH₃), 3.82 (s, **3H**, OCH₃), 6.90 (s, **1H**, ArH), 7.40 (s, **1H**, ArH), 11.00 (s, **1H**, NH), 12.00 (s, **1H**, NH)

LC-MS (APCI⁺): *m/z* calcd for C₁₅H₁₉N₃O₄ 306 [(M + H)⁺]

2-Pivaloylamino-4-chloro-6,7-dimethoxyquinazoline (**75**)



White solid (70%)

C₁₅H₁₈ClN₃O₃

MW = 323.77 g.mol⁻¹

Protocol: A solution of 2-pivaloylamino-6,7-dimethoxyquinazolin-4-one **74** (2.55 g, 8.35 mmol) in phosphorus oxychloride (20 mL) was refluxed for 6 h. After removal of the solvent, the residue was dissolved in ice-water (50 mL) and the mixture was neutralized by 10% K_2CO_3 solution. The precipitate was collected by filtration and dissolved in CH_2Cl_2 (100 mL). The organic layer was washed with 10% K_2CO_3 solution, brine and dried over CaCl_2 , and the solvent was removed under reduced pressure to give **75** as a white solid (75%).

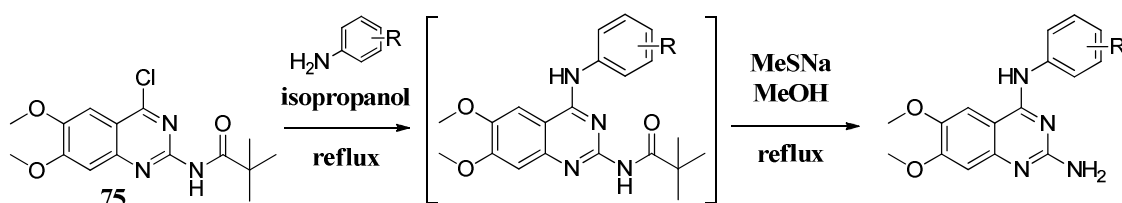
Mp: 139-141°C

IR (cm^{-1}): 3042 (NH), 1675 (C=O)

^1H NMR ($\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) 1.30 (s, **9H**, *t*-Bu), 4.00 (s, **3H**, OCH_3), 4.05 (s, **3H**, OCH_3), 7.20 (s, **1H**, ArH), 7.40 (s, **1H**, ArH), 10.20 (s, **1H**, NH)

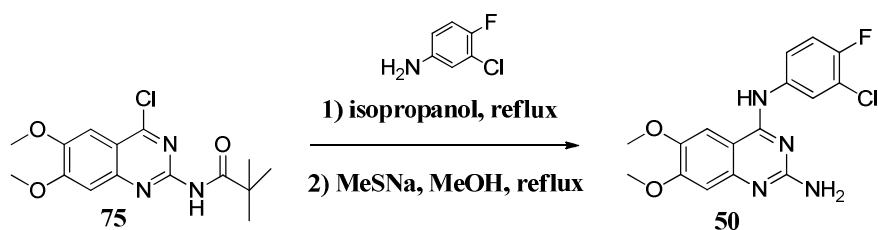
LC-MS (APCI⁺): m/z calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{O}_3$ 324 [(M + H)⁺ for ^{35}Cl] and 326 [(M + H)⁺ for ^{37}Cl]

General procedure for 2-amino-4-anilino-6,7-dimethoxyquinazolines (**50-56**)



Protocol: To a solution 2-pivaloylamino-4-chloro-6,7-dimethoxyquinazoline **75** (1 eq) in isopropanol, was added corresponding aniline (1,2 eq). After 2 h at reflux, the mixture was filtered. The obtained residue was stirred in methanol with sodium thiomethoxide at reflux for 2 h and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was dissolved in water and the precipitate was collected by filtration and recrystallized to give desired compound **50-56**.

2-Amino-4-(3-chloro-4-fluoroanilino)-6,7-dimethoxyquinazoline (**50**)



White solid (88%)

$\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{ClFN}_4\text{O}_2$

MW = 348.76 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Compound **50** was obtained by crystallization from acetonitrile.

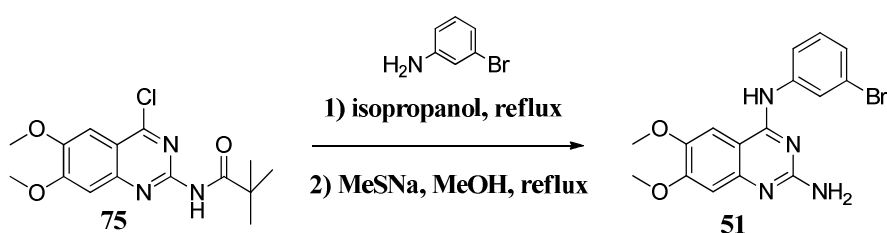
Mp > 250°C**IR** (cm⁻¹): 3202 (NH₂)

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 3.82 (s, **3H**, OCH₃), 3.83 (s, **3H**, OCH₃), 6.08 (s, **2H**, NH₂), 6.75 (s, **1H**, ArH), 7.38 (m, **1H**, ArH), 7.62 (s, **1H**, ArH), 7.91 (m, **1H**, ArH), 8.12 (m, **1H**, 1 ArH), 9.18 (s, **1H**, NH)

LC-MS (APCI⁺): *m/z* calcd for C₁₆H₁₄ClFN₄O₂ 349 [(M + H)⁺ for ³⁵Cl] and 351 [(M + H)⁺ for ³⁷Cl]

HRMS (ESI (M+H)⁺ *m/z*) calcd for C₁₆H₁₄ClFN₄O₂ 349.0862 found 349.0859

2-Amino-4-(3-bromoanilino)-6,7-dimethoxyquinazoline (**51**)



White solid (91%)

C₁₆H₁₅BrN₄O₂MW = 375.22 g.mol⁻¹

Compound **51** was obtained by crystallization from acetonitrile.

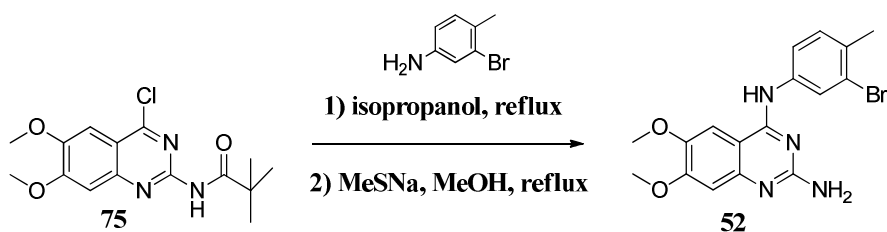
Mp > 250°C**IR** (cm⁻¹): 3190 (NH₂)

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 3.82 (s, **3H**, OCH₃), 3.88 (s, **3H**, OCH₃), 6.05 (s, **2H**, NH₂), 6.71 (s, **1H**, ArH), 7.35 (m, **2H**, 2 ArH), 7.63 (s, **1H**, ArH), 8.05 (m, **2H**, 2 ArH), 9.12 (s, **1H**, NH)

LC-MS (APCI⁺): *m/z* calcd for C₁₆H₁₅BrN₄O₂ 375 [(M + H)⁺ for ⁷⁹Br] and 377 [(M + H)⁺ for ⁸¹Br]

HRMS (ESI (M+H)⁺ *m/z*) calcd for C₁₆H₁₅BrN₄O₂ 375.0451 found 375.0446

2-Amino-4-(3-bromo-4-methylanilino)-6,7-dimethoxyquinazoline (**52**)



White solid (85%)

C₁₇H₁₇BrN₄O₂MW = 389.25 g.mol⁻¹

Compound **52** was obtained by crystallization from ethanol.

Mp > 250°C

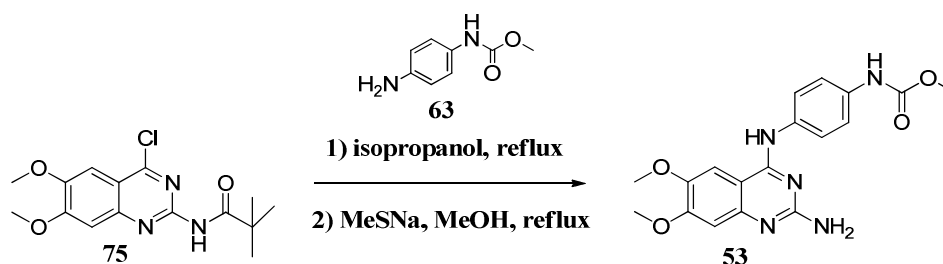
IR (cm⁻¹): 3193 (NH₂)

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 2.30 (s, **3H**, CH₃), 3.80 (s, **3H**, OCH₃), 3.90 (s, **3H**, OCH₃), 6.01 (s, **2H**, NH₂), 6.75 (s, **1H**, ArH), 7.35 (d, **1H**, *J* = 6.1 Hz, ArH), 7.66 (s, **1H**, ArH), 8.01 (m, **2H**, 2 ArH), 9.10 (s, **1H**, NH)

LC-MS (APCI⁺): *m/z* calcd for C₁₇H₁₇BrN₄O₂ 389 [(M + H)⁺ for ⁷⁹Br] and 391 [(M + H)⁺ for ⁸¹Br]

HRMS (ESI (M+H)⁺ *m/z*) calcd for C₁₇H₁₇BrN₄O₂ 389.0608 found 389.0606

***N*-[4-(2-Amino-6,7-dimethoxyquinazolin-4-ylamino)phenyl]-
carbamic acid methyl ester (**53**)**



White solid (90%)

C₁₈H₁₉N₅O₄

MW = 369.37 g.mol⁻¹

Compound **53** was obtained by crystallization from ethanol.

Mp = 197-199°C

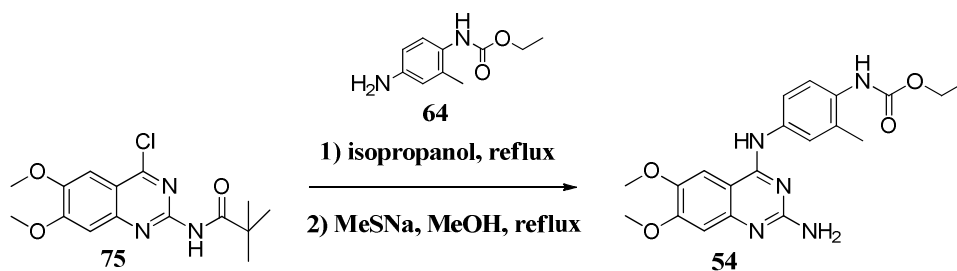
IR (cm⁻¹): 3356 (NH₂), 3304 (NH), 1710 (C=O)

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 3.45 (s, **3H**, CH₃), 3.95 (s, **3H**, OCH₃), 4.00 (s, **3H**, OCH₃), 6.01 (s, **2H**, NH₂), 7.50 (d, **2H**, *J* = 8.9 Hz, 2 ArH), 7.55 (s, **1H**, ArH), 7.65 (d, **2H**, *J* = 8.9 Hz, 2 ArH), 8.20 (s, **1H**, ArH), 9.10 (s, **1H**, NH), 9.50 (s, **1H**, NH)

LC-MS (APCI⁺): *m/z* calcd for C₁₈H₁₉N₅O₄ 370 [(M + H)⁺]

HRMS (ESI (M+H)⁺ *m/z*) calcd for C₁₈H₁₉N₅O₄ 370.1510 found 370.1509

***N*-[2-Methyl-4-(2-amino-6,7-dimethoxyquinazolin-4-ylamino)phenyl]-
carbamic acid ethyl ester (54)**



White solid (60%)

$C_{20}H_{23}N_5O_4$

MW = 397.43 g.mol⁻¹

Compound **54** was obtained by crystallization from acetonitrile.

Mp > 250°C

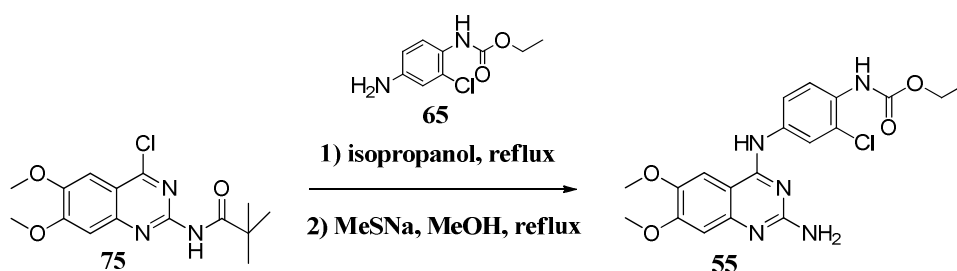
IR (cm⁻¹): 3384 (NH₂), 1713 (C=O)

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 1.25 (t, **3H**, *J* = 7.6 Hz, CH₃), 2.20 (s, **3H**, CH₃), 3.90 (s, **3H**, OCH₃), 3.95 (s, **3H**, OCH₃), 4.15 (q, **2H**, *J* = 7.6 Hz, CH₂), 6.02 (s, **2H**, NH₂), 7.00 (s, **1H**, ArH), 7.45 (Dd, **1H**, *J* = 3.2 and 9.0 Hz, ArH), 7.50 (D, **1H**, *J* = 9.0 Hz, ArH), 8.10 (s, **1H**, ArH), 8.90 (d, **1H**, *J* = 3.2 Hz, ArH), 10.60 (s, **1H**, NH), 12.75 (s, **1H**, NH)

LC-MS (APCI⁺): *m/z* calcd for C₂₀H₂₃N₅O₄ 398 [(M + H)⁺]

HRMS (ESI (M+H)⁺ *m/z*) calcd for C₂₀H₂₃N₅O₄ 398.1823 found 398.1821

***N*-[2-Chloro-4-(2-amino-6,7-dimethoxyquinazolin-4-ylamino)phenyl]-
carbamic acid ethyl ester (55)**



White solid (65%)

$C_{19}H_{20}ClN_5O_4$

MW = 417.85 g.mol⁻¹

Compound **55** was obtained by crystallization from acetonitrile.

Mp > 250°C

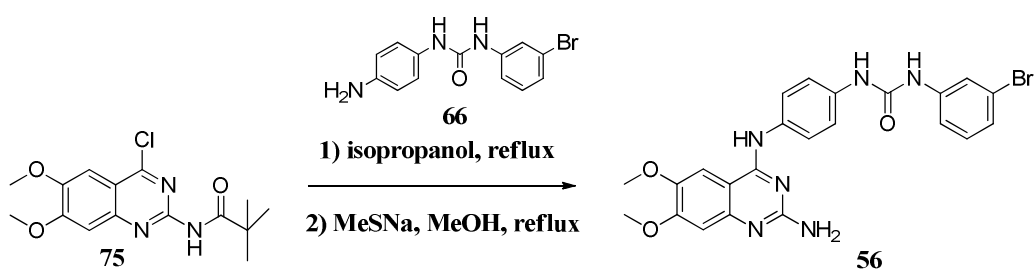
IR (cm⁻¹): 3380 (NH₂), 1707 (C=O)

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 1.20 (t, **3H**, $J = 7.6$ Hz, CH₃), 3.80 (s, **3H**, OCH₃), 3.85 (s, **3H**, OCH₃), 4.10 (q, **2H**, $J = 7.6$ Hz, CH₂, ArH), 6.00 (s, **2H**, NH₂), 6.70 (s, **1H**, ArH), 7.40 (d, **1H**, $J = 8.9$ Hz, ArH), 7.60 (s, **1H**, ArH), 7.90 (Dd, **1H**, $J = 3.1$ and 8.5 Hz), 8.00 (d, **1H**, $J = 2.9$ Hz, ArH), 8.90 (s, **1H**, NH), 9.15 (s, **1H**, NH)

LC-MS (APCI⁺): m/z calcd for C₁₉H₂₀ClN₅O₄ 418 [(M + H)⁺ for ³⁵Cl] and 420 [(M + H)⁺ for ³⁷Cl]

HRMS (ESI (M+H)⁺ m/z) calcd for C₁₉H₂₀ClN₅O₄ 418.1277 found 418.1274

***N'*-[4-(2-amino-6,7-dimethoxyquinazolin-4-ylamino)phenyl]urea (56)**



White solid (60%)

C₂₃H₂₁BrN₆O₃

MW = 509.36 g.mol⁻¹

Compound **56** was obtained by crystallization from methanol.

Mp > 250°C

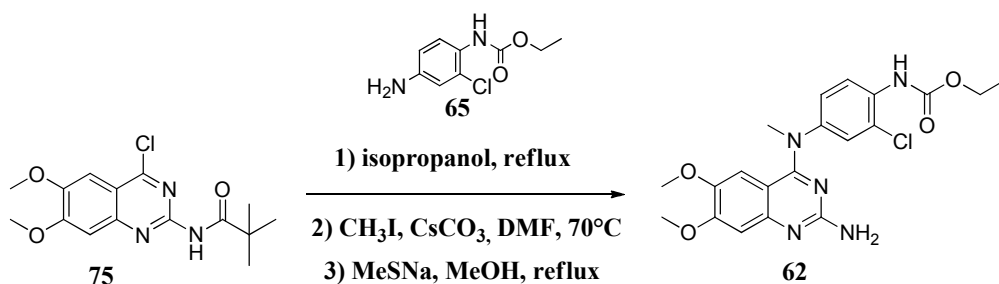
IR (cm⁻¹): 3193 (NH), 1634 (C=O)

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 3.90 (s, **3H**, OCH₃), 3.85 (s, **3H**, OCH₃), 6.10 (s, **2H**, NH₂), 6.75 (s, **1H**, ArH), 7.14 (m, **1H**, ArH), 7.24 (m, **1H**, ArH), 7.32 (m, **1H**, ArH), 7.43 (d, **2H**, $J = 8.6$ Hz, 2 ArH), 7.67 (s, **1H**, ArH), 7.74 (d, **2H**, $J = 8.6$ Hz, 2 ArH), 7.87 (m, **1H**, ArH), 8.70 (s, **1H**, NH), 8.90 (s, **1H**, NH), 9.15 (s, **1H**, NH)

LC-MS (APCI⁺): m/z calcd for C₂₃H₂₁BrN₆O₃ 509 [(M + H)⁺ for ⁷⁹Br] and 511 [(M + H)⁺ for ⁸¹Br]

HRMS (ESI (M+H)⁺ m/z) calcd for C₂₃H₂₁BrN₆O₃ 509.0931 found 509.0933

***N*-[2-Chloro-4-(2-amino-6,7-dimethoxyquinazolin-4-*N*-(methyl)lamino)phenyl] carbamic acid ethyl ester (**62**)**



White solid (20%)

$\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{ClN}_5\text{O}_4$

MW = 431.87 g.mol⁻¹

Protocol: To a solution 2-pivaloylamino-4-chloro-6,7-dimethoxyquinazoline **75** (1 eq) in isopropanol, was added aniline **65** (1,2 eq). After 2 h at reflux, the mixture was filtered.

