

UNIVERSITE LILLE NORD DE FRANCE – DROIT ET SANTE
Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques
JPArC INSERM UMR S-1172

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN CHIMIE ORGANIQUE

Spécialité : Sciences du médicament

Présentée et soutenue le 22 Septembre 2017

Par

Romain DUROUX

**Conception, synthèse et évaluation
d'antagonistes des récepteurs A_{2A}**

Membres du Jury

Rapporteurs : **Pr. Sylvain Routier**, Professeur - Université d'Orléans
Dr. Fanny Roussi, Directrice de Recherches - ICSN, Gif-sur-Yvette

Examineurs : **Pr. Marc Le Borgne**, Professeur - Université de Lyon 1
Dr. Sandrine Delarue Cochin, Maître de Conférences - Université Paris-Sud
Pr. Patricia Melnyk, Professeur - Université Lille 2

Directeur de thèse : **Dr. Saïd Yous**, Maître de Conférences - Université Lille 2

REMERCIEMENTS

Mes premiers remerciements s'adressent forcément au Dr. Saïd Yous, mon directeur de thèse. Je te remercie particulièrement pour ton encadrement, pour m'avoir délivré tes secrets de la chimie, « sentir la poudre » comme on dit. Merci aussi pour la confiance que tu m'as accordée durant ces trois années me permettant d'être très autonome et de me laisser libre dans la manière de diriger le projet. C'est un plus considérable pour moi et c'est comme cela que je concevais une thèse. Je te remercie aussi pour toutes les discussions qu'on a pu avoir aussi bien autour de la chimie que du reste, au laboratoire comme au Badau, qui ont été indispensables au bon déroulement de cette thèse. Tout cela a fait que je n'ai pas vu passer ces trois années et que chaque matin c'était un plaisir d'aller au labo.

Je souhaite aussi remercier le Professeur Patricia Melnyk, directrice du laboratoire "Onco et Neurochimie" pour m'avoir accueilli au sein de son équipe de recherche. Merci aussi pour votre confiance, pour avoir accepté que j'aie aux Etats-Unis et accepté finalement la plupart de mes requêtes.

Je remercie sincèrement les membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont bien voulu porter à ce travail. Je suis très reconnaissant envers le Pr Sylvain Routier de l'Institut de Chimie Organique et Analytique de l'Université d'Orléans pour son suivi tout au long de ces trois ans, et le Dr Fanny Roussi, Directrice de Recherches à l'Institut de Chimie de Substances Naturelles à Gif-sur-Yvette, d'avoir accepté le rôle de rapporteur et ainsi accordé un temps précieux à ce manuscrit. Je remercie également le Pr Marc Le Borgne, Professeur à l'Université de Lyon 1 et le Dr. Sandrine Delarue-Cochin de l'Université Paris-Sud qui ont bien voulu examiner ce travail de thèse.

Un grand merci aux membres de chimie thérapeutique 1. Je pense au Dr. Nicolas Lebegue pour nos nombreuses discussions (chimiques ou non), notamment pendant nos têtes à têtes le midi. Merci aussi à Max, le biologiste-paysan et futur maire de Loos, qui m'a empêché de rester seul dans mon bureau mais c'était bien mieux comme ça. Une pensée aussi à Aurélien qui m'a parfaitement intégré à la ville durant ma première année et à Ayano. Bref, on n'a pas été nombreux au premier mais on s'est quand même bien marré ! J'espère que le KBP perdurera...

Un grand merci au Dr Nicolas Renault pour m'avoir formé au travail de modélisation moléculaire mais aussi pour son accueil au laboratoire et les différentes discussions qu'on a pu avoir.

J'inclus aussi le Dr. Jamal El Bakali qui m'a largement aidé dans la rédaction de publications et sur la façon de réfléchir à un projet.

Je tiens aussi à remercier le Dr Laurence Agouridas pour son aide sur le projet, sa gentillesse et ses différentes relectures de publications, PPT, etc...

Une grande pensée aussi à Floriane qui aura rythmée de façon certaine ces trois années de thèse... Tu es une part très importante de cette thèse.

Merci aussi à tous les autres membres de chimie thérapeutique 2. C'est rare j'imagine de s'entendre avec tout le monde mais pourtant c'est le cas dans cette équipe. Merci donc aux Ch'ti Manon, Florian, Fabrice, Philippe, Séverine et Polo. J'inclus aussi les différents stagiaires que j'ai pu encadrer : William's, Ruth et Callum les Ecosais, et enfin Raphaël.

Je tiens aussi à remercier grandement le Dr. David Blum qui m'a tout d'abord bien préparé pour le concours de l'école doctorale et qui a toujours bien voulu répondre à mes questions. Merci aussi à toi d'être aussi passionné par le sujet et intéressé par tout (pour peu même la chimie !), ça motive énormément. Merci aussi de m'avoir mis en relation avec le Dr. Jacobson. Merci aussi au Dr. Emilie Faivre pour ta gentillesse et le temps pris sur ton emploi du temps pour faire les manip *vivo*.

Cette thèse m'a permis de collaborer avec de nombreuses équipes pluridisciplinaires. Un grand merci au Pr. Fabien Gosselet et à Emmanuel Sevin du LBHE de Lens pour votre accueil et pour m'avoir permis de réaliser les expériences de passage de la BHE. J'associe aussi Catherine Pivateau de la plateforme ADME de la Faculté de Pharmacie pour toutes les analyses des plaques.

J'ai aussi eu la chance de réaliser deux expériences à l'étranger qui ont été des plus enrichissantes. Un grand merci donc à Luisa V. Lopes de m'avoir accueilli au sein de l'IMM de Lisbonne et de m'avoir formé. Ces deux mois au Portugal ont été géniaux. Merci aussi au Dr. Kenneth A. Jacobson du NIH à Bethesda de m'avoir accueilli au sein de sa prestigieuse équipe. Cela m'a permis de voir autre chose, une autre chimie et un autre mode de fonctionnement. Merci aussi à tous les deux pour votre gentillesse et votre simplicité. Cette expérience sera à coup sûr très bénéfique pour moi.

Je tiens aussi à remercier le Dr. Pascal Caignard, mon ancien chef des laboratoires Servier, qui est le premier à m'avoir montré ce qu'était la chimie et la medchem ! Tu m'as poussé à faire une thèse et tu as eu raison !

Je n'oublierais pas non plus la troupe des gaziers qui en plus m'ont fait le plaisir de venir et d'écouter cette thèse. Tous ces moments passés avec vous pendant les week-ends ont été tout aussi important. Enfin, et le meilleur pour la fin, je remercie ma sœur et mes parents qui m'ont toujours soutenu et laissé faire ce que j'avais envie. J'ai une grande chance de vous avoir.

Publications et communications

Le travail réalisé lors de ce projet de thèse a donné lieu pour le moment aux publications, communications et posters suivants :

Publications :

Duroux R., Renault N., Cuelho J., Agouridas A., Blum D., Lopes L., Melnyk P. and Yous S.
Design, synthesis and evaluation of 2-aryl benzoxazoles as promising hit for the A_{2A} receptor.
J. Enz. Inhib. Med. Chem., **2017**, 32, 850-864

Duroux R., Ciancetta A., Mannes P., Yu J., Boyapati S., Gizewski E., Yous S., Ciruela F., Auchampach J.A., Gao Z.G. and Jacobson K.A.
Fluorescent Antagonists of the A_{2A} Adenosine Receptor Based on Pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidin-5-amine Functionalized Congeners
Med. Chem. Commun., **2017**, 8, 1659-1667

Duroux R., Agouridas A., Renault N., El Bakali J., Furman C., Melnyk P. and Yous S.
Antagonists of the adenosine A_{2A} receptor based on a 2-arylbenzoxazole scaffold: Investigation of the C5- and C7-positions to enhance affinity
Eur. J. Med. Chem., *soumis*

Communications orales :

Duroux R., Renault N., Agouridas L., Sevin E., Gosselet F., Melnyk P., Yous S.
From virtual screening to pharmacological evaluation of quinazoline derivatives as adenosine A_{2A} receptor antagonists for the potential treatment of Alzheimer disease.
8th PhD student day, Lille, 2017, March 21th.

Duroux R., Renault N., Agouridas L., Lopes L., Chavatte P., Melnyk P., Yous S.
From design to pharmacological evaluation of benzoxazole derivatives as adenosine A_{2A} receptor antagonists for the potential treatment of Alzheimer disease
Lille, 16^{ème} édition la Journée Andre Verbert, September 21th.

Duroux R., Renault N., Agouridas L., Lopes L., Chavatte P., Melnyk P., Yous S.
From design to pharmacological evaluation of benzoxazole derivatives as adenosine A_{2A} receptor antagonists for the potential treatment of Alzheimer disease.
30^{ème} journées franco-belges de pharmacochimie, Amboise, 2016, May 25-27th.

Prix de la meilleure communication orale

Duroux R., Renault N., Agouridas L., Lopes L., Chavatte P., Melnyk P., Yous S.
Design, synthesis and evaluation of new potential A_{2A} antagonists for the treatment of Alzheimer's disease.
7th PhD student day (Lille, 2016, April 19th).

Prix de la meilleure communication orale

Duroux R., Renault N., Agouridas L., Lopes L., Chavatte P., Melnyk P., Yous S.
A_{2A} receptor antagonists for the treatment of Alzheimer diseases: design, synthesis and biological evaluation, 24th Young Research Fellow Meeting (SCT) (Lille, 2016, February 15-17th).

Communications par affiches :

Duroux R., Renault N., Agouridas L., Lopes L., Sevin E., Gosselet F., Melnyk P., Yous S.

From virtual screening to pharmacological evaluation of quinazoline derivatives as adenosine A_{2A} receptor antagonists for the potential treatment of Alzheimer disease.

The 13th International Conference on Alzheimer's & Parkinson's, Vienna, 2017, March 29-April 2.

Duroux R., Renault N., Cuelho Esteves J., Agouridas L., Blum D., Buée L., Furman C., Lopes L., Melnyk P., Yous S.

A_{2A} receptor antagonists for the treatment of Alzheimer's disease : design, synthesis and biological evaluation of a new benzoxazole family.

The 13th International Conference on Alzheimer's & Parkinson's, Vienna, 2017, March 29-April 2.

Duroux R., Renault N., Agouridas L., Lopes L., Chavatte P., Melnyk P., Yous S.

From design to pharmacological evaluation of benzoxazole derivatives as adenosine A_{2A} receptor antagonists for the potential treatment of Alzheimer disease.

52nd International Conference on Medicinal Chemistry, Caen, 2016, July 6-8th.

Duroux R., Renault N., Agouridas L., Lopes L., Chavatte P., Melnyk P., Yous S.,

Antagonistes potentiels des récepteurs A_{2A} pour le traitement de la maladie d'Alzheimer : conception, synthèse et évaluation biologique.

16^{ème} Rencontres de Chimie Biologique, Aussois, 2016, March 13-17th.

Prix de la meilleure présentation poster

Duroux R., Renault N., Agouridas L., Melnyk P., Yous S.

Targeting A_{2A} receptor to treat neurodegenerative diseases: design, synthesis and evaluation of potential antagonists.

6th PhD student day, Lille, 2015.

Liste des abréviations

Certaines dénominations sont données sous leurs formes anglo-saxonnes.

AcOEt	Acétate d'éthyle
AcOH	Acide acétique
AICD	Domaine intracellulaire de l'APP
AMP	Adénosine monophosphate
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
AN	Acétonitrile
APP	Protéine précurseur de l'amyloïde
ApoE	Apolipoprotéine E
APTS	Acide paratoluènesulfonique
AR	Récepteur à Adenosine
ATP	Adénosine triphosphate
A β	Bêta-Amyloïde
BACE-1	Beta sécrétase 1
BHE	Barrière Hémato-Encéphalique
BINAP	2,2'-Bis(diphénylphosphino)-1,1'-binaphtyle
Boc ₂ O	Dicarbonate de di-tert-butyle
br s / m	Broad singulet / multiplet
CB1	Récepteur cannabinoïde
CDCl ₃	Chloroforme deutéré
CDK	Cyclin dependent kinase
MsCl	Chlorure de méthane sulfonyle
DA	Dopamine
DCM	Dichlorométhane
DIPEA	<i>N, N</i> -diisopropyléthylamine
DMAP	4-diméthylaminopyridine
DMAc	Diméthylacétamide
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EDCI	1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
Et ₃ N	Triéthylamine

EtOH	Ethanol
EP	Ether de pétrole
FDA	Food and drug administration
[¹⁸ F]FDG	Fluorodésoxyglucose (¹⁸ F)
GABA	Acide γ-aminobutyrique
GSK	« GlycogenSynthase Kinase »
GTPγS	Guanosine 5'-O-[gamma-thio]triphosphate
HOBT	1-Hydroxybenzotriazole
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
IFN	Interféron
IL-1b	Interleukine-1 bêta
IP3	Inositol triphosphate
K _i	Constante d'inhibition
LAH	Tétrahydroaluminat de lithium
LCMS	Liquid chromatography – Mass spectrometry
LPS	Lipopolysaccharide
MAO	Monoamine Oxydase
MeOH	Méthanol
MNDs	Maladies Neuro Dégénératives
MPTP	1-Méthyl-4-phényl-1, 2, 3, 6-tétrahydropyridine
MT	Microtubule
MTT	3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium
NaHMDS	Bis(triméthylsilyl)amidure de sodium
NFTs	Enchevêtrement neurofibrillaire « Neurofibrillary Tangles »
NMO	N-Méthylmorpholine-N-oxyde
NO	Nitric Oxyde
Pd(OAc) ₂	Palladium II acétate
Pd(PPh ₃) ₂ Cl ₂	Bis(triphénylphosphine)palladium (II) dichloride
PKC	Protéine Kinase C
PLC	Phospholipase C
PPh ₃	Triphénylphosphine
PSEN	Préséniline
RSA	Relations Structure-Affinité
RMN	Résonance magnétique nucléaire
sAPPα	Précurseur de la protéine soluble alpha-Amyloïde

SNC	Système Nerveux Central
SNP	Système Nerveux Périphérique
T3P	Anhydride propane phosphonique
TBABr	Bromure de Tetra- <i>N</i> -Butylammonium
TNF	Facteur de nécrose tumorale « tumor necrosis factor »
TFA	Acide trifluoroacétique
THF	Tétrahydrofurane
Xantphos	4,5-Bis(diphénylphosphino)-9,9-diméthylxanthène
δ (ppm)	Déplacement chimique exprimé en partie par million

Table des matières

Chapitre 1 : Introduction	1
I- La maladie d'Alzheimer	3
1- Diagnostique et physiopathologie.....	4
2- Les traitements actuels.....	7
3- Les nouvelles stratégies thérapeutiques	10
II- Les récepteurs à adénosine	21
1- L'adénosine	21
2- Classification des récepteurs à adénosine	22
3- Les récepteurs à adénosine comme cible thérapeutique.	25
2- Fonctionnement du récepteur A_{2A}	27
3- Récepteur A_{2A} et maladies associées : la maladie de Parkinson comme point de départ	31
4- La caféine comme potentiel traitement de la Maladie d'Alzheimer	33
5- Les antagonistes des récepteurs A_{2A}	37
Chapitre 2 : La famille des benzoxazoles, 1ère partie	49
I- Conception	50
1- Structure cocrystallisée de A_{2A}	50
2- Pharmacophore	51
3- Modélisation moléculaire.....	54
II- Synthèse des molécules cibles	59
1- Préparation de l'intermédiaire 2-aryl-benzoxazole (8-13)	59
2- Synthèses des analogues structuraux d'antagonistes de référence	65
3- Synthèses des molécules cibles des séries III, IV, V	71
4- Synthèses des amides (série VI) et du composé VIIa	77
III- Evaluation pharmacologique.....	78
1- Cytotoxicité.....	79
2- Mesure d'affinité.....	79
3- Relation structure-affinité	81
4- Enregistrement électrophysiologique	84
Chapitre 2 : La famille des benzoxazoles, 2ème partie	89
I- Modélisation moléculaire	90
II- Synthèses des molécules cibles.....	93
1- Synthèse des molécules issues de l'hypothèse 1	93
2- Synthèse des molécules issues de l'hypothèse 2	97

III- Évaluation des séries VIII, IX et X.....	102
1- Relation structure-affinité	102
2- Fonctionnalité des ligands benzoxazoles	107
3- Évaluation des paramètres ADME.....	110
Chapitre 3 : La famille des quinazolines	115
I- Identification de « hits » par criblage virtuel.....	116
II- Modélisation moléculaire réalisée autour du « hit » quinazoline.....	118
III- Synthèse des molécules cibles	120
1- Synthèse des molécules monosubstituées en position 4 (XIb-c)	121
2- Synthèses des composés 2-aminoquinazolines (XIIa-h).....	121
3- Synthèses des composés quinazolin-2-méthanamine (XIIIa-c).....	127
4- Synthèses des composés XIVa-o	129
IV- Evaluation des molécules cibles.	132
1- Relation structure-affinité	132
2- Évaluation des paramètres ADME.....	139
Chapitre 4 : Synthèse de sondes fluorescentes comme antagonistes des récepteurs A_{2A}..	142
I- Introduction	143
II- Synthèse et résultats	144
Conclusion et perspectives.....	150
Partie expérimentale	156
I- Chemistry.....	157
1- Synthesis of benzoxazoles (Chap.2, 1 st part)	158
2- Synthesis of benzoxazoles (Chap.2, 2 nd part)	200
3- Synthesis of quinazolines (Chap.3).....	230
4- Synthesis of antagonists probes (Chap.4)	275
II- Molecular Docking	285
III- In vitro testing.....	285
1- Displacement binding assays.....	285
2- [³⁵ S]-GTPS binding assay	285
3- Cell culture and cytotoxicity assay	286
4-ADME assessment	286
5- Blood Brain Barrier crossing	287
Bibliographie.....	288

Chapitre 1 : Introduction

Ces cinquante dernières années ont été marquées par la percée des maladies neurodégénératives. Si leur apparition ne date pas du 20^{ème} siècle, les cliniciens ont toutefois tardé à distinguer un vieillissement physiologique normal d'un vieillissement pathologique. Ainsi, avec les tumeurs cérébrales et les maladies vasculaires, les maladies neurodégénératives constituent les affections les plus fréquentes du système nerveux central.

Ces maladies, telles que la maladie d'Alzheimer, de Parkinson ou la chorée de Huntington, se caractérisent par une détérioration du fonctionnement des cellules nerveuses, en particulier les neurones, pouvant conduire à la mort cellulaire. Cette mort neuronale est plus rapide que celle observée lors du vieillissement normal et intervient dans une région précise du système nerveux central. Ces familles de maladies sont déjà fréquentes et risquent de le devenir encore plus compte tenu de l'augmentation de l'espérance de vie. Elles présentent un mécanisme pathologique commun, à savoir une agrégation et un dépôt de protéines mal repliées, provoquant la mort neuronale.

La maladie d'Alzheimer (MA) est la maladie neurodégénérative touchant le plus grand nombre de personnes. Malheureusement, les seuls traitements existant actuellement sont dits symptomatiques. Il n'existe donc pas de médicaments sur le marché permettant d'empêcher leur apparition ou leur progression. Les recherches de nouvelles cibles thérapeutiques, pour un traitement curatif, deviennent donc un enjeu majeur.

Parmi ces cibles, le récepteur à adénosine A_{2A} ($A_{2A}R$) a fait l'objet de nombreuses recherches ces dernières années. En effet, l'utilisation d'antagonistes de ce récepteur s'est montrée efficace pour le traitement de la maladie de Parkinson notamment, où plusieurs molécules ont atteint les phases cliniques. Concernant la maladie d'Alzheimer, moins de travaux ont été développés, mais de récentes études *in vivo* ont montré les effets bénéfiques de ces antagonistes pour cette pathologie. C'est pourquoi nous avons décidé de se focaliser sur cette maladie neurodégénérative. Aucune molécule n'ayant jusqu'à maintenant présentée des propriétés satisfaisantes, l'élaboration de nouveaux antagonistes des récepteurs A_{2A} reste essentielle.

Après une première partie consacrée à l'étude de la maladie d'Alzheimer, une présentation du récepteur A_{2A} et de son lien avec cette maladie sera détaillée. Les travaux menés au cours de cette thèse autour deux séries chimiques, les benzoxazoles et les quinazolines, seront ensuite présentées, de la conception par modélisation moléculaire et la synthèse jusqu'à l'évaluation pharmacologique. Enfin, une dernière partie traitera de la synthèse de sondes comme antagonistes du récepteur A_{2A} . Ce dernier travail a été réalisé au sein de l'équipe du Dr. Jacobson au NIDDK/NIH à Bethesda aux Etats-Unis dans le cadre d'une collaboration.

I- La maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative qui représente plus de 80% des cas de démences dans le monde.¹ C'est une maladie neurologique comprenant différents stades d'évolution (déclins cognitifs faibles, modérés ou sévères), en plus de certains syndromes psychologiques et comportementaux tels que la dépression, la psychose et l'agressivité.

La MA est devenue un problème majeur de santé publique avec le vieillissement de la population puisque le nombre de cas augmente de façon proportionnelle à l'espérance de vie. Ainsi, environ 200 000 personnes de moins de 65 ans présentent des symptômes de cette maladie tandis qu'au-delà de cet âge, on recense plus de 5 millions de personnes. En 2050, un nouveau cas de patient développant la MA est attendu toutes les 33 secondes, soit 1 million de nouveaux cas par an, portant ainsi le total à 13.8 millions de personnes. Ramenées à la population française, ces proportions donnent 860 000 personnes souffrant de démences de type Alzheimer. Le nombre de malades devrait atteindre deux millions en France en 2050.^{1,2}

Au stade actuel de nos connaissances, on ne sait pas guérir la MA et les traitements actuels permettent uniquement de ralentir l'évolution de la maladie. Si la durée de vie des malades est variable selon les individus, elle tend à augmenter depuis quelques années en raison de la précocité et l'efficacité du diagnostic. Actuellement, un patient atteint de la maladie meurt en moyenne dix ans après le diagnostic, période au cours de laquelle le sujet perd peu à peu son autonomie. En 2008, pour mobiliser l'effort national contre ce problème de santé publique majeur, le Président de la République Française a décidé de lancer un plan national sur 5 ans pour la maladie d'Alzheimer et les maladies apparentées, avec 3 axes majeurs : améliorer la qualité de vie des patients et de leurs familles, comprendre pour pouvoir agir et mobiliser pour un enjeu de société.

Cette maladie a été découverte par le Dr. Aloïs Alzheimer en 1901 après examen d'Auguste Deter. Cinq ans plus tard, l'autopsie du cerveau de cette patiente révéla la présence de plaques et autres écheveaux au niveau du cortex. Ce n'est que dans les années 1960 que les constituants biologiques de deux lésions caractéristiques ont été identifiés. La présence extracellulaire de plaques amyloïdes résultant de l'agrégation de peptide A β ainsi que la présence intracellulaire d'un amas anormal de neurofibrilles dû à une hyperphosphorylation de la protéine Tau ont été observées. Ces deux phénomènes conduisent à la mort neuronale. Ces deux facteurs restent les plus étudiés pour traiter la MA bien que d'autres mécanismes anormaux se produisent tels qu'un stress oxydatif chronique, un dysfonctionnement mitochondrial ou encore un phénomène d'inflammation par exemple.³

¹ Fargo K. et al., *Alzheimer's Association / Alzheimer's & Dementia*, 2014, 10, 47-92

² Alzheimer - Comprendre la maladie. <http://www.francealzheimer.org/comprendre-la-maladie> (28/05/2015)

³ Laumet G., *Thèse en Neurosciences*. Université de Lille II, 2010, 220p

1- Diagnostique et physiopathologie

Comme pour beaucoup de maladies chroniques, les causes ne sont pas clairement identifiées mais il semblerait que la MA résulte de plusieurs facteurs. L'âge est sûrement le plus reconnu car peu de personnes en dessous de 65 ans présentent cette maladie. Un facteur génétique, dû à la présence de l'apolipoprotéine E4 présents chez 40% à 65% des patients atteints de la MA est aussi considéré.⁴ De plus, plusieurs études montrent que le risque de maladies cardiovasculaires est associé au risque de développer la MA. Ainsi le tabac, l'obésité ou encore le diabète sont autant de facteurs à risque.⁵ De manière opposée, il semblerait que le nombre d'années d'études ou encore l'activité sociale et mentale au quotidien soient des facteurs limitants le développement de la MA. Cette maladie est donc la conséquence d'une combinaison de facteurs génétiques et environnementaux ainsi que du style de vie.

Généralement diagnostiqués à partir de 65 ans, les premiers signes de la MA sont souvent confondus avec les aspects normaux dus au vieillissement. En effet, les symptômes communs chez un sujet atteint de la MA sont les suivants:⁶

- La perte de mémoire qui perturbe la vie quotidienne
- Problème de planification et de résolution de problèmes
- Difficulté à remplir des tâches familières à la maison ou au travail
- Confusion avec le temps et le lieu
- Problèmes avec les mots aussi bien pour parler que pour écrire
- Perte de nombreuses choses
- Retrait dans les activités sociales
- Changement d'humeur et de personnalité, y compris l'apathie et la dépression

Les premiers diagnostics, établis par le médecin avec l'aide des proches du malade, reposent sur des tests cognitifs ainsi que sur un examen physique et neurologique.

De plus, ces dernières années, de nouveaux critères de diagnostic ont été proposés. Ainsi, des techniques d'imagerie cérébrale comme l'imagerie par résonance magnétique (IRM) ou la tomographie par émission de positon (TEP) (figure 1), peuvent respectivement mettre en évidence une atrophie de l'hippocampe et un déficit du métabolisme glucidique cérébral permettant de discriminer les patients atteints de la MA de sujets témoins.⁷ L'imagerie TEP au [¹⁸F]FDG permet par

⁴ Fratiglioni L. et al., *Ann Neurol*, 1993, 33, 258–66

⁵ <http://www.inserm.fr/thematiques/neurosciences-sciences-cognitives-neurologie-sychiatrie/dossiers-d-information/alzheimer>

⁶ <http://www.alz.org/10signs>

⁷ Querfurth H. W. et al., *New England Journal of Medicine*, 2010, 362, 329-34

exemple de visualiser l'hypométabolisme cérébral du glucose chez les patients atteints de la MA (figure 1-A).⁸ Cette baisse d'activité cellulaire est répandue dans plusieurs régions du cerveau confirmant que l'on a affaire à une maladie neurodégénérative.

L'imagerie TEP, par visualisation de différents composés se liant aux facteurs pathogènes, permet aussi d'estimer *in vivo*, la charge amyloïde présente dans le cerveau d'un patient (figure 1-B). Parmi les radio-traceurs utilisés, le C11-PIB (le composé B de Pittsburgh) est celui qui a été le plus développé.⁹

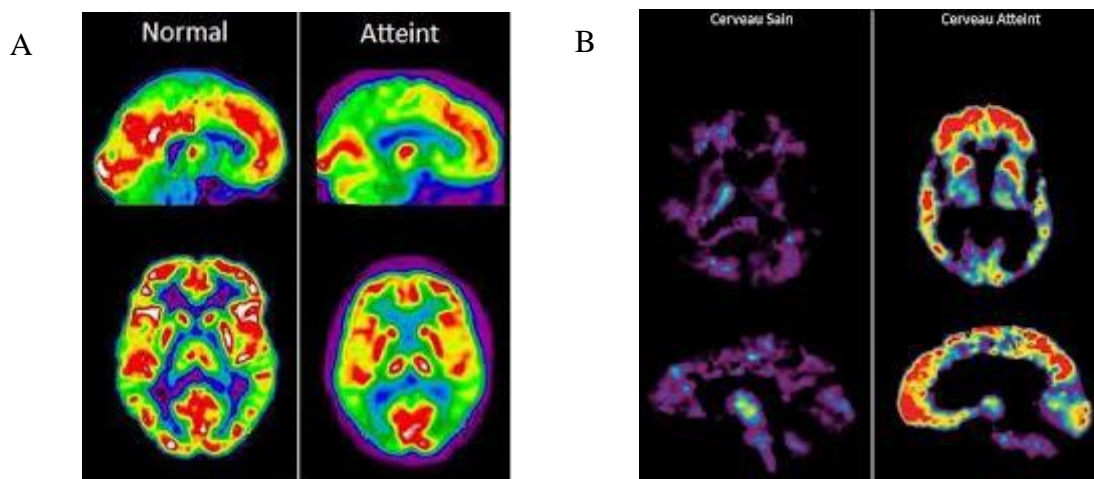


Figure 1 : (A) Représentation de la capture de glucose (rouge et jaune) ; (B) Représentation de plaque amyloïde (couleur rouge)¹⁰

Ces tests, combinés aux symptômes cités précédemment, permettent de distinguer la MA des autres types de démences. Bien que l'utilisation de ces nouveaux outils de diagnostic ne soit pas généralisée et encore trop souvent restreinte à des services spécialisés, ils constituent un espoir important dans l'amélioration du diagnostic de la MA.

A partir de ces tests, il est possible d'établir quatre stades de la MA. Le premier stade est dit de pré-démence, où l'individu ne présente pas de symptômes extérieurs (si ce n'est quelques légères pertes de mémoire) mais plutôt des changements au niveau du cerveau (détectés par IRM ou encore par le dosage de biomarqueurs comme le A β 1-42). Ce stade peut être déclaré 20 ans avant l'apparition des premiers symptômes mais est difficilement identifiable car il n'existe aucun critère pour le médecin.¹¹

⁸ Gatchel J.R. et al., *Am. J. Geriatr. Psychiatry*, 2017, 7, 683-693

⁹ Rowe C.C. et al., *Neurobiology of Aging*, 2010, 31, 1275-1283

¹⁰ Mattson M. et al., *Nature*, 2004, 430, 631-639

¹¹ Villemagne V.L. et al., *Lancet Neurol.*, 2013, 12, 357-367

Lors du deuxième stade, dit de phase initiale, des troubles légers mais cependant mesurables par les proches sont observés sans que cela n'empêche la réalisation des tâches quotidiennes. Des problèmes de mémoire récente sont principalement observés ainsi que des difficultés à se remémorer le nom des personnes ou encore la place des objets.¹²

Puis durant la phase dite modérée, le patient est incapable d'accomplir les tâches quotidiennes de la vie. En effet, une perte notable de la mémoire (le patient ne reconnaît plus les membres de la famille proche par exemple), une paraphasie et des troubles du comportement (irritabilité, humeur inconstante, agressivité, ect...) sont observés.

Enfin, le patient entre dans la phase avancée lorsque celui-ci est totalement dépendant de la famille ou du personnel soignant. Un mutisme total et une mobilité très restreinte sont alors observés.

La physiopathologie exacte de la MA reste actuellement méconnue. L'hypothèse actuelle est celle d'une cascade d'événements aboutissant à la perte synaptique et à la mort cellulaire. Outre la recherche chez l'homme, les recherches ont bénéficié des résultats obtenus sur des modèles animaux. Ces recherches ont permis d'identifier plusieurs éléments importants de cette cascade pathologique, sans pour autant pouvoir les relier de façon certaine. Cette recherche est toutefois fondamentale, car c'est la seule permettant de trouver un traitement curatif.

Il a ainsi été montré que la MA est due au développement de deux types de lésions au niveau du SNC, à savoir les dégénérescences neurofibrillaires (DNF) et les plaques amyloïdes (PA). Ainsi la prévention/destruction du dépôt de peptide A β est une des cibles les plus prometteuses pour le traitement tout comme la modulation de la phosphorylation/agrégation de la protéine Tau.¹³ Le ciblage du stress oxydatif, conséquence des plaques amyloïdes, en fait aussi une cible de par sa capacité à provoquer la mort neuronale.¹⁴

Une perte importante de neurones cholinergiques, noradrénergiques, dopaminergiques, et GABAergiques est aussi observée. Des traitements visant les neurotransmetteurs tels que des inhibiteurs de la cholinestérase et des antagonistes des récepteurs de la *N*-méthyl-*D*-aspartate (NMDA) sont actuellement les seuls utilisés afin de potentialiser l'activité neuronale.¹⁵ La MA est donc une pathologie à cibles thérapeutiques multiples comme le montre la figure 2, ce qui rend son traitement très complexe.

¹² Manly J.J. et al., *Ann. Neurol.*, **2008**, *63*, 494–506

¹³ Folch J. et al., *Neural. Plast.*, **2016**, *2016*, 8501693

¹⁴ Huang W.J. et al., *Biomed. Rep.*, **2016**, *5*, 519-522

¹⁵ Olazaran J. et al., *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.*, **2010**, *30*, 161–178

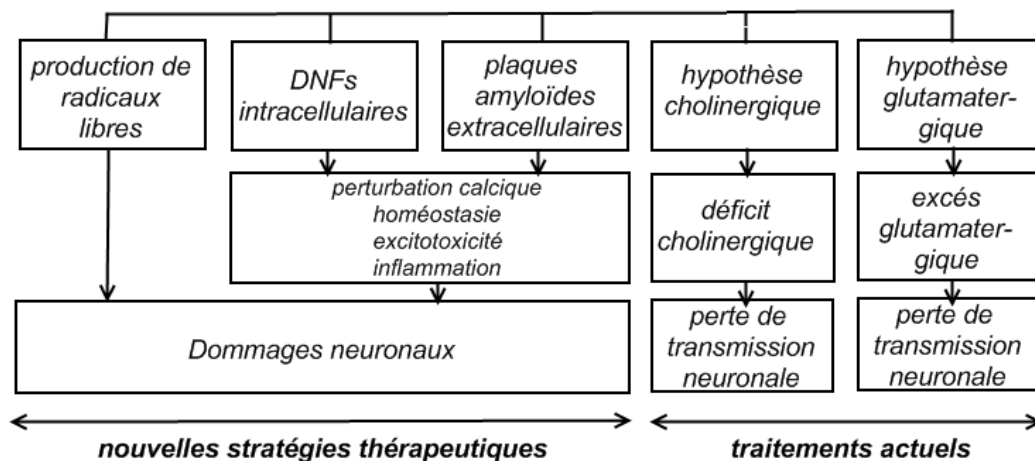


Figure 2 : Hypothèses majeures dans la maladie d'Alzheimer ¹⁶

2- Les traitements actuels

Les traitements actuels sont des traitements dit symptomatiques, prescrits pour limiter le déficit en neurotransmetteurs et ainsi retarder la progression des déficits observés. Le gain thérapeutique obtenu chez certain patients, disparaît après arrêt du traitement. Le but de ce traitement est d'une part de stabiliser ou au moins de freiner la progression de la maladie et d'autre part, d'améliorer les troubles psycho-comportementaux associés. Ces traitements jouent ainsi sur les conséquences des lésions, mais non sur leurs causes. Actuellement, seules les molécules capables d'interférer avec les systèmes cholinergiques et glutamatergiques sont utilisées en thérapie.