The obtained residue was stirred at 70°C for 16 h in *N,N*-dimethylformamide with cesium carbonate (2 eq) in) and iodomethane (2 eq). The reaction was quenched by water, and then the aqueous solution was extracted with EtOAc, washed with a solution of K₂CO₃ 10%, and dried over MgSO₄. The solvent was removed under reduced pressure.

The obtained residue was stirred in methanol with sodium thiomethoxide at reflux for 2 h and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was dissolved in water and the precipitate was collected by filtration and recrystallized in methanol to give **62** as a white solid (47%).

Mp > 250°C

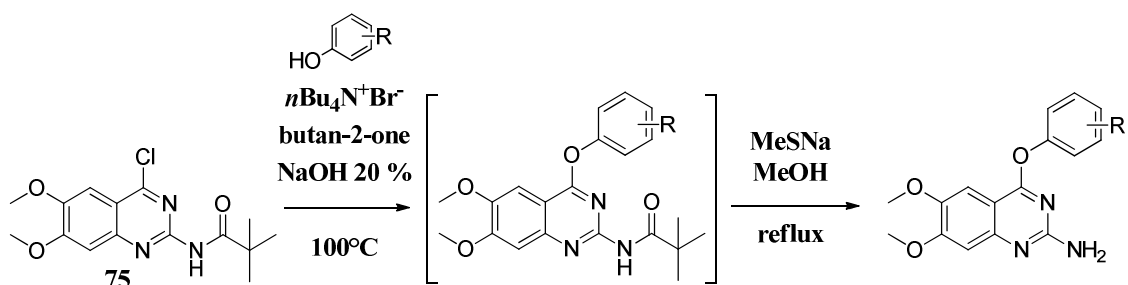
IR (cm⁻¹): 3321 (NH₂), 1792 (C=O)

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 1.22 (t, **3H**, *J* = 7.6 Hz, CH₃), 2.95 (s, **3H**, CH₃), 3.80 (s, **3H**, OCH₃), 3.84 (s, **3H**, OCH₃), 4.12 (q, **2H**, *J* = 7.6 Hz, CH₂), 6.03 (s, **2H**, NH), 6.73 (s, **1H**, ArH), 7.88 (m, **1H**, ArH), 7.68 (s, **1H**, ArH), 8.02 (m, **2H**, 2 ArH), 9.33 (s, **1H**, NH)

LC-MS (APCI⁺): *m/z* calcd for C₂₀H₂₂ClN₅O₄ 432 [(M + H)⁺ for ³⁵Cl] and 434 [(M + H)⁺ for ³⁷Cl]

HRMS (ESI (M+H)⁺ *m/z*) calcd for C₂₀H₂₂ClN₅O₄ 432.1433 found 432.1433

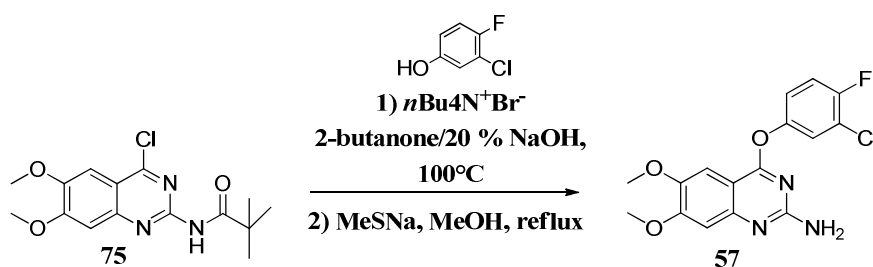
General procedure for 2-amino-4-aryloxy-6,7-dimethoxyquinazolines (57-60)



Protocol: To a stirred solution of chloro derivative **75** (1 eq) and tetrabutylammonium bromide in 10 mL of a mixture of 20% NaOH and 2-butanone (1 : 2) were added phenol derivative (1 eq). After 1 h at room temperature, the reaction was quenched by water, and then the aqueous solution was extracted with EtOAc (3 x 10 mL), washed with a solution of NaOH 1N, and dried over MgSO₄. The solvent was removed under reduced pressure.

The obtained residue was stirred in methanol with sodium thiomethoxide at reflux for 2 h and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was dissolved in water and the precipitate was collected by filtration and recrystallized to give desired compound **57-60**.

2-Amino-4-(3-chloro-4-fluoroaryloxy)-6,7-dimethoxyquinazoline (57)



White solid (41%)

C₁₆H₁₃ClFN₃O₃

MW = 349.74 g.mol⁻¹

Compound **57** was obtained by crystallization from acetonitrile.

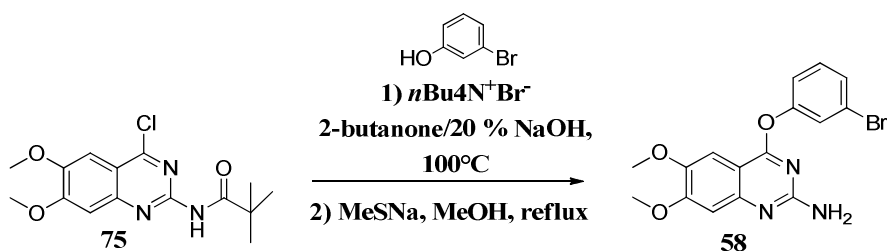
Mp: 247°C

IR (cm⁻¹): 3383 (NH₂)

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 3.82 (s, **3H**, OCH₃), 3.90 (s, **3H**, OCH₃), 6.34 (s, **2H**, NH₂), 6.82 (s, **1H**, ArH), 7.28 (s, **1H**, ArH), 7.38 (m, **1H**, ArH), 7.52 (Dd, **1H**, *J* = 9.1 and 9.1 Hz, ArH), 7.68 (Dd, **1H**, *J* = 2.2 and 5.8 Hz, ArH)

LC-MS (APCI⁺): *m/z* calcd for C₁₆H₁₃ClFN₃O₃ 350 [(M + H)⁺ for ³⁵Cl] and 352 [(M + H)⁺ for ³⁷Cl]

2-Amino-4-(3-bromoaryloxy)-6,7-dimethoxyquinazoline (58)



Beige solid (38%)
 $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{BrN}_3\text{O}_3$
 MW = 376.20 g.mol⁻¹

Compound **58** was obtained by crystallization from ethanol.

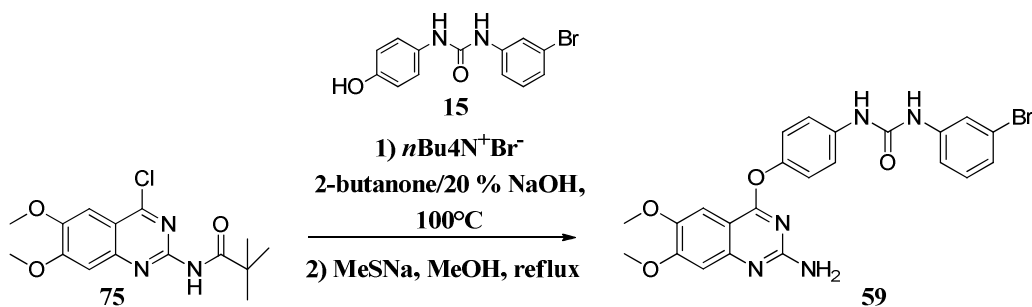
Mp > 250°C

IR (cm⁻¹): 3256 (NH₂)

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 3.85 (s, **3H**, OCH₃), 3.88 (s, **3H**, OCH₃), 6.35 (s, **2H**, NH₂), 6.88 (s, **1H**, ArH), 7.35 (m, **2H**, 2 ArH), 7.63 (s, **1H**, ArH), 8.05 (m, **2H**, 2 ArH)

LC-MS (APCI⁺): *m/z* calcd for C₁₆H₁₄BrN₃O₃ 376 [(M + H)⁺ for ⁷⁹Br] and 378 [(M + H)⁺ for ⁸¹Br]

***N*'**-[4-(2-amino-6,7-dimethoxyquinazolin-4-yloxy)phenyl]urea (**59**)



Beige solid (30%)
 $\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{BrN}_5\text{O}_4$
 MW = 510.34 g.mol⁻¹

Compound **59** was obtained by crystallization from methanol.

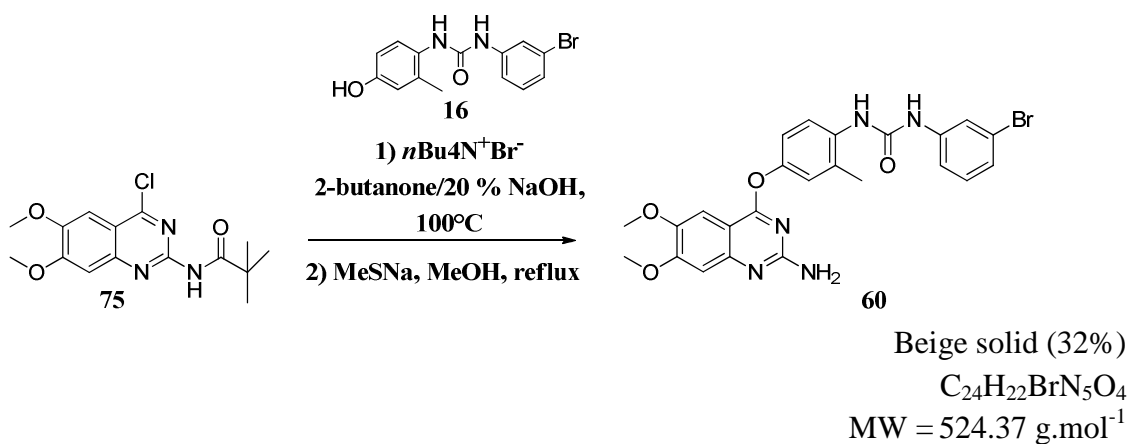
Mp: 183°C

IR (cm⁻¹): 3279 (NH₂), 1635 (C=O)

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 3.82 (s, **3H**, OCH₃), 3.89 (s, **3H**, OCH₃), 6.28 (s, **2H**, NH₂), 6.82 (s, **1H**, ArH), 7.15 (m, **4H**, 4 ArH), 7.25 (m, **2H**, 2 ArH), 7.50 (m, **2H**, 2 ArH), 7.86 (s, **1H**, ArH), 8.81 (s, **1H**, NH), 8.89 (s, **1H**, NH)

LC-MS (APCI⁺): m/z calcd for C₂₃H₂₀BrN₅O₄ 510 [(M + H)⁺ for ⁷⁹Br] and 512 [(M + H)⁺ for ⁸¹Br]

***N*'**-[3-bromophenyl]-
***N*'**-[3-methyl-4-(2-amino-6,7-dimethoxyquinazolin-4-yloxy)phenyl]urea (**60**)



Compound **60** was obtained by crystallization from methanol.

Mp: 197-199°C

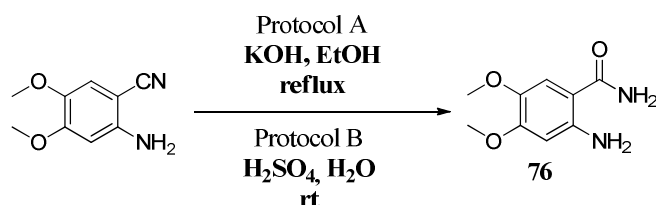
IR (cm⁻¹): 3280 (NH₂), 1632 (C=O)

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 2.28 (s, **3H**, CH₃), 3.85 (s, **3H**, OCH₃), 3.86 (s, **3H**, OCH₃), 6.30 (s, **2H**, NH₂), 7.01-7.16 (m, **2H**, 2 ArH), 7.21-7.32 (m, **2H**, 2 ArH), 7.41 (s, **1H**, ArH), 7.54 (s, **1H**, ArH), 7.81-7.91 (m, **2H**, 2 ArH), 8.10 (s, **1H**, NH), 8.53 (s, **1H**, ArH), 9.24 (s, **1H**, NH)

LC-MS (APCI⁺): m/z calcd for C₂₄H₂₂BrN₅O₄ 524 [(M + H)⁺ for ³⁵Cl] and 526 [(M + H)⁺ for ³⁷Cl]

SYNTHESIS OF 2-AMINOMETHYLQUINAZOLINES

2-Amino-4,5-dimethoxybenzamide (76)



White solid
 C₉H₁₂N₂O₃
 MW = 196.20 g.mol⁻¹

Protocol A: To a stirred solution of 2-amino-4,5-dimethoxybenzonitrile (1 eq) in ethanol was added potassium hydroxide (5 eq). After 16 h at reflux, the solvent was removed under reduced pressure and the crude residue was dissolved in water. The aqueous layer was extracted with EtOAc and dried over MgSO₄. The solvent was removed under reduced pressure and the precipitate was collected by filtration from dichloromethane to give desired compound **76** (27%).

Protocol B: A solution of 2-amino-4,5-dimethoxybenzonitrile (1 eq) in a mixture of concentrated HCl / H₂O (5 : 1) was stirred at room temperature for 16 h. The mixture was neutralized with a 2 N NaOH solution and the obtained precipitate was filtered and washed by water. Then, the residue was dried in vacuo to give desired compound **76** (70%).

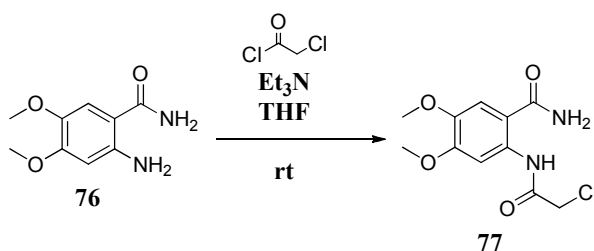
Mp: 138-140°C

IR (cm⁻¹): 3090 (NH₂), 1624 (C=O)

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 3.65 (s, **3H**, OCH₃), 3.70 (s, **3H**, OCH₃), 6.30 (s, **1H**, ArH), 6.45 (s, **2H**, NH₂), 6.80 (s, **1H**, NH), 7.10 (s, **1H**, ArH), 7.50 (s, **1H**, NH)

LC-MS (APCI⁺): *m/z* calcd for C₉H₁₂N₂O₃, 197 [(M + H)⁺]

2-[(2-Chloroacetyl)amino]-4,5-dimethoxybenzamide (77)



White solid (86%)
 C₁₁H₁₃ClN₂O₄
 MW = 272.68 g.mol⁻¹

Protocol: A solution of chloroacetyl chloride (1.2 eq) in THF was added dropwise to a suspension of a 2-amino-4,5-dimethoxybenzamide **76** (1 eq) at 0°C in THF. The resulting mixture was stirred at room temperature for a further 2 h. The solvent was removed under reduced pressure and the precipitate was collected by filtration from H₂O. Then, the residue was dried in vacuo to give desired compound **77** (86%).

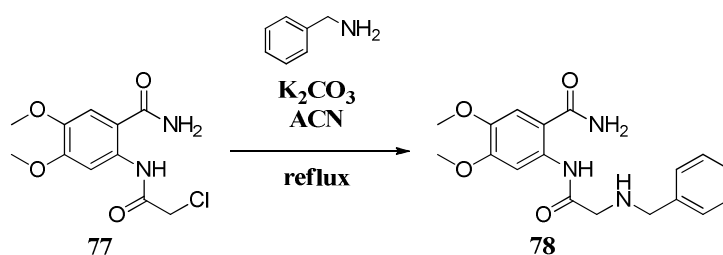
Mp: 208-210°C

IR (cm⁻¹): 3086 (NH₂), 1630 (C=O)

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 3.80 (s, **3H**, OCH₃), 3.85 (s, **3H**, OCH₃), 4.35 (s, **2H**, CH₂), 7.35 (s, **1H**, ArH), 7.60 (s, **1H**, NH), 8.20 (s, **1H**, NH), 8.30 (s, **1H**, ArH), 12.60 (s, **1H**, NH)

LC-MS (APCI⁺): *m/z* calcd for C₁₁H₁₃ClN₂O₄ 273 [(M + H)⁺ for ³⁵Cl] and 275 [(M + H)⁺ for ³⁷Cl]

2-[(2-(Benzylamino)acetyl)amino]-4,5-dimethoxybenzamide (**79**)



Beige solid (97%)

C₁₈H₂₁N₃O₄

MW = 343.38 g.mol⁻¹

Protocol: To a stirred solution of 2-[(2-chloroacetyl)amino]-4,5-dimethoxybenzamide **77** (1 eq) in acetonitrile were added potassium carbonate (1 eq) and bezylamine (1 eq). After 16 h at reflux, the solvent was removed under reduced pressure and the crude residue was dissolved in water. The aqueous layer was extracted with EtOAc and dried over MgSO₄. The solvent was removed under reduced pressure to give desired compound **78** (97%).

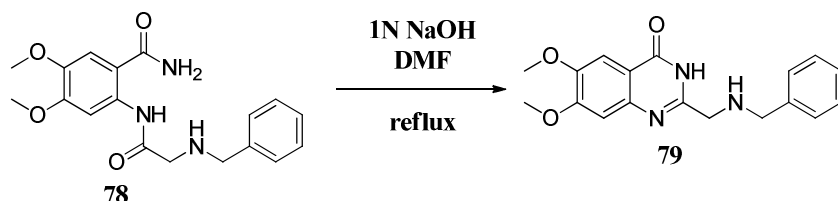
Mp: 143-145°C

IR (cm⁻¹): 3086 (NH₂), 1630 (C=O)

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 3.20 (s, **2H**, CH₂), 3.70 (s, **2H**, CH₂), 3.75 (s, **3H**, OCH₃), 3.80 (s, **3H**, OCH₃), 7.10-7.50 (m, **8H**, 7 ArH + NH), 8.00 (s, **1H**, NH), 8.40 (s, **1H**, NH), 12.40 (s, **1H**, NH)

LC-MS (APCI⁺): *m/z* calcd for C₁₈H₂₁N₃O₄ 344 [(M + H)⁺]

2-[(2-(Benzylamino)methyl)-6,7-dimethoxyquinazolin-4-one (79)



Beige solid (72%)

 $C_{18}H_{19}N_3O_3$ MW = 325.36 g.mol⁻¹

Protocol: A solution of 2-[(2-(benzylamino)acetyl)amino]-4,5-dimethoxybenzamide **79** (1 eq) in a mixture of 1N NaOH and *N,N*-dimethylformamide (5 : 5) was stirred at reflux for 2 h. The reaction was quenched by water, and then the aqueous layer was extracted with EtOAc (3 x 10 mL), washed with a solution of 1N NaOH, and dried over MgSO₄. The solvent was removed under reduced pressure to give desired compound **79**.

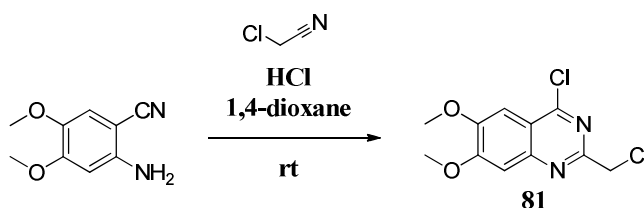
Mp: 150-152°C

IR (cm⁻¹): 1641 (C=O)

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 3.60 (s, **2H**, CH₂), 3.70 (s, **2H**, CH₂), 3.80 (s, **3H**, OCH₃), 3.85 (s, **3H**, OCH₃), 6.40 (s, **1H**, NH), 7.05 (s, **1H**, ArH), 7.15 (s, **1H**, ArH), 7.20-7.30 (m, **5H**, 5 ArH), 7.45 (s, **1H**, NH)

LC-MS (APCI⁺): *m/z* calcd for C₁₈H₂₁N₃O₄ 326 [(M + H)⁺]

2-Chloromethyl-4-chloro-6,7-dimethoxyquinazoline (81)



White solid (17%)

 $C_{11}H_{10}Cl_2N_2O_2$ MW = 273.12 g.mol⁻¹

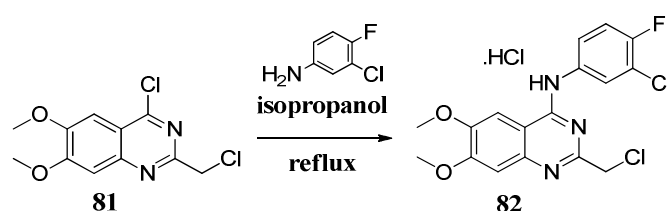
Protocol : To a stirred solution of commercial 2-amino-4,5-dimethoxybenzonitrile (1 eq) in 1,4-dioxane was added 2-chloroacetonitrile (1.3 eq). The mixture was stirred at 0°C and HCl was bubbled on the flask for 6 h. After further 12 h at room temperature, the solvent was removed under reduced pressure and the crude residue was separated by FC (CH₂Cl₂/AcOEt, 9 : 1).

Mp: 150-152°C

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 3.99 (s, **3H**, OCH₃), 4.00 (s, **3H**, OCH₃), 4.87 (s, **2H**, CH₂), 7.41 (s, **1H**, ArH), 7.48 (s, **1H**, ArH)

LC-MS (APCI⁺): *m/z* calcd for C₁₁H₁₀Cl₂N₂O₂ 274 [(M + H)⁺ for ³⁵Cl/³⁵Cl]; 276 [(M + H)⁺ for ³⁵Cl/³⁷Cl] and 278 [(M + H)⁺ for ³⁷Cl/³⁷Cl]

2-(Chloromethyl)-4-(3-chloro-4-fluoroanilino)-6,7-dimethoxyquinazoline hydrochloride (82)



Yellow solid (72%)
C₁₇H₁₄Cl₂FN₃O₂.HCl
MW = 418.68 g.mol⁻¹

Protocol: To a stirred solution of dichloro compound **81** (1 eq) in isopropanol was added 3-chloro-4-fluoroaniline (1.2 eq) and the mixture was stirred at reflux. After 1 h, the precipitate was collected by filtration and washed by isopropanol.

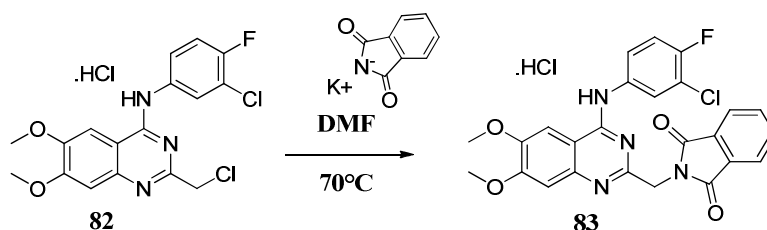
Mp: 180-184°C

IR (cm⁻¹): 3200 (NH⁺)

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 3,91 (s, **3H**, OCH₃), 3,95 (s, **3H**, OCH₃), 4,72 (s, **2H**, CH₂), 6,79 (Dd, **1H**, ArH, *J* = 9.0 and 9.0 Hz), 7,01 (s, **1H**, ArH), 7,44 (m, **1H**, ArH), 7,65 (s, **1H**, ArH), 7,77 (m, **1H**, ArH), 9,27 (s, **1H**, NH⁺)

LC-MS (APCI⁺): *m/z* calcd for C₁₁H₁₀Cl₂N₂O₂ 419 [(M + H)⁺ for ³⁵Cl/³⁵Cl]; 421 [(M + H)⁺ for ³⁵Cl/³⁷Cl] and 423 [(M + H)⁺ for ³⁷Cl/³⁷Cl]

2-(Phtalimidomethyl)-4-(3-chloro-4-fluoroanilino)-6,7-dimethoxyquinazoline hydrochloride (83)



Beige solid (78%)
C₂₅H₁₈ClFN₄O₄.HCl
MW = 529.35 g.mol⁻¹

Protocol: A solution of compound **82** (1 eq) and potassium phthalimide (2 eq) in *N,N*-dimethylformamide was stirred at 70°C for 6 h. The reaction was quenched by water, and the precipitate was filtered and washed by water. The obtained residue was dried in vacuo to give desired compound **83**.

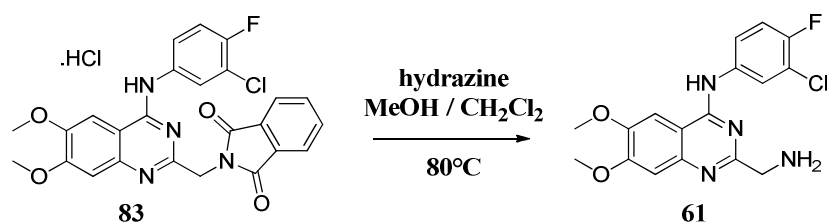
Mp > 250°C

IR (cm⁻¹): 3197 (NH⁺), 1697 (C=O)

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 3,91 (s, **3H**, OCH₃), 3,93 (s, **3H**, OCH₃), 4,85 (s, **2H**, CH₂), 6,89 (Dd, **1H**, ArH, *J* = 9.0 and 9.0 Hz), 7,13 (s, **1H**, ArH), 7,59 (m, **1H**, ArH), 7,77 (m, **1H**, ArH), 7,82 (s, **1H**, ArH), 7,83-7,92 (m, **4H**, 4 ArH), 9,56 (s, **1H**, NH⁺)

LC-MS (APCI⁺): *m/z* calcd for C₁₁H₁₀Cl₂N₂O₂ 493 [(M + H)⁺ for ³⁵Cl] and 495 [(M + H)⁺ for ³⁷Cl]

2-(Aminomethyl)-4-(3-chloro-4-fluoroanilino)-6,7-dimethoxyquinazoline (61)



Brown solid (69%)

C₁₇H₁₆ClFN₄O₄

MW = 362.79 g.mol⁻¹

Protocol: To a stirred solution of compound **83** (1 eq) in a mixture of methanol and dichloromethane (2 : 1) was added hydrazine (5 eq). The mixture was stirred at 80°C for 14 h. The solvent was removed under reduced pressure and the crude residue was separated by FC (CH₂Cl₂/MeOH, 95 : 5). The obtained residue was crystallized by acetonitrile.

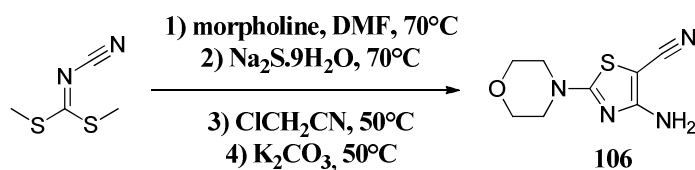
Mp > 250°C

IR (cm⁻¹): 3200 (NH₂)

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 3,93 (s, **3H**, OCH₃), 3,95 (s, **3H**, OCH₃), 4,12 (s, **2H**, CH₂), 7,16 (s, **1H**, ArH), 7,17-8,11 (s, **2H**, NH₂), 7,40 (Dd, **1H**, *J* = 9.0 and 6.0 Hz, ArH), 7,91-7,92 (m, **2H**, 2 ArH), 8,10 (d, **1H**, *J* = 6.0 Hz), 9,80 (s, **1H**, NH)

LC-MS (APCI⁺): *m/z* calcd for C₁₇H₁₆ClFN₄O₄ 363 [(M + H)⁺ for ³⁵Cl] and 365 [(M + H)⁺ for ³⁷Cl]

SYNTHESIS OF THIAZOLOTRIAZINES

4-Amino-2-(4-morpholinyl)-[1,3]-thiazole-5-carbonitrile (**106**)

Orange solid (75%)

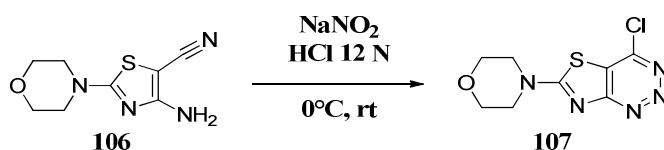
C₈H₁₀N₄OSMW = 210.26 g.mol⁻¹

Protocol: Dimethyl cyanodithioimidocarbonate (1 eq) was dissolved in *N,N*-dimethylformamide. Morpholine (1 eq) was added and the mixture was heated at 70°C for 1 h. Then Na₂S.9H₂O (1 eq) was added and heated for 2 h at 70°C. Chloroacetonitrile (3 eq) was added dropwise at 50°C. The mixture was heated at 50°C for 2 h and the potassium carbonate (1 eq) was added. The reaction was stirred at 50°C for further 1 h. The mixture was poured onto water with good stirring. The precipitate was filtered, washed with water, dried in vacuo and recrystallized in ethanol.

Mp > 233-235°C**IR** (cm⁻¹): 3320 (NH₂), 2201 (CN)

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 3.40 (t, **4H**, *J* = 5.1 Hz, 2 CH₂), 3.68 (t, **4H**, *J* = 5.1 Hz, 2 CH₂), 6.85 (s, **2H**, NH₂)

LC-MS (APCI⁺): *m/z* calcd for C₈H₁₀N₄OS 211 [(M + H)⁺]

4-Chloro-6-(4-morpholinyl)-[1,3]-thiazolo-[4,5-*d*]-[1,2,3]-triazine (**107**)

Orange solid (38%)

C₈H₈N₅OSMW = 257.70 g.mol⁻¹

Protocol: A solution of sodium nitrite (1.4 eq) in H₂O was added over 15 min to a suspension of a 4-amino-2-(4-morpholinyl)-1,3-thiazole-5-carbonitrile **106** (1 eq) at 0°C in concentrated HCl. The resulting mixture was stirred at 0°C for a further 40 min and then allowed to stand at room temperature overnight. The mixture was poured onto water with good stirring. The

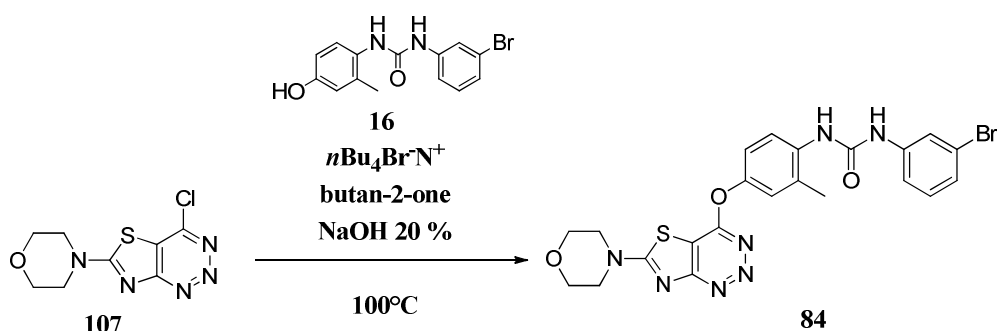
precipitate was filtered, washed with water and dried in vacuo. The residue was purified in acetonitrile and filtered while hot.

Mp > 250°C

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 3.50 (t, **4H**, *J* = 5.0 Hz, 2 CH₂), 3.70 (t, **4H**, *J* = 5.0 Hz, 2 CH₂)

LC-MS (APCI⁺): *m/z* calcd for C₈H₈N₅OS 258 [(M + H)⁺ for ³⁵Cl] and 260 [(M + H)⁺ for ³⁷Cl]

***N*-(3-Bromophenyl)-*N'*-{3-methyl-4-[(6-(4-morpholinyl)-[1,3]-thiazolo-[4,5-*d*]-[1,2,3]-triazin-4-yl)oxy]-phenyl}urea (84)**



Brown solid (3%)

C₂₂H₂₀BrN₇O₃S

MW = 542.41 g.mol⁻¹

Protocol: To a stirred solution of chloro derivative **107** (1 eq) and tetrabutylammonium bromide in of a mixture of 20% NaOH and 2-butanone (1 : 2) were added phenol **16** (1 eq). After 30 min at room temperature, the reaction was quenched by water, and then the aqueous solution was extracted with EtOAc (3 x 10 mL), washed with a solution of NaOH 1N, and dried over MgSO₄. The solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified in methanol and filtered while hot.

Mp > 250°C

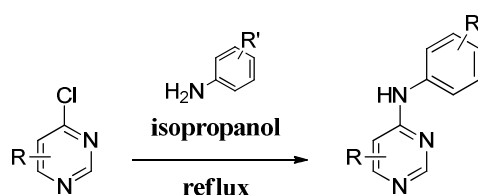
IR (cm⁻¹): 1638 (C=O)

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 2.20 (s, **3H**, CH₃), 3.47 (m, **4H**, 2 CH₂), 3.62 (m, **4H**, 2 CH₂), 6.53 (Dd, **1H**, *J* = 2.6 Hz and *J* = 9.1 Hz, ArH), 6.62 (d, **1H**, *J* = 2.6 Hz, ArH), 7.10–7.30 (m, **4H**, ArH), 7.81 (s, **1H**, NH), 8.05 (m, **1H**, ArH), 8.58 (s, **1H**, NH)

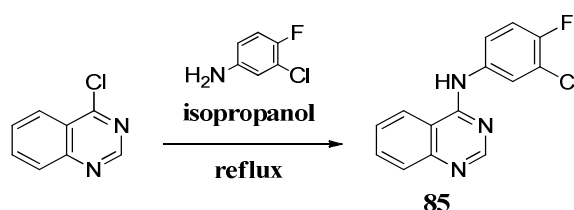
LC-MS (APCI⁺): *m/z* calcd for C₂₂H₂₀BrN₇O₃S 542 [(M + H)⁺ for ⁷⁹Br] and 544 [(M + H)⁺ for ⁸¹Br]

SYNTHESIS OF QUINAZOLINES AND THIENOPYRIMIDINES

General procedure for 4-anilino-quinazolines/thienopyrimidines



Protocol: To a stirred solution of commercial chloro derivative (1 eq) in isopropanol was added aniline (1.2 eq). After 2 h at reflux, the precipitate was filtered, washed with isopropanol. The obtained residue was dissolved in a 10% K_2CO_3 solution and the mixture was stirred 30 min at room temperature. Then, the aqueous layer was extracted with EtOAc and the organic layers were dried over $MgSO_4$. The solvent was removed under reduced pressure.

4-(3-Chloro-4-fluoroanilino)-quinazoline (**85**)

White solid (99%)
 $C_{14}H_9ClFN_3$
 MW = 273.69 g.mol⁻¹

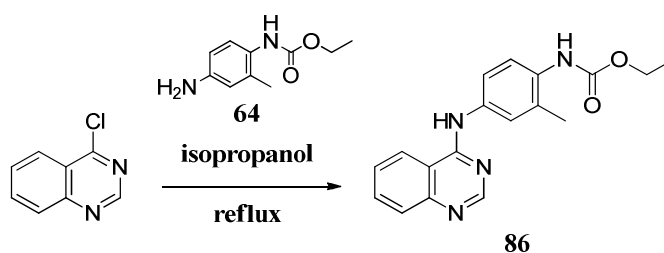
Compound **85** was obtained by crystallization from acetonitrile.