2-1 Les anticholinestérasiques

Les neurones cholinergiques sont les principaux neurotransmetteurs impliqués dans la MA. Ceux-ci maintiennent notamment la circulation sanguine cérébrale et jouent un rôle dans différentes tâches telles que l'apprentissage et la mémoire.¹⁷

L'acétylcholine (ACh) est synthétisée dans le neurone présynaptique à partir de choline et d'acétylcoenzyme A, par action de la choline acétyltransférase (CAT). L'acétylcholine libérée dans la fente se lie aux récepteurs post-synaptiques afin de transmettre le signal nerveux.¹⁸ Elle est ensuite rapidement métabolisée en choline par l'acétylcholinestérase (AChE), recaptée *via* un transporteur spécifique, la choline acétyltransférase (CT), et remise à disposition (figure 3).

¹⁶ Gueroux M., *Thèse en Biochimie/Chimie-Physique*. Université de Limoges, 2013, 148p

¹⁷ Deutch J.A., *Science*, 1974, 174, 788-794

¹⁸ Ferreira-Vieira T.H. et al., *Curr. Neuropharmacol.*, 2016, 14, 101-115

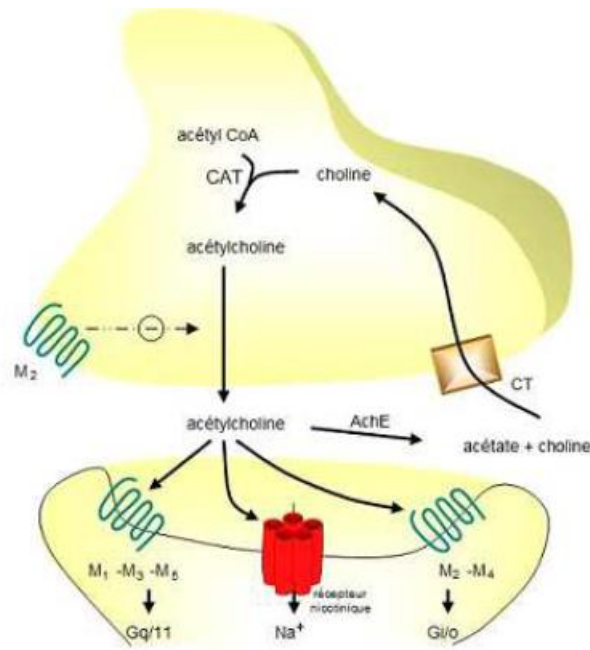


Figure 3 : Synapse cholinergique¹⁶

Dans le cas de la MA, un dysfonctionnement du système cholinergique induit une diminution de l'activité de la choline acétyltransférase, réduit "l'up-take" de la choline, la synthèse d'acétylcholine et altère le taux de récepteurs à acétylcholine.¹⁹ La présence de plaques amyloïdes en serait une des causes car celles-ci perturberaient les sites des récepteurs de la choline et interagiraient avec l'AChE. La dégénérescence neurofibrillaire semblerait aussi impliquée dans ce déficit d'influx après observation d'un enchevêtrement de neurofibrilles dans ces neurones.²⁰

Alors que différents agonistes cholinergiques (nicotinique et muscarinique) se sont révélés inefficaces, l'inhibition de l'acétylcholinestérase est aujourd'hui la seule solution thérapeutique utilisée pour compenser le déficit cholinergique. Il existe actuellement 4 inhibiteurs de l'AchE (figure 4) prescrits dans le traitement de la MA :^{21,22}

¹⁹ Unzeta M. et al., *Front. Neurosci.*, **2016**, *10*, 205

²⁰ Orta-Salazar E. et al., *Life Sci.*, **2014**, *116*, 83-89

²¹ Allain H. et al., *Clin. Pharmacol.*, **2003**, *17*, 419-428

²² Cummings J.L., *New Engl. J. Med.*, **2004**, *351*, 56-67

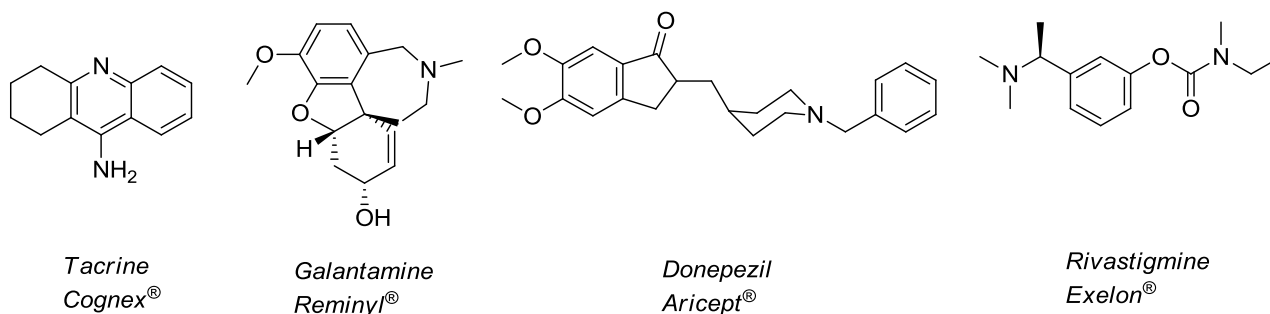


Figure 4 : Inhibiteurs de l'AchE

La tacrine, premier anticholinestérasique approuvé par la FDA en 1991, semble se fixer sur le site catalytique de l'enzyme de façon compétitive. Sa commercialisation a cependant été arrêtée pour des problèmes de toxicité hépatique.

Le donépézil, commercialisé en 1998 en France, est un inhibiteur sélectif et réversible de l'AchE faisant partie de la famille de *N*-benzyle pipéridine. La Rivastigmine est quant à lui un inhibiteur de l'AchE qui facilite la neurotransmission cholinergique en ralentissant la dégradation de l'acétylcholine.

Enfin la galantamine est un inhibiteur réversible et compétitif de l'AchE et montre une stimulation des récepteurs présynaptiques nicotiniques. Un agoniste nicotinique permet d'améliorer la mémoire, la cognition et l'attention chez les patients atteints de la MA.

Ces différents inhibiteurs de cholinestérase présentent la même efficacité et les mêmes effets secondaires (nausées, vomissements, diarrhées ou encore une agitation ou confusion chez le patient).

2-2 Les anti-glutamates

Les récepteurs du *N*-méthyl-D-Aspartate (NMDA) appartiennent à la famille des récepteurs ionotropiques au glutamate. Ces récepteurs sont présents de façon abondante et ubiquitaire au niveau du cerveau et ont un rôle crucial dans la croissance des neurones, l'apprentissage ou encore la mémoire.²³

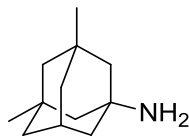
Un dysfonctionnement de l'activité de ces derniers est observé lors de la MA due à une augmentation de la concentration en glutamate et une diminution de la capture de celui-ci.²⁴ Ainsi, l'excès de glutamate, va entraîner une excitotoxicité *via* l'activation excessive des récepteurs qui lui sont associés, notamment les récepteurs du NMDA, par influx intracellulaire excessif de Ca²⁺

²³ Takai H. et al., *Exp. Mol. Pathol.*, 2003, 1, 89-94

²⁴ Zhang Y. et al., *Neurol. Sci.*, 2016, 7, 1039-1047

provoquant la mort cellulaire.²⁵ Là encore, des études ont montré la connexion entre l'amplification de l'activité de ces récepteurs et la production de peptide A β *via* une élévation du processus de clivage de l'APP.^{26,27}

La mémantine (Ebixa[®]), un antagoniste non compétitif de récepteurs NMDA, traite les symptômes cognitifs de la maladie (figure 5) en modulant l'excitotoxicité. Ce médicament, approuvé par la FDA en 2003, est utilisé pour le traitement des cas modérés à sévères de la MA. Une bithérapie avec le Donépézil améliore l'efficacité de la mémantine.²⁸ De plus, des études ont montré que le traitement avec cet anti-glutamate protège aussi les cellules de la toxicité induite par le peptide A β , diminue l'apoptose des cellules et les protège du stress oxydatif.²⁴ Les effets secondaires de la mémantine peuvent être des vertiges, des maux de tête ou encore une confusion.



Mémantine
Namenda[®]

Figure 5 : Mémantine

Le rendu des traitements actuels étant faible, la découverte de nouvelles stratégies thérapeutiques pour un traitement curatif de la maladie d'Alzheimer constitue un axe de recherche majeur.

3- Les nouvelles stratégies thérapeutiques

Les médicaments décrits précédemment montrent donc une capacité à ralentir les symptômes cognitifs et réduire les problèmes comportementaux. Cependant, toutes les personnes ne répondent pas à ce traitement. Ainsi les efforts actuels se dirigent vers des thérapies permettant de bloquer la progression de la maladie en ciblant différentes voies métaboliques.

Comme décrit par Alois Alzheimer en 1906, le cerveau d'un patient atteint de la MA présente avec abondance des plaques A β extracellulaires. De plus, un taux anormal et une hyperphosphorylation de la protéine Tau ont été rapportés comme la cause sous-jacente d'un grand nombre de maladies neurodégénératives appelées « tauopathies ». La conséquence néfaste de ce phénomène est la production d'agrégats fibrillaires et une accumulation de neurofibrilles intracellulaires insolubles. Ainsi de nouveaux candidats médicaments visant à éviter la formation de ces agrégats A β et Tau font actuellement l'objet d'études.

²⁵ Silvestrelli G. et al., *Mechanisms of Ageing and Development*, **2006**, 127, 148–157

²⁶ Dinamarca M. et al., *Front Physiol.*, **2012**, 3, 464

²⁷ Revett T.J. et al., *J. Psychiatry. Neurosci.*, **2013**, 38, 6-23

²⁸ Wang X. et al., *PLoS One*, **2015**, 12, e0145441

3-1- Stratégie visant la protéine A β

3-1-1- La cascade amyloïde

Les plaques amyloïdes sont principalement composées de fragments protéiques appelés peptides A β . Ces derniers, constitués de 39 à 43 acides aminés, sont des dérivés protéolytiques provenant de l'action enzymatique successive de la β et de la γ -sécrétase sur l'APP ("Amyloid Precursor Protein") (figure 6).²⁹

L'APP fait partie de la grande famille des protéines dites transmembranaires. Elle possède une longue partie N-terminale située dans le milieu extracellulaire et une courte région C-terminale dans le cytoplasme. Cette protéine peut être clivée selon deux voies bien distinctes. La première est la voie non-amyloïdogénique où l'APP est clivée par action de l' α et de la γ sécrétase pour donner une forme soluble de l'APP (sAPP α) qui possède des propriétés neuroprotectrices.³⁰ Cependant, son rôle en condition physiologique reste incertain mais il semblerait qu'elle joue un rôle dans la mobilité cellulaire et la régulation de la transcription. La deuxième voie est la voie amyloïdogénique où l'APP est cette fois coupé par une β -sécrétase (BACE-1). Cela génère un fragment N-terminal, le sAPP β soluble, et un fragment C-terminal, l'APP-C99, dans la membrane. Ce dernier sera à son tour dégradé par la γ -sécrétase pour produire un peptide soluble constitué de 38 à 43 acides aminés.

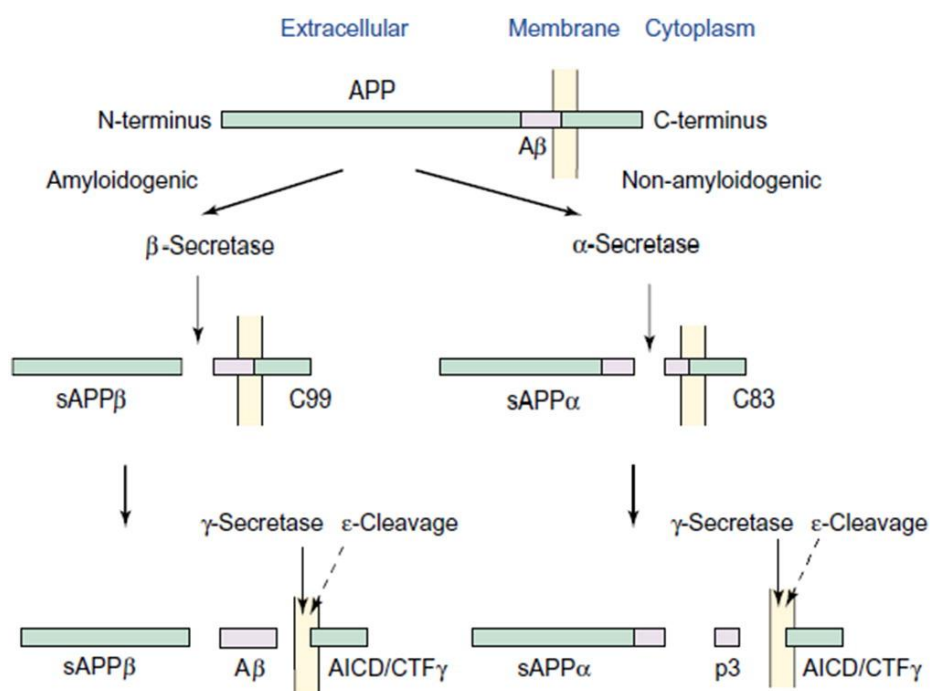


Figure 6 : La voie amyloïdogénique et la voie non amyloïdogénique ²⁹⁹

²⁹ Barage S.H. et al., *Neuropeptides*, 2015, 52, 1–18

³⁰ Kojro E. et al., *Subcell. Biochem.*, 2005, 38, 105–127

Il existe deux isoformes majoritaires selon le site de clivage sur l'APP : le peptide A β ₄₀, le plus répandu, et le peptide A β ₄₂, plus hydrophobe. Ce dernier s'agrège plus facilement que l'autre isoforme et est surtout plus toxique.³¹ Au sein des plaques, les peptides s'assemblent et se polymérisent pour apparaître sous différentes formes comme des fibrilles ou encore des oligomères polymorphiques. Ces plaques contiennent d'ailleurs majoritairement la forme à 42 acides aminés durant les stades légers et modérés de l'Alzheimer.

De plus, des évidences génétiques, biochimiques et pathologiques montrent la présence d'une cascade amyloïde (figure 7) qui supporte l'idée que l'accumulation et l'agrégation du peptide A β sont la première raison de la MA.³² Cette hypothèse de la cascade amyloïde, présentée pour la première fois par J. Hardy et J. A. Higgins en 1992³³ soutient que le dépôt de peptides A β entraîne la formation d'un enchevêtrement neurofibrillaire, la mort cellulaire et par conséquent une démence. De plus, la présence de plaque amyloïde induit des dommages oxydatifs, une hyperphosphorylation de la protéine Tau (nous reviendrons plus en détail sur ce phénomène lors du chapitre suivant), et un effet toxique sur les synapses et la mitochondrie. Les peptides A β entraînent aussi une activation de microglies qui résulte de la libération de cytokines pro-inflammatoires telles que IL-1 β , TNF- α , et IFN- γ .³⁴ Tous ces changements biochimiques vont se traduire par la perte de synapse, une perte neuronale et une atrophie cérébrale. Enfin comme évoqué précédemment, différentes hypothèses tendent à prouver que les peptides A β induisent une kinase qui, à son tour, inactive la CAT ce qui diminue la concentration d'Ach, molécule essentielle pour la mémorisation.²⁰

³¹ Walsh D.M. et al., *J. Neurochem.*, **2007**, *101*, 1172–1184

³² Chen G. et al., *Nature*, **2000**, *408*, 975–979

³³ Hardy J.A. et al., *Science*, **1992**, *256*, 184–185

³⁴ Eikelenboom P. et al., *Glia*, **2002**, *40*, 232-239

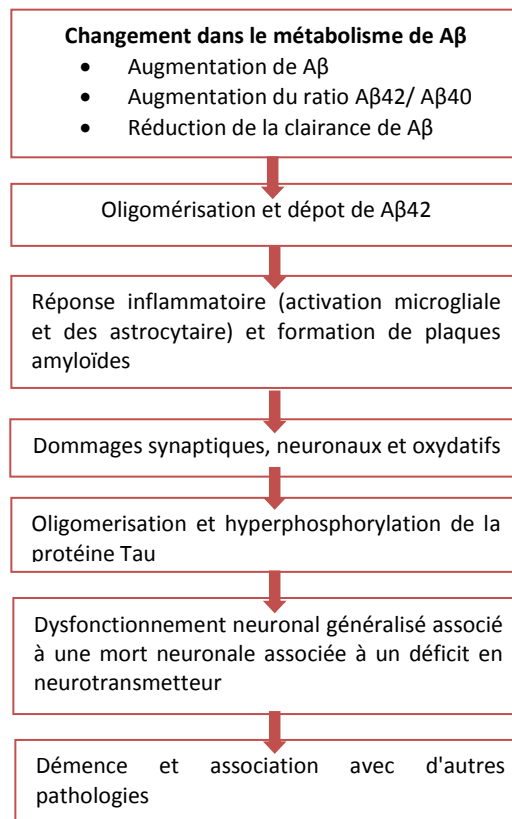


Figure 7 : L'hypothèse de la cascade amyloïde²⁹

3-1-2- Perturbation de la voie amyloïdogénique et thérapies envisagées

Différentes perturbations de cette voie telles que des mutations de l'APP, de BACE-1, des protéines PSEN1 et PSEN 2 (protéines faisant partie du complexe protéique de la γ -sécrétase), ou de l'ApoE par exemple, peuvent contribuer à une accumulation de peptides A β .³⁵ Par exemple, des mutations de l'APP et de PSEN1³⁶ ont été montrées comme une des causes de la MA car cela entraîne la production neurotoxique du peptide A β_{42} . En effet, une mutation de l'APP augmenterait l'action de la β -sécrétase qui accélère la production d'A β . L'ApoE4 est aussi considérée comme un des facteurs de risque de la MA du fait de son interaction avec A β qui va former un complexe stable et insoluble augmentant la formation des plaques amyloïdes.³⁷ De ce fait, l'augmentation de l'ApoE4 augmente l'agrégation et diminue la clairance d'A β dans le cerveau.

³⁵ Bertram L. et al., *Neuron*, **2010**, 68, 270–281

³⁶ Shen J. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2007**, 104, 403–409

³⁷ Castano E.N. et al., *J. E. Biochem.*, **1995**, 306, 599–604

Actuellement de nombreuses recherches portent sur la stratégie thérapeutique anti-amyloïde qui vise différents domaines du métabolisme de l'APP. Le but étant de diminuer la production d'A β ou d'améliorer la clairance de celui-ci.

- *Inhibition de la β -sécrétase*

La β -sécrétase, responsable de la formation du peptide A β par clivage de l'APP, présente une activité importante chez les patients atteints de la MA. Par conséquent, la conception d'inhibiteurs de cette sécrétase est l'une des voies thérapeutiques les plus étudiées et les plus prometteuses pour la MA.³⁸ Malheureusement peu d'entre eux ont atteints la phase I clinique dû à des faibles propriétés ADME et une faible efficacité *in vivo*. Seul l'inhibiteur MK-8931, développé par Merck, est toujours en phase III avec des résultats attendus pour 2018-2021.

- *Inhibition de la γ -sécrétase*

Des inhibiteurs de la γ -sécrétase ont aussi connu un certain intérêt. Des études ont montré que certains anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)³⁹ comme l'ibuprofène et l'indométacine inhibaient la synthèse d'A β 40 et A β 42 par le biais de la γ -sécrétase. S'il a été montré que ceux-ci diminuent la formation d'A β , ils ne permettent pas de détruire les plaques déjà existantes.⁴⁰ De plus, des problèmes de sélectivité ont été constatés et il semblerait que cette sécrétase soit utile pour différentes voies de signalisations notamment par une action sur la protéine Notch, responsable de la prolifération et de la croissance des neurones. Les recherches se tournent maintenant vers des modulateurs de la γ -sécrétase afin d'augmenter la formation de peptide plus court, non amyloïdogénique (A β 37 et A β 38), sans perturber d'autres voies de signalisation.⁴¹

- *Activation de l' α -sécrétase*

Si peu de recherches ont été effectuées dans ce sens, des activateurs d' α -sécrétase pourraient être intéressants, de par leur capacité à générer de l'APP soluble neuroprotecteur et de diminuer la production de peptide A β .⁴² Plusieurs médicaments, connus pour d'autres mécanismes d'action et ayant été identifiés comme pouvant stimuler cette enzyme (agonistes muscariniques, statines...) sont en phases cliniques. Seul l'Etazole (modulateur du GABA) et la Pryostatine-1 se sont montrés efficaces *via* cette voie et attendent actuellement de passer en phase III des essais cliniques.

- *Agent anti-agrégant de A β*

D'autres stratégies thérapeutiques visent plutôt l'agrégation amyloïde, notamment avec des molécules venant se lier au peptide A β pour prévenir son agrégation. Des tests sur souris ont en effet

³⁸ Ghosh A.K. et al., *J. Neurochem.*, **2012**, 120, 71-83

³⁹ Weggen S. et al., *J. Biol. Chem.*, **2003**, 278, 31831-31837

⁴⁰ Abramowski D. et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2008**, 327, 411-424

⁴¹ Bursavich M.G. et al., *J. Med. Chem.*, **2016**, 59, 7389-7409

⁴² Smith A. et al., *Int. J. Pharm.*, **2010**, 389, 207-212

montré une diminution de l'oligomère A β et par conséquent du déclin cognitif.⁴³ Un composé comme le Tramiprosate a montré des résultats encourageants avec une amélioration cognitive spécifique dans divers aspects de la mémoire et du langage.⁴⁴ Malheureusement ce composé a été arrêté en phase III.

Plusieurs études ont aussi montré l'existence d'enzymes de dégradation d'A β , telles que la neprilysin (NEP)⁴⁵ ou encore des enzymes dégradant l'insuline (IDE).⁴⁶ Une surexpression d'enzymes comme l'IDE ou la NEP permet ainsi de réduire le taux d'A β , mais aussi de prévenir partiellement ou totalement la formation de plaques amyloïdes. Cependant, aucune de ces enzymes n'a été montrée comme étant capable de détruire les plaques amyloïdes déjà formées.

Enfin, des stratégies d'immunothérapies ont été développées. L'idée consiste à vacciner les individus à partir d'oligomère A β , ce qui va induire une réponse immunitaire de l'organisme afin d'inhiber cet agrégation (immunothérapie active). Des études cliniques, dans lesquelles un vaccin immunothérapeutique (ACC-001) avec ou sans adjuvant (composé synthétique d'A β_{42}) a été administré, ont montré la production d'anticorps anti-A β et une diminution du déclin cognitif.⁴⁷

3-2- Stratégie visant la protéine tau

Les principales recherches pour développer de nouvelles stratégies contre la MA se font à partir de l'hypothèse A β . Bien que cette hypothèse soit appuyée par des preuves génétiques, le fait qu'A β soit la cause de cette pathologie reste encore discutable. De plus, le développement de stratégies ciblant ce peptide a pour le moment connu un succès limité.

Une autre cible actuellement très étudiée est la protéine tau. En effet, la MA est caractérisée par la présence intraneuronale de neurofibrilles. Celles-ci résultent d'un assemblage de protéine tau hyperphosphorylée qui constitue par ailleurs un des biomarqueurs de la MA. Une augmentation du taux de protéine tau phosphorylée tout au long des différents stades de la maladie est remarquée et corrélée à l'évolution clinique de la maladie. Toutes ces preuves constituent la base de l'hypothèse tau.⁴⁸

Différentes études tendent à montrer le lien entre le rôle de la protéine tau et le peptide A β . Le dysfonctionnement de tau, en absence de la pathologie amyloïde, est suffisant pour causer une perte neuronale et entraîner une démence clinique. De manière intéressante, il semblerait que tau soit nécessaire à la toxicité d'A β ⁴⁹, que ce soit *in vitro* ou *in vivo*, comme le montre le phénomène de

⁴³ DaSilva K.A. et al., *Exp. Neurol.*, **2010**, 223, 311-321

⁴⁴ Saumier D. et al., *J. Nutr. Health Aging*, **2009**, 13, 808-812

⁴⁵ Marr R.A. et al., *J. Mol. Neurosci.*, **2004**, 22, 5-11

⁴⁶ Vekrellis K. et al., *J. Neurosci.*, **2000**, 20, 1657-1665

⁴⁷ Pasquier F. et al., *J Alz. Dis.*, **2016**, 51, 1131-1143

⁴⁸ Pedersen J.T. et al., *Trends in Molecular Medicine*, **2015**, 6, 394-402

⁴⁹ Vessel K.A. et al., *Science*, **2010**, 330, 198

résistance des neurones sur des modèles tau knockout (KO). D'autres articles mentionnent le fait que la formation d'A β conduit à la pathologie tau en provoquant son hyperphosphorylation, même si la formation de dépôt de tau dans le cerveau précède souvent les plaques amyloïdes.⁵⁰ Enfin une dernière hypothèse est qu'A β et tau ciblent des processus cellulaires de manière synergique et potentialisent ainsi leur toxicité mutuelle.⁵¹

3-2-1- La protéine tau

La protéine tau est principalement localisée dans le cerveau (le cortex, l'hippocampe et le cervelet) et plus particulièrement dans les neurones. Elle appartient à la famille des protéines associées aux microtubules (MAPs) et joue un rôle important dans l'assemblage et la stabilisation de celles-ci.⁵² Un microtubule est un tube dont la paroi est constituée d'un assemblage de dimères de tubulines α et β reliées par des liaisons non covalentes. Cette stabilisation est importante pour l'établissement et le maintien du transport axonal et donc pour la viabilité des neurones (figure 8).⁷ La principale caractéristique de la protéine tau est la présence d'un site de liaison aux microtubules composés de 18 acides-aminés que l'on retrouve 3 ou 4 fois sur la protéine. Ces domaines sont fortement impliqués dans la stabilisation et la polymérisation des microtubules.⁵³ La phosphorylation de différents acides aminés de la protéine tau permet de réguler la fixation de celle-ci aux microtubules. Des enzymes comme la glycogène synthase kinase 3 (GSK-3 β), la kinase cycline-dépendent (CDK5) ou encore la protéine kinase (MAPK) permettent cette phosphorylation.⁵⁴ Ce caractère stabilisant de la structure microtubulaire est hautement régulé par la phosphorylation de tau. Ainsi, de manière générale, un état peu phosphorylé augmente l'affinité de tau pour les MTs alors qu'une hyperphosphorylation va tendre à la diminuer.

⁵⁰ Handoko M. et al., *Neurologie*, **2013**, 70, 594–599.

⁵¹ Rhein V. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2009**, 106, 20057-20062

⁵² Buee L. et al., *Brain Res. Rev.*, **2000**, 33, 95-130

⁵³ Goedert M., *EMBO J.*, **1989**, 8, 393-399

⁵⁴ Mazanetz M.P. et al., *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2007**, 6, 464–479

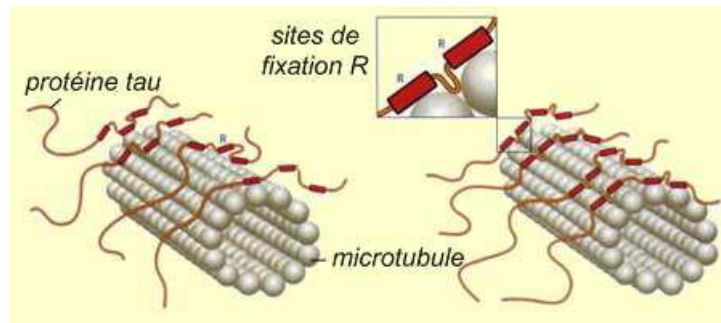


Figure 8: Fixation de tau aux microtubules via le domaine de liaison.⁶

3-2-2- Protéine tau pathologique et cible thérapeutique

Dans les conditions pathologiques de la MA, une augmentation anormale de la protéine tau hyperphosphorylée est observée. Cette dernière, insoluble dans l'eau, a une capacité à s'auto-agréger, ce qui rend inaccessible aux phosphatases un certain nombre de site de phosphorylation.⁵⁵

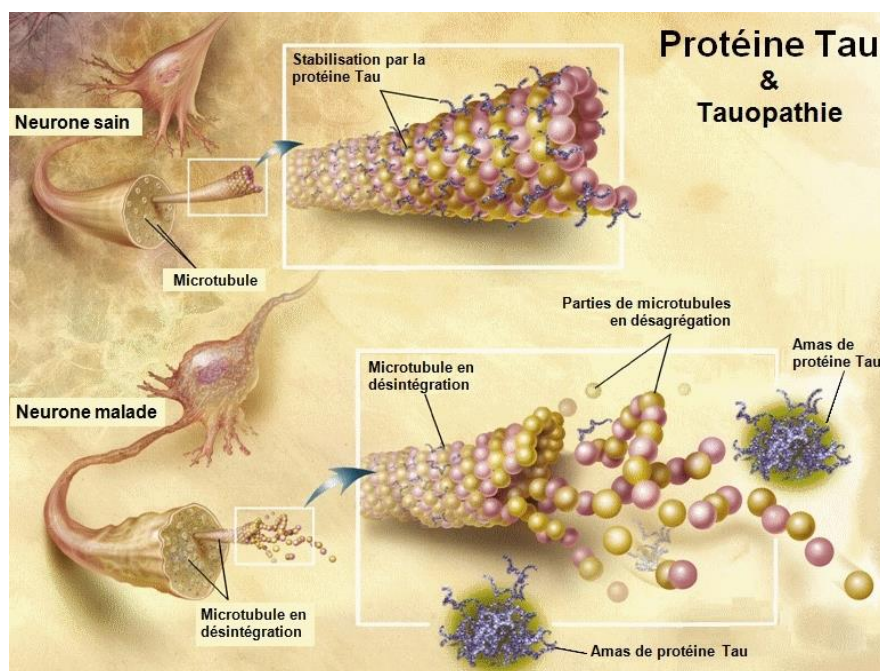


Figure 9: Implication de l'hyperphosphorylation de tau dans la dissociation des microtubules et dans la mort neuronale⁶

Ainsi, le détachement de tau des microtubules après hyperphosphorylation affecte le fonctionnement cellulaire normal des neurones (figure 9), le transport axonal et entraîne un dysfonctionnement synaptique ainsi qu'une mort neuronale. De plus, cette hyperphosphorylation permet une agrégation de ces protéines pour former un enchevêtrement de neurofibrilles qui forme

⁵⁵ Medina M. et al., *Bio. Pharma.*, 2014, 88, 540–547

le constituant principal des amas neurofibrillaires intraneuronaux.⁵⁶ Ce phénomène de dégénérescence neurofibrillaire (figure 10) va ensuite envahir le cytoplasme des neurones jusqu'à l'extrémité de leur prolongement pour entraîner leur mort. Cela se traduit cliniquement par des pertes de mémoire puis une démence.⁵⁷

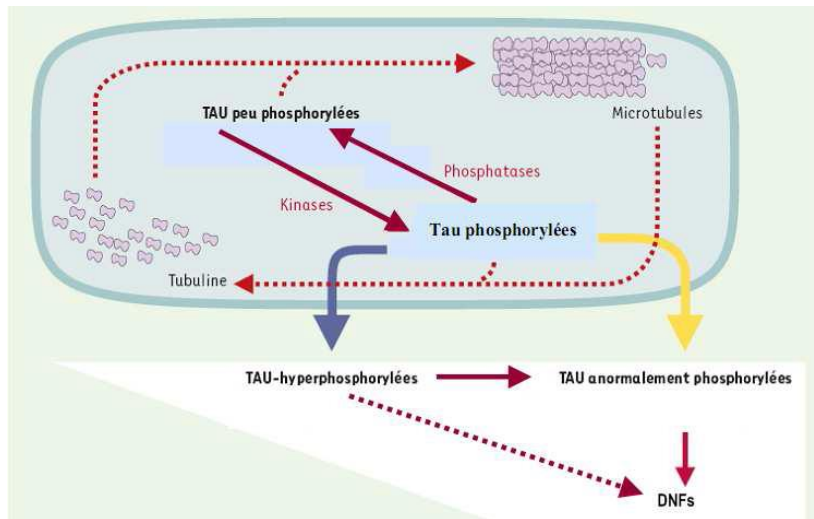


Figure 10: Phosphorylations physiologique et pathogène de la protéine tau dans la maladie d'Alzheimer.¹⁶

Différentes stratégies thérapeutiques ciblant l'hypothèse tau sont actuellement en cours d'étude. L'une d'entre elles est de moduler la phosphorylation de la protéine *via* la conception d'inhibiteurs de tau kinases hyperactivées (GSK3 et CDK5)⁵⁸, responsables de la phosphorylation. En effet, dans la MA, les kinases GSK3 et CDK5 sont très activées. La glycogène synthase kinase 3 (GSK3), une des premières enzymes impliquées dans la phosphorylation de tau, connaît un dysfonctionnement lors de la MA⁵⁹. Il a été montré que le valproate de sodium, un antiépileptique, a une action inhibitrice sur GSK3 et réduit la pathologie tau. Le tideglusib, un inhibiteur irréversible de GSK3, a montré une amélioration de la cognition, mais a été arrêté en fin de phase IIb par manque de réelle efficacité. Une autre stratégie consiste à stabiliser les microtubules. Le paclitaxel, isolé de l'écorce d'if, est connu pour améliorer le transport axonal, la densité des microtubules et la fonction motrice.⁶⁰ Cependant, le fait qu'il pénètre mal la BHE en plus d'une forte cytotoxicité limite son investigation. D'autres stratégies visant le blocage de l'oligomérisation de tau en réduisant l'interaction tau-tau ou encore en essayant d'améliorer la dégradation de tau sont en cours d'étude.⁶¹ Des dérivés du bleu de

⁵⁶ Bourdenx M. et al., *Progress in Neurobiology*, **2015**, 15, 77-85

⁵⁷ Kuret J. et al., *Microsc. Res. Tech.*, **2005**, 67, 141-155

⁵⁸ Folch J. et al., *Neural. Plast.*, **2016**, 2016, 8501693

⁵⁹ Medina M. et al., *Front. Mol. Neuro.*, **2011**, 4, 24

⁶⁰ Golde T.E. et al., *Exp. Neurol.*, **2010**, 223, 252-266

⁶¹ Takashima A. et al., *Curr. Alz. Res.*, **2010**, 7, 665-669

méthylène ont par exemple réussi à stabiliser la progression de la maladie pendant 50 semaines accompagnées d'une réduction du déficit cognitif de 90%.