Mp: 216-218°C

IR (cm⁻¹): 3122 (NH)

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 7.35 (DD, **1H**, $J = 9.0$ and 9.0 Hz, ArH), 7.49-7.54 (m, **1H**, ArH), 7.64-7.78 (m, **3H**, 3 ArH), 8.11 (Dd, **1H**, $J = 7.0$ and 2.5 Hz, ArH), 8.42-8.49 (m, **2H**, 2 ArH), 10.44 (s, **1H**, NH)

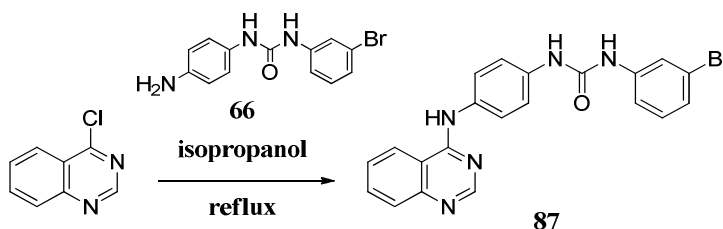
LC-MS (APCI⁺): m/z calcd for $C_{14}H_9ClFN_3$ 274 [(M + H)⁺ for ³⁵Cl] and 276 [(M + H)⁺ for ³⁷Cl]

***N*-[2-Methyl-4-(quinazolin-4-ylamino)phenyl]-carbamic acid ethyl ester (86)**

White solid (82%)

 $C_{18}H_{18}N_4O_2$ MW = 322.36 g.mol⁻¹Compound **86** was obtained by crystallization from ethanol.**Mp:** 210-212°C**IR** (cm⁻¹): 3484 (NH), 1706 (C=O)

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 1.22 (t, **3H**, $J = 7.0$ Hz, CH₃), 2.19 (s, **3H**, CH₃), 4.09 (q, **2H**, $J = 7.0$ Hz, CH₂), 7.36-7.33 (m, **1H**, ArH), 7.54-7.63 (m, **3H**, 3 ArH), 7.70-7.76 (m, **1H**, ArH), 7.77-7.84 (m, **1H**, ArH), 8.48-8.55 (m, **2H**, 2 ArH), 8.74 (s, **1H**, NH), 9.62 (s, **1H**, NH)

LC-MS (APCI⁺): m/z calcd for C₁₈H₁₈N₄O₂ 323 [(M + H)⁺]***N*-(3-Bromophenyl)-*N'*-[4-(quinazolin-4-ylamino)phenyl]urea (87)**

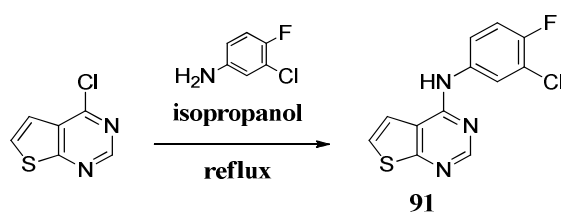
White solid (99%)

 $C_{21}H_{16}BrN_5O$ MW = 434.29 g.mol⁻¹Compound **87** was obtained by crystallization from methanol.**Mp:** 232-234°C**IR** (cm⁻¹): 3171 (NH), 1682 (C=O)

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 7.10-7.18 (m, **1H**, ArH), 7.18-7.39 (m, **2H**, 2 ArH), 7.45-7.56 (m, **2H**, 2 ArH), 7.60-7.79 (m, **3H**, 3 ArH), 7.79-8.00 (m, **3H**, 3 ArH), 8.60-8.72 (m, **2H**, 2 ArH), 9.24 (s, **1H**, NH), 9.38 (s, **1H**, NH), 10.44 (s, **1H**, NH)

LC-MS (APCI⁺): m/z calcd for C₂₁H₁₆BrN₅O 434 [(M + H)⁺ for ⁷⁹Br] and 436 [(M + H)⁺ for ⁸¹Br]

4-(3-Chloro-4-fluoroanilino)-thieno[2,3-*d*]pyrimidine (91)



White solid (55%)

 $C_{12}H_7ClFN_3S$ MW = 279.72 g.mol⁻¹Compound **91** was obtained by crystallization from acetonitrile.

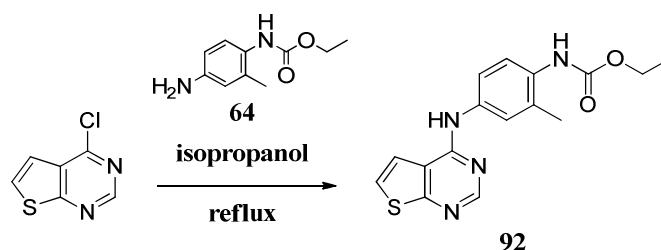
Mp: 228-229°C

IR (cm⁻¹): 3348 (NH)

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 7.44 (DD, **1H**, *J* = 9.0 and 9.0 Hz, ArH), 7.75 (D, **1H**, *J* = 6.0 Hz, ArH), 7.73-7.82 (m, **1H**, ArH), 7.86 (D, **1H**, *J* = 6.0 Hz, ArH), 8.20 (Dd, **1H**, *J* = 6.7 and 2.4 Hz, ArH), 8.55 (s, **1H**, ArH), 9.79 (s, **1H**, NH)

LC-MS (APCI⁺): *m/z* calcd for C₁₂H₇ClFN₃S 280 [(M + H)⁺ for ³⁵Cl] and 282 [(M + H)⁺ for ³⁷Cl]

N-[2-Methyl-4-(thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-ylamino)phenyl]-carbamic acid ethyl ester (92)



White solid (74%)

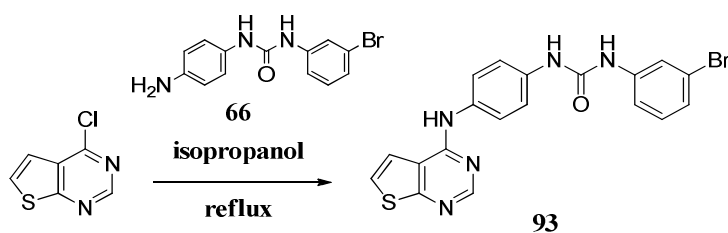
 $C_{16}H_{16}N_4O_2S$ MW = 328.39 g.mol⁻¹Compound **92** was obtained by crystallization from ethanol.

Mp: 224-226°C

IR (cm⁻¹): 3250 (NH), 1681 (C=O)

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 1.23 (t, **3H**, *J* = 7.0 Hz, CH₃), 2.20 (s, **3H**, CH₃), 4.10 (q, **2H**, *J* = 7.1 Hz, CH₂), 7.31(m, **1H**, ArH), 7.54-7.63 (m, **2H**, 2 ArH), 7.74 (D, **1H**, *J* = 5.7 Hz, ArH), 7.89 (D, **1H**, *J* = 5.7 Hz, ArH), 8.51 (s, **1H**, ArH), 8.79 (s, **1H**, NH), 8.83 (s, **1H**, NH)

LC-MS (APCI⁺): *m/z* calcd for C₁₆H₁₆N₄O₂S 329 [(M + H)⁺]

***N*-(3-Bromophenyl)-*N'*-[4-(thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-ylamino)phenyl]urea (93)**

White solid (48%)

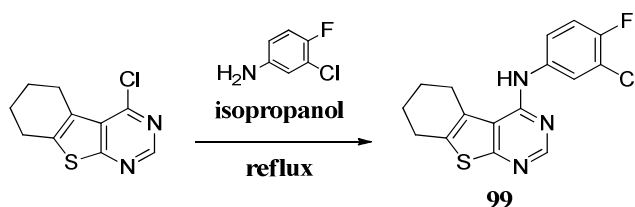
 $C_{19}H_{14}BrN_5OS$ MW = 440.32 g.mol⁻¹Compound **93** was obtained by crystallization from methanol.

Mp: 240-242°C

IR (cm⁻¹): 3251 (NH), 1671 (C=O)

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 7.10-7.17 (m, **1H**, ArH), 7.17-7.38 (m, **2H**, 2 ArH), 7.48 (D, **2H**, J = 8.8 Hz, 2 ArH), 7.64-7.72 (m, **2H**, 2 ArH), 7.72-7.79 (m, **1H**, ArH), 7.83-7.92 (m, **2H**, 2 ArH), 8.51 (s, **1H**, ArH), 8.99 (s, **1H**, NH), 9.11 (s, **1H**, NH), 9.89 (s, **1H**, NH)

LC-MS (APCI⁺): *m/z* calcd for C₁₉H₁₄BrN₅OS 440 [(M + H)⁺ for ⁷⁹Br] and 442 [(M + H)⁺ for ⁸¹Br]

4-(3-Chloro-4-fluoroanilino)-5,6,7,8-tetrahydrobenzo[4,5]thieno[2,3-*d*]pyrimidine (99)

White solid (33%)

 $C_{16}H_{13}ClFN_3S$ MW = 333.81 g.mol⁻¹Compound **99** was obtained by crystallization from acetonitrile.

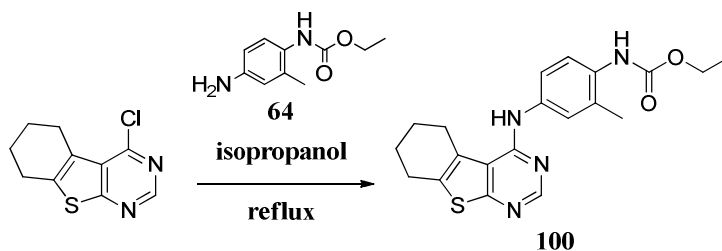
Mp: 128-130°C

IR (cm⁻¹): 3457 (NH)

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 1.84 (m, **4H**, 2 CH₂), 2.83 (m, **2H**, 2 CH₂), 3.11 (m, **2H**, CH₂), 7.40 (DD, **1H**, J = 9.1 and 9.1 Hz, ArH), 7.60-7.67 (m, **1H**, ArH), 7.92 (Dd, **1H**, J = 6.9 and 2.5 Hz, ArH), 8.23 (s, **1H**, ArH), 8.41 (s, **1H**, NH)

LC-MS (APCI⁺): *m/z* calcd for C₁₆H₁₃ClFN₃S 334[(M + H)⁺ for ³⁵Cl] and 336 [(M + H)⁺ for ³⁷Cl]

***N*-[2-Methyl-4-(5,6,7,8-tetrahydrobenzo[4,5]thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-ylamino)phenyl]-carbamic acid ethyl ester (**100**)**



White solid (18%)

$C_{20}H_{22}N_4O_2S$

MW = 382.48 g.mol⁻¹

Compound **100** was obtained by crystallization from ethanol.

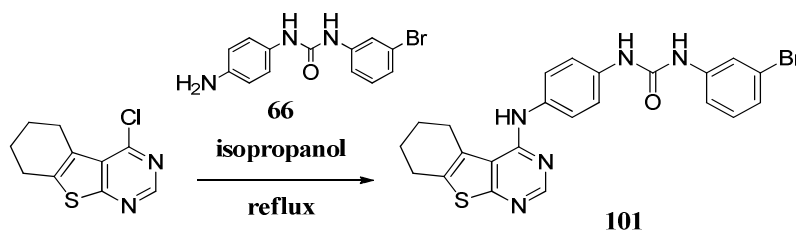
Mp: 184-185°C

IR (cm⁻¹): 3237 (NH), 1681 (C=O)

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 1.24 (t, **3H**, *J* = 7.7 Hz, CH₃), 1.87 (m, **4H**, 2 CH₂), 2.22 (s, **3H**, CH₃), 2.81 (m, **2H**, CH₂), 3.12 (m, **2H**, CH₂), 4.10 (q, **2H**, *J* = 7.7 Hz, CH₂), 7.31-7.50 (m, **3H**, 3 ArH), 8.38 (s, **1H**, NH), 8.41 (s, **1H**, ArH), 8.80 (s, **1H**, NH)

LC-MS (APCI⁺): *m/z* calcd for C₂₀H₂₂N₄O₂S 383 [(M + H)⁺]

***N*-(3-Bromophenyl)-*N'*-[4-(5,6,7,8-tetrahydrobenzo[4,5]thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-ylamino)phenyl]urea (**101**)**



White solid (65%)

$C_{23}H_{20}BrN_5OS$

MW = 494.41 g.mol⁻¹

Compound **101** was obtained by crystallization from methanol.

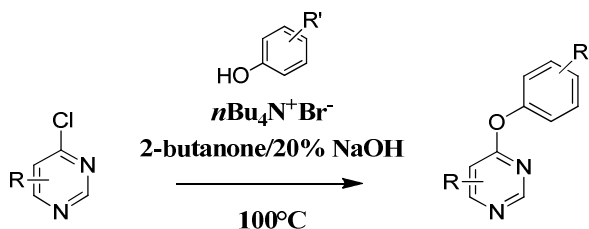
Mp: 241-243°C

IR (cm⁻¹): 3282 (NH), 1633 (C=O)

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 1.85 (m, **4H**, 2 CH₂), 2.82 (m, **4H**, 2 CH₂), 3.13 (m, **2H**, CH₂), 7.14 (m, **1H**, ArH), 7.23 (DD, **1H**, *J* = 7.9 and 7.9 Hz, ArH), 7.30 (m, **1H**, ArH), 7.43 (d, **2H**, *J* = 8.9 Hz, ArH), 7.54 (d, **2H**, *J* = 8.9 Hz, ArH), 7.43 (dd, **1H**, *J* = 1.5 and 1.5 Hz, ArH), 8.03 (s, **1H**, NH), 8.32 (s, **1H**, ArH), 8.71 (s, **1H**, NH), 8.83 (s, **1H**, NH)

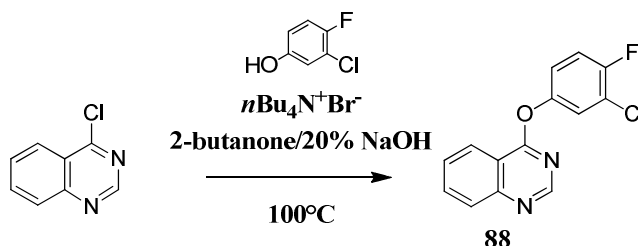
LC-MS (APCI⁺): m/z calcd for C₂₃H₂₀BrN₅OS 494 [(M + H)⁺ for ⁷⁹Br] and 496 [(M + H)⁺ for ⁸¹Br]

**General procedure for 4-aryloxy-quinnazolines/thienopyrimidines
substituted by halogen or urea**



Protocol: To a stirred solution of commercial chloro derivative (1 eq) and tetrabutylammonium bromide in 10 mL of a mixture of 20% NaOH and 2-butanone (1 : 2) were added phenol (1 eq). After 1 h at room temperature, the reaction was quenched by water, and then the aqueous solution was extracted with EtOAc (3 x 10 mL), washed with a solution of NaOH 1N, and dried over MgSO₄. The solvent was removed under reduced pressure.

4-(3-Chloro-4-fluoroaryloxy)-quinazoline (88)



White solid (4%)
C₁₄H₈ClFN₂O
MW = 274.68 g.mol⁻¹

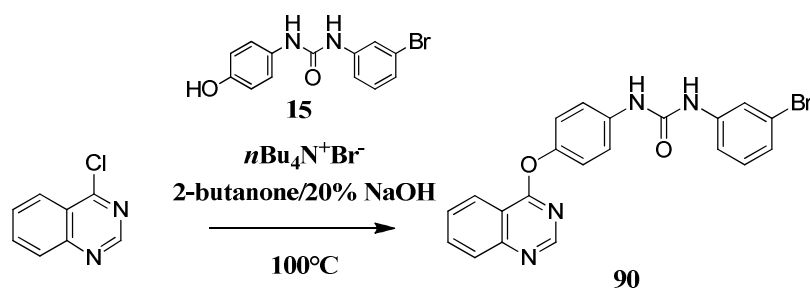
Compound **88** was purified in heptane and filtered while hot.

Mp: 122-124°C

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 7.41-7.48 (m, **1H**, ArH), 7.57 (DD, **1H**, $J = 9.0$ and 9.0 Hz, ArH), 7.75-7.84 (m, **2H**, ArH), 7.98-8.10 (m, **2H**, 2 ArH), 8.34-8.40 (m, **1H**, ArH), 8.65 (s, **1H**, ArH)

LC-MS (APCI⁺): m/z calcd for C₁₄H₈ClFN₂O 275 [(M + H)⁺ for ³⁵Cl] and 277 [(M + H)⁺ for ³⁷Cl]

***N*-(3-Bromophenyl)-*N'*-{4-[(quinazolin-4-yl)oxy]-phenyl}urea (90)**



White solid (12%)

$C_{21}H_{15}BrN_4O_2$

MW = 435.27 g.mol⁻¹

Compound **90** was purified in acetonitrile and filtered while hot.

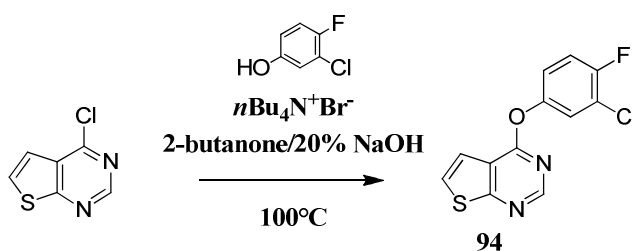
Mp: 248-250°C

IR (cm⁻¹): 3266 (NH), 1645 (C=O)

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 7.12-7.18 (m, **1H**, ArH), 7.21-7.37 (m, **4H**, 4 ArH), 7.55 (D, **2H**, *J* = 8.9 Hz, ArH), 7.73-7.83 (m, **1H**, ArH), 7.84-7.87 (m, **1H**, ArH), 7.98-8.08 (m, **2H**, 2 ArH), 8.34-8.40 (m, **1H**, ArH), 8.71 (s, **1H**, ArH), 8.85 (s, **1H**, NH), 8.91 (s, **1H**, NH)

LC-MS (APCI⁺): *m/z* calcd for $C_{21}H_{15}BrN_4O_2$ 435 [(M + H)⁺ for ⁷⁹Br] and 437 [(M + H)⁺ for ⁸¹Br]

4-(3-Chloro-4-fluoroaryloxy)-thieno[2,3-*d*]pyrimidine (94)



White solid (40%)

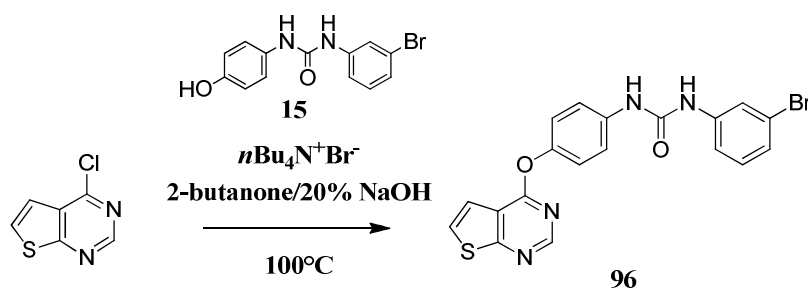
$C_{12}H_6ClFN_2OS$

MW = 280.71 g.mol⁻¹

Compound **94** was obtained by crystallization from acetonitrile.

Mp: 128-130°C

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 7.37-7.44 (m, **1H**, ArH), 7.55 (DD, **1H**, *J* = 9.0 and 9.0 Hz, ArH), 7.66 (d, **1H**, *J* = 6.0 Hz, ArH), 7.73 (Dd, **1H**, *J* = 6.3 and 3.0 Hz), 7.99 (d, **1H**, *J* = 6.0 Hz, ArH), 8.65 (s, **1H**, ArH)

***N*-(3-Bromophenyl)-*N'*-{4-[(thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)oxy]-phenyl}urea (96)**

White solid (36%)
 $C_{19}H_{13}BrN_4O_2S$
 MW = 441.30 g.mol⁻¹

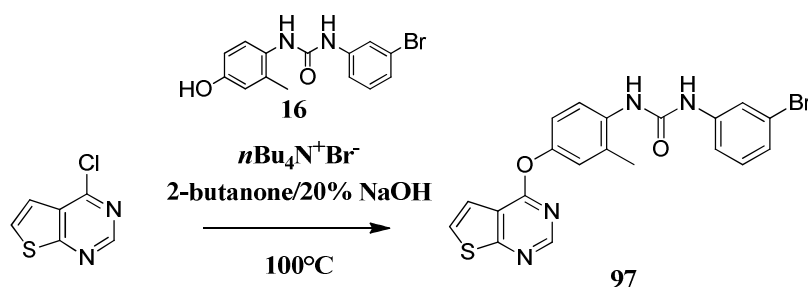
Compound **96** was purified in acetonitrile and filtered while hot.

Mp: 210-212°C

IR (cm⁻¹): 3280 (NH), 1629 (C=O)

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 7.11-7.17 (m, **1H**, ArH), 7.19-7.28 (m, **1H**, 1 ArH), 7.22 (D, **2H**, *J* = 8.9 Hz, ArH), 7.31-7.37 (m, **1H**, ArH), 7.57 (D, **2H**, *J* = 8.9 Hz, ArH), 7.65 (D, **1H**, *J* = 5.9 Hz, ArH), 7.87 (m, **1H**, ArH), 7.96 (D, **1H**, *J* = 5.9 Hz, ArH), 8.61 (s, **1H**, ArH)

LC-MS (APCI⁺): *m/z* calcd for $C_{19}H_{13}BrN_4O_2S$ 441 [(M + H)⁺ for ⁷⁹Br] and 443 [(M + H)⁺ for ⁸¹Br]

***N*-(3-Bromophenyl)-*N'*-{3-methyl-4-[(thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)oxy]-phenyl}urea (97)**

White solid (57%)
 $C_{20}H_{15}BrN_4O_2S$
 MW = 455.33 g.mol⁻¹

Compound **97** was purified in methanol and filtered while hot.

Mp: 211-213°C

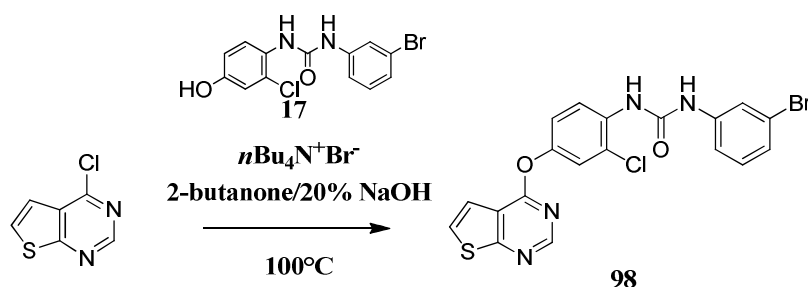
IR (cm⁻¹): 3280 (NH), 1630 (C=O)

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 2.07 (s, **3H**, CH₃), 7.10 (m, **1H**, ArH), 7.20-7.28 (m, **1H**, 1 ArH), 7.25 (m, **2H**, 2 ArH), 7.32-7.38 (m, **1H**, ArH), 7.60 (m, **1H**, ArH), 7.71 (D, **1H**, *J* = 5.8

Hz, ArH), 7.90 (m, **1H**, ArH), 7.95 (D, **1H**, $J = 5.8$ Hz, ArH), 8.65 (s, **1H**, ArH), 8.79 (s, **1H**, NH), 9.20 (s, **1H**, NH)

LC-MS (APCI⁺): m/z calcd for C₂₀H₁₅BrN₄O₂S 455 [(M + H)⁺ for ⁷⁹Br] and 457 [(M + H)⁺ for ⁸¹Br]

***N*-(3-Bromophenyl)-*N'*-{3-chloro-4-[(thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)oxy]-phenyl}urea (**98**)**



White solid (11%)
C₁₉H₁₂BrClN₄O₂S
MW = 475.75 g.mol⁻¹

Compound **98** was purified in acetonitrile and filtered while hot.

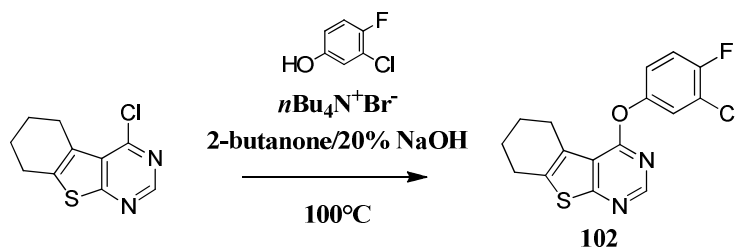
Mp: 227-229°C

IR (cm⁻¹): 3297 (NH), 1648 (C=O)

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 7.15-7.22 (m, **1H**, ArH), 7.22-7.27 (m, **2H**, 2 ArH), 7.31 (Dd, **1H**, $J = 9.0$ and 2.5 Hz, ArH), 7.57 (d, **1H**, $J = 2.5$ Hz, ArH), 7.67 (D, **1H**, $J = 5.9$ Hz, ArH), 7.86-7.93 (m, **1H**, ArH), 7.98 (D, **1H**, $J = 5.9$ Hz, ArH), 8.16 (D, **1H**, $J = 9.0$ Hz, ArH), 8.65 (s, **1H**, ArH)

LC-MS (APCI⁺): m/z calcd for C₁₉H₁₂BrClN₄O₂S 474 [(M+H)⁺ for ³⁵Cl/⁷⁹Br], 476 [(M+H)⁺ for ³⁵Cl/⁸¹Br], 476 [(M+H)⁺ for ³⁷Cl/⁷⁹Br], 478 [(M+H)⁺ for ³⁷Cl/⁸¹Br]

4-(3-Chloro-4-fluoroaryloxy)-5,6,7,8-tetrahydrobenzo[4,5]-thieno[2,3-*d*]pyrimidine (102**)**



White solid (29%)
C₁₆H₁₂ClFN₂OS
MW = 334.80 g.mol⁻¹

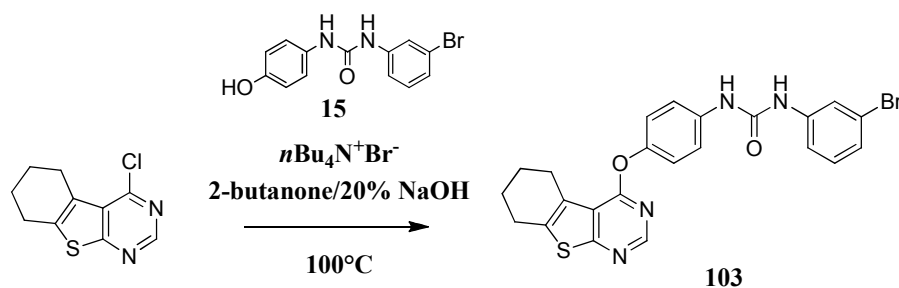
Compound **102** was obtained by crystallization from cyclohexane.

Mp: 145-147°C

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 1.84 (m, **4H**, 2 CH₂), 2.91 (m, **2H**, CH₂), 3.04 (m, **2H**, CH₂), 7.35-7.40 (m, **1H**, ArH), 7.53 (DD, **1H**, *J* = 9.0 and 9.0 Hz, ArH), 7.69 (Dd, **1H**, *J* = 6.1 and 2.9 Hz), 8.51 (s, **1H**, ArH)

LC-MS (APCI⁺): *m/z* calcd for C₁₆H₁₂ClFN₂OS 335 [(M + H)⁺ for ³⁵Cl] and 337 [(M + H)⁺ for ³⁷Cl]

***N*-(3-Bromophenyl)-*N'*-{4-[(5,6,7,8-tetrahydrobenzo[4,5]-thieno[2,3-*d*]-pyrimidin-4-yl)oxy]-phenyl}urea (**103**)**



White solid (69%)

C₂₃H₁₉BrN₄O₂S

MW = 495.39 g.mol⁻¹

Compound **103** was purified in acetonitrile and filtered while hot.

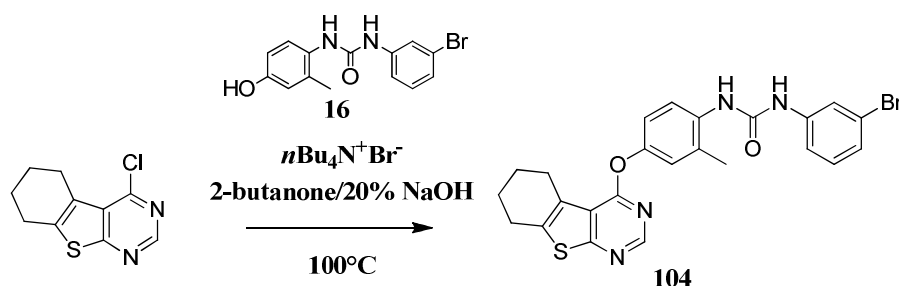
Mp: 231-233°C

IR (cm⁻¹): 3269 (NH), 1649 (C=O)

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 1.83 (m, **4H**, 2 CH₂), 2.84 (m, **2H**, CH₂), 3.00 (m, **2H**, CH₂), 7.10-7.28 (m, **4H**, 4 ArH), 7.30-7.39 (m, **1H**, ArH), 7.53 (D, **2H**, *J* = 8.8 Hz, ArH), 7.83-7.90 (m, **1H**, ArH), 8.47 (s, **1H**, ArH), 9.30 (s, **1H**, NH), 9.31 (s, **1H**, NH)

LC-MS (APCI⁺): *m/z* calcd for C₂₃H₁₉BrN₄O₂S 495 [(M + H)⁺ for ⁷⁹Br] and 497 [(M + H)⁺ for ⁸¹Br]

***N*-(3-Bromophenyl)-*N'*-{3-methyl-4-[(5,6,7,8-tetrahydrobenzo[4,5]-thieno[2,3-*d*]-pyrimidin-4-yl)oxy]-phenyl}urea (104)**



White solid (64%)

$C_{24}H_{21}BrN_4O_2S$

MW = 509.42 g.mol⁻¹

Compound **104** was purified in methanol and filtered while hot.

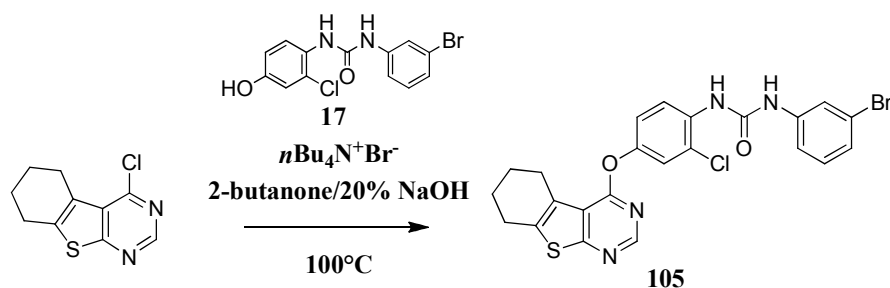
Mp: 208-210°C

IR (cm⁻¹): 3278 (NH), 1641 (C=O)

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 1.85 (m, **4H**, 2 CH₂), 2.80 (m, **2H**, CH₂), 2.07 (s, **3H**, CH₃), 2.99 (m, **2H**, CH₂), 7.11 (m, **1H**, ArH), 7.14 (m, **1H**, 1 ArH), 7.23 (m, **2H**, 2 ArH), 7.35-7.46 (m, **1H**, ArH), 7.62 (m, **1H**, ArH), 7.91 (m, **1H**, ArH), 8.54 (s, **1H**, ArH), 8.80 (s, **1H**, NH), 9.12 (s, **1H**, NH)

LC-MS (APCI⁺): *m/z* calcd for C₂₄H₂₁BrN₄O₂S 509 [(M + H)⁺ for ⁷⁹Br] and 511 [(M + H)⁺ for ⁸¹Br]

***N*-(3-Bromophenyl)-*N'*-{3-chloro-4-[(5,6,7,8-tetrahydrobenzo[4,5]-thieno[2,3-*d*]-pyrimidin-4-yl)oxy]-phenyl}urea (105)**



White solid (13%)

$C_{23}H_{18}BrClN_4O_2S$

MW = 529.84 g.mol⁻¹

Compound **105** was purified in methanol and filtered while hot.

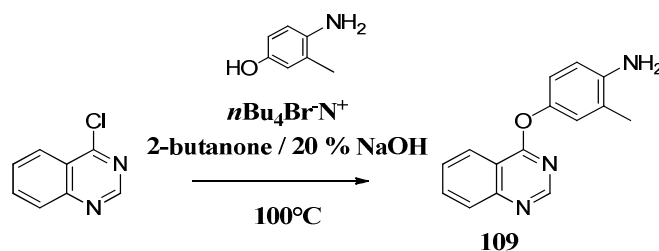
Mp: 239-241°C

IR (cm⁻¹): 3289 (NH), 1617 (C=O)

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 1.85 (m, **4H**, 4 ArH), 2.86 (m, **2H**, 2 ArH), 3.00 (m, **2H**, 2 ArH), 7.10-7.38 (m, **4H**, 4 ArH), 7.45-7.62 (m, **1H**, ArH), 7.80-7.97 (m, **1H**, ArH), 8.09-8.12 (m, **1H**, ArH), 8.42 (s, **1H**, NH), 8.52 (s, **1H**, ArH), 9.56 (s, **1H**, NH)

LC-MS (APCI $^+$): m/z calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{18}\text{BrClN}_4\text{O}_2\text{S}$ 528 [(M+H) $^+$ for $^{35}\text{Cl}/^{79}\text{Br}$], 530 [(M+H) $^+$ for $^{35}\text{Cl}/^{81}\text{Br}$], 530 [(M+H) $^+$ for $^{37}\text{Cl}/^{79}\text{Br}$], 532 [(M+H) $^+$ for $^{37}\text{Cl}/^{81}\text{Br}$]

4-(3-Methyl-4-aminoaryloxy)-quinazoline (109)



White solid (69%)

$\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}$

MW = 251.28 g.mol $^{-1}$

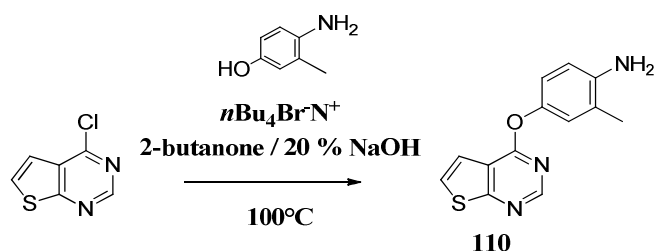
Mp: 160-162°C

IR (cm $^{-1}$): 3224 (NH $_2$)

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 2.08 (s, **3H**, CH $_3$), 4.85 (s, **2H**, NH $_2$), 6.67 (d, **1H**, $J = 8.5$ Hz, ArH), 6.83 (Dd, **1H**, $J = 8.5$ and 2.6 Hz, ArH), 6.88 (d, **1H**, $J = 2.6$ Hz, ArH), 7.72-7.78 (m, **1H**, ArH), 7.94-8.05 (m, **2H**, 2 ArH), 8.30-8.36 (m, **1H**, ArH), 8.68 (s, **1H**, ArH)

LC-MS (APCI $^+$): m/z calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}$ 252 [(M + H) $^+$]

4-(3-Methyl-4-aminoaryloxy)-thieno[2,3-*d*]pyrimidine (110)



White solid (66%)

$\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{OS}$

MW = 257.31 g.mol $^{-1}$

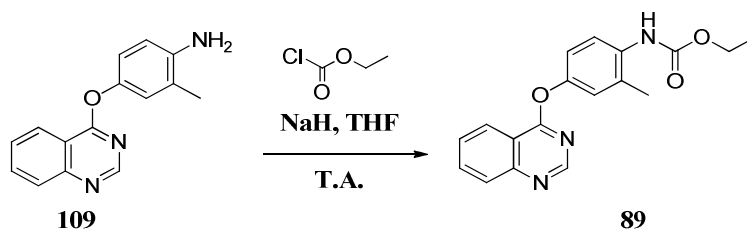
Mp: 161-163°C

IR (cm $^{-1}$): 3349 (NH $_2$)

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 2.06 (s, 3H, CH₃), 4.84 (s, 2H, NH₂), 6.64 (d, 1H, J = 8.4 Hz, ArH), 6.80 (Dd, 1H, J = 8.4 and 2.0 Hz, ArH), 6.84 (d, 1H, J = 2.0 Hz, ArH), 7.57 (d, 1H, J = 5.9 Hz, ArH), 7.91 (d, 1H, J = 5.9 Hz, ArH), 8.57 (s, 1H, ArH)

LC-MS (APCI⁺): m/z calcd for C₁₃H₁₁N₃OS 258 [(M + H)⁺]

***N*-[2-Methyl-4-(quinazolin-4-yloxy)phenyl]-carbamic acid ethyl ester (89)**



White solid (31%)

C₁₈H₁₇N₃O₃

MW = 323.35 g.mol⁻¹

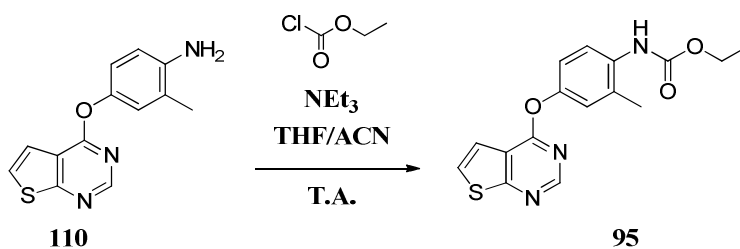
Protocol: To a stirred solution of compound **109** (1 eq) in THF in inert atmosphere, was added sodium hydride (1.4 eq) at 0°C. The resulting mixture was stirred 30 min and ethyl chloroformate (1.2 eq) was added. The mixture was stirred at room temperature for 3 h. The reaction was quenched by water, and then the aqueous solution was extracted with EtOAc, washed with brine, and dried over MgSO₄. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by crystallization from acetonitrile.