Les stratégies thérapeutiques visant l'hypothèse amyloïde et tau sont résumées dans la figure 11.

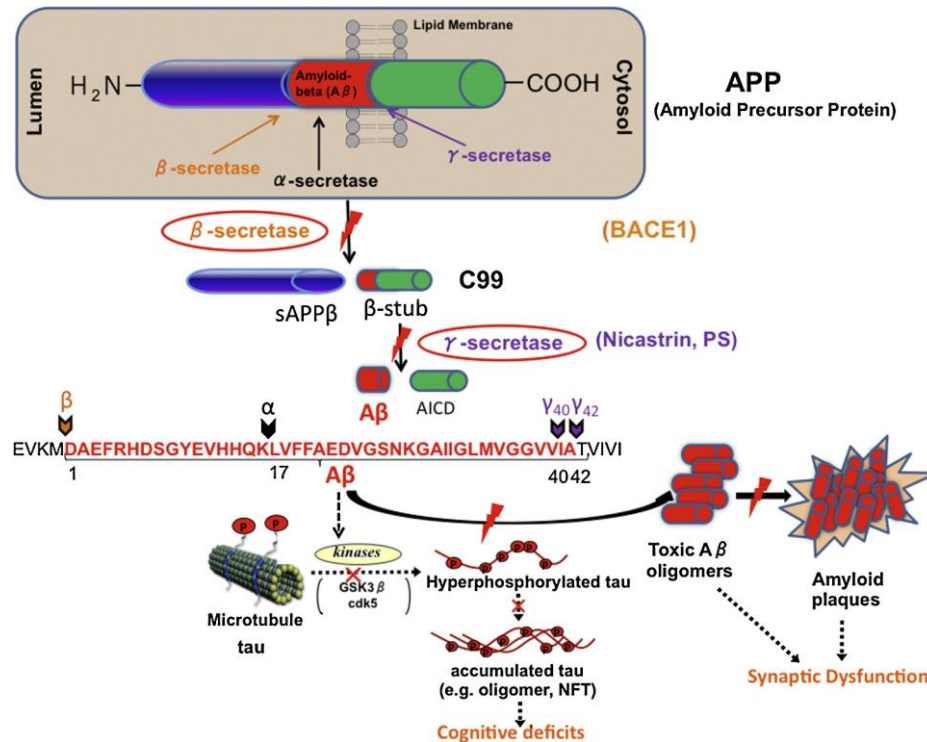


Figure 11 : Représentation des cibles thérapeutiques pour la MA : les cibles thérapeutiques qui visent la voie amyloïde sont indiquées par un éclair. Ceux visant la voie tau sont indiqués par une croix.⁵⁶

Si les hypothèses amyloïde et tau sont les deux stratégies thérapeutiques les plus étudiées et les plus prometteuses actuellement, d'autres cibles font l'objet d'études. Le ciblage du stress oxydatif ainsi que le dysfonctionnement mitochondrial en font partie. En effet, les peptides A β inhibent le fonctionnement mitochondrial et augmentent le taux de ROS (espèces oxygénées réactives) qui attaquent les enzymes, les lipides et même l'ADN, entraînant la mort des cellules.⁶² De plus, une activité inflammatoire est constatée de par la libération de cytokines pro-inflammatoires due aux peptides A β . Des thérapies anti-inflammatoires sont donc envisagées.⁶³ Il est important de noter que tous ces paramètres (A β , Tau, ROS, inflammation, etc ...) sont liés et interagissent entre eux ce qui rend la recherche d'un traitement d'autant plus complexe. Ainsi, la découverte de molécules ou de cibles pouvant avoir un impact sur ces différents facteurs pour la maladie devient une piste prioritaire.

⁶² Lee J. et al., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2009, 61, 1316-1323

⁶³ Farina N. et al., *Cochrane Database Syst. Rev.*, 2012, 11

Le rôle de l'adénosine pour les maladies neurodégénératives a récemment été étudié, notamment pour la maladie de Parkinson. En effet, les récepteurs à adénosine et plus spécialement le récepteur A_{2A} , jouent un rôle central dans la modulation du fonctionnement neuronal et ont un impact sur les différentes causes de la maladie. Ainsi, des études ont montré que des antagonistes de ce récepteur induisent une diminution du déficit cognitif, de la charge amyloïde, de la phosphorylation de la protéine tau associé à des effets neuroprotecteurs et anti-inflammatoires. Tout cela permettant une diminution de la neurodégénérescence. Les travaux présentés dans ce mémoire portent ainsi sur l'étude du blocage de ce récepteur.

II- Les récepteurs à adénosine

1- L'adénosine

L'adénosine est un nucléoside composé d'un cycle adénine attaché à un ribose (figure 12). C'est un composé essentiel à la vie, distribué dans plusieurs tissus.⁶⁴ Elle est d'abord reconnue comme régulateur physiologique du tonus coronaire en 1929. Ce n'est qu'en 1970,⁶⁵ que Sattin et Rall montrent qu'elle peut réguler le fonctionnement cellulaire *via* ses interactions avec des récepteurs spécifiques.

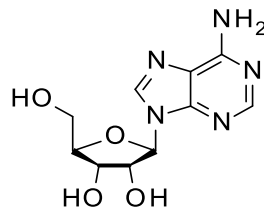


Figure 12 : Structure de l'adénosine

L'adénosine joue un rôle vital dans de nombreux fonctionnements physiologiques.⁶⁶ Elle est impliquée dans la synthèse de l'ATP, par ajout de trois groupements phosphates, et produit différents effets pharmacologiques *via* ses récepteurs, aussi bien au niveau du SNC que du SNP.⁶⁷ En effet, elle régule un certain nombre de neurotransmetteurs du SNC en jouant un rôle de neuromodulateur de l'activité neuronale. De plus, sa concentration augmente en condition ischémique, hypoxique ou inflammatoire. Son transport dans le domaine extracellulaire vers ses récepteurs est alors effectué, ce qui permet de réduire les lésions des tissus et ainsi favoriser leurs réparations.⁶⁸

L'adénosine agit directement sur une grande variété de processus synaptiques, sur des voies de signalament, en plus de jouer un rôle important sur plusieurs neurotransmetteurs du SNC. Sa libération et sa capture sont régulées par des transporteurs nucléosidiques et ses mouvements dépendent uniquement du gradient de concentration entre le cytoplasme et l'espace extracellulaire.⁶⁹ Son action est exercée par son interaction avec ses récepteurs et inhibée par action d'antagonistes sur ces derniers ou par action du système de métabolisation. L'adénosine, présente en faible concentration dans le milieu extracellulaire, peut être formée dans les sites intra- et extracellulaires (figure 13). Deux substrats, l'AMP et la S-adénosyl homocystéine, sont impliqués dans

⁶⁴ Seth S. et al., *Int. J. Mol. Sci.*, **2014**, *15*, 2024-2052

⁶⁵ Sattin A. et al., *Mol. Pharmacol.*, **1970**, *6*, 13-23

⁶⁶ Sashdeva S. et al., *Saudi Pharm. J.*, **2013**, *21*, 245-253

⁶⁷ Matsumoto T. et al., *Pharmacol. Res.*, **2012**, *65*, 81-90

⁶⁸ Linden J. et al., *Mol. Pharmacol.*, **2005**, *67*, 1385-1387

⁶⁹ Boison D. et al., *Neuropharmacology*, **2012**, *62*, 1527-1543

sa synthèse. En milieu intracellulaire, l'adénosine est rapidement phosphorylée pour donner l'AMP ou subit une désamination pour donner l'inosine. Ce contrôle enzymatique permet de réguler sa concentration intracellulaire.⁷⁰

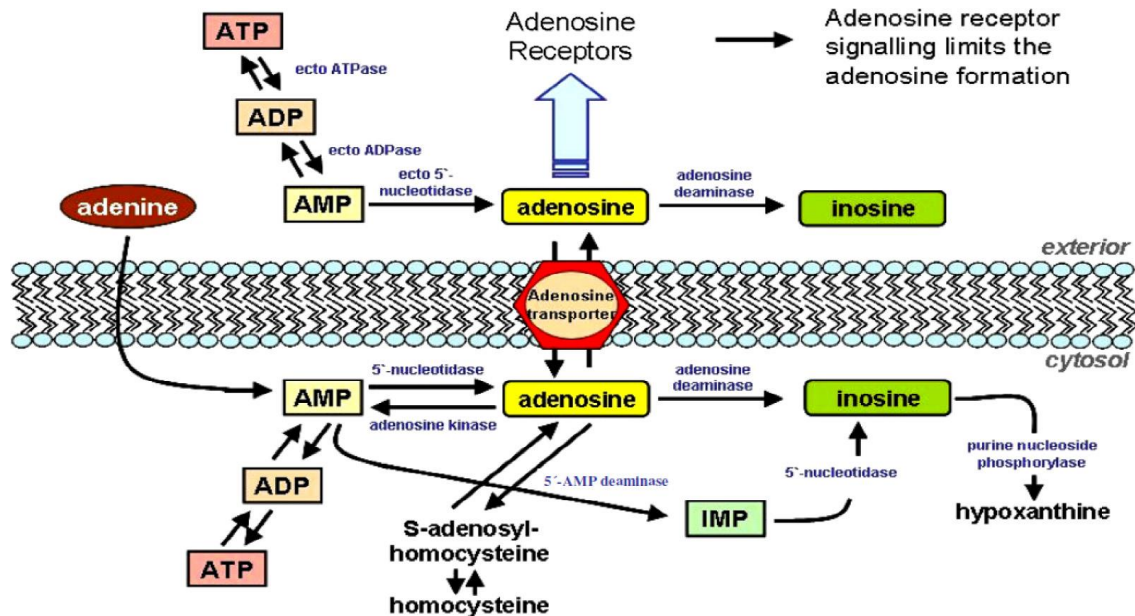


Figure 13 : Formation et catabolisme de l'adénosine⁶⁶

Il y a trois systèmes permettant l'inactivation de l'adénosine dans les tissus : l'adénosine désaminase (ADA), l'adénosine kinase (AK) et le système de capture. Ainsi, l'inhibition de ces enzymes a reçu une attention particulière. Par exemple, l'inhibition de l'AK permet une neuroprotection dans le domaine de la douleur et de l'inflammation. De plus, en condition d'hypoxie, le ciblage de la cascade enzymatique responsable de la forte concentration observée d'adénosine fait l'objet de recherche.⁷¹

2- Classification des récepteurs à adénosine

Les récepteurs purinergiques, reconnus en 1978, ont tout d'abord été classés en deux sous-types : P₁ et P₂. P₁ reconnaît l'adénosine comme principal ligand tandis que P₂ (P2X et P2Y) reconnaît des ligands tels que l'ATP, l'ADP, l'UTP, l'UDP ou encore d'autres dinucléotides.⁷² Ces récepteurs sont à leur tour divisés selon leurs propriétés biochimiques, moléculaires et selon leurs évidences pharmacologiques. Ils appartiennent tous à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Les membres de cette famille présentent une architecture moléculaire similaire. Ceux-ci se caractérisent par une structure avec sept hélices α transmembranaires avec un domaine

⁷⁰ Zhou Y. et al., *Pharmacol. Ther.*, **2009**, 123, 105-116

⁷¹ Mark A. et al., *Bioorg. Med. Chem.*, **2007**, 15, 1586-1605

⁷² Ralevic V. et al., *Circ. Res.*, **1991**, 69, 1583-1590

extracellulaire comprenant la partie N-terminale avec trois boucles extracellulaires et un domaine intracellulaire comprenant la partie C-terminale et trois boucles intracellulaires.⁷³

Les récepteurs P₁, appelés récepteurs à adénosine après identification du ligand endogène, comprennent quatre sous types de récepteurs : A₁, A_{2A}, A_{2B} et A₃ et sont présents dans différentes régions du corps (tableau 1).⁷⁴

Récepteur	A ₁	A _{2A}	A _{2B}	A ₃
Distribution (SNC)	Cortex cérébral ; hippocampe, thalamus, moelle épinière	Striatum	Uniforme (faiblement abondant)	Hippocampe (faiblement abondant)
Autres principaux sites	Yeux, glandes surrénales, foie, rein	Thymus, leucocyte, plaquette sanguine	Colon, vessie, poumon	Testicules, mastocytes
Protéine G	G _{i/o}	G _s , G _{olf}	G _s , G _q	G _i , G _q
Effets	↓ AMPc ↑ IP ₃ ↑ K ⁺ ↓ Ca ²⁺	↑ AMPc	↑ AMPc ↑ IP ₃	↓ AMPc ↑ IP ₃
Ki (nM) adénosine	70	1500	5100	6500

Tableau 1 : Distribution, effets et affinité des récepteurs à adénosine⁷³

Chacun de ces récepteurs a été classé après clonage, selon le profil d'activité agoniste ou antagoniste, le couplage à la protéine-G ou encore le système effecteur. L'adénosine et ses agonistes sont capables de moduler l'activité de l'adénylate cyclase (AC), qui produit l'AMP cyclique (AMPc). Ces différents récepteurs peuvent avoir des effets stimulateurs ou inhibiteurs sur cette enzyme.

Ainsi, les récepteurs A₁ et A₃ sont préférentiellement couplés aux protéines G_i, pour inhiber l'action de l'AC et donc la production d'AMPc. Les récepteurs A_{2A} et A_{2B} stimulent, eux, la production d'AMPc par couplage aux récepteurs G_s et G_o (tableau 1).

Si ces récepteurs se retrouvent dans plusieurs organes, chacun va se retrouver dans des sites préférentiels. Ainsi le récepteur A₁ (A₁R) se trouve principalement au sein du SNC, notamment dans le néocortex, l'hippocampe, le cervelet mais aussi la moelle épinière ou encore le muscle cardiaque.⁷⁵ L'adénosine présente la plus grande affinité pour ce récepteur. Son activation, en plus d'inhiber l'AC, inhibe des canaux calciques voltage dépendants couplés aux protéines G (figure 14).

⁷³ Jacobson K.A. et al., *Neuropharmacology*, **2016**, 104, 31-49

⁷⁴ Livingston M. et al., *Inflamm. Res.*, **2004**, 53, 171-178

⁷⁵ Yuzlenko O. et al., *Curr. Med. Chem.*, **2006**, 13, 3609-3625

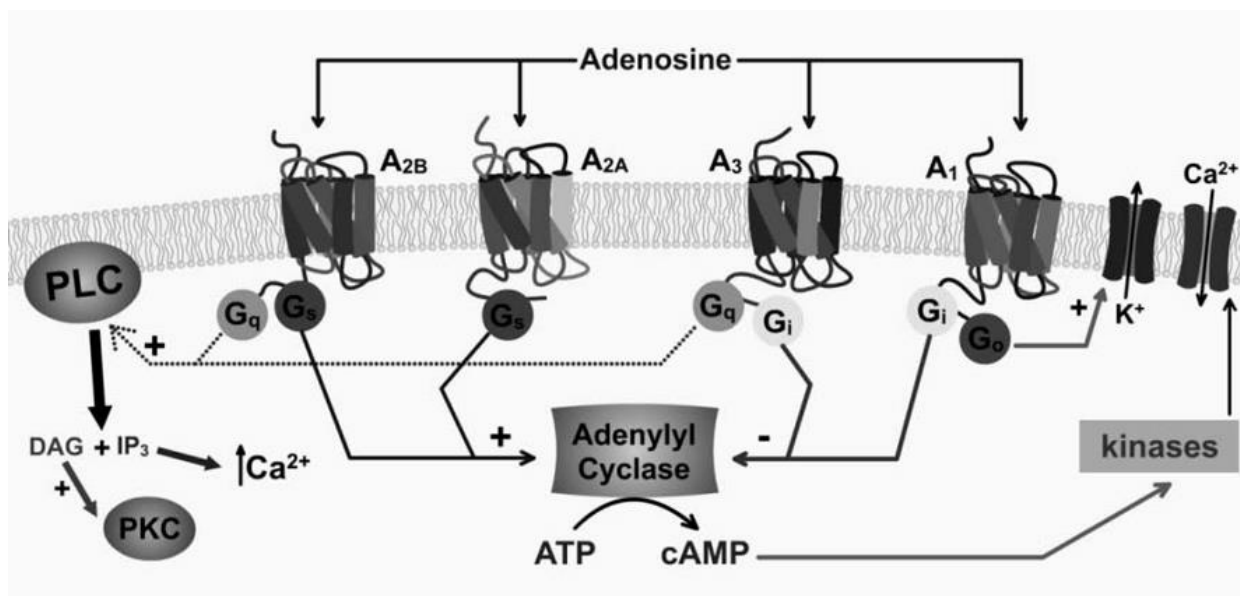


Figure 14 : Représentation schématique des voies de signalisation des récepteurs à adénosine⁷⁶

Les récepteurs A₂ (A₂Rs) sont plus présents que les A₁Rs puisqu'on les retrouve dans les terminaisons nerveuses pré- et post-synaptiques, les mastocytes, le muscle lisse bronchique et les leucocytes circulants. Le A_{2A}R est fortement présent dans les neurones striataux mais faiblement exprimé dans les neurones extérieurs au striatum et dans les cellules gliales tandis que A_{2B} est fortement exprimé dans le tractus gastro-intestinal, la vessie et les poumons. Ces deux récepteurs sont différenciés de par leur affinité avec le ligand endogène. A_{2A}R est surtout associé à des protéines G_s au niveau périphérique et à une protéine G_{olf} dans le striatum tandis que A_{2B}R peut stimuler l'AC et la phospholipase C par activation respective de G_s et G_q.⁷⁷

Le récepteur A₃ est largement distribué puisqu'on le retrouve dans les reins, les testicules, les poumons, les mastocytes, le cœur ou encore le cortex cérébral. Son activation se traduit également par la libération de calcium à partir de réserves intracellulaires. Il présente généralement de grandes différences dans la structure, la distribution tissulaire et dans ses propriétés fonctionnelles et pharmacologiques par rapport aux autres récepteurs.⁷⁸

⁷⁶ Cristalli G. et al., *Curr. Pharm. design*, **2008**, *14*, 1525-1552

⁷⁷ Boison D. et al., *Neuropharm.*, **2012**, *62*, 1527-1543

⁷⁸ Jacobson K.A., *Trends Pharmacol. Sci.*, **1998**, *19*, 184-191

3- Les récepteurs à adénosine comme cible thérapeutique.

Le potentiel thérapeutique des récepteurs à adénosine (ARs) a été évalué pour la première fois en 1930 pour le traitement de la tachycardie supraventriculaire. L'adénosine est impliquée dans de nombreuses maladies dont les plus importantes sont la maladie de Parkinson (MP), l'ischémie et l'inflammation.⁷⁹ L'activation des ARs permet une cytoprotection dans plusieurs organes et tissus. Le taux extracellulaire d'adénosine peut augmenter en condition de stress hypoxique. Les ARs vont alors s'adapter à ces conditions et leur réponse permet une augmentation des besoins énergétiques, le pré-conditionnement ischémique, l'inhibition de la libération de neurotransmetteurs toxiques ou encore la diminution de la réponse inflammatoire.⁸⁰

De nombreuses études sur ces quatre récepteurs à adénosine ont été réalisées. Ainsi, la synthèse de ligands sélectifs a permis d'étudier et de prouver l'efficacité thérapeutique de chacun de ces récepteurs pour différentes applications. Il est à noter qu'un même ligand pourrait être sélectif d'un des récepteurs pour une espèce donnée (humaine par exemple) mais pas sur une autre (souris par exemple).⁸¹ De même l'affinité pour un même récepteur peut changer selon l'espèce étudiée. Par conséquent, des précautions doivent être prises lors de la caractérisation et l'utilisation de ces ligands pour des expériences pharmacologiques.

L'adénosine, elle-même, a pendant longtemps été utilisée comme seul agoniste en thérapeutique. L'utilisation pour le traitement de la tachycardie paroxysmale supraventriculaire de l'Adenocard®, *via* l'activation de A₁R, est ainsi largement répandue.⁸² L'adénosine est aussi étudiée pour ses propriétés cardioprotectives et neuropathiques. De plus, une activation des A₁Rs s'est aussi montrée utile sur des modèles d'arythmie cardiaque, d'ischémie et de douleur.⁸³ Un agoniste de A_{2A}R présente tant qu'à lui des effets anti-inflammatoires⁸⁴ et un effet immunosuppresseur, tandis qu'un agoniste de A₃R est proposé pour le traitement de l'inflammation auto-immune ou encore pour l'ischémie cardiaque (tableau 2).⁸⁵

⁷⁹ Chen J.F. et al., *Nat. Rev. Drug Disc.*, **2013**, *12*, 265-286

⁸⁰ Fredholm B.B. et al., *Pharmacol. Rev.*, **2001**, *53*, 527-552

⁸¹ Muller C.E. et al., *Biochim. Biophys. Acta Biomembranes*, **2011**, *1808*, 1290-1308

⁸² Hutchinson S.A. et al., *Front. Med. Chem.*, **2006**, *3*, 125-156

⁸³ F. Ochoa-Cortes et al., *Inflamm. Bowel Dis.*, **2014**, *20*, 1259-1287

⁸⁴ Palmer T.M. et al., *J. Pharmacol.*, **2008**, *153*, 527-534

⁸⁵ Guzman J. et al., *Inflamm. Bowel Dis.*, **2006**, *12*, 766-789

Ligands	Récepteurs	Intérêts thérapeutiques
Agonistes	A ₁	Blocage des nœuds auriculo-ventriculaire et tachyarythmie supraventriculaire
	A _{2A}	Troubles respiratoires, thrombose, hypertension, troubles inflammatoires
	A _{2B}	Réaction allergique, cardioprotection
	A ₃	Ischémie cardiaque, arythmie, inflammation
Antagonistes	A ₁	Infarctus du myocarde inférieur, arrêt cardiaque, insuffisance rénale.
	A _{2A}	Maladie de Parkinson, maladie d'Alzheimer, neurodégénérescence
	A _{2B}	Asthme, inflammation pulmonaire
	A ₃	Glaucome

Tableau 2 : Potentiels thérapeutiques des ligands des RAs

Pour ce qui est des antagonistes, les premières recherches se sont basées sur l'étude de la caféine et de la théophylline, qui sont des antagonistes non sélectifs des ARs. Le rôle de la caféine se situe principalement au niveau du SNC. Elle est principalement connue pour contrer la fatigue et restaurer la vigilance, ou encore limiter la douleur (migraine, maux de tête).⁸⁶ La théophylline peut, elle, être utilisée comme substitut de la caféine pour la prévention de l'apnée du sommeil chez les adultes et le prématuré. Des antagonistes des A₁Rs ont montré une efficacité sur l'insuffisance cardiaque et rénale.⁸⁷ Plusieurs antagonistes de A_{2A}R ont été évalués cliniquement pour le traitement de la MP et leurs potentiels d'action concernent les maladies neurodégénératives comme la MA ou encore la dépression sont actuellement en cours d'étude.⁸¹ Les antagonistes de A_{2B}R présentent un intérêt pour le traitement de l'asthme tandis que le blocage des A₃Rs aurait une activité anti-glaucomateuse.⁸⁸

Du fait d'un intérêt croissant de ce récepteur pour les maladies neurodégénératives, notamment la MA, nous nous sommes intéressés au récepteur A_{2A} et notamment aux antagonistes de celui-ci.

⁸⁶ Fredholm B.B. et al., *Pharmacol. Rev.*, **1999**, 51, 83-133

⁸⁷ Dhalla A.K. et al., *Curr. Top. Med. Chem.*, **2003**, 3, 369-385

⁸⁸ Che J. et al., *Mol. Pharmacol.*, **2007**, 72, 1626-1636

2- Fonctionnement du récepteur A_{2A}

2-1- Voie biochimique

Plusieurs études reportent que les A_{2A}Rs se trouvent dans un grand nombre d'organes incluant le cœur, le foie ou encore les poumons. Leur présence dans le cœur, et plus précisément dans les tissus ventriculaires et dans les vaisseaux coronaires, permet de réguler la vasodilatation.⁸⁹ On les retrouve aussi dans différentes régions du cerveau comme le striatum, le noyau accumbens, le tubercule olfactif, le cortex et l'hippocampe où ils modulent la libération de neurotransmetteurs tels que le glutamate, l'acétylcholine ou encore le GABA. Le rôle de ce récepteur a ainsi été démontré dans le développement neuronal, la neuroprotection et dans différentes fonctions homéostatiques.⁹⁰ De plus, une forte expression de A_{2A}R a été trouvée dans les plaquettes, les leucocytes, les muscles vasculaires lisses et les cellules endothéliales, avec pour conséquence une forte implication dans la régulation de la réponse inflammatoire.⁸⁹

La voie de signalisation utilisée par le récepteur A_{2A} dépend du type de cellules et de tissus où le récepteur est localisé. Elle dépend aussi de la protéine G impliquée et de la kinase présente dans la cellule.

L'activation de ce récepteur A_{2A} provoque un échange entre la guanosine diphosphate (GDP) et la guanosine triphosphate (GTP). Cette dernière se lie à la sous-unité α , qui se dissocie de l'hétérodimère $\beta\gamma$. De par le couplage du récepteur avec la protéine G activatrice, l'activité de l'AC est stimulée, permettant la production d'AMPC, qui active la protéine kinase A (PKA).⁹¹ Cette PKA phosphorylée va ensuite activer différents récepteurs comme des canaux ioniques, des phosphodiésterases ou encore la protéine CREB. L'activation de cette dernière montre l'activité anti-inflammatoire du A_{2A}R de par sa capacité à inhiber l'activité du facteur nucléaire kB (NF-kB) ainsi que l'expression de cytokines. De plus, l'activation des A_{2A}Rs stimule la formation de PLC qui module la formation d'inositol phosphate, augmente le calcium intracellulaire et active des PKC.⁹²

Dans le système nerveux périphérique, l'activation de la protéine G_s, entraîne une vasodilatation des artères coronaires et de l'aorte, et inhibe l'agrégation plaquettaire. Dans le striatum, les A_{2A}Rs stimule G_{olf}, un autre membre de protéine G activatrice couplée à l'AC.⁹³

⁸⁹ Fredholm B.B. et al., *Curr. Top. Med. Chem.*, **2002**, 3, 1349-1364

⁹⁰ Peterfreund R.A. et al., *J. Neuro.*, **1996**, 66, 362-368

⁹¹ Fredholm B.B. et al., *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **2000**, 362, 364-374

⁹² Marala R.B. et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1993**, 266, 294-300

⁹³ Fredholm B.B. et al., *Progr. Neuro.*, **2007**, 83, 263-276

2-2- Homo- et hétérodimérisation du récepteur A_{2A}

Depuis plusieurs années, il a été reporté un grand nombre de récepteurs, notamment des RCPGs, capables de former des multimères et/ou des dimères.

Des techniques de bioluminescence (BRET) ont montré l'existence d'une interaction A_{2A}R-A_{2A}R qui représente une forme fonctionnelle du récepteur sur la membrane plasmique.⁹⁴ De plus, il est connu que le récepteur A_{2A} forme des hétérodimères avec d'autres récepteurs à adénosine ainsi qu'avec les récepteurs à dopamine D₂ et aux cannabinoïdes CB₁.⁹⁵ Cette interaction allostérique entre deux récepteurs peut ainsi modifier les paramètres pharmacologiques de chacun de ces récepteurs pris séparément, et ce, pour un même ligand. Ainsi, un antagoniste A_{2A} pourrait présenter une différence d'affinité pour un "même" A_{2A}R, pris dans différents hétérodimères.^{96,97}

Le récepteur A_{2A} est principalement exprimé dans le striatum et joue un rôle important dans la transmission dopaminergique de par sa co-localisation avec les récepteurs D₂ dans les neurones GABAergique postsynaptiques.⁹⁸

Cette interaction A_{2A}R-D₂R est responsable de la diminution et de l'augmentation de l'activité motrice par action respective d'agonistes et d'antagonistes A_{2A}Rs (figure 15). En effet, il a été observé chez l'animal que les agonistes de A_{2A} diminuent l'affinité du récepteur D₂ pour la dopamine. En contrepartie, les antagonistes du récepteur A_{2A} potentialisent les effets du récepteur D₂ dans l'activité motrice *via* la libération de neurotransmetteurs. De ce fait, l'action d'un antagoniste A_{2A} présente un effet thérapeutique intéressant pour le traitement de la MP.⁹⁹

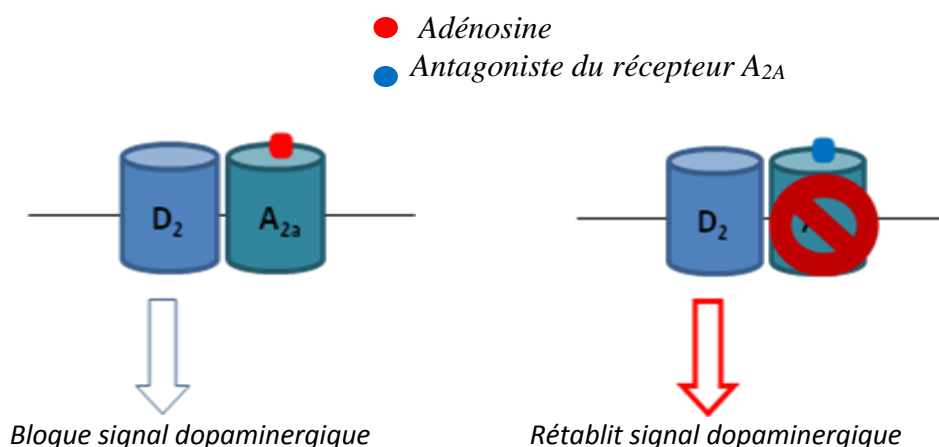


Figure 15 : Action d'un agoniste ou d'un antagoniste du A_{2A}R sur le signal dopaminergique

⁹⁴ Ciruela F. et al., *Trends Biotechnol.*, **2010**, 28, 407-415

⁹⁵ Cristovao-Ferreira S. et al., *Purinergic Signal*, **2013**, 9, 433-449

⁹⁶ Ferre S. et al., *Trends Neurosci.*, **1997**, 20, 482-487

⁹⁷ Bonaventura J. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2015**, 112, 3609-3618

⁹⁸ Schiffmann S.N. et al., *Prog. Neurobiol.*, **2007**, 83, 277-292

⁹⁹ Tozzi A. et al., *J. Neurosci.*, **2011**, 31, 1850-1852

Il est à noter que la composition présynaptique et postsynaptique des hétéromères des A_{2A}R diffère. Au niveau post-synaptique, outre son interaction avec le D₂R, A_{2A}R peut aussi former un hétérodimère avec le CB₁R.¹⁰⁰ L'effet d'un antagoniste A_{2A}R aura le même effet qu'un antagoniste CB₁. En effet, la diminution de motricité induite par un agoniste CB₁ est contrecarrée par la présence d'un antagoniste de l'un des deux récepteurs. Cependant, il a été prouvé sur modèles animaux qu'une administration combinée d'un antagoniste A_{2A} avec un antagoniste CB₁ ne présentait pas de meilleurs résultats que pour un antagoniste A_{2A} seul.¹⁰¹

Les A_{2A}Rs sont aussi localisés dans les terminaisons glutaminergiques pré et postsynaptiques, où ils forment un hétérodimère avec le récepteur A₁, et régulent ainsi la libération de glutamate.¹⁰² Il a été constaté une régulation croisée entre les deux récepteurs de cet hétérodimère. Sachant que l'adénosine présente une affinité plus importante pour A₁ que A_{2A}, de faibles concentrations de celle-ci activeraient le récepteur A₁ et les mécanismes inhibiteurs associés à sa protéine (inhibition de neurotransmission glutamatergique). A l'inverse, de fortes concentrations du neuromodulateur activeraient plutôt le récepteur A_{2A} qui, de par la régulation croisée diminuerait l'activité d'A₁ (facilite la libération de glutamate, et par conséquent favorise l'excitotoxicité neuronale). Cela s'expliquerait du fait qu'en présence d'un agoniste des A_{2A}Rs, l'affinité du A₁R pour son agoniste diminue. L'action d'un agoniste des A₁R n'ayant pas d'effet sur A_{2A}R, il semble clair que le A_{2A}R régule l'activité de cet hétérodimère (figure 16).¹⁰³ La présence d'antagoniste A_{2A} permet donc d'avoir un effet neuroprotecteur vis-à-vis de la toxicité du glutamate.

¹⁰⁰ Ferré S. et al., *J. Neurochem.*, **2016**, *136*, 897-899

¹⁰¹ Cerri S. et al., *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **2014**, *73*, 414-424

¹⁰² Ciruela F. et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **2011**, *1808*, 1245-1255

¹⁰³ Fredholm B.B. et al., *Biochem. Pharmacol.*, **2001**, *61*, 241-248

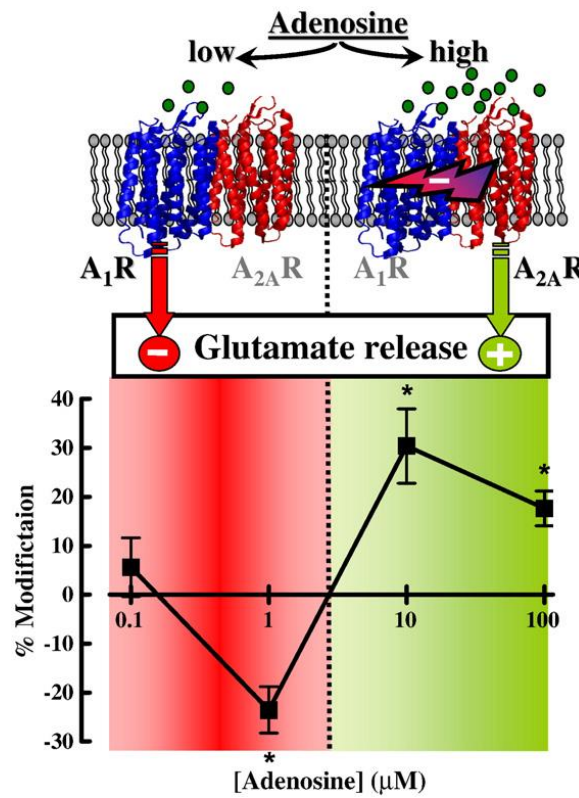


Figure 16 : Représentation du lien entre la concentration en adénosine et la libération de glutamate par action sur l'hétérodimère A_1/A_{2A} .¹⁰²

Enfin, la colocalisation du récepteur glutamate métabotrope type 5 (mGlu₅) avec le A_{2A}R au sein du striatum (figure 17) fait état d'une possible interaction entre ces deux récepteurs.¹⁰⁴ L'utilisation d'agonistes et d'antagonistes de ce récepteur produit les mêmes effets que sur le A_{2A}R, permettant ainsi le contrôle de l'activité motrice *via* son interaction avec le récepteur D₂.¹⁰⁵ Des études récentes ont montré que ces deux récepteurs interagissaient de façon synergique dans la modulation du récepteur D₂.¹⁰⁶ Peu de travaux ont été effectués sur ce récepteur pour la MA mais il semblerait que celui-ci puisse moduler la neuroinflammation ainsi que la mort neuronale.¹⁰⁷ L'utilisation d'antagonistes du récepteur mGlu₅ et/ou d'antagonistes mixtes A_{2A}/mGlu₅ pourrait donc être une piste pour le traitement de la MP.

¹⁰⁴ Hettinger B.D. et al., *J. Comp. Neurol.*, **2011**, 431, 331-346

¹⁰⁵ Ossowaska K. et al., *Neuropharmacology*, **2001**, 41, 413-420

¹⁰⁶ Beggiato S. et al., *J. Neurochem.*, **2016**, 138, 254-264

¹⁰⁷ Kumar A. et al., *Front. Neurosci.*, **2015**, 9, article 215

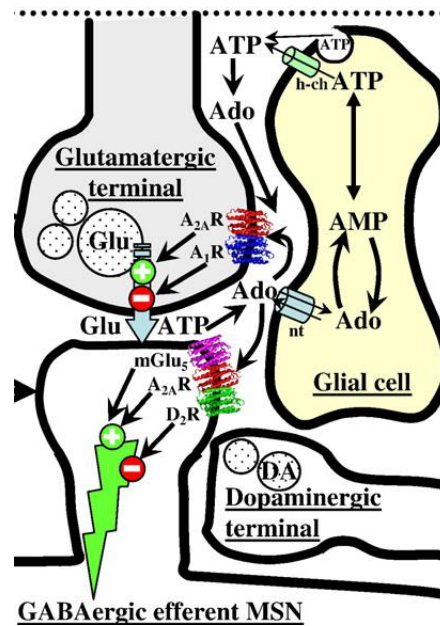


Figure 17 : Hétérodimères du récepteur A_{2A} ¹⁰²

Ces différents résultats mécanistiques révèlent le potentiel du récepteur A_{2A} en tant que modulateur de la transmission synaptique *via* notamment la formation d'hétérodimères.

3- Récepteur A_{2A} et maladies associées : la maladie de Parkinson comme point de départ

Le rôle de l'adénosine est clairement identifié pour de nombreuses maladies touchant au cerveau. Les récepteurs A_1 et A_{2A} sont reconnus comme des cibles thérapeutiques d'intérêt notamment de par leurs capacités à contrôler la libération de glutamate qui est souvent associée à une excitotoxicité. Ces propriétés neuroprotectrices se sont révélées intéressantes *in vivo* lors d'une ischémie, une épilepsie ou encore pour la maladie d'Huntington et de Parkinson.¹⁰⁸

Un autre mécanisme pour expliquer cette activité neuroprotectrice serait le contrôle des microglies impliquées dans la régulation de la neuroinflammation. Le biomarqueur de cette neuro-inflammation est l'activation gliale (microglie et astrocyte).¹⁰⁹ Brièvement, la microglie est une population de cellules gliales constituées de macrophages présents au niveau du cerveau et de la moelle épinière formant la principale défense immunitaire active du SNC. Lors de maladies du SNC, l'activation de ces dernières entraîne une production de facteurs neurotrophiques (développement des tissus neuronaux) et neurotoxiques. Cette activation va en outre contribuer aux dommages neuronaux *via* la libération de facteurs pro-inflammatoires et toxiques tels que le $TNF-\alpha$, IL-1 ou encore des ROS et le monoxyde d'azote. Or, des études montrent clairement le rôle du $A_{2A}R$ dans ce mécanisme

¹⁰⁸ Kalda A. et al., *J. Neurol. Sci.*, 2006, 248, 9-15

¹⁰⁹ Kreutzberg G.W. et al., *Trends Neurosci.*, 1996, 19, 312-318

d'activation de la microglie en condition pathologique. Ainsi des antagonistes de ce récepteur permettraient d'atténuer l'expression de médiateurs pro-inflammatoires (NO et TNF) et de réguler des gènes reconnus (LPS) pour induire une réponse pro-inflammatoire dans le cerveau.¹¹⁰

L'utilisation des antagonistes du récepteur A_{2A} a dans un premier temps été particulièrement étudié dans le cadre de la maladie de Parkinson. Cette dernière se caractérise par un dépôt d'agrégats dus à une accumulation anormale de protéines mutées (α -synucléine), qui forment des corps de Lewy.¹¹¹ Ces derniers entraînent une activation du processus d'inflammation, un dysfonctionnement mitochondrial associé à un stress oxydatif et une mort neuronale. La MP se traduit ainsi par une perte de dopamine endogène au niveau du striatum due à la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la substance noire.¹¹¹

Les symptômes cliniques de la MP sont une bradykinésie, une akinésie, une raideur, des tremblements au repos et une altération de la posture de marche.¹¹²

Les médicaments actuellement sur le marché sont des précurseurs de la dopamine, des agonistes dopaminergiques ou des inhibiteurs des enzymes de dégradation de la dopamine. Cependant, ces traitements symptomatiques présentent deux problèmes majeurs : leurs effets secondaires (problèmes moteurs incluant une dyskinésie) et une incapacité à stopper le processus de neurodégénérescence.¹¹³

Des études ont dans un premier temps été réalisées à partir de la caféine (antagoniste non sélectif du A_{2A}R). Ainsi, une réduction de 50% du risque de développer la MP a été observée chez les personnes consommant entre 2 et 4 tasses de café par jour par rapport à ceux qui n'en consomment pas.¹¹⁴ En effet, la prise de caféine améliore l'activité motrice grâce à une activité neuroprotectrice et neurorestauratrice. De plus, une diminution de la perte des neurones dopaminergiques associée à une diminution de la réponse inflammatoire et de la production de monoxyde d'azote a été constatée lors de l'action de la caféine sur les A_{2A}Rs.¹¹⁵ Enfin, sur modèle animaux, une protection vis-à-vis de la toxicité induite par la neurotoxine MPTP, empêchant par conséquent la mort des neurones dopaminergiques, a été observée.

Comme vu précédemment, le récepteur dopaminergique D₂ au niveau du cerveau se retrouve principalement sous forme d'hétérodimère avec A_{2A}. Ces deux récepteurs présentent des fonctions antagonistes réciproques; un antagoniste des A_{2A}R ayant le même effet qu'un agoniste des D₂Rs. Par

¹¹⁰ Madeira M.H. et al., *Mediators of Inflammation*, **2017**, 2017, 12 pages

¹¹¹ Braak H. et al., *Neurobiol. Aging*, **2003**, 24, 197-211

¹¹² Dauer W. et al., *Neuron*, **2003**, 39, 889-909

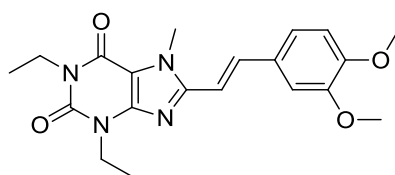
¹¹³ Gomes C.V. et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **2011**, 1808, 1380-1399

¹¹⁴ Ascherio A. et al., *Ann. Neurol.*, **2001**, 50, 56-63

¹¹⁵ Salvemini D. et al., *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **2013**, 304, 473-487

conséquent, la diminution du taux de dopamine pourrait aussi être due à une augmentation de la concentration en adénosine, observée lors de la MP. Le blocage de A_{2A} apparaît donc comme une piste thérapeutique intéressante.¹¹⁶

Plusieurs antagonistes ont été jusqu'en phases cliniques II et III. Ils ont montré une amélioration des effets moteurs sans présenter de dyskinésie, principal effet secondaire des agonistes dopaminergiques. L'istradefylline (figure 18), seul antagoniste A_{2A} commercialisé (au Japon uniquement), administré en présence d'une faible dose de levodopa, potentialise l'activité motrice sans présenter de dyskinésie.¹¹⁷ D'autres symptômes comme la bradykinésie, la rigidité musculaire et les tremblements au repos ont aussi diminué.



Istradefylline (KW-6002)

Figure 18 : Structure de l'Istradefylline

En conclusion, le blocage de ces récepteurs réduit la perte des neurones dopaminergiques et augmente la concentration en dopamine au sein du striatum. De plus, une activité neuroprotectrice *via* l'inhibition de la libération de glutamate associée à une inhibition de l'activité gliale ainsi que l'inhibition de la MAO-B (qui permet d'augmenter le taux de dopamine), fait du A_{2A}R une piste clinique pour un traitement curatif de la MP.¹¹⁸ Bien que des similitudes existent entre la MA et la MP, moins de recherches ont été effectuées sur la possible utilisation d'antagonistes des A_{2A}R pour le traitement de la MA. Cependant de plus en plus de preuves tendent à prouver l'utilité de ces ligands pour le traitement de cette maladie.

4- La caféine comme potentiel traitement de la Maladie d'Alzheimer

Comme pour la maladie de Parkinson, beaucoup d'études sont basées sur la molécule de caféine. Ce psychostimulant contenu dans le café est connu pour sa capacité à moduler des fonctionnements comportementaux tels que la vigilance, l'attention ou encore l'humeur ainsi que l'amélioration cognitive.⁸⁶ Depuis plusieurs années, il a été prouvé le rôle prépondérant de la caféine pour l'amélioration de la mémoire et de l'apprentissage à travers différents tests comportementaux.¹¹⁹

C'est ainsi que de nombreuses études ont décrit le lien entre la consommation de café, le déclin cognitif et la maladie d'Alzheimer. En effet, plusieurs études épidémiologiques ont prouvé que des

¹¹⁶ Shook B.C. et al., *ACS Chem. Neurosci.*, **2011**, 2, 555-567

¹¹⁷ M. Morelli, et al., *Handb. Exp. Pharmacol.*, **2009**, 193, 589-615

¹¹⁸ Petzer J.P. et al., *Neurotherapeutics*, **2009**, 6, 141-151

¹¹⁹ Flaten V. et al., *Biochem. Soc. Trans.*, **2015**, 42, 587-592

personnes buvant entre 3 et 5 tasses de cafés par jour (~300 mg/j) présentaient moins de risques de développer la MA (estimé à 65%) que ceux qui en consomment peu ou pas.¹²⁰ De même, cette prise de café est associée à une diminution du déclin en ce qui concerne la mémoire verbale et visuelle chez les personnes de plus de 65 ans. De manière très intéressante, il a été prouvé lors d'autopsie, qu'une personne consommant cette quantité de café au cours de sa vie présentait beaucoup moins de lésions liées à la MA, de lésions ischémiques microvasculaires, de corps de Lewy ou encore d'atrophie généralisée.¹²¹

Il est maintenant bien établi que l'effet exercé par la caféine dans le cerveau dépend de sa capacité à bloquer les récepteurs A_{2A} et A_1 . De plus durant le vieillissement, il a été démontré une surexpression du récepteur A_{2A} , son expression étant deux fois plus importante chez un rat âgé que chez un jeune rat. Cette surexpression, observée dans les cellules microgliales de l'hippocampe et du cortex cérébral, se traduit par un déficit comportemental notamment une perte de mémoire spatiale.¹²² De ce fait, l'utilisation d'antagonistes de ces récepteurs, aussi bien naturelle comme la caféine que synthétique apparait comme une solution pour le traitement de la MA.

Si le mécanisme d'action de ce récepteur reste à prouver, plusieurs évidences tendent à montrer le lien entre ce récepteur à adénosine et les pathologies Tau et Amyloïde.¹²³

4-1- A_{2A} et la pathologie amyloïde

Dans un premier temps, le lien entre la pathologie amyloïde et le récepteur A_{2A} a dû être prouvé. Pour cela, des études ont été réalisées sur des souris transgéniques présentant la mutation "Swedish" (APPSw), qui se traduit par une surexpression du précurseur APP. La caféine, mise en solution dans l'eau, est donnée aux souris pendant une période de 4 à 9 mois avec pour concentration 300 mg/L d'eau bue, correspondant environ à 500 mg/jour de caféine pour un humain, soit l'équivalent de 5 tasses.¹²⁴ Des tests de mémoire ont montré une amélioration significative par rapport aux souris transgéniques sans caféine ajoutée. De plus, il a été observé une diminution de la charge amyloïde au niveau de l'hippocampe ($A\beta_{40}$ et $A\beta_{42}$) et une réduction de l'expression de la β -sécrétase et de la Presenillin 1. Bien que la densité des récepteurs n'ait pas diminué, la concentration d'adénosine est redevenue normale. De manière importante, il a aussi été constaté qu'à un stade avancé de la pathologie (18 mois), un traitement de 4 semaines par la caféine renverse le déficit mémoriel et réduit la charge amyloïde.¹²⁵ Pour être plus complet, des études ont montré qu'une prise aigüe de caféine réduit rapidement le taux d' $A\beta$ chez des souris jeunes et âgées. Une prise

¹²⁰ Eskelinen M.H. et al., *J. Alz. Dis.*, **2009**, *16*, 85-91

¹²¹ Gelber R.P. et al., *J. Alz. Dis.*, **2011**, *23*, 607-615

¹²² Diogenes M.J. et al., *Neuropsychopharmacology*, **2011**, *36*, 1823-1836

¹²³ Kolahdouzan M. et al., *CNS Neurosci. Ther.*, **2017**, *23*, 272-290

¹²⁴ Arendash G.W. et al., *Neuroscience*, **2006**, *142*, 941-952

¹²⁵ Arendash G.W. et al., *J. Alz. Dis.*, **2009**, *17*, 661-680

chronique de caféine, montre pour sa part, aussi bien une diminution d'A β soluble que du dépôt qui s'est formé dans différentes régions du cerveau.¹²⁶ De plus, dans des modèles de souris A_{2A} KO, l'administration d'A β ne cause pas de déficit d'apprentissage ou une synaptotoxicité (figure 19).

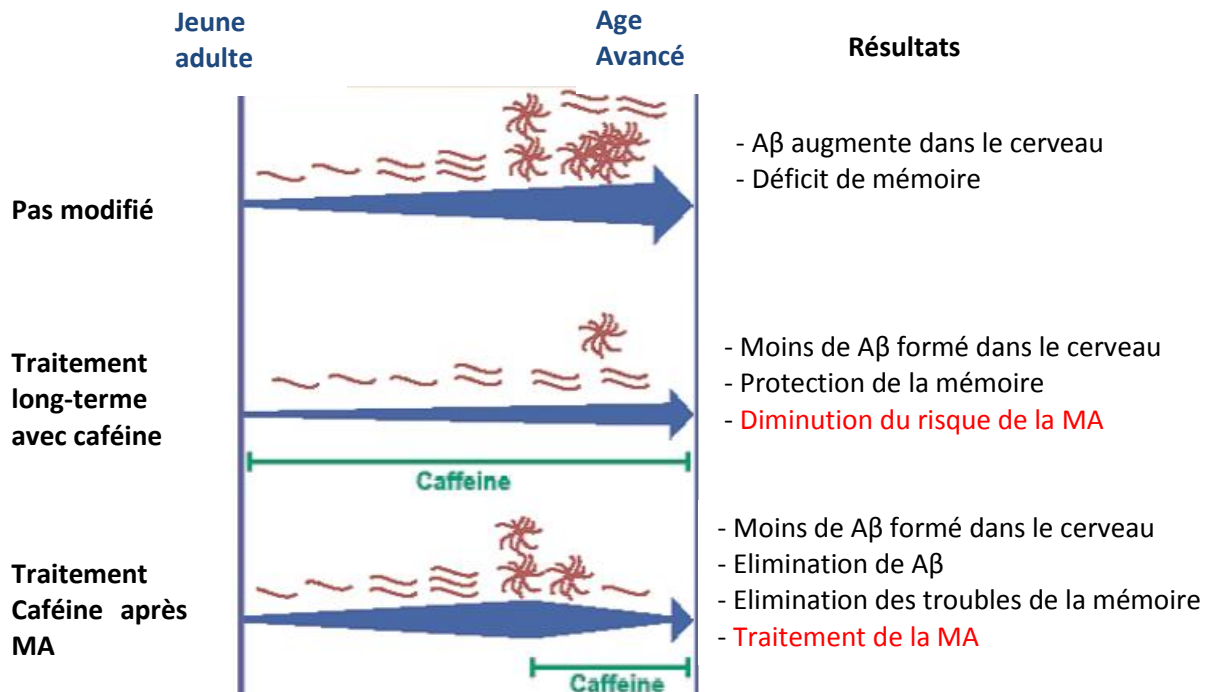


Figure 19 : Représentation de l'effet de la caféine pour la pathologie amyloïde¹²⁶

Plus récemment, des études sur un autre modèle souris d'amyloïdogenèse (APP/PS1) ont montré l'implication du A_{2A}R.¹²⁷ Cette mutation entrainerait un déficit de mémoire dû à une augmentation du récepteur A_{2A} qui serait restauré par l'action d'antagonistes de ces récepteurs.

Enfin, les effets neuroprotecteurs induits par ces antagonistes protégeraient de la toxicité d'A β . Cela proviendrait d'une part, de la capacité du récepteur à contrôler la production de radicaux libres ainsi que l'excitotoxicité du glutamate et d'autre part, à limiter la réponse pro-inflammatoire régulée par les microglies.¹²⁸ Aussi, PM Cana¹²⁹ a mis en évidence que le contrôle de cette neurotoxicité par le récepteur A_{2A} se ferait par la phosphorylation de la p38 MAPK qui ne serait ainsi plus activée par A β . Enfin, une déficience mémorielle causée par l'administration de scopolamine (un antagoniste cholinergique des récepteurs muscariniques) a été limitée par la prise de caféine.¹³⁰ Cela confirme l'hypothèse selon laquelle les récepteurs à adénosine peuvent aussi corriger l'hypofonctionnement cholinergique, associé à une perte de mémoire.

¹²⁶ Arendash G.W. et al., *J. Alz. Dis.*, 2010, 20, 117–126

¹²⁷ Viana da Silva S. et al., *Nature com.*, 2016, 7, 11915

¹²⁸ Almeida C.G. et al., *Neurosci. Lett.*, 2003, 339, 127–130

¹²⁹ Canas P.M. et al., *J. Neurosci.*, 2009, 29, 14741–14751

¹³⁰ Rodrigues R.J. et al., *Neurobiol. Aging*, 2008, 29, 1597–1601

4-2- A_{2A} et la pathologie Tau

Peu de corrélations entre A_{2A} et la pathologie tau sont répertoriées. Ce n'est que très récemment que D. Blum a montré le rôle du A_{2A}R sur la pathologie tau.¹³¹ Ses études ont porté sur l'observation de souris THY-Tau22 (modèle de souris pour l'agrégation tau) présentant un déficit de mémoire. Alors que la suppression du A_{2A}R ne conduit pas à des changements en terme d'apprentissage et de mémoire chez les animaux WT, la suppression du gène codant pour le A_{2A}R a permis une protection contre les déficits de mémoire spatiale. En effet, une thérapie orale utilisant un antagoniste A_{2A}R a montré une amélioration de la mémoire même après le début de la pathologie. Cela supporte l'idée que ces antagonistes peuvent être efficaces pour prévenir mais aussi pour inverser les déficits. De plus, alors qu'une diminution de la phosphorylation de la protéine Tau chez les souris THY-Tau22 en présence de MSX-3 (antagoniste A_{2A}) est montrée, aucune modification sur l'agrégation de ces protéines n'a été observée. L'amélioration de la mémoire semble donc être principalement due au changement d'état de phosphorylation dans ce cas présent. Cette diminution serait la conséquence d'une inhibition de la kinase GSK3 β qui va être phosphorylée et donc inactive pour phosphoryler la protéine Tau.

De plus, cette diminution entrainerait une réduction de la neuro-inflammation de l'hippocampe. En effet, il est connu que l'activation de cytokine pro-inflammatoire entraine une hyperphosphorylation de la protéine *via* l'activation de différentes kinases. Dès lors, l'action d'antagonistes modulerait ces kinases et donc la libération de facteurs pro-inflammatoires. Aussi, le blocage de ces récepteurs permettrait une régulation de la libération du glutamate. En effet, au niveau des synapses, une légère mais significative augmentation du taux de glutamate est observée chez ces souris transgéniques. En bloquant le récepteur A_{2A}, une augmentation de la concentration de GABA a été observée, permettant une normalisation du ratio glutamate/GABA. Cette normalisation permet une neuroprotection associée à une amélioration de la mémoire. Le potentiel bénéfique des antagonistes A_{2A}R sur la pathologie tau a été récemment appuyé par Zhao ZA.¹³²

Le blocage des récepteurs A_{2A} s'avère donc être une piste thérapeutique très intéressante pour le traitement de la MA. Comme il a été montré au cours de ce chapitre, la capacité de la caféine ou d'autres antagonistes du A_{2A}R à améliorer le dysfonctionnement mémoriel, se fait sous différentes conditions pathologiques. Cela semble donc indiquer que ce récepteur peut avoir un impact sur la préservation de la mémoire de manière générale sans cibler sélectivement un mécanisme

¹³¹ Laurent C. et al., *Molecular Psychiatry*, 2016, 21, 97-101

¹³² Zhao Z.A. et al., *Transl. Psychiatry*, 2017, 7, e1123

pathologique précis de la MA, mais en ciblant plusieurs mécanismes (figure 20)¹³³ ce qui rend ce récepteur particulièrement intéressant pour le traitement de cette maladie multifactorielle..

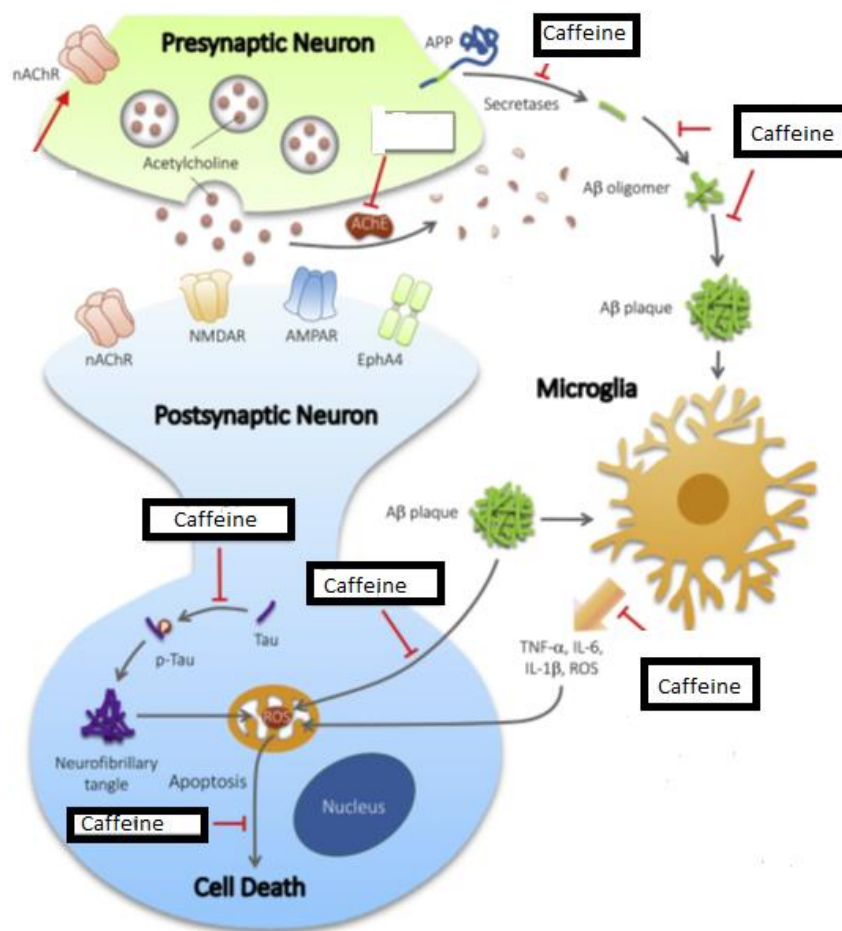


Figure 20 : Différents mécanismes d'action de la caféine pour la MA¹³³

5- Les antagonistes des récepteurs A_{2A}

La conception d'antagonistes des récepteurs A_{2A} a été particulièrement étudiée depuis presque 30 ans notamment pour leur activité antiparkinsonienne. Ainsi, de nombreux antagonistes sont répertoriés dans la littérature. Contrairement aux agonistes, les antagonistes des A_{2A}Rs ne présentent pas la fonction ose et possèdent en général une structure mono-, bi- ou tricyclique pour mimer la partie adénine de l'adénosine. Ces composés sont classés en deux familles : les dérivés dits "xanthines-like", dérivés de la caféine et les dérivés dits "non-xanthine-like". Nous présenterons dans ce chapitre différentes classes d'antagonistes en se basant sur plusieurs revues parues sur le sujet.^{134,135,136,137} La sélectivité sera principalement étudiée vis-à-vis de A₁ étant donné que ce dernier

¹³³ Ng Y.P. et al., *Neurochem. Int.*, **2015**, 89, 260-270

¹³⁴ Muller C.E. et al., *Recent Patents on CNS Drug Discovery*, **2007**, 2, 1-21

est largement présent dans le cerveau comparé à A_{2B} et A₃. De plus, il est généralement plus difficile d'être sélectif vis-à-vis de ce récepteur par rapport aux deux autres.

5-1- Les dérivés xanthines

Le « scaffold » xanthine a été un point de départ pour la mise au point d'antagonistes du A_{2A}R. La caféine exerce son activité pharmacologique en bloquant avec une faible affinité les récepteurs A₁, A_{2A} et A_{2B} de manière non sélective. Le premier antagoniste décrit avec une affinité nanomolaire et sélectif pour A_{2A}R est un dérivé de la caféine, le 8-phényl-1,3-dipropylxanthine (**XAC**) (figure 21). Différentes modulations notamment l'ajout d'une chaîne styryle en position 8 de la xanthine ont permis la synthèse d'antagonistes très intéressants tels que le **CSC**, l'istradefylline (**KW-6002**) et le **MSX-2**. Ce dernier a ensuite conduit au **MSX-3**, qui est une prodrogue permettant d'améliorer la solubilité du **MSX-2**. Il est à noter que l'istradefylline est le seul antagoniste A_{2A} qui a obtenu une autorisation pour son utilisation comme médicament antiparkinsonien au Japon.

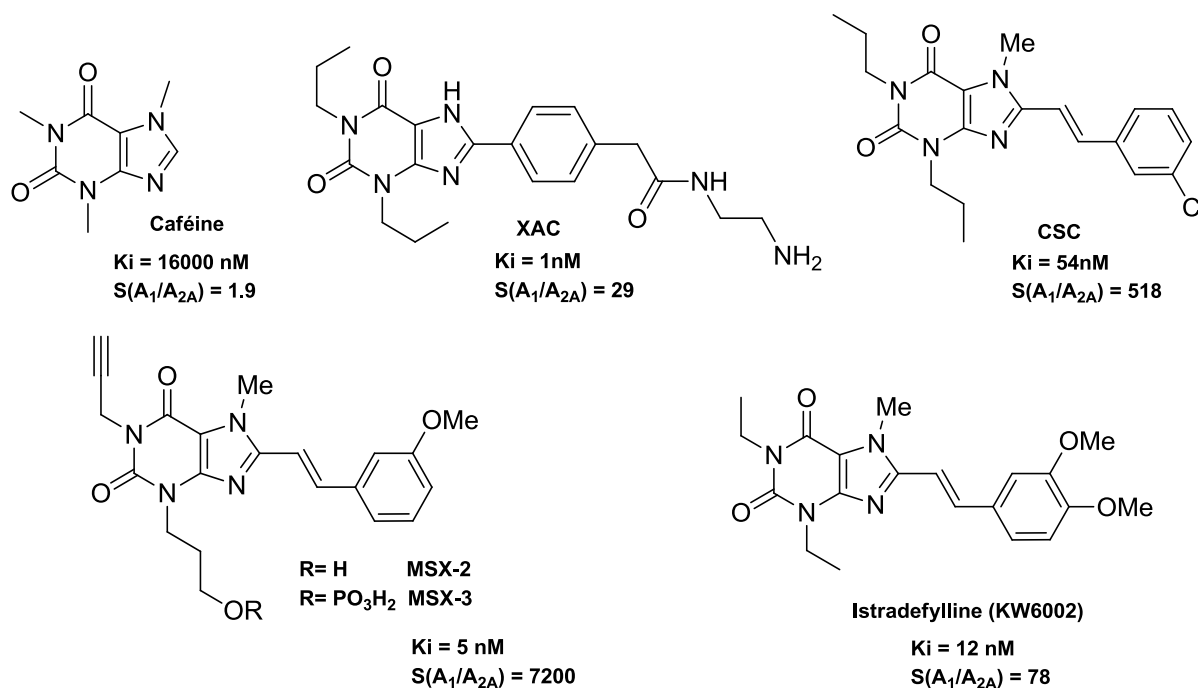


Figure 21 : Ligands de type « xanthine »

Le **CSC**, en plus de son activité antagoniste des récepteurs A_{2A}, s'est aussi révélé être un inhibiteur de la MAO-B (IC₅₀ = 70 nM). Cette activité a pu contribuer au potentiel antiparkinsonien de cette molécule car l'inhibition de cette enzyme augmente le taux de dopamine dans le SNC tout en empêchant le mécanisme de stress oxydatif qui contribue à la neurodégénération. Les autres dérivés styrylxanthine présentent aussi cette activité inhibitrice mais de manière moins importante (par

¹³⁵ Ng Y.P. et al., *ACS Chem. Neurosci.*, **2011**, 2, 555–567

¹³⁶ Ruiz M. de L. et al., *J. Med. Chem.*, **2014**, 57, 3623–3650

¹³⁷ Preti D. et al., *Med. Res. Review*, **2015**, 35, 1–59

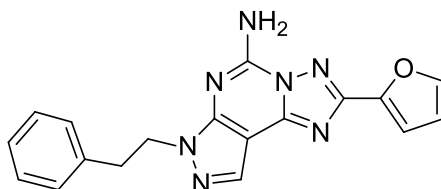
exemple pour l'istradefylline, $IC_{50} = 28 \mu M$). Il est à noter que la caféine ne présente pas cette activité inhibitrice de la MAO-B. Cette inhibition pourrait donc être due à la partie styryl.

Tous ces composés sont des dérivés 8-(*E*)-styrylxanthine. Des précautions doivent être prises car ces dérivés s'isomérisent en solution pour donner un mélange des isomères (*E*) et (*Z*), l'isomère (*Z*) étant inactif. De plus, les styrylxanthines peuvent être dimérisées à l'état solide par action de la lumière, *via* une cycloaddition [2+2] de la double liaison. Ils doivent donc être stockés à l'abri de la lumière. En plus de ces inconvénients, une faible solubilité des dérivés xanthines est observée. Par conséquent, d'autres squelettes de type mono-, di- ou tri-hétérocycliques ont été développés.

5-2- Les dérivés non-xanthines

- Les antagonistes tricycliques

Le principal tricycle répertorié est le Pyrazolo[4,3-*e*][1,2,4]Triazolo[1,5-*c*]Pyrimidine (**PTP**) identifié par Schering-Plough dans les années 1990. Ce tricycle a mené à la découverte du **SCH-58261** (figure 22). Si ce dernier a présenté des résultats intéressants sur un modèle de la MP, celui-ci souffrait d'une faible solubilité et d'une inactivité par voie orale. Une forte sélectivité vis-à-vis du A_{1R} est obtenue grâce à la chaîne aryle-éthyle en position N^7 . De plus, ce composé est encore fortement utilisé comme pharmacophore dans la conception de radioligand, de molécules pour l'imagerie PET ou encore pour la synthèse de sonde fluorescente (cf chapitre 4) par substitution du phényle par des groupements appropriés.