Mp: 198-200°C

IR (cm⁻¹): 3171 (NH), 1713 (C=O)

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 1.25 (t, 3H, J = 6.0 Hz, CH₃), 2.23 (s, 3H, CH₃), 4.12 (q, 2H, J = 6.0 Hz, CH₂), 7.12 (Dd, 1H, J = 8.7 and 2.7 Hz, ArH), 7.18 (d, 1H, J = 2.7 Hz, ArH), 7.42 (D, 1H, J = 8.7 Hz, ArH), 7.75-7.84 (m, 1H, ArH), 7.97-8.07 (m, 2H, 2 ArH), 8.34-8.40 (m, 1H, ArH), 8.72 (s, 1H, ArH), 8.89 (s, 1H, NH)

LC-MS (APCI⁺): m/z calcd for C₁₈H₁₇N₃O₃ 324 [(M + H)⁺]

***N*-[2-Methyl-4-(thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-yloxy)phenyl]-carbamic acid ethyl ester (95)**

White solid (29%)

 $C_{16}H_{15}N_3O_3S$ MW = 329.37 g.mol⁻¹

Protocol: To a stirred solution of compound **110** (1 eq) in a mixture of THF and acetonitrile (5 : 5), were added triethylamine (3 eq) and ethyl chloroformate (1.2 eq). The mixture was stirred at room temperature for 24 h at inert atmosphere. The solvent was removed under reduced pressure and the crude residue was purified by FC (CH₂Cl₂/AcOEt, 7 : 3).

Mp: 207-209°C**IR** (cm⁻¹): 3219 (NH), 1711 (C=O)

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 1.25 (t, **3H**, *J* = 6.0 Hz, CH₃), 2.22 (s, **3H**, CH₃), 4.12 (q, **2H**, *J* = 6.0 Hz, CH₂), 7.08 (Dd, **1H**, *J* = 8.6 and 2.5 Hz, ArH), 7.14 (d, **1H**, *J* = 2.5 Hz, ArH), 7.39 (D, **1H**, *J* = 8.6 Hz, ArH), 7.65 (d, **1H**, *J* = 5.9 Hz, ArH), 7.96 (d, **1H**, *J* = 5.9 Hz, ArH), 8.61 (s, **1H**, ArH), 8.88 (s, **1H**, NH)

LC-MS (APCI⁺): *m/z* calcd for C₁₆H₁₅N₃O₃S 330 [(M + H)⁺]

RÉFÉRENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

A

J. A. Adams,
Kinetic and catalytic mechanisms of protein kinases
Chemical reviews, **2001**, 101, 2271-2290.

A. Antignani et D. Fitzgerald,
Immunotoxins: the role of the toxin
Toxins, **2013**, 5, 1486-1502.

B

V. Baeriswyl et G. Christofori,
The angiogenic switch in carcinogenesis
Seminars in Cancer Biology, **2009**, 19, 329-337.

A. W. Beham, I. M. Schaefer, P. Schöler, S. Cameron et B. M. Ghadimi,
Gastrointestinal stromal tumors
International Journal of Colorectal Disease, **2012**, 27, 689-670.

J. Blanc, R. Geney et C. Menet,
Type II kinase inhibitors: an opportunity in cancer for rational design
Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry, **2013**, 13, 1-17.

P. Bose, Y. Dai et S. Grant,
Histone deacetylase inhibitor (HDACI) mechanisms of action: Emerging insights
Pharmacology & Therapeutics, **2014**, doi: 10.1016/j.pharmthera.2014.04.004

E. Bouey-Bencteux, C. Loison, N. Pommery, R. Houssin et J. P. Hénichart,
Synthesis and antiproliferative properties of 4-aminoquinazoline derivatives as inhibitors of EGF receptor-associated tyrosine kinase activity
Anticancer Drug Design, **1998**, 13, 893-922.

S. Boutayeb, F. Z. Zakkouri, M. Aitelhaj, M. Mesmoudi, A. Boutayeb, W. Boutayeb, H. Mrabti et H. Errihani,
Protein tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy
Pathologie Biologie, **2012**, 60, 229-233.

A. Bridges, H. Zhou, D. R. Cody, G. W. Rewcastle, A. McMichael, H. D. Showalter, D. W. Fry, A. J. Kraker et W. A. Denny,
Tyrosine kinase inhibitors. 8. An unusually steep structure-activity relationship for analogues of 4-(3-bromoanilino)-6,7-dimethoxyquinazoline (PD 153035), a potent inhibitor of the epidermal growth factor receptor
Journal of Medicinal Chemistry, **1996**, 39, 267-276.

F. Broekman, E. Giovannetti et G. J. Peters,
Tyrosine kinase inhibitors: Multi-targeted or single-targeted?
World Journal of Clinical Oncology, **2011**, 2, 80-93.

E. M. Bublil et Y. Yarden,

The EGF receptor family: spearheading a merger of signaling and therapeutics

Current Opinion in Cell Biology, **2007**, 19, 124-134.

H. A. Burris, J. Ibbitts, S. N. Holden, M. X. Sliwkowski et G. D. Lewis Phillips,

Trastuzumab emtansine (T-DM1): a novel agent for targeting HER2+ breast cancer

Clinical Breast Cancer, **2011**, 11, 275-282.

C

J. Campbell, S. Noyce et R. Storr,

The reaction of 1,2,3-benzotriazines with Grignard reagents

Journal of the Chemical Society, **1983**, 1344-1346.

L.C. Cantley,

The phosphoinositide3-kinase pathway

Science, **2002**, 296, 1652-1657.

V. Caolo, D. G. M. Molin et M. J. Post

Notch regulation of hematopoiesis, endothelial precursor cells, and blood vessel formation: orchestrating the vasculature

Stem Cells International, **2012**, doi.org/10.1155/2012/805602.

M. P. Cava et M. I. Levinson,

Thionation reactions of lawesson's reagents

Tetrahedron, **1985**, 41, 5061-5087.

S. Cébe-Suarez, A. Zehnder-Fjällman et K. Ballmer-Hofer,

The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships

Cellular and Molecular Life Sciences, **2006**, 63, 601-615.

B. P. Ceresa et S. L. Schmid,

Regulation of signal transduction by endocytosis

Current Opinion in Cell Biology, **2000**, 12, 204-210.

N. Chalhoub et S. J. Baker,

PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer

Annual Review of Pathology Mechanisms of Disease, **2009**, 4, 127-150.

K. Chanprapaph, V. Vachiramom et P. Rattanakaemakorn,

Epidermal Growth Factor Receptor inhibitors: a review of cutaneous adverse events and management

Dermatology Research and Practice, **2014**, doi.org/10.1155/2014/734249.

X. Chen, L. A. Soma et J. R. Fromm,

Targeted therapy for Hodgkin lymphoma and systemic anaplastic large cell lymphoma: focus on brentuximab vedotin

OncoTargets and Therapy, **2013**, 7, 45-56.

J. G. Christensen,

A preclinical review of sunitinib, a multitargeted receptor tyrosine kinase inhibitor with anti-angiogenic and antitumour activities

Annals of Oncology, **2007**, 18, 3-10.

L. Claesson-Welsh et M. Welsh,

VEGFA and tumour angiogenesis

Journal of General Internal Medicine, **2013**, 273, 114-127.

M. H. Cohen, J. R. Johnson, Y. F. Chen, R. Sridhara et R. Pazdur,

FDA drug approval summary: erlotinib (Tarceva) tablets

Oncologist, **2005**, 10, 461-466.

C. C. Compton,

Colorectal carcinoma: diagnostic, prognostic, and molecular features

Modern Pathology, **2003**, 16, 376 -388.

C. L. Corless, A. Schroeder, D. Griffith, A. Town, L. McGreevey, P. Harrell, S. Shiraga, T. Bainbridge, J. Morich et M. C. Heinrich,

PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumors: frequency, spectrum and in vitro sensitivity to imatinib

Journal of Clinical Oncology, **2005**, 23, 5357-5364.

A. P. Costa-Pereira, N. A. Bonito et M. J. Seckl,

Dysregulation of janus kinases and signal transducers and activators of transcription in cancer

American Journal of Cancer Research, **2011**, 1, 806-816.

M. I. Crespo, L. Pagès, A. Vega, V. Segarra, M. López, T. Doménech, M. Miralpeix, J. Beleta, H. Ryder et J. M. Palacios,

Design, synthesis, and biological activities of new thieno[3,2-d] pyrimidines as selective type 4 phosphodiesterase inhibitors

Journal of Medicinal Chemistry, **1998**, 41, 4021-4035.

D

M. A. Dawson et T. Kouzarides,

Cancer epigenetics: from mechanism to therapy

Cell, **2012**, 150, 12-27.

E. I. Deryugina et J. P. Quigley,

Matrix metalloproteinases and tumor metastasis

Cancer and metastasis reviews, **2006**, 25, 9-34.

G. R. Desiraju,

C-H...O and other weak hydrogen bonds. From crystal engineering to virtual screening

Chemical communications, **2005**, 2995-3001.

M. Desroses, G. Laconde, A. Telliez, M.-C. Piron, N. Pommery, P. Depreux et J.-P. Hénichart,
Development of new anilinoquinazolines, potentially inhibitor of the tyrosine kinase activity of the EGF receptor

Fundamental and Clinical Pharmacology, **2004**, 18, 593-599.

J. Dietrich, C. Hulme et L. H. Hurley,

The design, synthesis, and evaluation of 8 hybrid DFG-out allosteric kinase inhibitors: a structural analysis of the binding interactions of Gleevec, Nexavar, and BIRB-796

Bioorganic & Medicinal Chemistry, **2010**, 18, 5738-5748.

E

C. E. Edling et B. Hallberg,

c-Kit--a hematopoietic cell essential receptor tyrosine kinase

International Journal of Biochemistry & Cell Biology, **2007**, 39, 1995-1998.

S. A. Eming et T. Krieg,

Molecular mechanisms of VEGF-A action during tissue repair

Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings, **2006**, 11, 79-86.

J. A. Endicott, M. E. Noble et L. N. Johnson,

The structural basis for control of eukaryotic protein kinases

Annual Review of Biochemistry, **2012**, 81, 587-613.

R. B. Ewesuedo et M. J. Ratain,

Topoisomerase I Inhibitors

Oncologist, **1997**, 2, 359-364.

F

M. Felcht, R. Luck, A. Schering, P. Seidel, K. Srivastava, J. Hu, A. Bartol, Y. Kienast, C. Vettel, E. K. Loos, S. Kutschera, S. Bartels, S. Appak, E. Besemfelder, D. Terhardt, E. Chavakis, T. Wieland, C. Klein, M. Thomas, A. Uemura, S. Goerdts et H. G. Augustin,

Angiopoietin-2 differentially regulates angiogenesis through TIE2 and integrin signaling

Journal of Clinical Investigation, **2012**, 122, 1991-2005.

M. Fickova,

Structure and activation of EGF receptor: minireview

Endocrine Regulations, **2002**, 36, 87-93.

D. A. Frank,

STAT signaling in the pathogenesis and treatment of cancer

Molecular Medicine, **1999**, 5, 432-456.

L. Fredriksson, H. Li et U. Eriksson,

The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms

Cytokine & Growth Factor Reviews, **2004**, 15, 197-204.

T. Furuta, T. Sakai, T. Senga, T. Osawa, K. Kubo, T. Shimizu, R. Suzuki, T. Yoshino, M. Endo et A. Miwa,

Identification of potent and selective inhibitors of PDGF receptor autophosphorylation

Journal of Medicinal Chemistry, **2006**, 49, 2186-2192.

G

A. Gangjee, O. A. Namjoshi, M. A. Ihnat et A. Buchanan,

The contribution of a 2-amino group on receptor tyrosine kinase inhibition and antiangiogenic activity in 4-anilinosubstituted pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidines

Bioorganic & Medicinal Chemistry, **2010**, 20, 3177-3181.

A. Gangjee, O. A. Namjoshi, J. Yu, M. A. Ihnat, J. E. Thorpe et L. C. Bailey-Downs,

N2-Trimethylacetyl substituted and unsubstituted-N4-phenylsubstituted-6-(2-pyridin-2-ylethyl)-7H-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidine-2,4-diamines: design, cellular receptor tyrosine kinase inhibitory activities and *in vivo* evaluation as antiangiogenic, antimetastatic and antitumor agents

Bioorganic & Medicinal Chemistry, **2013**, 21, 1312-1323.

A. Gangjee, N. Zaware, S. Raghavan, B. C. Disch, J. E. Thorpe, A. Bastian et M. A. Ihnat,

Synthesis and biological activity of 5-chloro-N4-substituted phenyl-9H-pyrimido[4,5-*b*]indole-2,4-diamines as vascular endothelial growth factor receptor-2 inhibitors and antiangiogenic agents

Bioorganic & Medicinal Chemistry, **2013**, 21, 1857-1864.

A. Garofalo, L. Goossens, B. Baldeyrou, A. Lemoine, S. Ravez, P. Six, M. H. David-Cordonnier, J. P. Bonte, P. Depreux, A. Lansiaux et J. F. Goossens,

Design, synthesis, and DNA-binding of N-alkyl(anilino)quinazoline derivatives

Journal of Medicinal Chemistry, **2010**, 53, 8089-8103.

A. Garofalo, L. Goossens, A. Lemoine, S. Ravez, P. Six, M. Howsam, A. Farce et P. Depreux,

[4-(6,7-Disubstituted quinazolin-4-ylamino)phenyl] carbamic acid esters: a novel series of dual EGFR/VEGFR-2 tyrosine kinase inhibitors

MedChemComm, **2011**, 2, 65-72.

A. Garofalo, L. Goossens, P. Six, N. Lebegue et P. Depreux,

Novel and efficient one-pot synthesis of (aminophenyl)carbamic acid esters

Synthetic Communications, **2011**, 41, 2007-2011.

A. Garofalo, L. Goossens, P. Six, A. Lemoine, S. Ravez, A. Farce et P. Depreux,

Impact of aryloxy-linked quinazolines: a novel series of selective VEGFR-2 receptor tyrosine kinase inhibitors

Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, **2011**, 2106-2112.

A. Garofalo, A. Farce, S. Ravez, A. Lemoine, P. Six, P. Chavatte, L. Goossens et P. Depreux,

Synthesis and structure-activity relationships of (aryloxy)quinazoline ureas as novel, potent, and selective vascular endothelial growth factor receptor-2 inhibitors

Journal of Medicinal Chemistry, **2012**, 55, 1189-1204.

- K. E. Gascoigne et S. S. Taylor,
How do anti-mitotic drugs kill cancer cells?
Journal of Cell Science, **2009**, 122, 2579-2585.
- A. Gazit, J. Chen, H. App, G. McMahon, P. Hirth, I. Chen et A. Levitzki
Tyrphostins IV--highly potent inhibitors of EGF receptor kinase. Structure-activity relationship study of 4-anilidoquinazolines
Bioorganic and Medicinal Chemistry, **1996**, 4, 1203-1207.
- M. Gellert,
DNA topoisomerases.
Annual Review of Biochemistry, **1981**, 50, 879-910.
- G. Giaccone et Y. Wang,
Strategies for overcoming resistance to EGFR family tyrosine kinase inhibitors
Cancer Treatment Reviews, **2011**, 37, 456-464.
- A. M. Gilfillan et C. Tkaczyk,
Integrated signalling pathways for mast-cell activation
Nature Reviews Immunology, **2006**, 6, 218-230.
- P. M. Glassman et J. P. Balthasar,
Mechanistic considerations for the use of monoclonal antibodies for cancer therapy
Cancer Biology & Medicine, **2014**, 11, 20-33.
- L. K. Goh et A. Sorkin,
Endocytosis of receptor tyrosine kinases
Cold Spring Harb Perspect Biol, **2013**, doi: 10.1101/cshperspect.a017459.
- J. Golay et M. Introna,
Mechanism of action of therapeutic monoclonal antibodies: promises and pitfalls of in vitro and in vivo assays
Archives of Biochemistry and Biophysics, **2012**, 526, 146-153.
- P. Goldhoff, N. M. Warrington, D. D. Jr. Limbrick, A. Hope, B. M. Woerner, E. Jackson, A. Perry, D. Piwnica-Worms et J. B. Rubin,
Targeted inhibition of cyclic AMP phosphodiesterase-4 promotes brain tumor regression
Clinical Cancer Research, **2008**, 14, 7717-7725.
- J. F. Goossens, E. Bouey-Bencteux, R. Houssin, J. P. Hénichart, P. Colson, C. Houssier, W. Laine, B. Baldeyrou et C. Bailly,
DNA interaction of the tyrosine protein kinase inhibitor PD153035 and its N-methyl analogue
Biochemistry, **2001**, 40, 4663-4671.
- K. J. Gotink et H. M. W. Verheul,
Anti-angiogenic tyrosine kinase inhibitors: what is their mechanism of action?
Angiogenesis, **2010**, 13, 1-14.

J. Gotlib, J. Cools, J. M. Malone, S. L. Schrier, D. G. Gilliland et S. E. Coutré,
The FIP1L1-PDGFRalpha fusion tyrosine kinase in hypereosinophilic syndrome and chronic eosinophilic leukemia: implications for diagnosis, classification, and management
Blood, **2004**, 103, 2879-2891.

A. Grassadonia, P. Cioffi, F. Simiele, L. Iezzi, M. Zilli et C Natoli,
Role of Hydroxamate-Based Histone Deacetylase Inhibitors (Hb-HDACIs) in the Treatment of Solid Malignancies
Cancers, **2013**, 5, 919-942.

G. Gremel, K. Grannas, L. A. Sutton, F. Pontén et A. Zieba,
In situ Protein Detection for Companion Diagnostics
Frontiers in Oncology, **2013**, doi: 10.3389/fonc.2013.00271.

C. A. Grob et P. W. Schiess,
Heterolytic fragmentation. A class of organic reactions
Angewandte Chemie, **1967**, 1, 1-106.

C. Gros, J. Fahy, L. Halby, I Dufau, A. Erdmann, J. M. Gregoire, F. Ausseil, S. Vispé et P. B. Arimondo,
DNA methylation inhibitors in cancer: recent and future approaches
Biochimie, **2012**, 94, 2280-2296.

F. Guerrini, S. Galimberti, E. Ciabatti, S. Brizzi, R. Testi, A. Pollastrini, B. Falini et M. Petrini,
Molecular detection of GNNK- and GNNK+ c-kit isoforms: a new tool for risk stratification in adult acute myeloid leukaemia
Leukemia, **2007**, 21, 2056-2058.

K. Gumireddy, S. J. Baker, S. C. Cosenza, P. John, A. D. Kang, K. A. Robell, M. V. R. Reddy et E. P. Reddy,
A non-ATP-competitive inhibitor of BCR-ABL overrides imatinib resistance
Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, **2005**, 102, 1992-1997.

H

D. Hanahan et R. A. Weinberg,
Hallmarks of cancer: the next generation
Cell, **2011**, 144, 646-674.

T. T. Hansel, H. Kropshofer, T. Singer, J. A. Mitchell et A. J. George,
The safety and side effects of monoclonal antibodies
Nature Reviews Drug Discovery, **2010**, 9, 325-338.