SCH 58261
K_i = 2 nM
S(A₁/A_{2A}) = 499

Figure 22 : Structure du SCH58261

Un travail de pharmacomodulation sur la partie gauche en position N^7 a alors été effectué (figure 23). La stratégie visant à remplacer ces noyaux aryles par des noyaux aryles-pipérazines a été une avancée importante pour ces molécules, notamment pour améliorer la solubilité. Cela a abouti à la synthèse du **Préladenant** (figure 23) qui a montré une sélectivité 1600 fois supérieure pour A_{2AR} vis-à-vis de A_{1R} . De plus, celui-ci reverse la catalepsie induite par l'halopéridol de 77% après 1 h, en plus d'être actif par voie orale. Même si cette molécule a montré une efficacité, notamment en co-

administration avec des agonistes dopaminergiques, son développement a été interrompu par Merck/Schering-Plough en phase clinique II à cause d'un manque d'efficacité lors de son utilisation en monothérapie.

Des modifications sur la partie gauche, en utilisant des bicycles hétéroaryles (**A**), améliorent le potentiel *in vivo* par rapport au **SCH 58261** mais souffrent par conséquent d'une faible solubilité. Dans ce sens, le composé **B** s'est avéré très intéressant avec une bonne solubilité et une très bonne activité *in vivo*. Des modifications de l'hétérocycle central en remplaçant par exemple le noyau pyrazole par un noyau imidazole (**C**) ont été aussi effectuées. Malheureusement aucune de ces molécules n'a présenté de résultats meilleurs que le Préladénant.

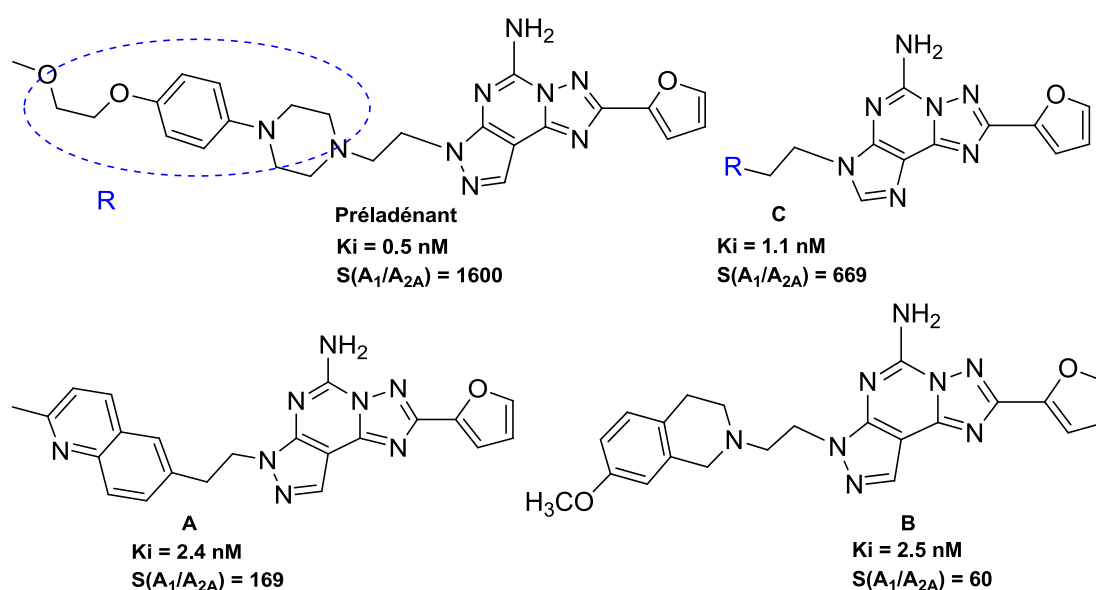


Figure 23 : RSA autour du SCH58261

Une deuxième famille de composés tricycliques a été développée, les aryles indénopyrimidines (figure 24). Cette famille a été découverte suite à un screening effectué par le groupe pharmaceutique Janssen. Une étude RSA a révélé l'importance de l'amine en position 2, du noyau phényle en position 4 ainsi qu'une substitution en position 8 par une chaîne amino-méthyle (**D**) pour une bonne activité *in vitro* et *in vivo*. Si le composé **D** s'est avéré très intéressant, aussi bien pour son affinité pour le $A_{2A}R$ que de par sa capacité à reverser la catalepsie, une oxydation du noyau pyrrolidine a été observée, conduisant à une génotoxicité. La synthèse de molécules possédant un groupement éther (**E**) ou amide (**F**) a ainsi permis d'éviter une biotransformation du groupement 8-méthylène.

La molécule **E** présente une affinité duale A_1 ($K_i = 48 \text{ nM}$) et A_{2A} ($K_i = 7.5 \text{ nM}$). Ainsi, si pendant plusieurs années, la recherche a été axée sur la conception d'antagonistes sélectifs des récepteurs

A_{2A} , notamment vis-à-vis de A_1R , des études précliniques réalisées sur **E** par exemple ont montré des effets bénéfiques à utiliser des composés mixtes A_1/A_{2A} pour la maladie de Parkinson. En effet, l'activité antagoniste vis-à-vis de ces deux récepteurs serait synergique. Puisque le récepteur A_1 est exprimé au niveau des neurones dopaminergiques dans le striatum, son inhibition faciliterait la libération de dopamine tandis que celle d' A_{2A} améliorerait la réponse dopaminergique post-synaptique (cf page 29). De plus, le récepteur A_1 se trouve dans l'hippocampe ou encore le néocortex qui sont des zones du cerveau impliquées dans le contrôle des fonctions cognitives et émotives. De ce fait, un antagoniste A_1 améliore l'apprentissage et la mémoire chez les modèles animaux. Cela se traduit donc par l'amélioration de l'activité motrice *via* son action sur A_{2A} ainsi que pour l'amélioration des fonctions cognitives *via* son activité antagoniste sur A_1 pour la MP. Cela montre le potentiel de l'action d'un antagoniste mixte A_1/A_{2A} et ouvre ainsi de nouvelles perspectives dans la conception de ligands mixtes.^{138,139,140}

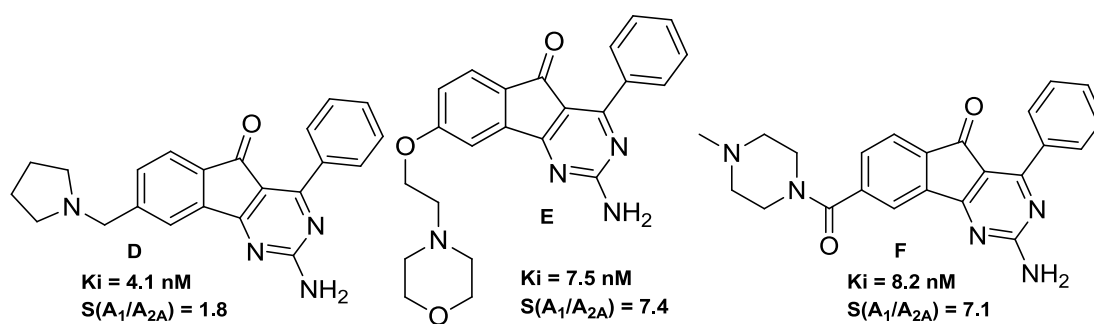


Figure 24 : Famille des aryloxyindolopyrimidines

¹³⁸ Shook B.C. et al., *J. Med. Chem.*, **2010**, 53, 8104-8115

¹³⁹ Mihara T. et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2007**, 323, 708-719

¹⁴⁰ Falsini M. et al., *J. Med. Chem.*, **2017**, X, XXX

- Antagonistes bicycliques

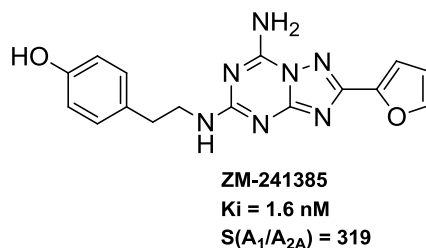


Figure 25 : Famille des 1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidines

Un des premiers bicycles développés a été le **ZM-241385** (figure 25). Cette molécule, développée par Zeneca est un analogue des PTPs (*i.e.* le Préladénant, figure 23) avec le cycle pyrazole en moins. Cette molécule est largement utilisée comme outil pharmacologique et a permis d'obtenir la première structure co-cristallisée du récepteur. Afin d'améliorer les propriétés de candidats-médicaments de cette molécule, des modulations sur cette dernière ont été réalisées dans le but d'améliorer la biodisponibilité orale, le passage de la BHE et l'efficacité *in vivo*.

Le groupe Biogen a ainsi effectué différentes modulations autour de cette molécule afin d'améliorer ces paramètres. Dans un premier temps, des groupements phényle-pipérazines ont été introduits au vu des résultats de la famille des PTPs (**H**, figure 26). La 2,6-disubstitution du groupement aryle par des groupements accepteurs de liaison hydrogène, comme un fluor, permet d'améliorer l'affinité et la sélectivité pour A_{2A}R. Si tout d'abord la fixation directe de la pipérazine sur l'hétérocycle central a été réalisée (**G**), une faible biodisponibilité orale et un faible potentiel *in vivo* ont été observés. L'introduction d'un « spaceur » alkylamine (**H**) entre la pipérazine et l'hétérocycle central a permis d'améliorer le potentiel *in vivo* mais pas la biodisponibilité orale. Enfin, l'ajout d'un noyau pipérazine dans un bicyclic rigide (**I**) permet d'améliorer la biodisponibilité orale tout en gardant une bonne affinité. Malheureusement, en plus d'une faible sélectivité, le problème d'instabilité métabolique persiste chez cette dernière. La substitution du furane, responsable en grande partie de cette instabilité, par des phényles substitués ou des hétérocycles azotés permet d'améliorer la stabilité métabolique mais présente une moins bonne activité *in vivo*.

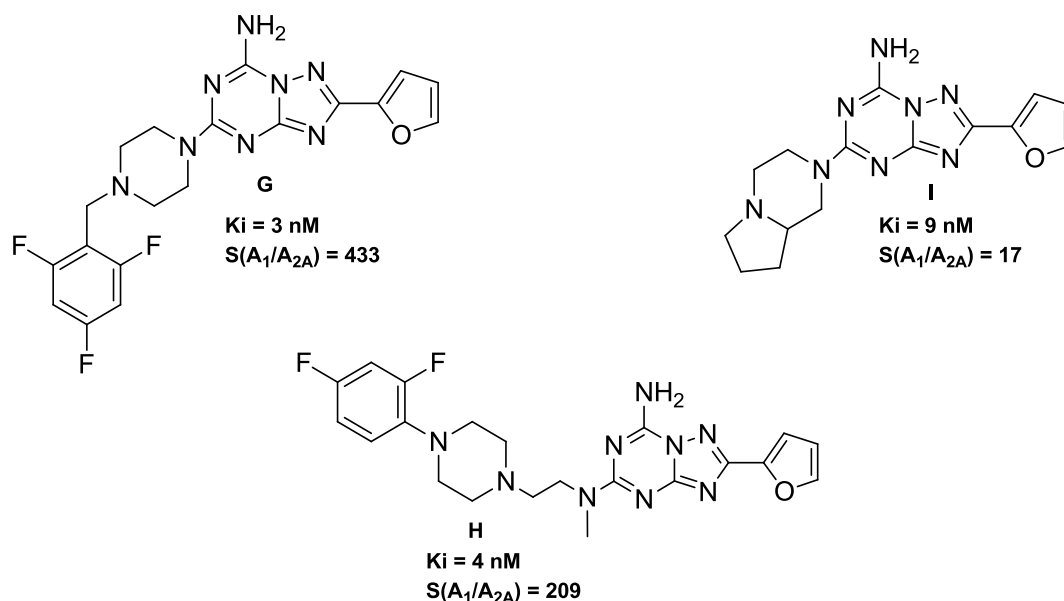


Figure 26 : SAR autour du ZM-241385

Une série de dérivés purines, développée par Sigma-Tau, est aussi connue pour son activité antagoniste des récepteurs A_{2A} . En se basant sur la structure de l'adénine, sans la partie ribose, des composés comme le **ST1535** ont été développés (figure 27). Dans ce cas, le groupement 2-*n*-butyle est important pour l'affinité. Cette molécule a atteint la phase I des essais cliniques après des études sur la MP. Une bonne tolérance est observée après administration orale. Deux métabolites de cette molécule ont été décrits, suite à l'oxydation du groupement butyle, et possèdent tous les deux des propriétés antagonistes du $A_{2A}R$. Pour cette molécule encore, la faible sélectivité A_1/A_{2A} ne l'empêche pas d'être l'une des plus intéressantes décrites jusqu'à présent. Le développement de cette molécule à malgré tout été arrêté sûrement du à l'instabilité du triazole. Le **VER 6947** est un autre exemple de composé de type purine qui présente une meilleure sélectivité vis-à-vis de A_1R grâce au groupement benzyle en position 9.

Ce groupement a ainsi été gardé pour la synthèse du **Vipadenant** qui présente un noyau central 8-azapurine. Ce composé a montré une efficacité en test clinique I et II, aussi bien en mono-thérapie qu'en bithérapie avec la L-DOPA. Il a cependant été interrompu par Vernalis et Biogen pour des problèmes de toxicité.

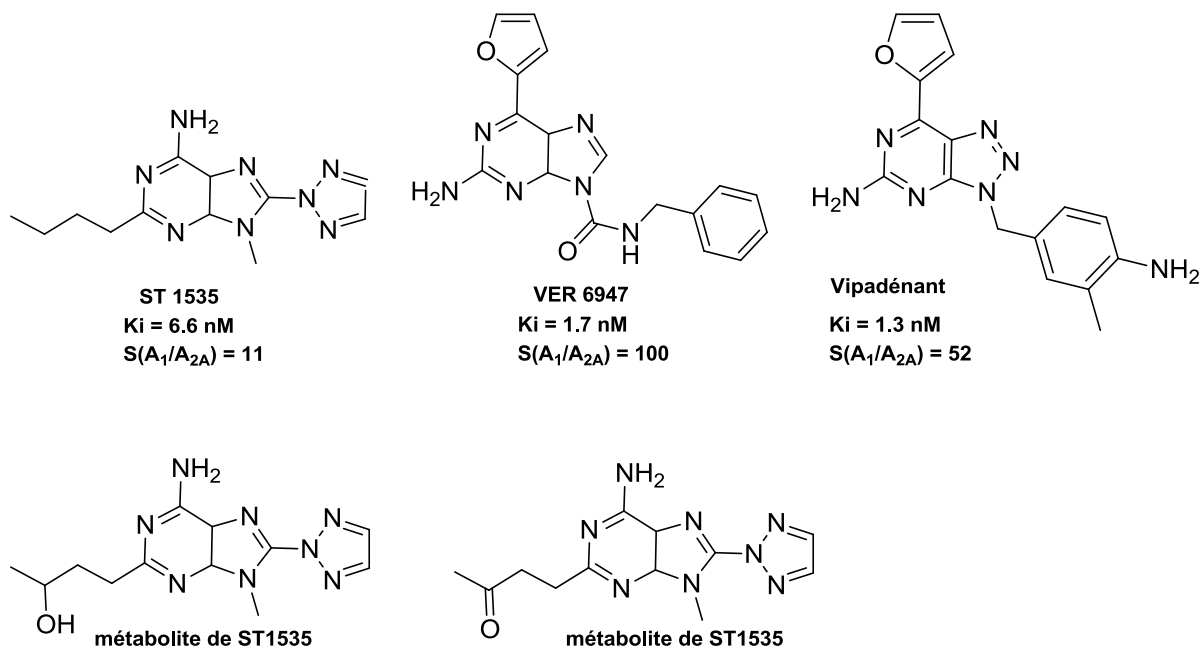


Figure 27 : Famille des dérivés purines

D'autres bicycles ont été développés et se sont révélés intéressants. C'est le cas des thiénoypyrimidines (**J**, figure 28) qui, comme pour les deux molécules précédentes, présentent un furane et une amine primaire exocyclique. Comme décrit antérieurement, le furane présente une instabilité métabolique. Le remplacement de ce dernier par un groupement cyano-aryl semble intéressant en maintenant une bonne activité *in vivo*, et en présentant un meilleur profit pharmacocinétique (**K**).

Enfin, deux autres séries de bicycles, les benzothiazoles (**SYN115**) et les benzofuranes (**L**), se sont avérées être intéressantes. Ces deux structures se rapprochent de par la présence d'une morpholine, d'un méthoxy et d'une fonction amide. La molécule **SYN115**, développée par Roche est actuellement en phase III pour la MP. Les premiers résultats suggèrent qu'une administration deux fois par jour, seule ou avec de la L-DOPA, diminue les symptômes parkinsoniens.

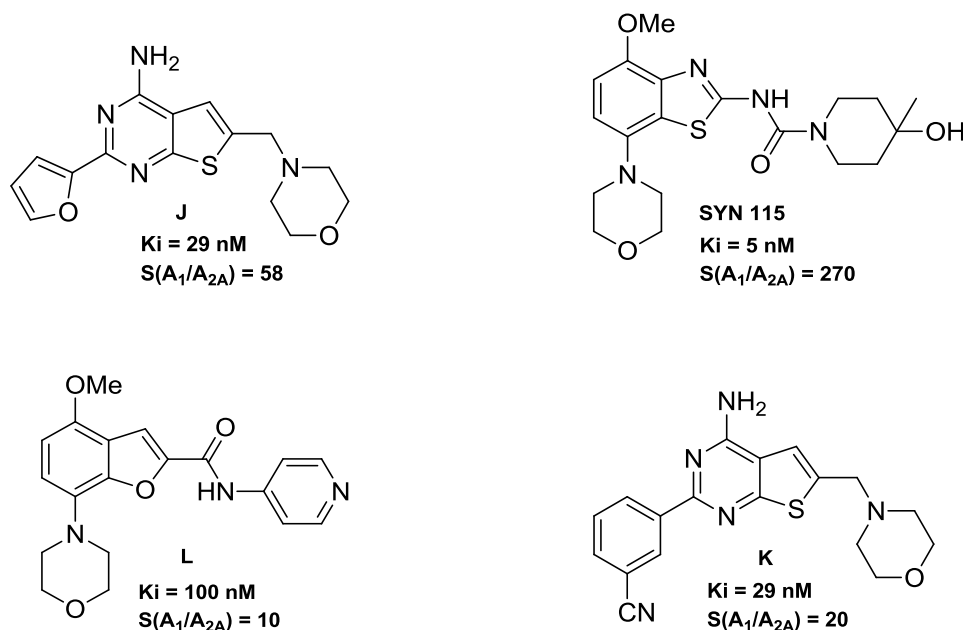


Figure 28 : Molécules des séries thiénoypyrimidines, benzofuranes, benzothiazoles

- Les antagonistes monocycliques

Des antagonistes très intéressants présentant un monocycle comme noyau aromatique central ont été développées comme la pyridine. Des substitutions en position 4 et 6 de cette dernière ont été effectuées avec différents hétérocycles. Des études RSA ont montré l'importance là encore du groupement furane de par sa capacité à être un accepteur de liaison hydrogène (**M**) pour renforcer l'interaction avec certain acide aminé. Le remplacement du furane par d'autres groupements plus stable métaboliquement conduit à une diminution d'affinité (**N**).

Le laboratoire Astellas Pharma a quant à lui développé une série de dérivés pyraziniques, comme ligands mixtes des récepteurs A_{2A} et A_1 , pour une utilisation contre la MP. La molécule **ASP-5854** (figure 29) s'est révélée très intéressante sur des modèles animaux, ce qui peut accréditer l'idée d'un effet bénéfique du blocage des deux récepteurs.

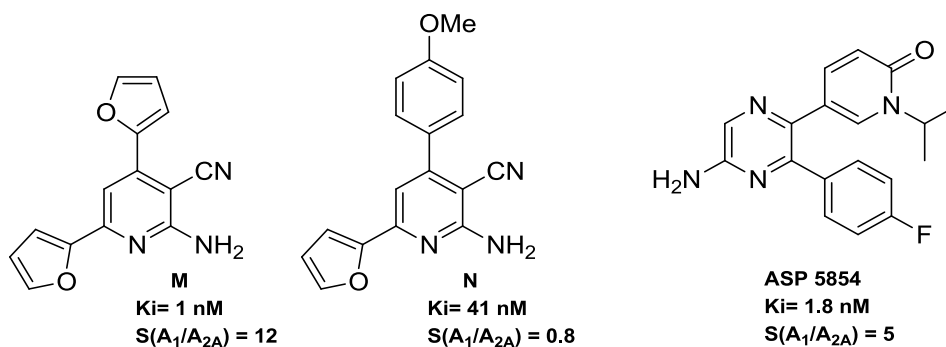


Figure 29 : Exemple de molécules de la famille des pyridines et pyrazines

Une série de composés acétamide pyrimidine représentée par la molécule **O** a été étudiée (figure 30). Comme précédemment pour les molécules **M** et **N**, la présence de 2 hétérocycles permet de garder une bonne affinité tandis que l'acylation de l'amine permet de gagner en sélectivité. De plus, la présence d'une amine basique protonable permet d'augmenter la solubilité dans l'eau. Afin d'éviter la fixation aux canaux *hERG* (« The human ether-a-go-go-related gene ») pouvant entraîner des problèmes cardiaques, le groupement méthyl-pipérazine a été remplacé par une pyridine (**P**) ce qui entraîne par conséquent une perte de solubilité. Un 5-méthyl-furane permet d'éviter le problème de stabilité métabolique du furane tandis que le NH₂ en position 2 améliore les propriétés pharmacocinétiques. A travers ces deux molécules, on peut aussi voir qu'une fonction amide ou rétro-amide (comme pour **SYN115**, figure 28) semble intéressante.

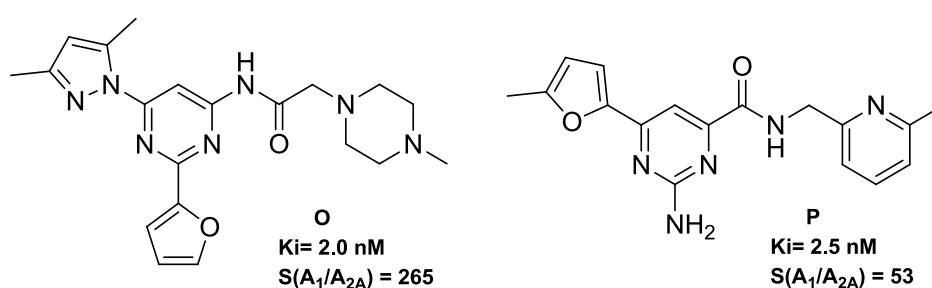


Figure 30 : Famille des pyrimidines

Enfin, les laboratoires de Shire/Heptares Therapeutics ont identifié un nouveau type de squelette de type 1,2,4-triazine avec une bonne affinité vis-à-vis de A_{2A}, et de bonnes propriétés physicochimiques (figure 31). Un grand nombre de ces structures a pu être co-cristallisé dans le récepteur. Des études de relation-structure-activité ont montré que seuls des substituants de petites tailles étaient tolérés. La présence d'un noyau phényle non-substitué en position 5 est préférable pour augmenter l'affinité pour A_{2A}R (**Q**). Le remplacement du noyau 6-aryl par une morpholine (**R**) substituée améliore la sélectivité vis-à-vis de A₁ mais diminue l'affinité pour A_{2A}. Cette molécule présente néanmoins d'excellentes propriétés pharmacocinétiques, une faible liaison aux protéines plasmatiques et n'inhibe pas les CYP450 et le canal *hERG*. De plus, ce composé présente un excellent passage au niveau de la barrière hémato-encéphalique.

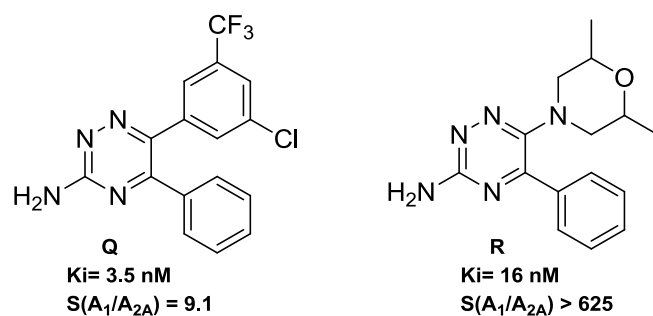


Figure 31 : Série des 1,2,4 triazines

Comme vu précédemment, un grand nombre de molécules avec une affinité nanomolaire pour le récepteur existe déjà. Cependant, la plupart de ces molécules présentent des problèmes liés à une certaine toxicité, un manque d'efficacité ou encore des problèmes pharmacocinétiques, notamment une faible solubilité. Un des challenges est donc maintenant de trouver des ligands ayant un bon équilibre entre affinité et propriétés pharmacocinétiques et physicochimiques.

A la vue des différentes structures présentées, il est difficile de dégager un pharmacophore type pour la conception des molécules. En effet, que ce soit des molécules de petite taille ou des molécules allongées de grande taille, toutes peuvent avoir une affinité nanomolaire pour le récepteur. Deux éléments se distinguent malgré tout pour espérer une bonne affinité. D'une part une amine primaire exocyclique et d'autre part, un furane bien qu'instable métaboliquement. Ce dernier peut être remplacé par des hétérocycles tels que le 5-méthylfurane ou encore le 2-cyano-aryl pour éviter ce problème. Ces deux groupements ne sont toutefois pas obligatoires pour avoir une affinité nanomolaire (*i.e.* SYN 115, figure 28). Enfin, la présence de deux hétérocycles sur le scaffold central est régulièrement rencontrée, de même qu'une fonction amide.

Un cahier des charges a ainsi été élaboré pour ces trois ans de thèse. L'objectif est dans un premier temps d'avoir de nouvelles molécules avec une affinité au nanomolaire pour le récepteur A_{2A} . Le second objectif prioritaire est d'apporter de la solubilité à nos ligands, qui est une propriété déficiente chez un grand nombre d'antagonistes. La sélectivité pour les autres récepteurs à adénosine sera aussi évaluée mais n'est pour le moment pas un objectif essentiel au vu des résultats *in vivo* très intéressants sur des molécules ayant une affinité mixte A_1/A_{2A} (**ST1535**, **ASP 5854** ou encore **E**). Le but est d'avoir à terme un ou plusieurs candidats pour des études de passage de la BHE et potentiellement des études *in vivo* sur modèle Parkinsonien dans un premier temps.

Deux séries chimiques seront développées au cours de ce rapport : la famille des benzoxazoles (chapitre 2) et la famille des quinazolines (chapitre 3).

Le chapitre 2 comportera deux parties. La première partie concernera la découverte de deux « hit » benzoxazoliques. La conception par modélisation moléculaire, la synthèse chimique et l'étude d'affinité que j'ai réalisé à l'IMM de Lisbonne (collab. L.V. Lopes) seront présentées. Une deuxième partie traitera des pharmacomodulations autour de ces deux « hit » afin d'en améliorer l'affinité. Des études de modélisation moléculaire, de synthèse et d'évaluation pharmacologiques en regardant les RSA mais aussi les paramètres ADME seront exposées.

Lors du chapitre 3, une étude de criblage virtuel permettant d'obtenir un « hit » présentant un scaffold quinazoline sera tout d'abord présentée. Les pharmacomodulations envisagées par modélisation moléculaire autour de cette molécule, la synthèse ainsi que l'évaluation pharmacologique seront par la suite abordées.

Enfin, le chapitre 4 présentera la synthèse de sondes fluorescentes pour le récepteur A_{2A} , en se basant sur le dérivé SCH58261 (cf figure 22, page 39). Ce travail a été réalisé lors de mon stage de 4 mois au sein de l'équipe du Dr. Jacobson du NIH aux États-Unis.

Chapitre 2 : La famille des benzoxazoles

1^{ère} partie

I- Conception

Afin de concevoir des molécules antagonistes des récepteurs A_{2A} , nous avons fait appel à la modélisation moléculaire. En effet, la cristallisation récente des RCPGs a permis la conception d'un grand nombre de nouveaux ligands.

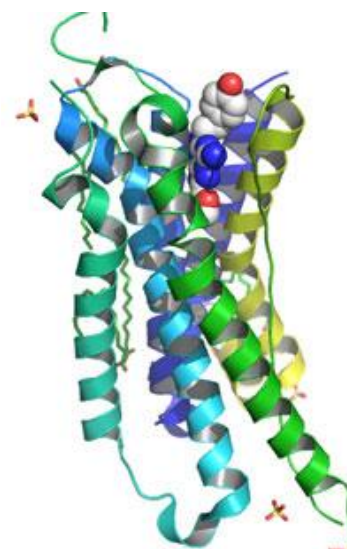
Au début de ma thèse, j'ai ainsi été formé aux études de modélisation moléculaire sous la direction du Dr. Nicolas Renault (UMR 995). Ceci m'a permis d'être rapidement autonome et de concevoir des ligands pour la suite de ma thèse. Mon travail a dans un premier temps consisté à étudier le site de liaison orthostérique de $A_{2A}R$ ainsi que la position de différents antagonistes de référence dans celui-ci. Le but était de visualiser les différents acides aminés clés et autres éléments pharmacophoriques essentiels à l'interaction. Dès lors, la conception de ligands a pu être réalisée.

1- Structure cocrystallisée de A_{2A}

Le développement de méthodes de cristallisation des récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs) a permis de faire des avancées considérables depuis dix ans dans la découverte de nouveaux ligands.¹⁴¹ Ainsi 11 structures co-cristallisées avec 8 ligands différents ont pu être établies pour le récepteur A_{2A} permettant d'établir plusieurs postulats sur les interactions ligand-récepteurs et les liaisons stabilisatrices.

A la fin des années 2000, Jaakola et ses collaborateurs¹⁴² ont publié la co-cristallisation du récepteur A_{2A} avec un antagoniste de haute affinité, le ZM-241385, grâce à la stratégie de fusion au lysozyme T4. L'insertion de ce domaine structuré à la place de la troisième boucle intracellulaire a permis de rigidifier la protéine pour permettre sa cristallisation et sa stabilisation. Depuis, plusieurs co-cristallisations avec ce ligand ont pu être obtenues avec de très bonnes résolutions jusqu'à 1.7 Å.¹⁴³ En 2012, Congreve et ses collaborateurs ont publié une autre structure cristallographique du récepteur A_{2A} avec un ligand de type triazine (résolution 3.3 Å).¹⁴⁴

Bien évidemment, notre regard s'est tourné dans un premier temps vers les structures co-cristallisées avec le ZM-241385, de meilleure résolution. Pourtant, une étude préliminaire de *docking* a permis d'établir que le site de liaison au ZM-241385 ne permettait pas de prédire avec satisfaction



¹⁴¹ Topiol S. et al., *Biochem. Pharmacol.*, **2009**, 78, 11-20

¹⁴² Jaakola V.L. et al., *Science*, **2008**, 21, 1211-1217

¹⁴³ Segela E. et al., *J. Med. Chem.*, **2016**, 59, 6470-6479

¹⁴⁴ Congreve M. et al., *J. Med. Chem.*, **2012**, 55, 1898-1903

les modes de liaison expérimentaux des antagonistes co-cristallisés tels que le XAC, la caféine ou la triazine. *A contrario*, dans la structure de la triazine, la pose du ZM-241385 est retrouvée tout comme celle des autres antagonistes co-cristallisés. De plus, le ligand triazine, plus volumineux que le ZM-241385, se positionne dans une poche plus large, moins longitudinale comme le montre la figure 32. Cette dernière structure cristallographique, si elle est utilisée pour des évaluations *in silico*, est donc capable d'accueillir des ligands d'une plus grande diversité chimique. Nous avons donc choisi cette structure pour les études de docking.

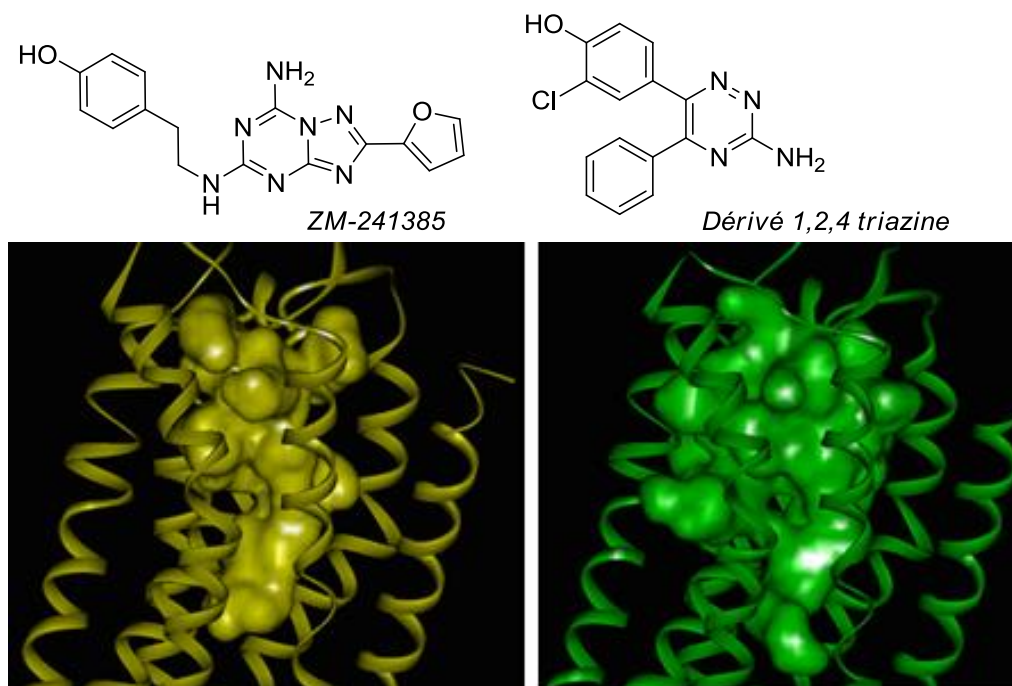


Figure 32 : Comparaison du volume du site de liaison entre le ZM-241385 et un dérivé 1,2,4 triazine (UZC)

2- Pharmacophore

Les récepteurs à l'adénosine ont tous la topologie caractéristique des RCPGs. Ils possèdent un motif central commun de sept domaines transmembranaires (TM1-7), chacun composé d'hélices α de 20-27 acides aminés. Les TM sont liés entre eux par 6 boucles (3 intracellulaires et 3 extracellulaires). Le site de liaison se trouve entre les régions transmembranaires 5 et 7. La spécificité de chaque récepteur à adénosine est conférée par la taille du domaine N-terminal extracellulaire, le domaine C-terminal intracellulaire et par les boucles qui lient les domaines transmembranaires.

La co-cristallisation du ZM-241385 a permis dans un premier temps de mettre en évidence les interactions clés de ce récepteur dans le site de liaison (figure 33).¹⁴²

Le scaffold central présente ainsi plusieurs interactions. D'une part, il forme des interactions de type liaison hydrogène avec les résidus Asn253 et Glu169 que ce soit avec l'amine exocyclique ou l'hétérocycle triazolotriazine. D'autre part, des interactions de type π -stacking avec la Phe168 et hydrophobes avec Ile274 sont aussi observées. Ces dernières permettent de rigidifier et de positionner les différentes parties polyhétéroaromatiques centrales des différents antagonistes.

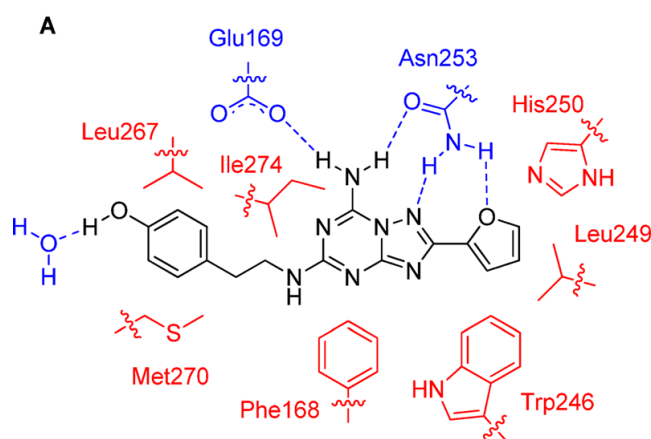


Figure 33 : Interactions du ZM241385 dans la poche de liaison de A_{2A} après co-cristallisation ¹³⁶

Le groupement furane, situé au fond de la poche, au cœur du récepteur, est accepteur de liaison hydrogène et va aussi interagir avec l'Asn253. De plus, une interaction avec l'His250 est aussi observée. Des études de mutagenèse dirigée¹⁴⁵ ont révélé l'importance de l'interaction avec l'Asn253 et l'His250, où une perte totale d'affinité est observée lorsqu'elles sont remplacées par une Alanine. En interagissant également avec le Trp246, le furane pourrait contribuer à maintenir le récepteur dans sa conformation inactive et ainsi conférer son activité antagoniste.

La partie phénolique du ZM-241385 vient quant à elle se fixer dans la partie haute du site de liaison. Dans cette région extracellulaire, les interactions sont essentiellement hydrophobes notamment avec la Leu267 et la Met270. Cependant, après observation de différents antagonistes, aucun groupement essentiel ne se dégage pour interagir dans cette zone. Cette grande flexibilité peut ainsi permettre différentes pharmacomodulations et présente une importante source d'innovation pour la conception de nouveaux ligands.

Pour résumer, après observation du ZM-241385 co-cristallisé (figure 34)¹⁴⁶, ou « dockés » dans le site de liaison de la triazine ainsi que différents antagonistes de structures allongées, 5 régions distinctes sont observées en partant du haut vers le bas du site de liaison :

¹⁴⁵ Jaakola V.P. et al., *Cur. Op. Stru. Bio.*, 2010, 20, 401–414

¹⁴⁶ Keranen H. et al., *PLOS One*, 2014, 10, e108492

- Une zone hydrophobe plus diffuse en haut de la poche.
- Une partie donneuse de liaison hydrogène (Liaison hydrogène avec Glu169).
- Une chaîne aliphatique hydrophobe.
- Une partie hétéroaromatique centrale plane (π -stacking avec Phe₁₆₈ et interaction avec Asn₂₅₃).
- Des interactions hydrophobes ou aromatiques (π -stacking avec His250 et Trp246) en bas de la poche.

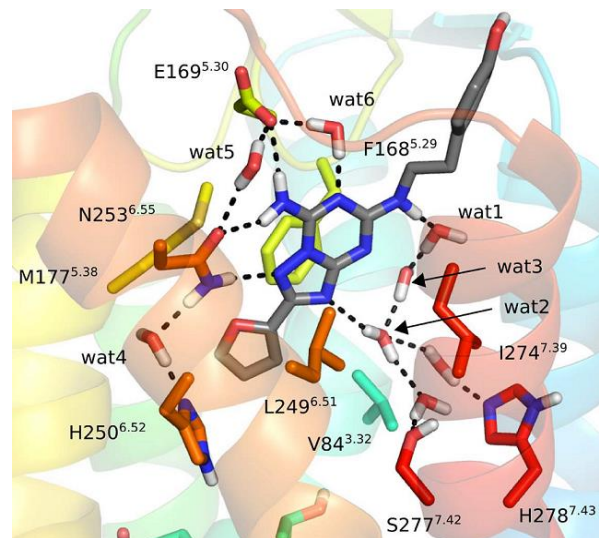


Figure 34 : Positionnement du ZM-241385 dans le site de liaison¹⁴⁶

En comparant les différentes séquences des quatre récepteurs à adénosine, nous avons observé que le récepteur A_{2A} partage 49% d'acides aminés communs avec A_{1A}R, 58% avec A_{2B}R, et seulement 41% avec A_{3A}R (figure 35). Le pourcentage moyen d'identité atteint 71% vis-à-vis des 3 récepteurs dans la région d'interaction avec le ligand. Enfin, comme le montrent les séquences ci-dessous, les différents acides aminés clés cités précédemment sont conservés pour les quatre récepteurs, ce qui montre la difficulté d'avoir des molécules sélectives. Cependant, en analysant bien ces différentes séquences, on peut observer qu'A_{2A}R présente un cluster acide caractérisé par la présence du Glu169 et Asp170 au sein de la boucle V du récepteur que les autres ne présentent pas. L'interaction avec dans cette zone pourrait donc être une piste pour obtenir des molécules sélectives.

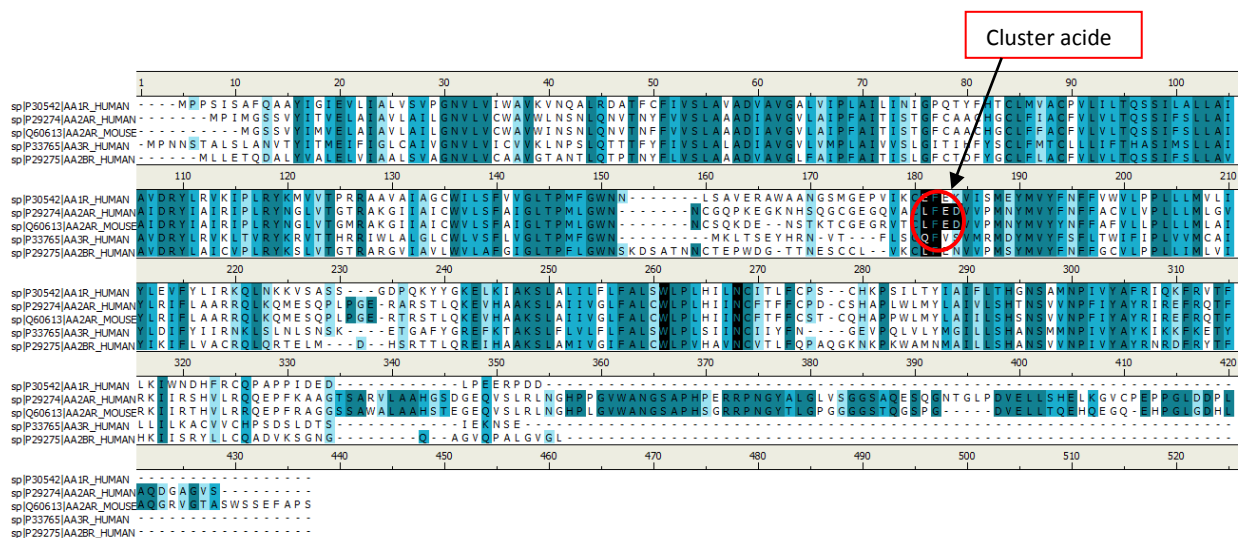


Figure 35 : Comparaisons des différentes séquences des récepteurs à adénosine

3- Modélisation moléculaire

Pour concevoir de nouveaux ligands, une étude de docking en utilisant le logiciel GOLD (Genetic Optimization for Ligand Docking), a été réalisée sur la base des coordonnées du récepteur A_{2A} co-cristallisé avec le ligand triazine T4E. Ce dernier permet en effet d’accommoder une plus grande diversité structurale comparé à la co-cristallisation du ZM-241385 comme expliqué précédemment.

Le but a été de concevoir des molécules autour du cycle benzoxazole bien connu au sein du laboratoire. Ainsi, plusieurs séries de molécules innovantes basées sur cet hétérocycle ont été imaginées en prenant en compte les éléments pharmacophoriques identifiés précédemment. Ce travail de modélisation a consisté dans un premier temps à réaliser différentes modulations autour de cet hétérocycle en ajoutant différents groupements sur différentes positions du cycle. Les molécules résultantes ont été évaluées *in silico* par docking. L’objectif est d’avoir des molécules qui se positionnent de la même manière dans le site de liaison que le ZM-241385 en interagissant avec les acides aminés identifiés. De plus, la visualisation des dix meilleurs résultats de scoring, pour chaque molécule, dans le site de liaison a été effectuée. Une molécule présentant au moins 5 à 7 poses identiques sur ces 10 résultats, a été retenue. La valeur RMSD (Root-Mean-Square Deviation, « Déviation de la Racine de la Moyenne ») sera aussi regardée afin d’avoir une idée de l’écart moyen entre les différentes poses.

Dans un premier temps, le furane a été conservé pour interagir avec l’Asn253, l’His250 et le Trp246 au fond de la poche et conférer le caractère antagoniste à nos molécules en bloquant le récepteur dans sa conformation inactive. De plus, pour interagir dans la partie supérieure du site de liaison,

différentes amines cycliques ont été sélectionnées. Celles-ci pourraient interagir avec le cluster acide (Glu169, Asp170) par liaisons ioniques tout en conservant des interactions aliphatiques hydrophobes. Ces amines prendraient donc la place du phénol du ZM-241385 dans cette poche. De plus, ces amines protonables permettraient aussi d'améliorer la solubilité des molécules, qui reste un problème majeur rencontré par les antagonistes de référence. Enfin le cycle benzoxazole permettrait d'interagir avec la Phe168 par π -stacking mais aussi avec l'Asn253 par formation d'une liaison hydrogène. De ce fait, la présence d'une amine primaire aromatique, présente dans le ZM-241385, est évitée car nos ligands semblent interagir avec tous les acides aminés clés sans celle-ci, notamment l'Asn253 et le Glu169. Tout cela ajouté au fait que la synthèse de benzoxazole présentant une amine en position 7 ne soit pas décrite, nous a amené à nous passer de cette amine.

Après des variations de la position du furane ainsi que la chaîne aliphatique sur le benzoxazole, il semblerait que la fixation du furane en position 2 et de la chaîne aliphatique en position 5 ou 6 du bicycle central soit préférable. En effet, c'est uniquement dans cette configuration, que les dix poses visualisées pour une même molécule, convergent vers un même résultat. Comme le montre la figure 36, la molécule **IVa** s'aligne de la même manière que l'antagoniste de référence (RMSD = 0.090 Å).

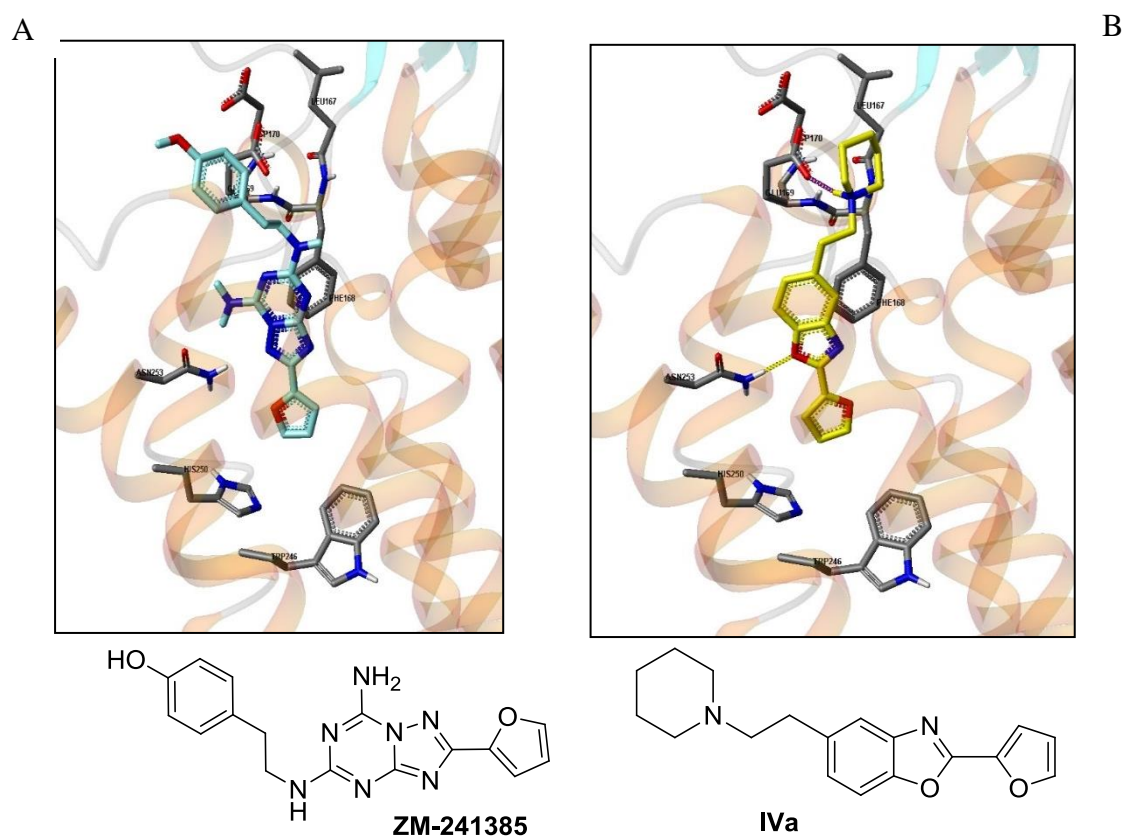
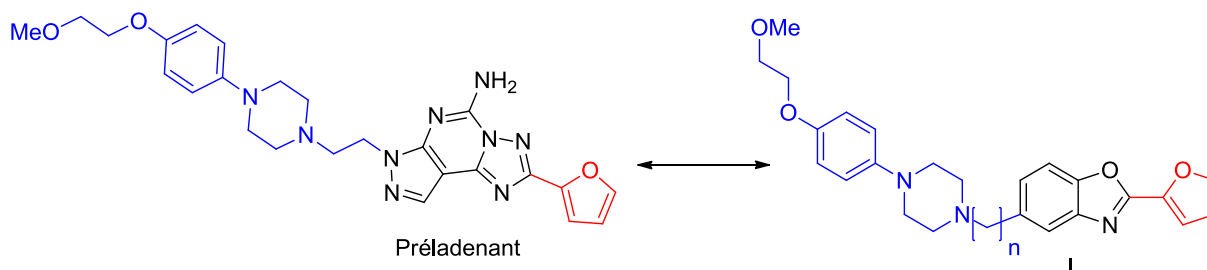


Figure 36 : Mode de liaison in silico ZM-241385 (A) et de IVa (B)

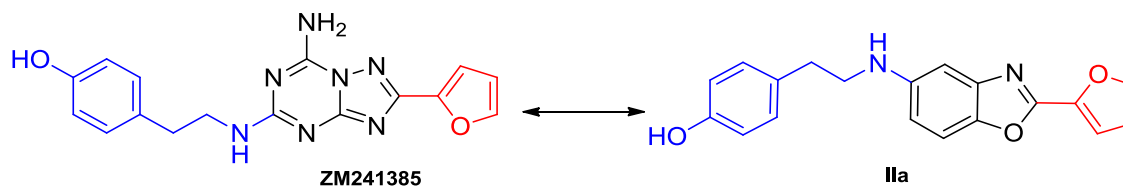
Cependant, et ce afin de valider notre squelette central benzoxazole mais aussi la position des substituants ainsi que l'absence de l'amine exocyclique, des analogues benzoxazoliques de deux antagonistes de référence, le Préladenant et le ZM-241385, ont dans un premier temps été synthétisés.

Analogue benzoxazolique du Préladenant : Série I



Outre l'analogue strict du Préladenant ($n = 2$), la synthèse de l'homologue inférieur ($n = 1$) et supérieur ($n = 3$) a été effectuée.

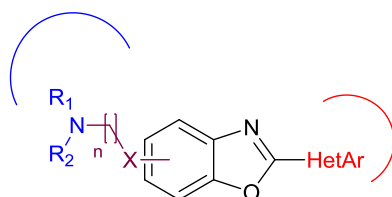
- Analogue benzoxazolique du ZM241385 : Série II



De plus, trois types de modulations sur le cycle benzoxazole ont été effectuées. La figure 37, résume les différentes pharmacomodulations envisagées et évaluées *in silico*.

Groupement polaire :
Liaison hydrogène, Interactions hydrophobes

Glu 169, Leu 167



Bas du site de liaison :
Interaction hydrophobe, liaison hydrogène

His 250, Trp 246, Asn 253

Plan aromatique :
interaction hydrophobe type stacking

Phe 168, Asn 253

NR_1R_2 = pipéridine, pipérazine; Boc-pipérazine; phényl-pipérazine

Ar = Furane; 3,4-diméthoxyphényle

X = CH₂, NH, NHCO

n = 1-3 atomes

Figure 37 : Représentation des modulations envisagées autour de l'hétérocycle benzoxazole

- **La partie droite** : Le furane permet l'interaction avec les acides aminés clés (His250, Trp246, Asn253). Le 3,4-diméthoxyphényle, sera aussi envisagé afin de palier l'instabilité métabolique du furane souvent décrite.
- **La chaîne latérale** entre le noyau benzoxazole et la fonction amine : insertion de linkers de type alkyle, amide et éthylamine (séries **III-V**, **VI**, **VII**).

Des linkers de type alkyle de différentes tailles (n = 1, 2, 3) seront utilisés. De plus, des travaux réalisés par Deborah H. Slee¹⁴⁷ ou encore de Michael Gutschow¹⁴⁸, ont montré que des molécules présentant une fonction amide pourraient s'avérer intéressante de par la rigidification de la structure (figure 38, série **VI**). Enfin, un linker éthylamine sera utilisé (série **VII**) par analogie avec l'analogue benzoxalique du ZM 241385 (**II**).

- **La partie gauche** : Insertion d'amines cycliques tertiaires telles que la pipéridine, la phénylpipérazine, la Boc-pipérazine et la pipérazine.

¹⁴⁷ Slee D.H. et al., *J. Med. Chem.*, **2008**, *51*, 1719–1729

¹⁴⁸ Gutschow M. et al., *J. Med. Chem.*, **2012**, *55*, 3331–3341

Ainsi trois séries de composés (séries III, IV, V) seront synthétisées comme le résume la figure 38.

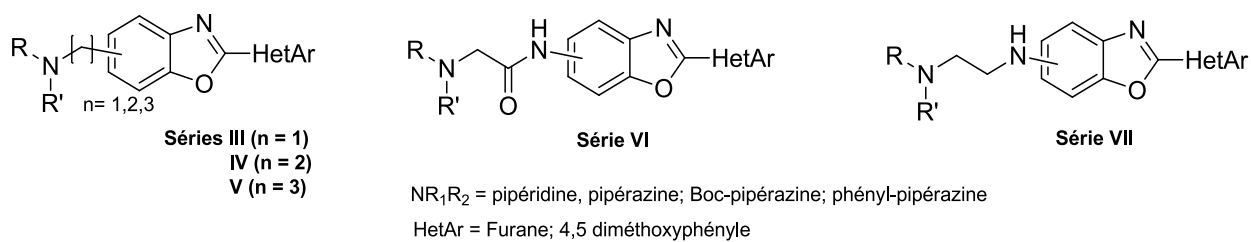


Figure 38 : Présentation des trois premières séries

Le positionnement dans le site de liaison d'une molécule de chacune de ces 3 familles est représenté sur la figure 39.

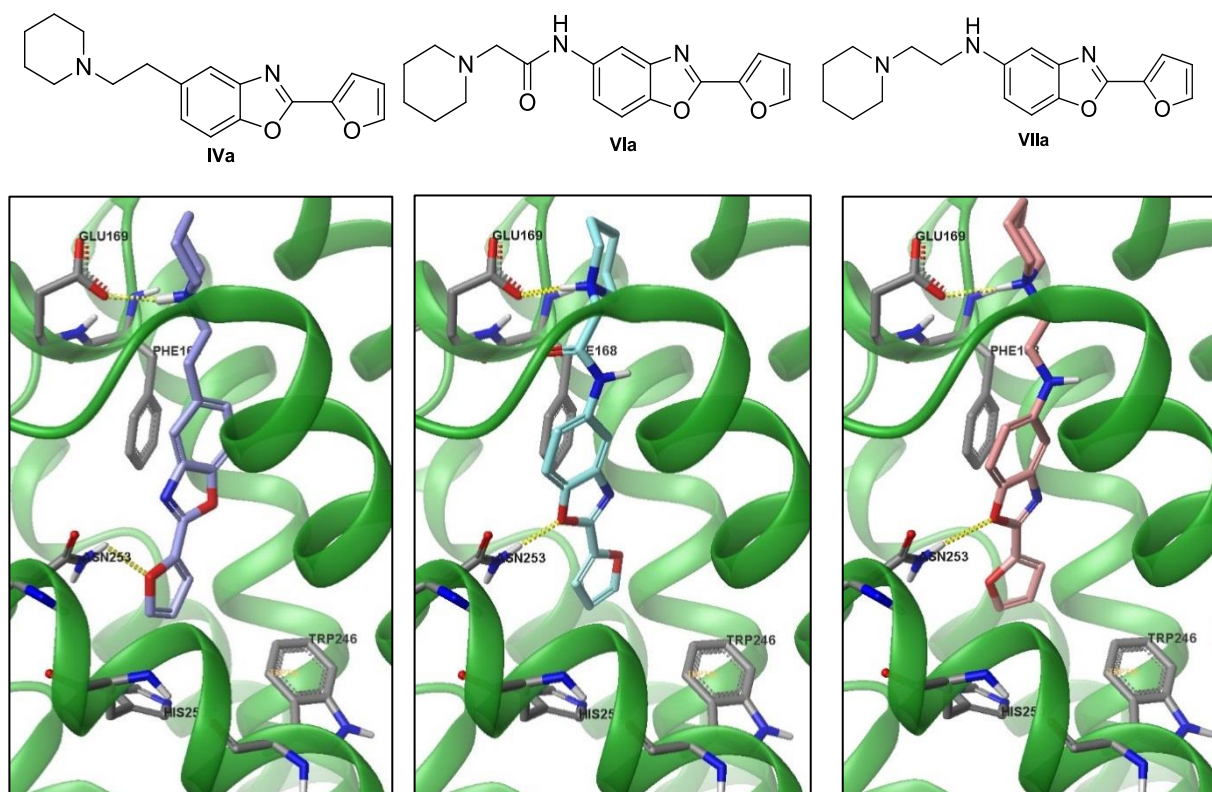
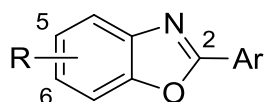


Figure 39 : Mode de liaison in silico de IVa, VIa et VIIa

II- Synthèse des molécules cibles

Afin d'accéder aux composés cibles des différentes séries III à VII, la synthèse du 1,3-benzoxazole convenablement substitué en position 2 et 5 ou 2 et 6 (figure 40), a été mise au point.



R = CH₃, NO₂, Br, CH₂CO₂H
Ar = Furane, 3,4-diméthoxyphényle

Figure 40 : 1,3-Benzoxazole convenablement substitué

1- Préparation de l'intermédiaire 2-aryl-benzoxazole (8-13)

1-1- Approche rétrosynthétique

Les benzoxazoles représentent une classe d'hétérocycles importante rencontrée régulièrement en chimie médicinale. En effet, ils ont été utilisés comme agonistes des récepteurs 5-HT₃¹⁴⁹, inhibiteurs de transcriptase inverse pour le HIV¹⁵⁰ ou encore agents anticancéreux.¹⁵¹ Plusieurs voies de synthèse sont répertoriées dans la littérature afin d'accéder aux dérivés 2-aryl-benzoxazoles (schéma 1). Les méthodes les plus classiques utilisent une condensation entre un 2-amino-phénol convenablement substitué en présence, soit d'un acide carboxylique en condition acide et à haute température (voie a), soit d'un aldéhyde suivi d'une oxydation (voie b).¹⁵² Ces deux méthodes permettent d'obtenir le composé souhaité en une étape. Il peut aussi être obtenu en deux étapes à partir de la même matière première en passant par l'intermédiaire amide, suivi d'une cyclisation en milieu acide (voie c).¹⁵³ D'autres méthodes utilisant des réactions dites de "cross-coupling" sont aussi décrites (voie d).¹⁵⁴ Celles-ci peuvent se faire *via* une réaction de couplage intramolécule catalysée au cuivre à partir du 2-bromo-anilide, lui-même obtenu après réaction d'acylation sur la 2-bromoaniline. Une autre méthode de couplage utilisant quant à elle la réaction de Kumada est aussi répertoriée (voie e).¹⁵⁵ La réaction se fait entre le benzoxazole présentant un halogène en position 2 et un réactif de Grignard en présence d'un catalyseur. Liu décrit des rendements de 90% pour le couplage d'un aryle sur un benzoxazole. Huang¹⁵⁶ a pour sa part décrit une méthode d'arylation directe d'hétéroarènes.

¹⁴⁹ Yoshida S. et al., *J. Med. Chem.*, **2005**, 48, 7075–7079

¹⁵⁰ Grobler J.A. et al., *J. Biol. Chem.*, **2007**, 282, 8005–8010

¹⁵¹ Easmon J. et al., *J. Med. Chem.*, **2006**, 49, 6343–6350.

¹⁵² Viirre R.D. et al., *J. Org. Chem.*, **2008**, 73, 3452–3459

¹⁵³ Wisastra R. et al., *Bioorg. Med. Chem.*, **2012**, 20, 5027–5032

¹⁵⁴ Ueda S. et al., *J. Org. Chem.*, **2009**, 74, 4272–4277

¹⁵⁵ Liu N. et al., *J. Org. Chem.*, **2011**, 76, 10031–10038

¹⁵⁶ Huang J. et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 132, 3674–3675

Cette C-H arylation est réalisée en présence d'un système co-catalytique Pd/Cu à partir d'un benzoxazole (voie f). Ainsi en présence de chlorure de palladium, de Cu(Xantphos) et de Cs₂CO₃ au reflux du toluène, l'obtention des arylbenzoxazoles est décrite avec un rendement moyen de 80%. D'autres méthodes moins conventionnelles sont aussi décrites. Par exemple, la voie g a été développée à partir d'une catalyse au cuivre (II) permettant la conversion d'une bis-aryloxime en un 2-arylbenzoxazole.¹⁵⁷

Afin d'accéder à nos composés benzoxazoliques, nous avons décidé d'utiliser les trois premières méthodes (a, b, c).

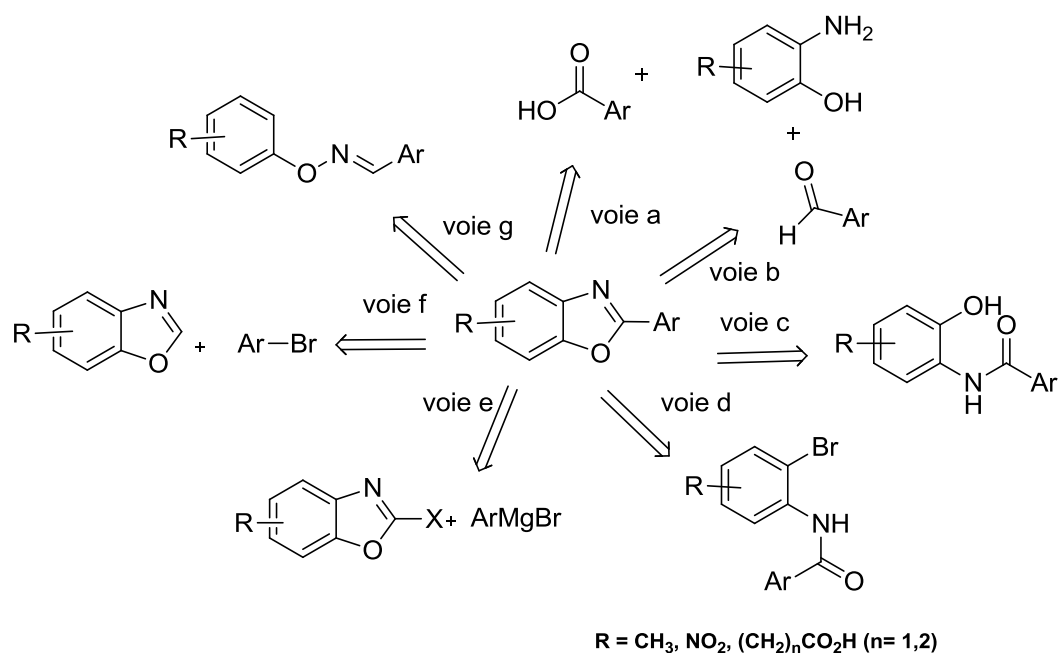
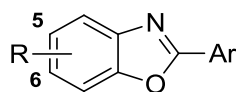


Schéma 1 : Rétrosynthèse pour l'élaboration du noyau 2-arylbenzoxazole

¹⁵⁷ Guru M.M. et al., *J. Org. Chem.*, **2011**, *76*, 5295-5308

1-2- Synthèse des dérivés 2-arylbenzoxazoles (**8-13**)

Les composés préparés sont rapportés dans le tableau 3.



Numéro	Position	R	Ar
8	5	CH ₃	Furane
9	5	CH ₃	3,4-diméthoxyphényle
10	6	CH ₃	Furane
11	5	NO ₂	Furane
12	5	Br	Furane
13	5	CH ₂ CO ₂ H	Furane

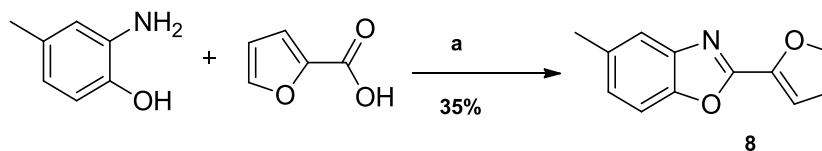
Tableau 3: Présentation des différents benzoxazoles 8-13

Afin d'accéder à ces composés, la mise au point a dans un premier temps été effectuée pour l'obtention du composé 2-(2-furyl)-5-méthyl-1,3-benzoxazole **8**. Pour ce faire, plusieurs voies de synthèse ont été testées.

i. Synthèse en 1 étape

Voie a : Cyclisation à l'aide de l'anhydride d'acide propane-phosphonique (T₃P).

Le T₃P est un agent de couplage très efficace. Il est principalement utilisé dans la synthèse peptidique et présente l'avantage d'être facilement éliminé par un simple lavage à l'eau.¹⁵⁸ Celui-ci peut aussi être utilisé pour des réactions de cyclisation en jouant le rôle de catalyseur acide.¹⁵⁹ Il permet aussi d'oxyder des alcools en aldéhydes ou encore de convertir des amides, des acides ou bien des aldéhydes en nitriles.¹⁶⁰



Réactifs et conditions : a) T₃P (1.0 éq.), DIPEA (1.0 éq.), acide furoïque (1.0 éq.), 150 W, 15min, 130 °C, Micro-ondes

Schéma 2 : Couplage au T₃P

¹⁵⁸ Klose J. et al., *Chem. Commun.*, **1999**, 18, 1847-1848

¹⁵⁹ Hoechst, WO 99/37620

¹⁶⁰ Augustine J.K., et al., *Synlett*, **2009**, 3378-3382

Plusieurs essais de condensation entre le 2-amino-4-méthylphénol et l'acide furoïque en présence de T_3P^{161} et de DIPEA ont été réalisés aussi bien par chauffage thermique que par irradiation sous micro-ondes en tube scellé (schéma 2). Les essais effectués par chauffage thermique n'ont pas permis d'obtenir la molécule **8** souhaitée. En effet, l'obligation de chauffer à haute température pour que la réaction se produise conduit à une dégradation, sûrement due à la fragilité de l'acide furoïque en position 2 du cycle benzoxazole. Cette hypothèse est renforcée par le fait que cette réaction se fait avec des rendements de l'ordre de 50% en remplaçant l'acide furoïque par l'acide 3,4-diméthoxybenzoïque, en présence de 2-amino-4-méthylphénol de T_3P et de DIPEA à 130°C. Afin d'obtenir la molécule **8**, la technique d'irradiation par micro-ondes a été utilisée. Les conditions optimales trouvées sont : une puissance de 150W, une température de 130°C et un temps de réaction de 15 minutes. Dans ces conditions, le produit attendu est obtenu après purification sur colonne avec un faible rendement de 35%.