A. Hassner et V. Alexanian,
Direct room temperature esterification of carboxylic acids
Tetrahedron Letters, **1978**, 19, 4475-4478.

- Y. He, T. Karpanen et K. Alitalo,
Role of lymphangiogenic factors in tumor metastasis
Biochimica et Biophysica Acta, **2004**, 1654, 3-12.
- C. H. Heldin,
Targeting the PDGF signaling pathway in tumor treatment
Cell Communication and Signaling, **2013**, 11, 97.
- L. F. Hennequin, E. S. Stokes, A. P. Thomas, C. Johnston, P. A. Plé, D. J. Ogilvie, M. Dukes, S. R. Wedge, J. Kendrew et J. O. Curwen,
Novel 4-anilinoquinazolines with C-7 basic side chains: design and structure activity relationship of a series of potent, orally active, VEGF receptor tyrosine kinase inhibitors
Journal of Medicinal Chemistry, **2002**, 45, 1300-1312.
- S. P. Herbert et D. Y. Stainier,
Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis
Nature Reviews Molecular Cell Biology, **2011**, 12, 551-564.
- F. Hillen et A. W. Griffioen,
Tumour vascularization: sprouting angiogenesis and beyond
Cancer and metastasis reviews, **2007**, 26, 489-502.
- R. V. Hoch et P. Soriano,
Roles of PDGF in animal development
Development, **2003**, 130, 4769-4784.
- P. M. Hoff et K. Machado,
Role of angiogenesis in the pathogenesis of cancer
Cancer Treatment Reviews, **2012**, 38, 825-833.
- K. Holmes, O. L. Roberts, A. M. Thomas et M. J. Cross,
Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition
Cellular Signalling, **2007**, 19, 2003-2012.
- D. D. Hu-Lowe, H. Y. Zou, M. L. Grazzini, M. E. Hallin, G. R. Wickman, K. Amundson, J. H. Chen, D. A. Rewolinski, S. Yamazaki, E. Y. Wu, M. A. McTigue, B. W. Murray, R. S. Kania, P. O'Connor, D. R. Shalinsky et S. L. Bender,
Nonclinical antiangiogenesis and antitumor activities of axitinib (AG-013736), an oral, potent, and selective inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases 1, 2, 3
Clinical Cancer Research, **2008**, 14, 7272-7283.
- S. Huang, E. A. Armstrong, S. Benavente, P. Chinnaiyan et P. M. Harari,
Dual-agent molecular targeting of the epidermal growth factor receptor (EGFR): combining anti-EGFR antibody with tyrosine kinase inhibitor
Cancer Research, **2004**, 64, 5355-5362.

C. Y. Huang, M. H. Pourgholami et B. J. Allen,
Optimizing radioimmunoconjugate delivery in the treatment of solid tumor
Cancer Treatment Reviews, **2012**, 38, 854-860.

S. R. Hubbard,
Structural analysis of receptor tyrosine kinases
Progress in Biophysics & Molecular Biology, **1999**, 71, 343-358.
 A. Huether, M. Höpfner, V. Baradari, D. Schuppan et H. Scherübl,
EGFR blockade by cetuximab alone or as combination therapy for growth control of hepatocellular cancer
Biochemical Pharmacology, **2005**, 70, 1568-1578.

T. Hunter,
Tyrosine phosphorylation: thirty years and counting
Current Opinion in Cell Biology, **2009**, 21, 140-146.

M. Huse et J. Kuriyan,
The conformational plasticity of protein kinases
Cell, **2002**, 109, 275-282.

N. E. Hynes et G. MacDonald,
ErbB receptors and signaling pathways in cancer
Current Opinion in Cell Biology, **2009**, 21, 177-184.

I, J, K

T. F. Impert,
Discovery of podophyllotoxins
Biochimie, **1998**, 80, 207-222.

M. Y. Jang, Y. Lin, S. De Jonghe, L. J. Gao, B. Vanderhoydonck, M. Froeyen, J. Rozenski, J. Herman, T. Louat, K. Van Belle, M. Waer et P. Herdewijn,
Discovery of 7-N-piperazinylthiazolo[5,4-d]pyrimidine analogues as a novel class of immunosuppressive agents with in vivo biological activity
Journal of Medicinal Chemistry, **2011**, 54, 655-668.

A. Jazayeri, J. Mc Gee, T. Shimamura, S. B. Cross et B. E. Bejcek,
SHP-2 can suppress transformation induced by platelet-derived growth factor
Experimental Cell Research, **2000**, 254, 197-203.

B. H. Jiang et L. Z. Liu,
PI3K/PTEN signaling in tumorigenesis and angiogenesis
Biochimica et Biophysica Acta, **2008**, 1784, 150-158.

R. N. Jorissen, F. Walker, N. Pouliot, T. P. Garrett, C. W. Ward et A. W. Burgess,
Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling
Experimental Cell Research, **2003**, 284, 31-53.

- K. Kawada, G. Upadhyay, S. Ferandon, S. Janarthanan, M. Hall, J. P. Vilardaga et V. Yajnik,
Cell migration is regulated by platelet-derived growth factor receptor endocytosis
Molecular and Cellular Biology, **2009**; 29, 4508-4518.
- J. D. Kelly, B. A. Haldeman, F. J. Grant, M. J. Murray, R. A. Seifert, D. F. Bowen-Pope, J. A. Cooper
 et A. Kazlauskas,
**Platelet-derived growth factor (PDGF) stimulates PDGF receptor subunit dimerization and
 intersubunit trans-phosphorylation**
Journal of Biological Chemistry, **1991**, 266, 8987-8992.
- H. Kimura, T. Ohira, O. Uchida, J. Matsubayashi, S. Shimizu, T. Nagao, N. Ikeda et K. Nishio,
**Analytical performance of the cobas EGFR mutation assay for Japanese non-small-cell lung
 cancer**
Lung Cancer, **2014**, 83, 329-333.
- T. Kitazaki, M. Oka, Y. Nakamura, J. Tsurutani, S. Doi, M. Yasunaga, M. Takemura, H. Yabuuchi, H.
 Soda et S. Kohno,
**Gefitinib, an EGFR tyrosine kinase inhibitor, directly inhibits the function of P-glycoprotein in
 multidrug resistant cancer cells**
Lung Cancer, **2005**, 49, 337-343.
- K. Kok, B. Geering et B. Vanhaesebroeck,
Regulation of phosphoinositide 3-kinase expression in health and disease
Trends in Biochemical Sciences, **2009**, 34, 115-127.
- B. L. Krock, N. Skuli et M. C. Simon,
Hypoxia-induced angiogenesis: good and evil
Genes & Cancer, **2011**, 2, 1117-1133.

L

- E. Laine, I. Chauvot de Beauchêne, D. Perahia, C. Auclair et L. Tchertanov,
**Mutation D816V Alters the Internal Structure and Dynamics of c-KIT Receptor Cytoplasmic
 Region: Implications for Dimerization and Activation Mechanisms**
PLoS Computational Biology, **2011**, 7, 1-20.
- A. J. Lamontanara, E. B. Gencer, O. Kuzyk et O. Hantschel,
Mechanisms of resistance to BCR-ABL and other kinase inhibitors
Biochimica et Biophysica Acta, **2013**, 1834, 1449-1459.
- M. C. Lawrence, A. Jivan, C. Shao, L. Duan, D. Goad, E. Zaganjor, J. Osborne, K. McGlynn, S.
 Stippec, S. Earnest, W. Chen et M. H. Cobb,
The roles of MAPKs in disease
Cell Research, **2008**, 18, 436-442.
- M. A. Lemmon et J. Schlessinger,
Cell signaling by receptor tyrosine kinases
Cell, **2010**, 141, 1117-1134.

J. Lennartsson, T. Jelacic, D. Linnekin et R. Shivakrupa,
Normal and oncogenic forms of the receptor tyrosine kinase kit
Stem Cells, **2005**, 23, 16-43.

J. Lennartsson et L. Rönstrand,
Stem cell factor receptor/c-Kit: from basic science to clinical implications
Physiological Reviews, **2012**, 92, 1619-1649.

J. Liang, Y. L. Wu, B. J. Chen, W. Zhang, Y. Tanaka et H. Sugiyama,
The C-kit receptor-mediated signal transduction and tumor-related diseases
International Journal of Biological Sciences, **2013**, 9, 435-443.

M. Linch, J. Claus et C. Benson,
Update on imatinib for gastrointestinal stromal tumors: duration of treatment
OncoTargets and Therapy, **2013**, 6, 1011-1023.

Y. Liu et N. S. Gray,
Rational design of inhibitors that bind to inactive kinase conformations
Nature Chemical Biology, **2006**, 2, 358-364.

J. L. Ly, R. Wang, D. Liu, G. Guo, Y. K. Jing et L. X. Zhao,
Design, synthesis, and antitumor activities of some novel substituted 1,2,3-benzotriazines
Molecules, **2008**, 13, 1427-1440.

F. Lyko et R. Brown,
DNA methyltransferase inhibitors and the development of epigenetic cancer therapies
Journal of the National Cancer Institute, **2005**, 97, 1498-1506.

M

A. Mahipal, N. Kothari et S. Gupta,
Epidermal growth factor receptor inhibitors: coming of age
Cancer Control, **2014**, 21, 74-79.

I. Marzo et J. Naval,
Antimitotic drugs in cancer chemotherapy: promises and pitfalls
Biochemical Pharmacology, **2013**, 86, 703-710.

C. Mc Innes et B. D. Sykes,
Growth factor receptors: structure, mechanism, and drug discovery
Biopolymers, **1997**, 43, 339-366.

P. J. Medina et S. Goodin,
Lapatinib: a dual inhibitor of human epidermal growth factor receptor tyrosine kinases
Clinical Therapeutics, **2008**, 30, 1426-1447.

G. Milano,
Le concept de cible en cancérologie, **2008**.

G. Minotti, P. Menna, E. Salvatorelli, G. Cairo et L. Gianni,
Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity.

Pharmacological Reviews, **2004**, 56, 185-229.

S. Mocellin, K. A. Pooley et D. Nitti,
Telomerase and the search for the end of cancer

Trends in Molecular Medicine, **2013**, 19, 125-133.

K. Motomura, M. Mittelbronn, W. Paulus, B. Brokinkel, K. Keyvani, U. Sure, K. Wrede, Y. Nakazato, Y. Tanaka, N. Nonoguchi, D. Pierscianek, Y. H. Kim, L. Mariani, A. Vital, A. Perry et H. Ohgaki,
PDGFRA gain in low-grade diffuse gliomas

Journal of Neuropathology and Experimental Neurology, **2013**, 72, 61-66.

Y. A. Muller, B. Li, H. W. Christinger, J. A. Wells, B. C. Cunningham et A. M. de Vos,
Vascular endothelial growth factor: crystal structure and functional mapping of the kinase domain receptor binding site

Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, **1997**, 94, 7192-7197.

N

M. Narita, T. Murata, K. Shimizu, T. Nakagawa, T. Sugiyama, M. Inui, K. Hiramoto et T. Tagawa,
A role for cyclic nucleotide phosphodiesterase 4 in regulation of the growth of human malignant melanoma cells

Oncology Reports, **2007**, 17, 1133-1139.

G. Neufeld, O. Kessler et Y. Herzog,
The interaction of Neuropilin-1 and Neuropilin-2 with tyrosine-kinase receptors for VEGF

Advances in Experimental Medicine and Biology, **2002**, 515, 81-90.

R. Nicholson, J. M. W. Gee et M. E. Harper,
EGFR and cancer prognosis

European Journal of Cancer, **2001**, 37, 9-15.

V. Nizet et R. S. Johnson,
Interdependence of hypoxic and innate immune responses

Nature Reviews Immunology, **2009**, 9, 609-617.

Y. Nomoto, H. Obase, H. Takai, M. Teranishi, J. Nakamura et K. Kubo,
Studies on cardiotoxic agents. II. Synthesis of novel phthalazine and 1,2,3-benzotriazine derivatives.

Chemical and pharmaceutical bulletin, **1990**, 38, 2178-2183.

O

C. Oefner, A. D'Arcy, F. K. Winkler, B. Eggimann et M. Hosang,
Crystal structure of human platelet-derived growth factor BB

The EMBO Journal, **1992**, 11, 3921-3926.

H. Ogiso, R. Ishitani, O. Nureki, S. Fukai, M. Yamanaka, J. H. Kim, K. Saito, A. Sakamoto, M. Inoue, M. Shirouzu et S. Yokoyama,
Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains.
Cell, **2002**, 775-787.

A. Okines, D. Cunningham et I. Chau,
Targeting the human EGFR family in esophagogastric cancer
Nature Reviews Clinical Oncology, **2011**, 8, 492-503.

A. K. Olsson, A. Dimberg, J. Kreuger et L. Claesson-Welsh,
VEGF receptor signalling - in control of vascular function
Molecular Cell Biology, **2006**, 7, 359-371.

H. M. Osborn et N. A. Williams,
Development of tyrosinase labile protecting groups for amines
Organic Letters, **2004**, 6, 3111-3113.

A. Ostman et F. D. Böhmer,
Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatases
Trends in Cell Biology, **2001**, 11, 258-266.

Z. K. Otrock, H. A. Hatoum, A. H. Awada, R. S. Ishak et A. I. Shamseddine,
Hypoxia-inducible factor in cancer angiogenesis: structure, regulation and clinical perspectives
Critical Reviews in Oncology/Hematology, **2009**, 70, 93-102.

C. Ozvegy-Laczka, J. Cserepes, N. B. Elkind et B. Sarkadi,
Tyrosine kinase inhibitor resistance in cancer: role of ABC multidrug transporters
Drug Resistance Updates, **2005**, 8, 15-26.

P

L. Palmieri et G. Rastelli,
 α C helix displacement as a general approach for allosteric modulation of protein kinases
Drug Discovery Today, **2013**, 18, 407-414.

W. Pao, V. A. Miller et M. G. Kris,
'Targeting' the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase with gefitinib (Iressa) in non-small cell lung cancer (NSCLC)
Seminars in Cancer Biology, **2004**, 14, 33-40.

M. K. Paul et A. K. Mukhopadhyay,
Tyrosine kinase - Role and significance in Cancer
International Journal of Medical Sciences, **2004**, 1, 101-115.

- N. A. Pennell et T. J. Jr. Lynch,
Combined inhibition of the VEGFR and EGFR signaling pathways in the treatment of NSCLC
Oncologist, **2009**, 14, 399-411.
- E. Perspicace, D. Thomae, G. Hamm, S. Hesse, G. Kirsch et P. Seck,
Synthesis of substituted selenolo[3,2-d]triazines and [1,3]selenazolo[4,5-d][1,2,3]triazines
Synthesis, **2009**, 20, 3472-3476.
- M. C. Pietanza, T. J. Jr. Lynch, P. N. Jr. Lara, J. Cho, R. H. Yanagihara, N. Vrindavanam, N. M. Chowhan, S. M. Gadgeel, N. A. Pennell, R. Funke, B. Mitchell, H. A. Wakelee et V. A. Miller,
XL647--a multitargeted tyrosine kinase inhibitor: results of a phase II study in subjects with non-small cell lung cancer who have progressed after responding to treatment with either gefitinib or erlotinib
Journal of Thoracic Oncology, **2012**, 7, 219-226.
- E. C. Pietsch, S. M. Sykes, S. B. McMahon et M. E. Murphy,
The p53 family and programmed cell death
Oncogene, **2008**, 27, 6507-6521.
- H. M. Pinedo et G. F. Peters,
Fluorouracil: biochemistry and pharmacology
Journal of Clinical Oncology, **1988**, 6, 1653-1664.
- I. A. Prior, P. D. Lewis et C. Mattos,
A comprehensive survey of Ras mutations in cancer
Cancer Research, **2012**, 72, 2457-2467.

R

- A. Rapisarda et G. Melillo,
Role of the VEGF/VEGFR axis in cancer biology and therapy
Advances in Cancer Research, **2012**, 114, 237-267.
- L. Reber, C. A. Da Silva et N. Frossard,
Stem cell factor and its receptor c-Kit as targets for inflammatory diseases
European Journal of Pharmacology, **2006**, 533, 327-340.
- M. Rebucci et C. Michiels,
Molecular aspects of cancer cell resistance to chemotherapy
Biochemical Pharmacology, **2012**, 85, 1219-1226.
- M. Reck et L. Crinò,
Advances in anti-VEGF and anti-EGFR therapy for advanced non-small cell lung cancer
Lung Cancer, **2009**, 63, 1-9.
- D. Ribatti,
Endogenous inhibitors of angiogenesis: a historical review
Leukemia Research, **2009**, 33, 638-644.

- M. Robba, J.-M. Leconte et M. Cugon de Sevracourt,
Thiénopyrimidine. I. Etude de l'oxo-4-dihydro-3,4-thiéno[2,3-d]pyrimidine
Bulletin de la Société Chimique de France, **1970**, 10, 3630-3636.
- D. M. Roberts, J. B. Kearney, J. H. Johnson, M. P. Rosenberg, R. Kumar et V. L. Bautch,
The vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor Flt-1 (VEGFR-1) modulates Flk-1 (VEGFR-2) signaling during blood vessel formation
American Journal of Pathology, **2004**, 164, 1531-1535.
- R. Jr. Roskoski,
The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer
Biochemical and Biophysical Research Communications, **2004**, 319, 1-11.
- R. Jr. Roskoski,
Structure and regulation of Kit protein-tyrosine kinase--the stem cell factor receptor
Biochemical and Biophysical Research Communications, **2005**, 338, 1307-1315.
- H. Roy, S. Bhardwaj et S. Ylä-Herttuala,
Biology of vascular endothelial growth factors
FEBS Letters, **2006**, 580, 2879-2887.
- A. L. Ruchelman, P. J. Houghton, N. Zhou, A. Liu, L. F. Liu et E. J. LaVoie,
5-(2-aminoethyl)dibenzo[c,h][1,6]naphthyridin-6-ones: variation of n-alkyl substituents modulates sensitivity to efflux transporters associated with multidrug resistance
Journal of Medicinal Chemistry, **2005**, 48, 792-804.
- C. Ruiz De Almodovar, D. Lambrechts, M. Mazzone et P. Carmeliet,
Role and therapeutic potential of VEGF in the nervous system
Physiological Reviews, **2009**, 89, 607-648.
-
- S**
-
- D. S. Salomon, R. Brandt, F. Ciardiello et N. Normanno,
Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies
Critical Reviews in Oncology/Hematology, **1995**, 19, 183-232.
- T. P. Selvam et P. V. Kumar,
Quinazoline Marketed drugs--A Review
Research in Pharmacy, **2011**, 1, 1-21.
- R. Sengupta, T. Sun, N. M. Warrington et J. B. Rubin,
Treating brain tumors with PDE4 inhibitors
Trends in Pharmacological Sciences, **2011**, 32, 337-344.
- A. H. Shim, H. Liu, P. J. Focia, X. Chen, P. C. Lin et X. He,
Structures of a platelet-derived growth factor/propeptide complex and a platelet-derived growth factor/receptor complex
Proceedings of the National Academy of Sciences, **2010**, 107, 11307-11312.