Mécanisme proposé pour cette réaction :

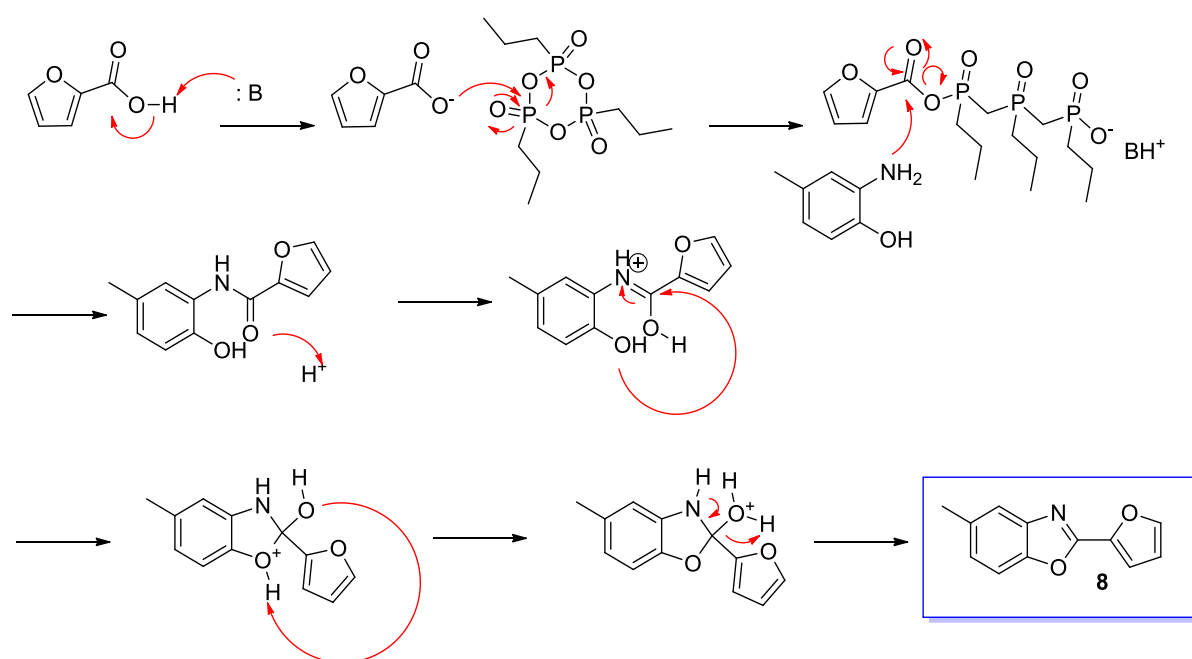


Schéma 3 : Mécanisme réactionnel proposé pour la cyclisation au T_3P

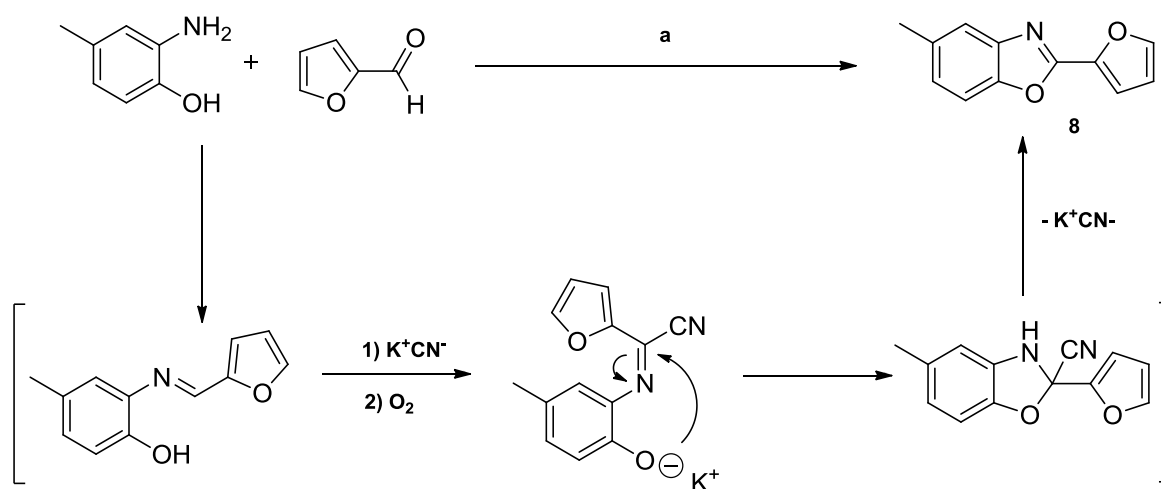
Voie b : Cyclisation oxydative

Une autre voie de synthèse rencontrée dans la littérature est la cyclisation oxydative aérobie d'une base de Schiff.¹⁶² La condensation est réalisée entre le furfural et le 2-amino-4-méthylphénol. Cette

¹⁶¹ Xiaohan W. et al., *Tet. Lett.*, 53, 2012, 2440-2443

¹⁶² Cho Y.H. et al., *Tetrahedron*, 2013, 69, 6565-6573

réaction se fait en présence de cyanure de potassium (KCN) au reflux du DMF et conduit après purification sur colonne au benzoxazole **8** avec un rendement de 33%.



Réactifs et conditions : a) Furfural (1.0 éq.), KCN (1.0 éq.), DMF, reflux

Schéma 4 : Mécanisme réactionnel proposé pour la cyclisation oxydative

Si un premier mécanisme avait été établi par Cho et al.¹⁶² où une étape d'oxydation aérobie était décrite, Chen et al.,¹⁶³ ont récemment réalisé des études plus poussées pour établir un nouveau mécanisme (schéma 4). Dans un premier temps, l'amine réagit avec l'aldéhyde pour former, après déshydratation, une base de Schiff. Cette dernière subit l'attaque nucléophile de l'ion cyanure, qui après action de l'oxygène de l'air donne un nouvel intermédiaire imine. Le phénolate formé attaque cette dernière pour former l'intermédiaire dihydrobenzoxazole, qui après départ de l'ion cyanure, conduit au benzoxazole **8**.

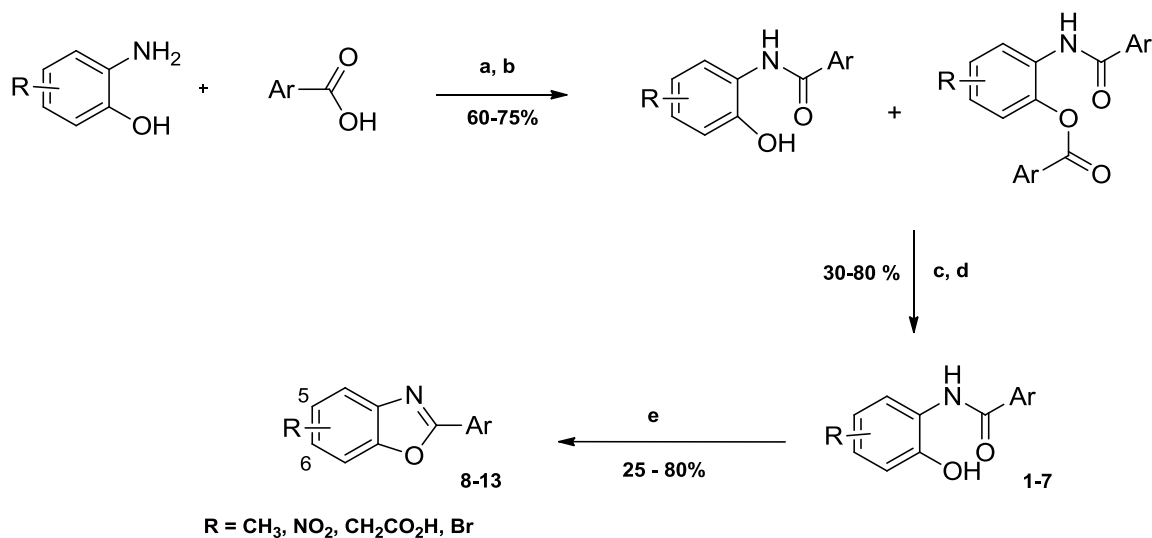
La synthèse en 1 seule étape (voies a et b) ayant conduit à de faibles rendements, nous avons choisi de réaliser cette synthèse en 2 étapes.

¹⁶³Chen W. et al., *J. Org. Chem.*, 2016, 81, 1085–1086

ii. Synthèse en 2 étapes

Voie c : Réaction d'amidification puis cyclisation intramoléculaire.

La voie de synthèse utilisée est rapportée sur le schéma 5 :



Réactifs et conditions : a) SOCl_2 (3.0 éq.), DCM, reflux ; b) Et_3N (3.0 éq.), 2-aminophénol (0.9 éq.), 0-25°C ; c) NaOH (4.0 éq.), H_2O , reflux ; d) HCl (6N) ; e) APTS (2.0 éq.), toluène, reflux

Schéma 5 : Synthèse des benzoxazoles 8-13

Les chlorures d'acides sont commercialisés, cependant nous avons choisi de les préparer à partir des acides correspondants par action de SOCl_2 dans le dichlorométhane. Le chlorure d'acide ainsi obtenu réagit avec l'*o*-aminophénol, convenablement substitué, pour conduire à un mélange de dérivés mono et di-acétylés. Les 2 produits ne sont pas séparés dans la mesure où l'hydrolyse de ce mélange en milieu basique conduit sélectivement à la saponification de l'ester pour donner les dérivés *N*-acétylés (**1-7**) avec des rendements de 70% en moyenne pour les deux étapes. Les amides (**1-7**) ainsi obtenus subissent une réaction de cyclisation intramoléculaire. Cette réaction de déshydratation est réalisée au reflux du toluène en présence de l'acide paratoluènesulfonique (APTS).¹⁵³ L'utilisation d'un montage de Dean-Stark est prépondérante puisqu'une diminution très significative de la durée de la réaction (une nuit au lieu de 3 jours) et une amélioration du rendement (80% au lieu de 55%) est observée pour la formation du 2-(2-furyl)-5-méthyl-1,3-benzoxazole (**8**). Cette voie de synthèse permet ainsi d'obtenir les dérivés 2-aryl-benzoxazoles diversement substitués en position 5 ou 6 (tableau 3). Seul le benzoxazole présentant une fonction acide en position 5 (**13**) a été obtenue avec un faible rendement de 25%.

Il est à noter que cette réaction de cyclisation a aussi été testée sous irradiation micro-ondes. Après mise au point des conditions expérimentales, une température de 220°C (puissance 150 W) en

présence de 0.1 éq. d'APTS, pendant 6 min, conduit au produit désiré **8** avec un rendement de 65%. Cependant cette méthode est applicable uniquement sur des petites quantités (m = 200 mg).

2- Synthèses des analogues structuraux d'antagonistes de référence

Comme nous l'avons indiqué dans la partie conception, le premier objectif était de préparer les analogues benzoxazoliques du Préladénant (**Ia**) et du ZM241385 (**IIa**). Les deux molécules préparées sont rappelées dans la figure 41 ci-dessous.

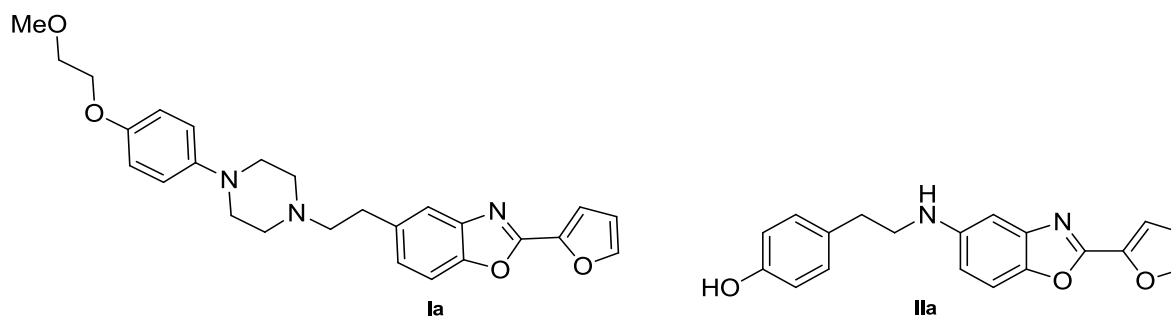


Figure 41 : Analogues benzoxazoliques du Préladénant et du ZM-241385

2-1- Synthèse de l'analogue du Préladénant (**Ia**).

Afin de synthétiser l'analogue benzoxazole du Préladénant (**Ia**), la préparation des intermédiaires **13** et **17** a tout d'abord été nécessaire comme le montre le schéma rétrosynthétique 6 suivant.

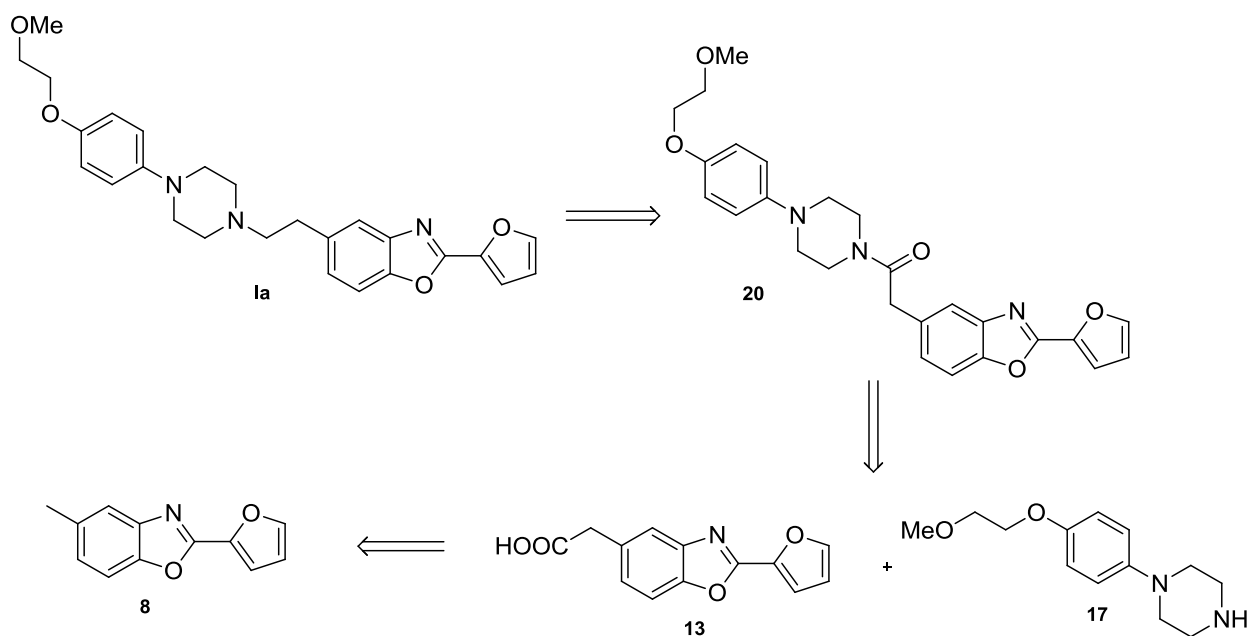
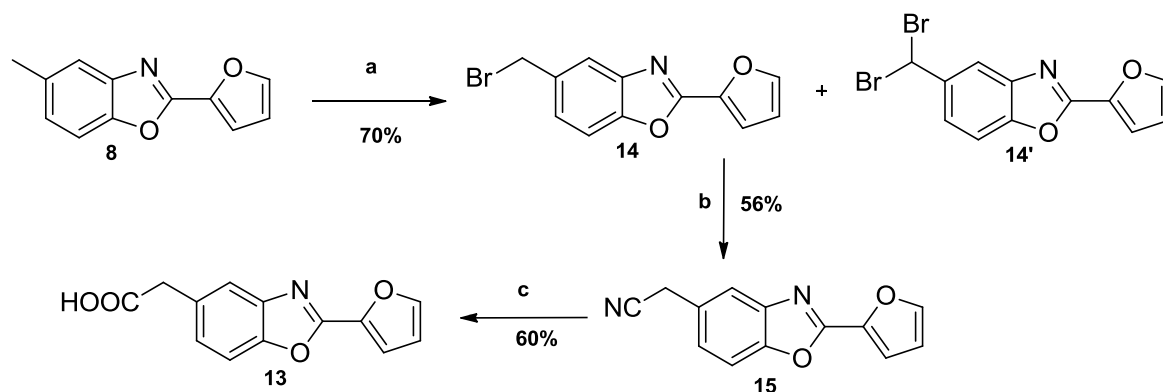


Schéma 6 : Rétrosynthèse pour l'obtention du composé Ia

▪ *Synthèse du composé 13*

La stratégie de synthèse adoptée pour obtenir le composé **13** est la suivante étant donné que la voie de synthèse rapportée sur le schéma 5 n'a pas permis de fournir cette molécule avec de bon rendement :



Réactifs et conditions : a) NBS (1.2 éq.), Peroxyde Benzoyle (0.07 éq.), CCl₄, reflux/hv ; b) KCN (5 éq.), TBABr (0.1 éq.), EtOH/H₂O, reflux ; c) AcOH/H₂O/H₂SO₄, reflux

Schéma 7 : Synthèse du composé 13

Dans un premier temps, la bromation radicalaire du méthyle du composé **8** est réalisée par le *N*-bromosuccinimide (NBS) en présence d'un initiateur radicalaire, le peroxyde de benzoyle, dans du tétrachlorométhane.¹⁶⁴ Le bromométhylbenzoxazole **14** est obtenu avec de bons rendements de l'ordre de 70%. Il est à noter la formation du composé dibromométhylé (avec un rendement d'environ 10%). La substitution nucléophile du dérivé bromé **14** par le cyanure de potassium est ensuite réalisée dans un mélange éthanol/eau.¹⁶⁵ Le nitrile **15** est obtenu avec un rendement de 56%. Ce dernier subit une hydrolyse acide¹⁶⁶ au reflux du mélange H₂SO₄/AcOH/H₂O pour donner le composé **13** avec un rendement de 60%.

- **Remarque :** L'hydrolyse basique du nitrile **15** a été tentée mais elle conduit à une dégradation, probablement due à l'ouverture du cycle benzoxazole.

▪ *Synthèse du 1-[4-(2-méthoxyéthoxy)phényl]pipérazine (17)*

La synthèse du composé **17** peut être réalisée selon deux voies.

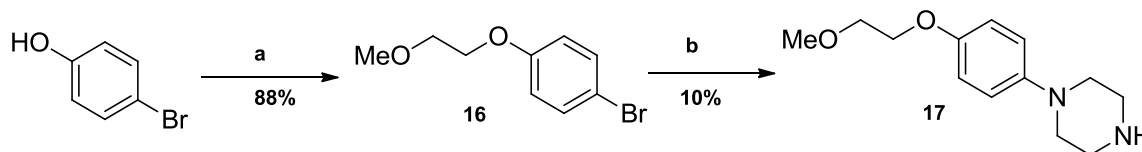
Une première voie de synthèse permet d'accéder en deux étapes au produit attendu **17** à partir du 4-bromophénol commercial (schéma 8). Ce dernier est *O*-alkylé par le 1-bromo-2-méthoxyéthane en présence de K₂CO₃ dans le DMF pour donner le 1-bromo-4-(2-méthoxyéthoxy)benzène (**16**) avec un

¹⁶⁴ Meddour A. et al., *Tet. Assy.*, **2000**, *11*, 3635–3644

¹⁶⁵ Perretta I. et al., *J. Med. Chem.*, **2005**, *48*, 5705 – 5720

¹⁶⁶ Nakazato A. et al., *J. Med. Chem.*, **1999**, *42*, 1076–1087

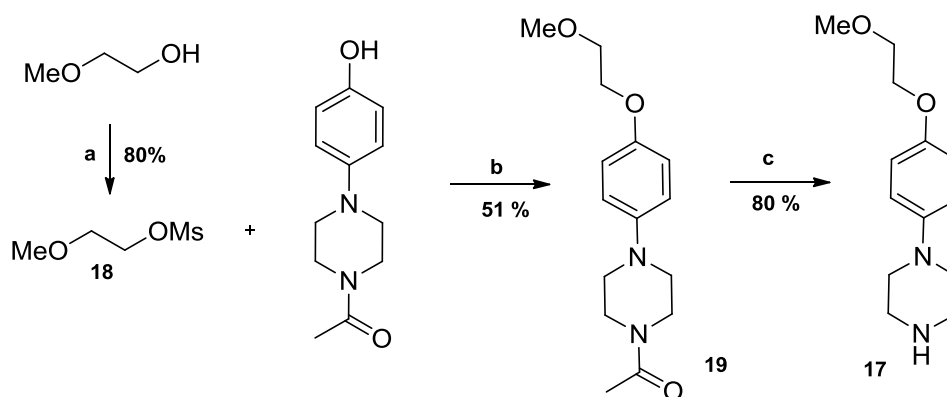
rendement de 88%. Une réaction de Buchwald-Hartwig est ensuite réalisée par action de la pipérazine¹⁶⁷ pour obtenir le composé **17** avec un faible rendement de 10% après purification par chromatographie sur gel de silice.



Réactifs et conditions : a) 1-bromo-2-méthoxyéthane (1.1 éq.), K₂CO₃ (1.1 éq.), DMF, 60°C ; b) NaOtBu (1.4 éq.), Pd₂(dba)₃ (1%), BINAP (3%), pipérazine (6.0 éq.), toluène, N₂, reflux

Schéma 8: Obtention du composé 17

Une deuxième voie de synthèse décrite par Silverman¹⁶⁷ a été effectuée (schéma 9). La 1-acétyl-4-(4-hydroxyphényl)pipérazine commerciale est traitée par du NaH dans du DMF en présence du 2-méthoxyéthyle méthanesulfonate (**18**) pour donner le composé **19** avec un rendement de 49%. La déprotection de la pipérazine est ensuite effectuée au reflux d'HCl (3N) avec un rendement de 80%. Il est à noter que le 2-méthoxyéthyle méthanesulfonate (**18**) est obtenu avec un rendement de 80% par traitement du 2-méthoxyéthanol commercial avec du chlorure de mésyle en présence de Et₃N dans le DCM.



Réactifs et conditions : a) MsCl (1.1 éq.), DCM, 25°C ; b) NaH (2.0 éq.), DMF (1.2 éq.), 70°C ; c) HCl (3N) (25.0 éq.), 80 °C

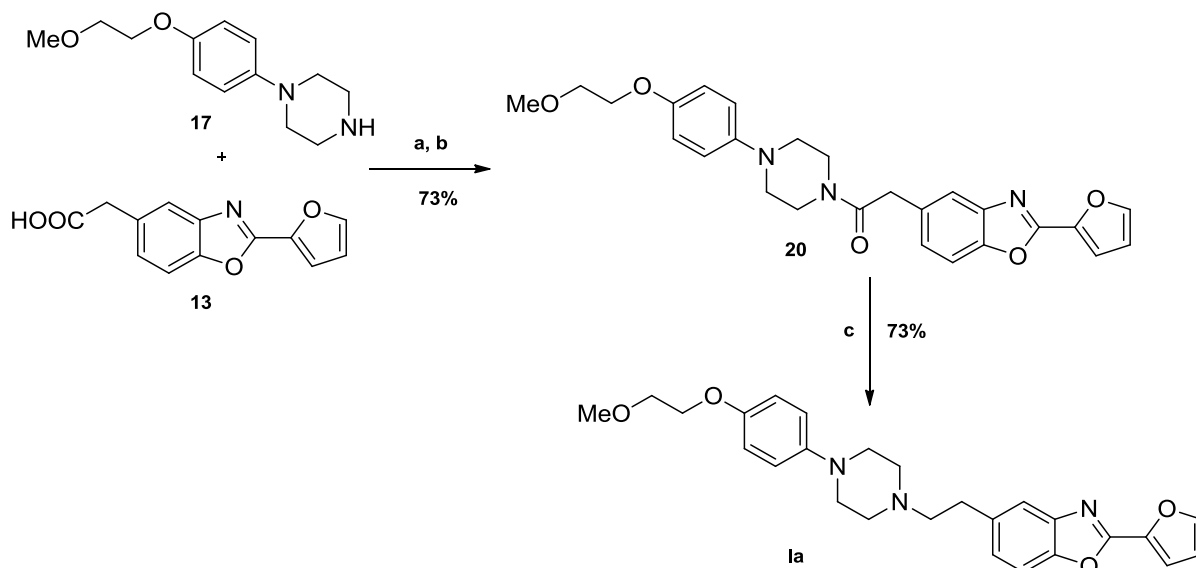
Schéma 9 : Synthèse du composé 17

▪ Synthèse du dérivé **1a**

La synthèse du composé **1a** est réalisée en deux étapes à partir des molécules **13** et **17** (schéma 10). L'acide **13** est tout d'abord activé par action de SOCl₂ dans le toluène. Le chlorure d'acide n'est pas isolé et est utilisé tel quel pour conduire, après traitement par le dérivé pipérazine **17** en présence

¹⁶⁷ Silverman L.S. et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2007**, *17*, 1659–1662

d'Et₃N dans l'AcOEt, à l'amide **20** avec un rendement de 73%. Ce dernier est réduit par action du LAH dans le THF pour donner la molécule **1a** avec un rendement de 73%.



Réactifs et conditions : a) SOCl₂ (3.0 éq.), toluène, reflux ; b) Et₃N (2.0 éq.), AcOEt 0-25°C ; c) LiAlH₄ (3.0 éq.), THF

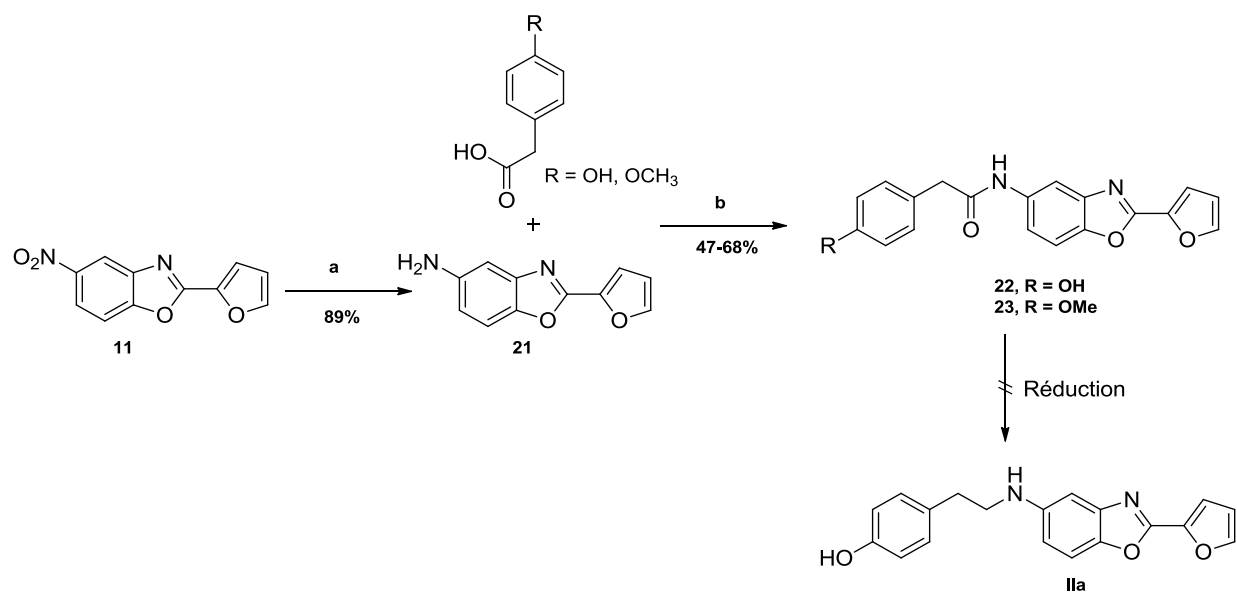
Schéma 10 : Synthèse du composé **1a**

2-2- Synthèse de l'analogue du ZM241385 (**11a**)

Afin d'accéder à l'analogue du ZM241385 (**11a**), 2 voies de synthèse ont été élaborées en partant du dérivé 5-nitro-benzoxazole (**11**).

▪ 1^{ère} voie

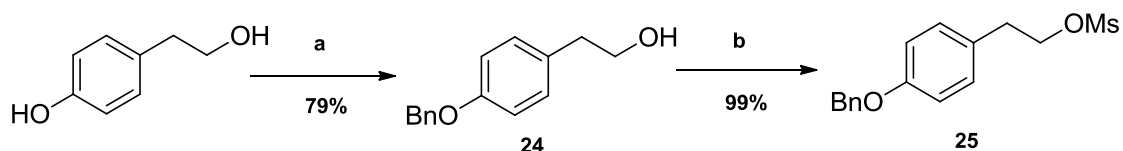
Une première voie consiste à passer par un intermédiaire amide (**22** et **23**) potentiellement intéressant à évaluer sur le récepteur A_{2A}. Pour ce faire, le dérivé nitré **11** est tout d'abord réduit par action d'hydrate d'hydrazine en présence de Pd/C pour conduire à l'amine **21** (schéma 11). Les amides **22** et **23** sont ensuite obtenus par couplage de type peptidique avec de bons rendements. Plusieurs essais de réduction de la fonction amide secondaire des composés **22** et **23** en utilisant des conditions classiques telles que l'hydrure mixte de lithium et d'aluminium ou le borane (BH₃/THF) ont été utilisés en vain. Ce résultat n'est toutefois pas surprenant étant donné qu'on est ici en présence d'un amide secondaire aromatique.



Réactifs et conditions : a) NH₂NH₂·H₂O (1.2 éq.), Pd/C, MeOH, b) EDCI (1.0 éq.), HOBT (1.0 éq.), DMAP (1.0 éq.), DCM

Schéma 11 : Synthèse envisagée pour obtenir le produit (IIa)

Afin de pallier ce problème de réduction et éviter de passer par un intermédiaire amide, une réaction de substitution nucléophile entre l'amine **21** et le dérivé mésylé **25** a été envisagée. La préparation du composé **25** à partir du 4-(2-hydroxyéthyl) phénol a donc été réalisée dans un premier temps (schéma 12) :



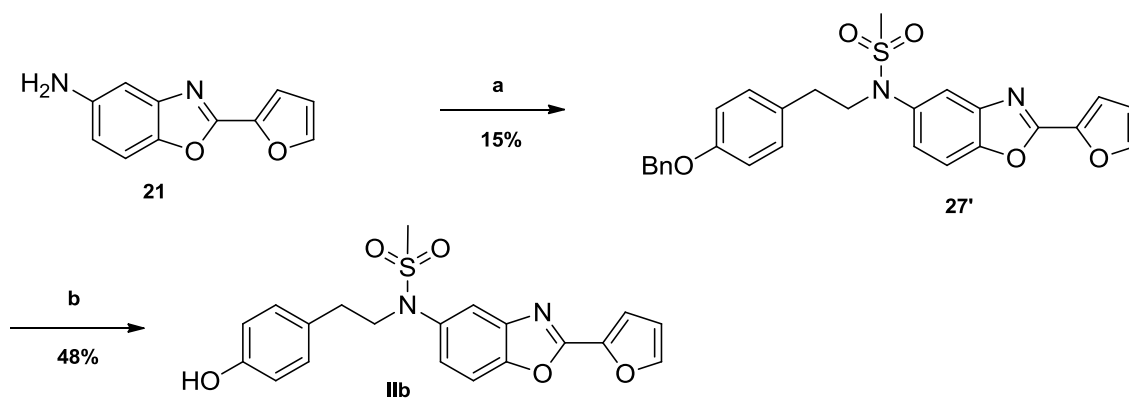
Réactifs et conditions : a) BnBr (1.0 éq.), K₂CO₃ (1.5 éq.), acétone, reflux ; b) CH₃SO₂Cl (2.0 éq.), Et₃N (2.3 éq.), DCM, 0-25°C

Schéma 12 : Synthèse du composé 25

La première étape consiste à protéger sélectivement la fonction phénol du 4-(2-hydroxyéthyl)phénol par un groupement benzyle. Cette réaction est réalisée en présence de bromure de benzyle et de carbonate de potassium dans l'acétone à reflux. Le composé protégé **24** est obtenu avec un rendement de 79%. L'activation de l'alcool primaire est effectuée par le chlorure de méthanesulfonyle en présence de triéthylamine dans le dichlorométhane pour donner le dérivé mésylé **25** avec un rendement de 99%.