C. J. Shishoo, M. B. Devani, V. S. Bhadti, K. S. Jain et S. Ananthan,
Reaction of nitriles under acidic conditions. Part VI. Synthesis of condensed 4-chloro- and 4-aminopyrimidines from ortho-aminonitriles
Journal of Heterocyclic Chemistry, **1990**, 27, 119-126.

S. Shukla, Z. S. Chen et S. V. Ambudkar,
Tyrosine kinase inhibitors as modulators of ABC transporter-mediated drug resistance
Drug Resistance Updates, **2012**, 15, 70-80.

J. M. Simon,
Hypoxia and angiogenesis
Bulletin du Cancer, **2007**, 94, S160-165.

R. Simon,
Drug-Diagnostics Co-Development in Oncology
Frontiers in Oncology, **2013**, doi: 10.3389/fonc.2013.00315.

D. R. Siwak, M. Carey, B. T. Hennessy, C. T. Nguyen, M. J. McGahren Murray, L. Nolden et G. B. Mills,
Targeting the epidermal growth factor receptor in epithelial ovarian cancer: current knowledge and future challenges
Journal of Oncology, **2010**, 1-20.

J. Stamos, M. X. Sliwkowski et C. Eigenbrot,
Structure of the epidermal growth factor receptor kinase domain alone and in complex with a 4-anilinoquinazoline inhibitor
Journal of Biological Chemistry, **2002**, 277, 46265-46272.

S. E. Strome, E. A. Sausville et D. Mann,
A mechanistic perspective of monoclonal antibodies in cancer therapy beyond target-related effects
Oncologist, **2007**, 12, 1084-1095.

T

T. Tammela, B. Enholm, K. Alitalo et K. Paavonen,
The biology of vascular endothelial growth factors
Cardiovascular Research, **2005**, 65, 550-563.

A. Telliez, M. Desroses, N. Pommery, O. Briand, A. Farce, G. Laconde, A. Lemoine, P. Depreux et J. P. Hénichart,
Derivatives of Iressa, a specific epidermal growth factor receptor inhibitor, are powerful apoptosis inducers in PC3 prostatic cancer cells
ChemMedChem, **2007**, 2, 318-332.

D. Thomae, E. Perspicace, S. Hesse, G. Kirsch et P. Seck,
Synthesis of substituted [1,3]thiazolo[4,5-*b*]pyridines and [1,3]thiazolo[4,5-*d*][1,2,3]triazines
Tetrahedron, **2008**, 64, 9309-9314.

D. Thomae, E. Perspicace, Z. Xu, D. Henryon, S. Schneider, S. Hesse, G. Kirsch et P. Seck,
One-pot synthesis of new 2,4,5-trisubstituted 1,3-thiazoles and 1,3-selenazoles
Tetrahedron, **2009**, 65, 2982-2988.

D. E. Thurston, D. S. Bose, A. S. Thompson, P. W. Howard, A. Leoni, S. J. Croker, T. C. Jenkins, S. Neidle, J. A. Hartley et L. H. Hurley,
Synthesis of Sequence-Selective C8-Linked Pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepine DNA Interstrand Cross-Linking Agents
Journal of Organic Chemistry, **1996**, 61, 8141-8147.

A. K. Tiwari, K. Sodani, S. R. Wang, Y. H. Kuang, C. R. Jr. Ashby, X. Chen et Z. S. Chen,
Nilotinib (AMN107, Tasisna) reverses multidrug resistance by inhibiting the activity of the ABCB1/Pgp and ABCG2/BCRP/MXR transporters
Biochemical Pharmacology, **2009**, 78, 153-161.

U, V, W

J. A. Ubersax et J. E. Jr Ferrell,
Mechanisms of specificity in protein phosphorylation
Nature Reviews Molecular Cell Biology, **2007**, 8, 530-541.

A. A. Ucuzian, A. A. Gassman, A. T. East et H. P. Greisler,
Molecular mediators of angiogenesis
Journal of Burn Care & Research, **2010**, 31, 158-175.

M. F. Van Delft et D. C. Huang,
How the Bcl-2 family of proteins interact to regulate apoptosis
Cell Research, **2006**, 16, 203-213.

M. Visentin, R. Zhao et I. D. Goldman,
The antifolates
Hematology/Oncology Clinics of North America, **2012**, 26, 629-648.

D. Vittet et J. J. Feige,
Lymphangiogenesis and tumor progression
Bulletin du Cancer, **2007**, 94, 881-886.

I. Vivanco et C. L. Sawyers,
The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer
Nature Reviews Cancer, **2002**, 2, 489-501.

J.M. Wagner, B. Hackanson, M. Lübbert et M. Jung,
Histone deacetylase (HDAC) inhibitors in recent clinical trials for cancer therapy
Clinical Epigenetics, **2010**, 1, 117-136.

G. P. Warwick,
The mechanism of action of alkylating agents
Cancer Research, **1963**, 23, 1315-1333.

L. M. Weine, R. Surana et S. Wang,
Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy
Nature Reviews Immunology, **2010**, 10, 317-327.

S. M. Wilhelm, L. Adnane, P. Newell, A. Villanueva, J. M. Llovet et M. Lynch,
Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling
Molecular Cancer Therapeutics, **2008**, 7, 3129-3140.

T. W. Wong, F. Y. Lee, S. Emanuel, C. Fairchild, J. Fargnoli, B. Fink, A. Gavai, A. Hammell, B. Henley, C. Hilt, J. T. Hunt, B. Krishnan, D. Kukral, A. Lewin, H. Malone, D. Norris, S. Oppenheimer, G. Vite et C. Yu,
Antitumor and antiangiogenic activities of BMS-690514, an inhibitor of human EGF and VEGF receptor kinase families
Clinical Cancer Research, **2011**, 17, 4031-4041.

Y, Z

C. Yewale, D. Baradia, I. Vhora, S. Patil et A. Misra,
Epidermal growth factor receptor targeting in cancer: a review of trends and strategies
Biomaterials, **2013**, 34, 8690-8707.

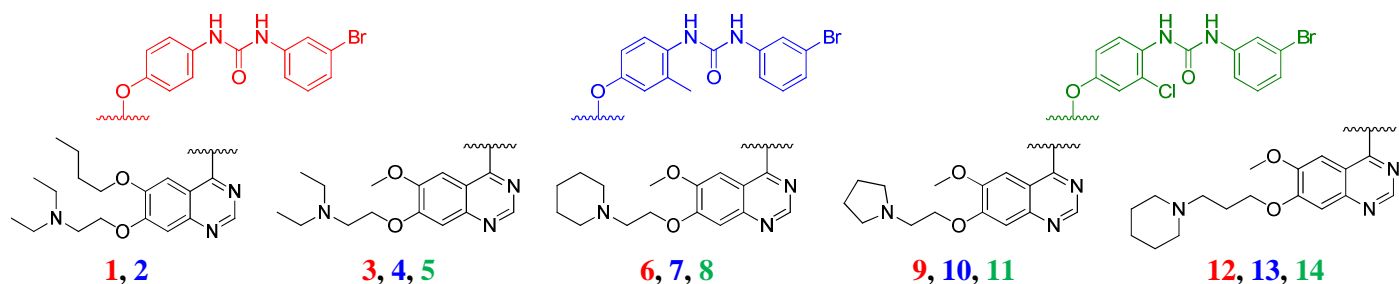
S. Y. Yoo et S. M. Kwon,
Angiogenesis and Its Therapeutic Opportunities
Mediators of Inflammation, **2013**, 2013, 1-11.

S. Yuzawa, Y. Opatowsky, Z. Zhang, V. Mandiyan, I. Lax et J. Schlessinger,
Structural basis for activation of the receptor tyrosine kinase KIT by stem cell factor
Cell, **2007**, 130, 323-334.

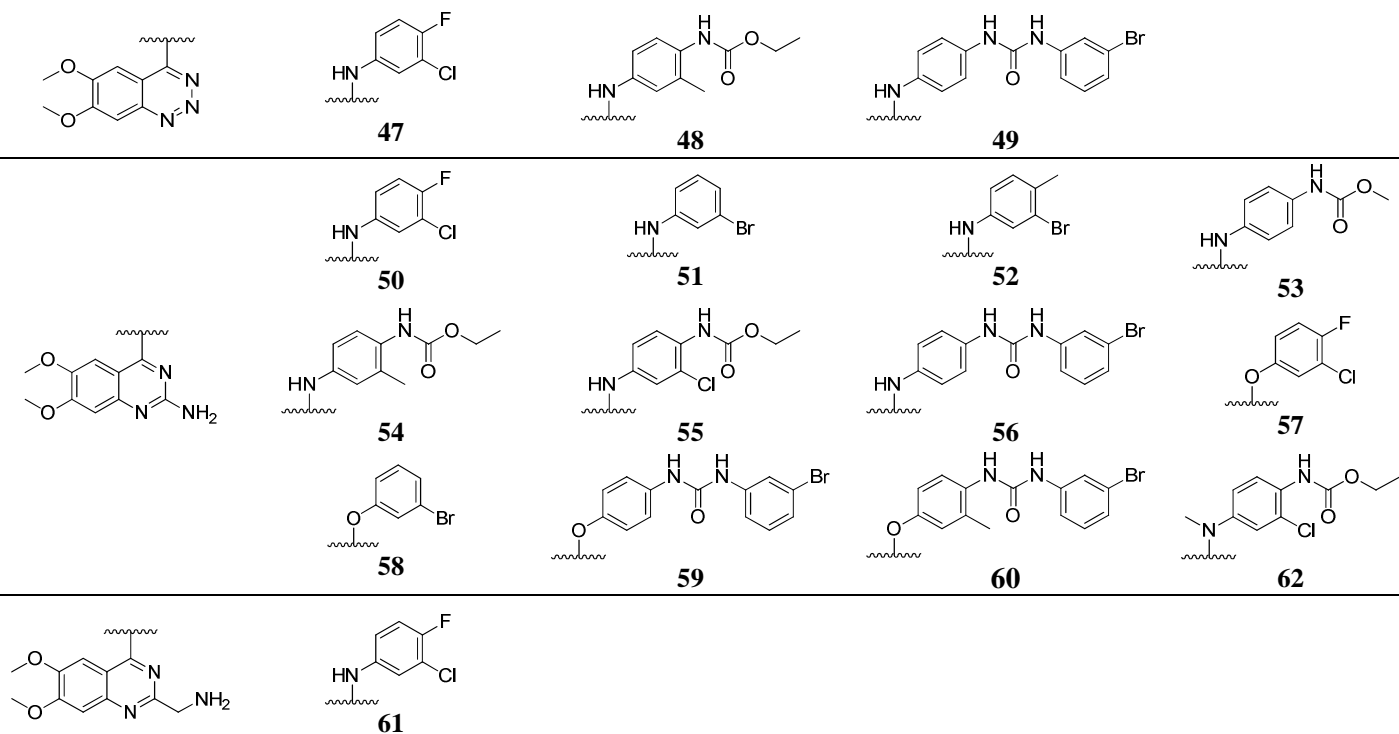
J. Zhang, F. J. Adrián, W. Jahnke, S. W. Cowan-Jacob, A. G. Li, R. E. Iacob, T. Sim, J. Powers, C. Dierks, F. Sun, G. R. Guo, Q. Ding, B. Okram, Y. Choi, A. Wojciechowski, X. Deng, G. Liu, G. Fendrich, A. Strauss, N. Vajpai, S. Grzesiek, T. Tunland, Y. LiuY, B. Bursulaya, M. Azam, P. W. Manley, J. R. Engen, G. Q. Daley, M. Warmuth et N. S. Gray,
Targeting Bcr-Abl by combining allosteric with ATP-binding-site inhibitors
Nature, **2010**, 463, 501-506.

J. Zheng, D. R. Knighton, L. F. ten Eyck, R. Karlsson, N. Xuong, S. S. Taylor et J. M. Sowadski,
Crystal structure of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase complexed with MgATP and peptide inhibitor
Biochemistry, **1993**, 32, 2154-2161.

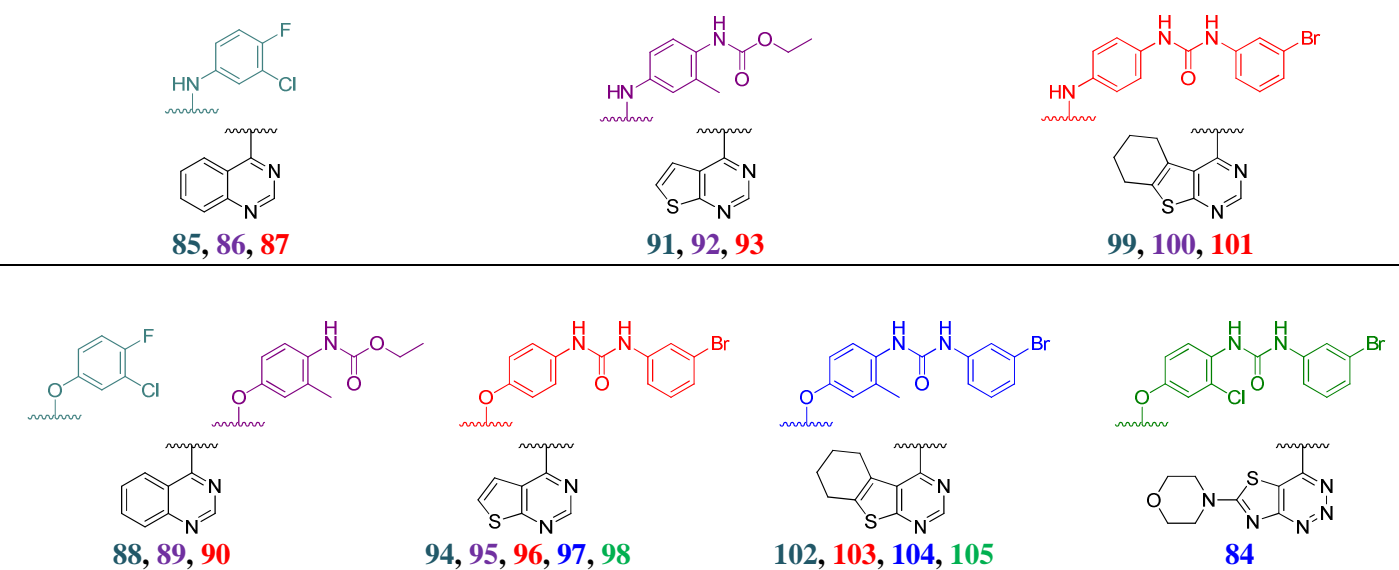
7-Aminoalkoxyquinazolines



Modulation de la position 2 de la quinazoline



Modulation de l'hétérocycle quinazolinique



CONCEPTION, SYNTHÈSE ET ÉVALUATION PHARMACOLOGIQUE D'HÉTÉROCYCLES AZOTÉS À VISÉE ANTICANCÉREUSE

Avec près de 150 000 décès estimés en 2012 d'après l'Agence internationale pour la Recherche sur le Cancer, le cancer représente la première cause de mortalité en France. Cette maladie est caractérisée par la prolifération anarchique et incontrôlée de certaines cellules de l'organisme qui échappent aux mécanismes de contrôle. A l'heure actuelle, les thérapies anticancéreuses visent principalement ces cellules tumorales en agissant sur des protéines qu'elles surexpriment, telles que les récepteurs aux facteurs de croissance à activité tyrosine kinase.

Nos travaux se sont essentiellement portés sur quatre de ces récepteurs : l'EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*), le VEGFR (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*), le PDGFR (*Platelet-Derived Growth Factor Receptor*) et le récepteur c-Kit. Plusieurs hétérocycles azotés (quinazoline, benzotriazine, thiényrimidine) se différenciant par leur motif anilino ou aryloxy en position 4 ont été conçus, synthétisés et évalués pharmacologiquement. Parmi ces produits, les 4-aryloxyquinazolines substituées en position 7 par des chaînes aminoalkoxy se sont révélées être de puissants inhibiteurs des récepteurs VEGFR, PDGFR et c-Kit et présentent un fort pouvoir anti-angiogénique.

En parallèle de ces travaux, des dérivés de type 2-aminoquinazolines ont été conçus. Ces composés substitués par différentes anilines en position 4 ont montré un pouvoir antiprolifératif intéressant grâce à leur intercalation entre les paires de bases de l'ADN.

Mots-clés : cancer, inhibiteurs tyrosine kinase, angiogenèse, aryloxyquinazolines, thiényrimidines

DESIGN, SYNTHESIS AND PHARMACOLOGICAL EVALUATION OF NITROGEN HETEROCYCLES AS ANTICANCER DRUGS

According to the International Agency for Research on Cancer, cancer is the first cause of death in France with about 150 000 deaths estimated in 2012. This disease is characterized by grow uncontrolled cells that escape control mechanisms. Currently, the anticancer drugs target mainly the cancerous cells that overexpress proteins, such as growth factor receptors with tyrosine kinase activity.

Our work is mainly carried on four of these receptors: EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), VEGFR (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor), PDGFR (Platelet-Derived Growth Factor Receptor) and c-Kit receptor. Several heterocycles (quinazoline, benzotriazine, thienopyrimidine) differing by their aniline or aryloxy moiety in C-4 position were designed, synthesized and evaluated. Among these products, the 4-aryloxyquinazolines substituted by aminoalkoxy chains in C-7 position have the characteristic to be potent inhibitors of VEGFR, PDGFR and c-kit receptor with high anti-angiogenic potency.

Simultaneously, 2-aminoquinazoline derivatives were designed. These compounds substituted by various anilines in C-4 position showed interesting antiproliferative activity through their intercalation between the pairs of DNA bases.

Keywords: cancer, tyrosine kinase inhibitors, angiogenesis, aryloxyquinazolines, thienopyrimidines