Ce dérivé mésylé est par la suite mis en réaction avec l'amine **21** (schéma 13) en présence de K₂CO₃ dans le DMF pour conduire au composé inattendu **27'**. Ce dernier est obtenu avec un faible rendement de 15%. La formation de celui-ci peut s'expliquer de par la formation *in situ* de l'anhydride méthanesulfonique très réactif, venant réagir avec l'amine secondaire. Ce composé est

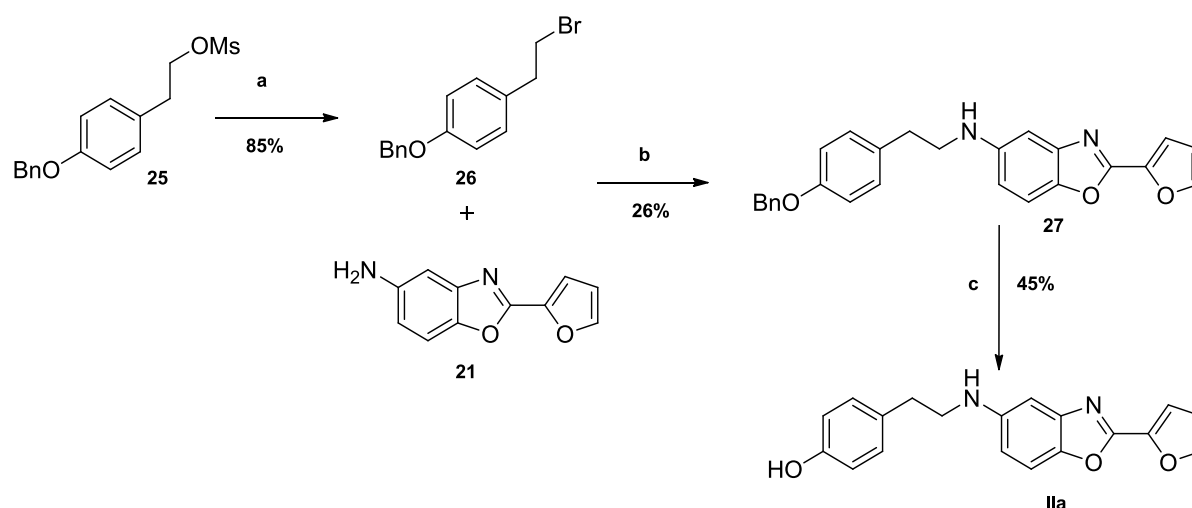
finaleme nt traité en présence de palladium sur charbon et de formiate d'ammonium dans le méthanol. Le composé final **IIb** est obtenu avec un rendement de 48%.



Réactifs et conditions : a) **25**, K₂CO₃ (1.5 éq.), DMF, 70°C ; b) H₂, Pd/C, MeOH, 25°C

Schéma 13 : Synthèse du produit IIb

Afin d'éviter la formation du composé **27'**, une étape de bromation de **25** est réalisée (schéma 14).



Réactifs et conditions : a) LiBr (2.5 éq.), acétone, reflux ; b) K₂CO₃ (1.5 éq.), reflux ; c) H₂, Pd/C, MeOH, 25 °C

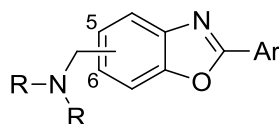
Schéma 14 : Synthèse du produit II

Le composé **25** est traité par LiBr au reflux de l'acétone et fournit le dérivé bromé **26** avec un rendement de 85%. Ce dernier est mis en réaction pour alkyler l'amine **21** et obtenir le composé **27** avec un faible rendement de 26%. Ce faible rendement s'explique d'une part, par une réaction d'élimination sur le dérivé bromé **26** dans ces conditions de réaction, et d'autre part, du fait de la faible réactivité de l'amine primaire aromatique. Enfin la réaction de débenzylation est effectuée par hydrogénation catalytique en présence de palladium sur charbon dans le méthanol. Le composé final **IIa** est obtenu avec un rendement de 45%.

3- Synthèses des molécules cibles des séries III, IV, V

3-1- Synthèses des dérivés III (1 carbone)

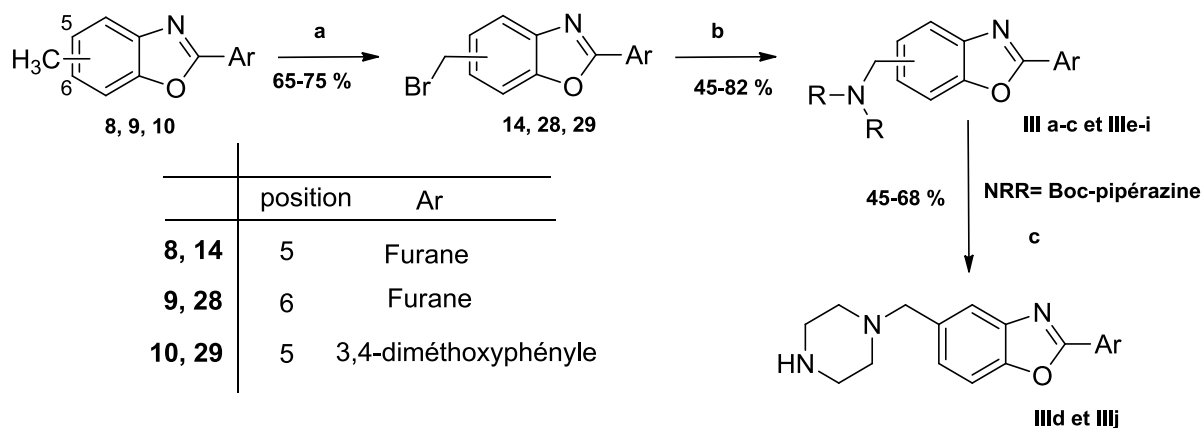
Les composés préparés sont rapportés sur le tableau 4.



N°	Ar	Amine	Position
IIIa	Furane	Pipéridine	5
IIIb	Furane	Phénylpipérazine	5
IIIc	Furane	Boc-pipérazine	5
III d	Furane	Pipérazine	5
IIIe	Furane	Pipéridine	6
III f	Furane	Phénylpipérazine	6
III g	3,4-diméthoxyphényle	Pipéridine	5
III h	3,4-diméthoxyphényle	Phénylpipérazine	5
III i	3,4-diméthoxyphényle	Boc-pipérazine	5
III j	3,4-diméthoxyphényle	Pipérazine	5

Tableau 4 : Dérivés à un carbone (série III)

Le schéma réactionnel mis en œuvre pour accéder à ces composés est décrit ci-dessous :



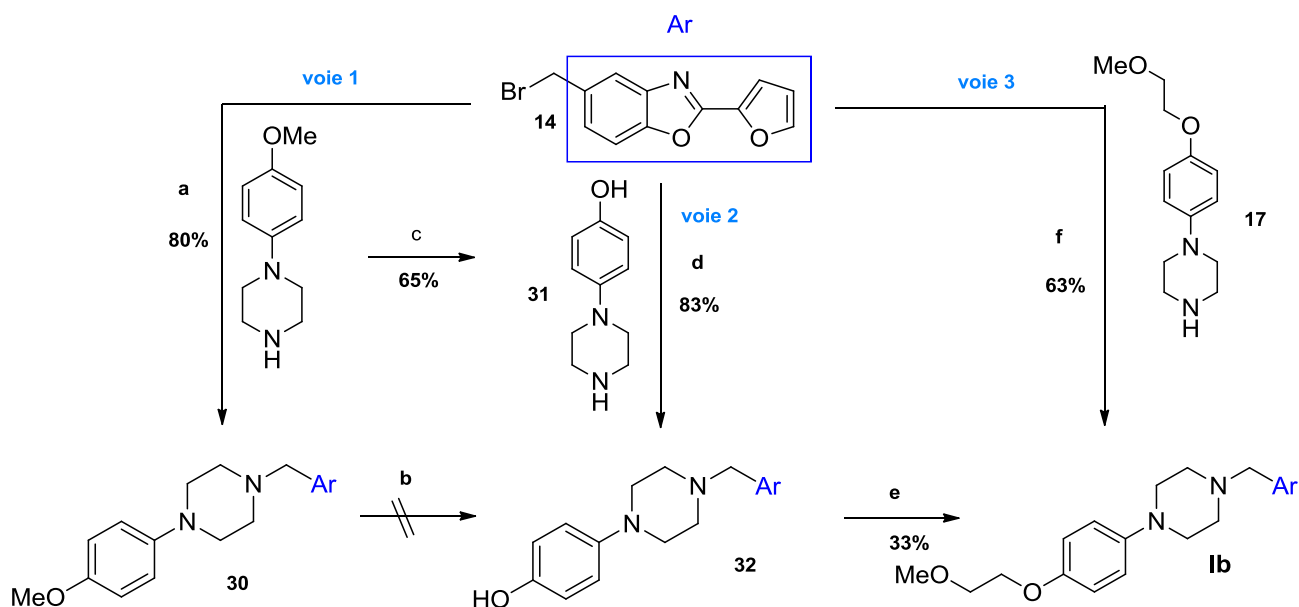
Réactifs et conditions : a) NBS (1.2 éq.), Peroxyde Benzoylé (0.07 éq.), CCl₄, reflux/hv ; b) Amines (1.0 éq.), Et₃N (1.1 éq.), acétone, reflux ; c) TFA (6.0 éq.), DCM, 25°C

Schéma 15 : Synthèse des composés cibles (IIIa-j)

Pour cela, une première étape de bromation radicalaire est effectuée, comme décrit pour la synthèse du composé **1a** (cf page 66), pour donner les dérivés bromés **14**, **28** ou **29** respectivement. La synthèse des molécules cibles (**IIIa-c** et **IIIe-i**) est effectuée par une simple substitution nucléophile

entre les dérivés bromométhylbenzoxazoles (**14**, **28** et **29**) et une amine cyclique secondaire. La réaction est réalisée au reflux de l'acétone en présence de triéthylamine. Concernant la synthèse des molécules **IIId** et **IIIj**, une déprotection de la Boc-pipérazine en présence de TFA dans le DCM est réalisée.

Il nous a aussi semblé intéressant de synthétiser le composé **Ib**, homologue inférieur du composé **Ia**. Trois voies de synthèse ont été élaborées comme le montre le schéma 16 ci-dessous :



Réactifs et conditions : *voie 1* a) Et₃N (1.2 éq.), DCM, reflux ; b) AlCl₃ (4.0 éq.), DCM, reflux ; *voie 2* c), HBr 48% (1.5 éq.), AcOH, reflux ; d) Et₃N (1.2 éq.), DCM, reflux ; e) NaH (2.0 éq.), **18** (1.1 éq.), DMF, 60°C ; *voie 3* f) Et₃N (1.2 éq.), **18** (1.1 éq.), DMF, 60°C

Schéma 16 : Voies de synthèse envisagées pour l'obtention du composé (Ib)

- **Voie 1 :**

Cette première voie semble particulièrement intéressante puisqu'elle nous aurait permis d'accéder à deux composés (**30**, **32**) potentiellement intéressants. La substitution nucléophile du dérivé bromé **14** par la 1-(4-méthoxyphényl)-pipérazine est réalisée en présence de Et₃N dans le DCM. Le composé **30** est obtenu avec un rendement de 80%. Des essais de déméthylation de ce dernier ne permettent cependant pas d'obtenir le composé **32**. En effet, le chlorhydrate du composé **32** précipite dans le milieu et la réaction de déméthylation ne se fait pas. De ce fait, 2 autres voies de synthèse ont été élaborées parallèlement.

- Voie 2 :

Pour cette deuxième voie, sachant que la pipérazine est plus réactive que la fonction phénol, une substitution nucléophile entre le dérivé bromé **14** et le composé **31** préalablement synthétisé, permet d'obtenir le composé **32** avec un rendement de 83%. Ce dernier est *O*-alkylé par le 2-méthoxyéthyle méthanesulfonate **18** en présence de NaH dans du DMF pour donner le produit **1b** avec un rendement de 33%.

- Voie 3 :

Enfin une troisième voie de synthèse permet d'accéder au composé **1b** désiré en une seule étape. Pour cela, une simple étape de substitution nucléophile entre le composé **17** préalablement synthétisé pour préparer l'analogue du Préladenant (**1a**), et le dérivé bromé **14** en présence de Et₃N dans du DMF, est réalisée. Le composé **1b** est obtenu avec un rendement de 63%.

3-2- Synthèses des dérivés **IV** (2 carbones)

3-2-1- Approche rétrosynthétique

Afin d'accéder aux dérivés à 2 carbones, une analyse rétrosynthétique a été élaborée à partir du dérivé 5-(bromométhyle)-2-(furan-2-yl)-1,3-benzoxazole (**14**) et rapportée sur le schéma 17 ci-dessous :

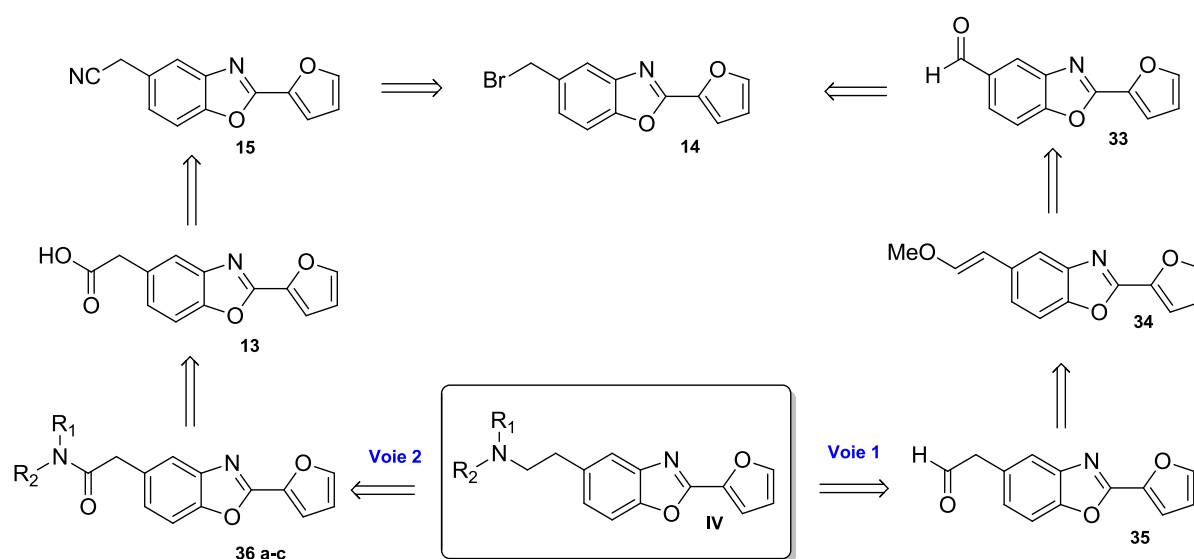


Schéma 17 : Rétrosynthèse des dérivés **IV**

L'obtention des molécules **IV** peut s'envisager selon deux voies.

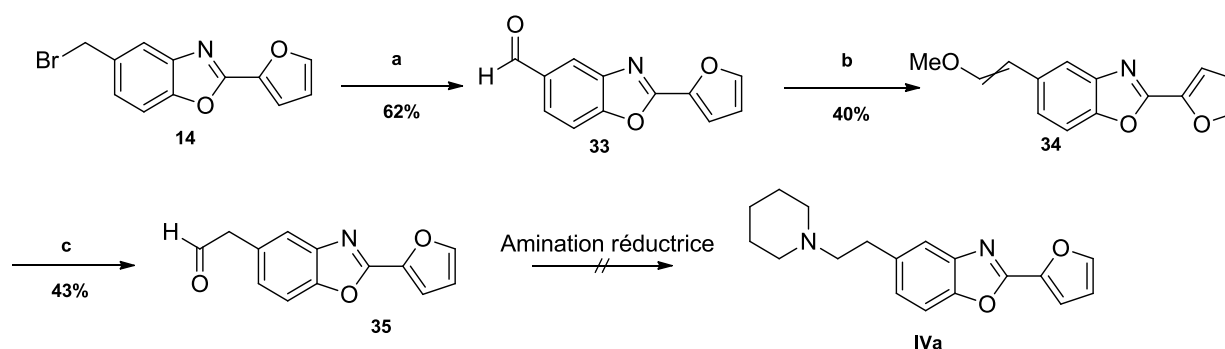
En utilisant la voie 1, les molécules **IV** seraient obtenues par amination réductrice d'une amine secondaire sur le dérivé aldéhyde **35**. Ce dernier proviendrait de l'hydrolyse de l'oléfine **34** obtenue par réaction de Wittig sur l'aldéhyde **33**, lui-même synthétisé à partir de **14**. La voie 2 permettrait

d'accéder aux composés **IV** par réduction des amides tertiaires obtenus à partir du dérivé **13** préalablement synthétisé pour l'obtention de l'analogue du Préladenant **1a** (cf page 68).

3-2-2- Synthèse des dérivés à 2 carbones présentant un noyau furane en 2

Voie 1 : Essais d'obtention des composés à 2 carbones via une réaction de Wittig

La voie de synthèse utilisée pour mettre en œuvre cette première voie rétrosynthétique est rapportée sur le schéma 18. L'aldéhyde **33** est tout d'abord obtenu avec un rendement de 62% à partir du dérivé bromé **14** par action de la *N*-méthylmorpholine-*N*-oxide (NMO) au reflux de l'acétonitrile.¹⁶⁸ Le composé **33** ensuite subit une réaction de Wittig¹⁶⁹ par action du bromure de (méthoxyméthyl)triphénylphosphonium en présence de NaHMDS dans le THF anhydre pour conduire à un mélange 50/50 du dérivé Z et E (**34**, rdt = 40%) déterminé par RMN. Ce dernier est ensuite traité par action du TFA dans un mélange H₂O/DCM pour donner **35** avec un rendement de 43%. Des essais d'amination réductrice par action de NaBH(OAc)₃ ou de NaBH₃CN ont été tentés en vain et n'ont pas permis d'obtenir **IVa**. De ce fait, la deuxième voie de synthèse a été étudiée afin d'obtenir les composés **IV**.



Réactifs et conditions : a) NMO (3.0 éq.), ms 4 A, AN, reflux ; b) Ph₃P⁺CH₂OMeBr⁻ (1.5 éq.), NaHMDS (2.0 éq.), THF, N₂, -30 à 25°C ; c) TFA (3.6 éq.), H₂O/DCM, 25°C

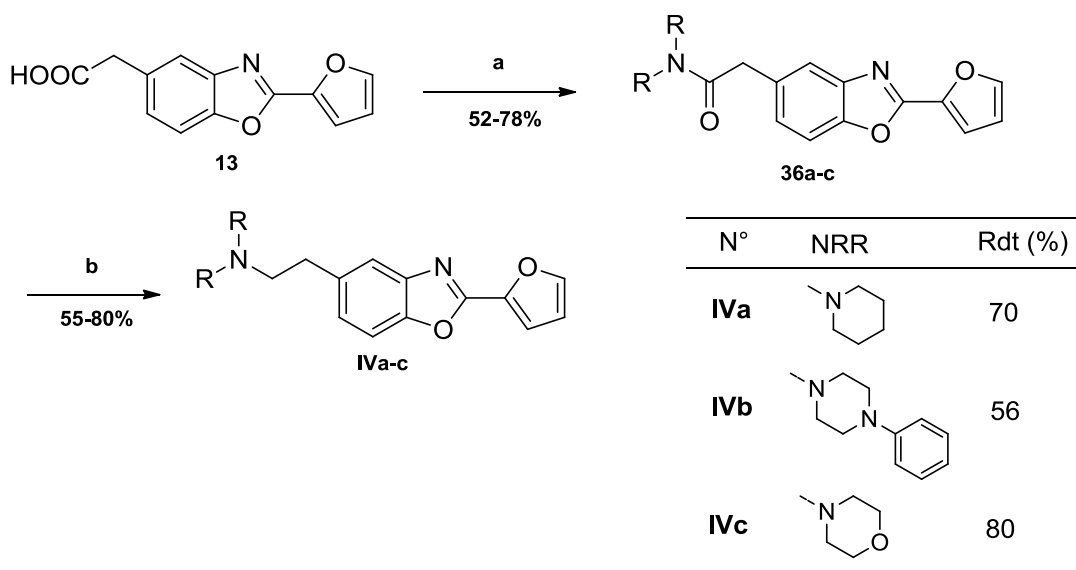
Schéma 18 : Synthèse envisagée pour le composé IV

Voie 2 : Préparation des composés à 2 carbones

Cette deuxième voie de synthèse (schéma 19) consiste à utiliser l'acide carboxylique **13** décrit pour la synthèse de l'analogue du Préladenant (cf page 68). Ce dernier est ensuite activé par action de SOCl₂ dans le dichlorométhane. Le chlorure d'acide n'est pas isolé et est utilisé à l'état brut pour conduire par action des amines adéquates aux amides désirés (**36a-c**). Enfin, les amides sont réduits par action de LiAlH₄ dans le THF pour fournir les amines correspondantes (**IVa-c**).

¹⁶⁸ Shook B.C. et al., *J. Med. Chem.*, **2012**, *55*, 1402-1417

¹⁶⁹ Tran V.H. et al., *Eur. J. Org. Chem.*, **2006**, *13*, 2970-2976

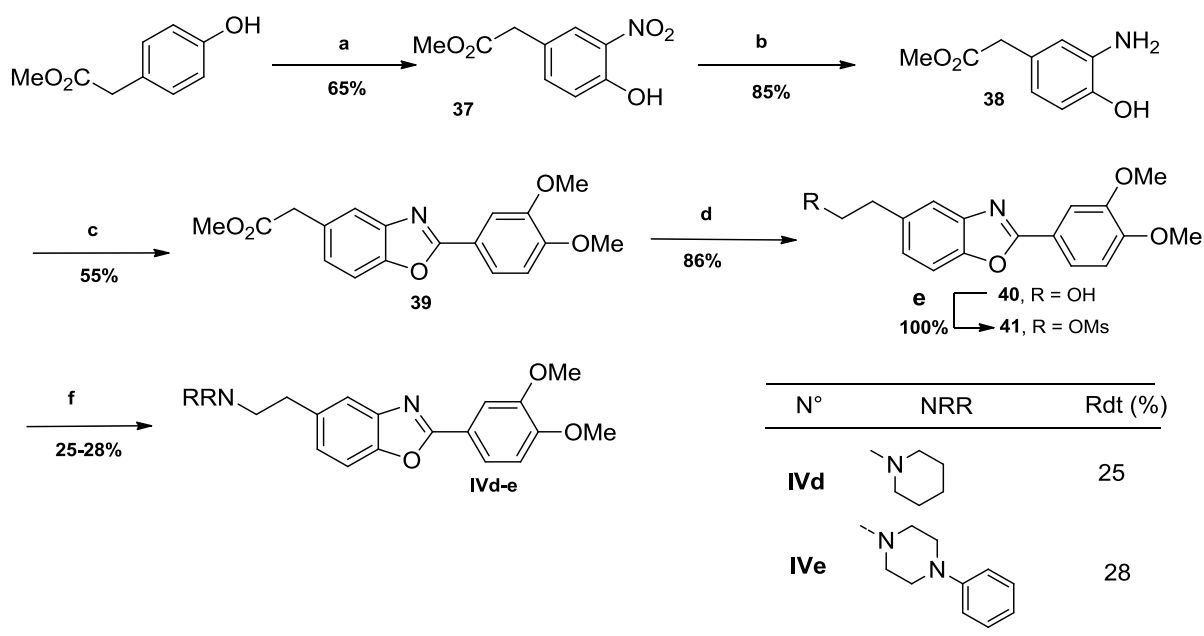


Réactifs et conditions : a) SOCl₂ (4.0 éq.), toluène ou DCM, reflux ; b) Amine (1.1 éq.), Et₃N (1.3 éq.), AcOEt, 0 à 25°C ; c) LiAlH₄ (2.5 éq.), THF, 25°C

Schéma 19 : Synthèse des dérivés en IVa-c

3-2-3) Préparation des molécules à 2 carbones présentant un noyau 3,4-diméthoxyphényle en 2 (IVd-e)

La voie de synthèse élaborée pour la préparation des composés IVd-e est rapportée sur le schéma 20.



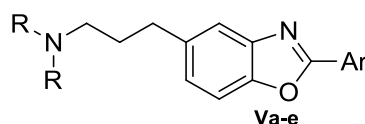
Réactifs et conditions : a) HNO₃ (1.0 éq.), AcOH, 0-5°C ; b) HCOO⁻NH₄⁺ (5.0 éq.), Pd/C (10%), MeOH, 60°C ; c) Acide 3,4-diméthoxybenzoïque (1.0 éq.), T₃P (1.5 éq.), DIPEA (1.0 éq.), 120 °C ; d) LiAlH₄ (3.0 éq.), THF, e) MsCl (1.5 éq.), DCM, 0-25°C ; f) Amine (1.3 éq.), K₂CO₃ (2.0 éq.), DMF, 60°C

Schéma 20 : Synthèse des molécules IVd-e

La nitration de l'acétate de méthyle-4-hydroxyphényle est effectuée en présence d'un mélange HNO_3/AcOH entre 0 et 5 °C pour obtenir le composé **37**.¹⁷⁰ Il est important de contrôler la température car au-delà de 5 °C, la formation du composé 2,6 dinitré est observée. Le dérivé **37** est ensuite réduit par action du formiate d'ammonium en présence de Pd/C dans le méthanol pour conduire à l'amine **38** avec un rendement de 85%. L'étape de formation du dérivé benzoxazole **39** est réalisée selon la voie 1 décrite page 71, en présence de T₃P et d'acide 3,4-diméthoxybenzoïque, avec un rendement de 55%. L'ester **39** est ensuite traité par du LiAlH₄ dans du THF pour donner l'alcool **40** avec un rendement de 86%. L'activation de ce dernier par action du chlorure de mésyle dans le dichlorométhane permet d'obtenir le composé **41**. Enfin, la substitution nucléophile est réalisée par action des amines secondaires dans l'acétone en présence de Et₃N.

3-3- Synthèses des dérivés V (3 carbones)

Les produits de la série V préparés sont rapportés sur le tableau 5 ci-dessous.

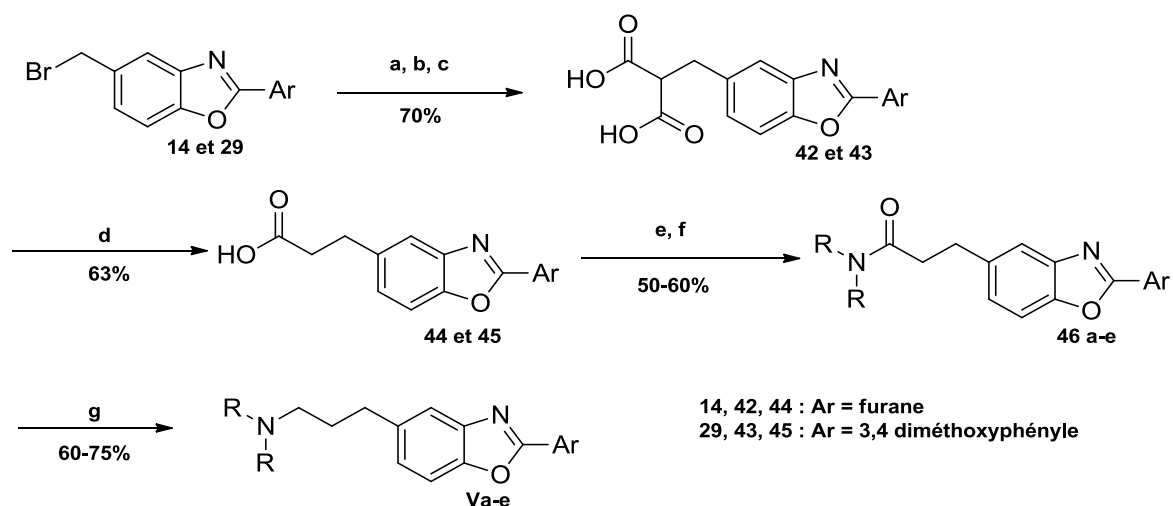


N°	Ar	NRR
Va	Furane	Phénylpipérazine
Vb	3,4-diméthoxyphényle	Pipéridine
Vc	3,4-diméthoxyphényle	Phénylpipérazine
Vd	3,4-diméthoxyphényle	Morpholine
Ve	3,4-diméthoxyphényle	Pipérazine

Tableau 5 : Molécules de la série V synthétisées

Le schéma 21, illustre la voie de synthèse élaborée pour accéder aux composés de la série V. Ces derniers sont préparés en 5 étapes à partir des dérivés bromés **14** ou **29**. La C-alkylation du malonate de diméthyle au reflux de l'acétone fournit les intermédiaires diester qui ne sont pas isolés mais engagés directement dans une étape d'hydrolyse basique à chaud. Après acidification, les composés diacides **42** et **43** sont obtenus avec un rendement global de 70%. La décarboxylation est réalisée par chauffage dans le DMF et conduit aux acides **44** et **45** avec un rendement moyen de 63%. Ces derniers sont ensuite activés par action de SOCl₂ dans le toluène et engagés à l'état brut, pour conduire par action des amines adéquates, aux amides désirés **46a-e** avec un rendement compris entre 60 et 75%. Enfin, les amides sont réduits par action de LiAlH₄ dans le THF pour fournir les amines correspondantes **Va-e**.

¹⁷⁰ Obermeyer A.C. et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, 136, 9572-9579



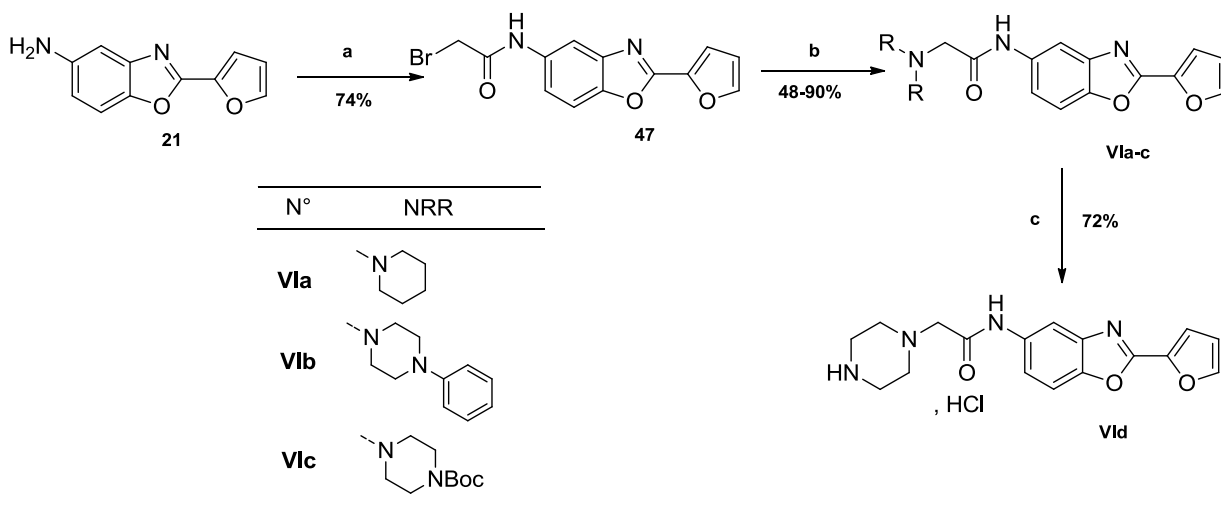
Réactifs et conditions : a) Malonate de diméthyle (2.0 éq.), K₂CO₃ (3.0 éq.), acétone, reflux ; b) NaOH (4.0 éq.), H₂O, reflux ; c) HCl ; d) DMF, 80 °C ; e) SOCl₂ (4.0 éq.), toluène ou DCM, reflux ; f) Amine (1.1 éq.), Et₃N (1.3 éq.), AcOEt, 0-25°C ; g) LiAlH₄ (2.5 éq.), THF, 25°C

Schéma 21 : Synthèse des dérivés en Va-e

4- Synthèses des amides (série VI) et du composé VIIa

4-1- Synthèse des molécules cibles VIa-d

Les amides **VIa-d** peuvent être obtenus en 2 ou 3 étapes à partir de l'amine **21** comme le montre le schéma 22 ci-dessous.



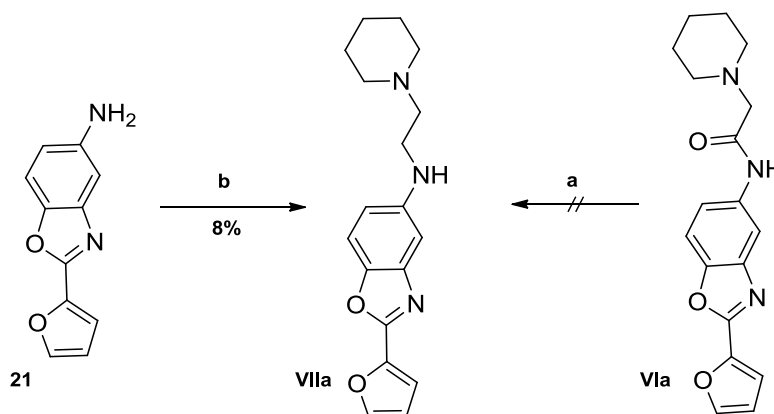
Réactifs et conditions : a) Bromure de bromoacétyle (1.2 éq.), Et₃N (2.0 éq.), DCM, 0-25°C ; b) Amine (1.1 éq.), K₂CO₃ (1.5 éq.), acétone, reflux ; c) VIc, HCl (6N) (5.0 éq.), MeOH, 40°C

Schéma 22 : Synthèse des molécules cibles VIa-d

L'amidification de l'amine **21** par le bromure de bromoacétyle en présence de Et₃N dans le DCM permet d'obtenir le composé **47** avec un rendement de 74%. Différentes amines secondaires cycliques sont greffées sur ce dernier en utilisant du K₂CO₃ dans l'acétone pour donner les molécules cibles **Vla-c**. Le composé **Vlc** subit enfin une déprotection par action d'HCl 6N dans le méthanol pour fournir le dérivé **Vld** avec un rendement de 72%.

4-2- Synthèse de la molécule cible **VIIa**

Pour préparer le composé **VIIa**, la voie d'accès la plus simple était de réduire le carbonyle de l'amide secondaire du composé **Vla** (schéma 23). Plusieurs essais de réduction ont été réalisés en vain. Le même problème que pour la réduction des amides secondaires de la série **IIa** (cf page 69) est donc rencontré. Afin d'obtenir la molécule **VIIa**, une *N*-alkylation par la *N*-chloroéthylpipéridine dans le DMF est donc réalisée.¹⁷¹ Etant donnée la faible réactivité de l'amine primaire aromatique **21** et l'instabilité en milieu basique du réactif chloré, le composé **VIIa** est obtenu avec un très faible rendement de 8%. Il est à noter que la synthèse de ce composé n'a été réalisée qu'une seule fois et n'a ainsi pas été optimisée.



Réactifs et conditions : a) LiAlH₄, THF ; b) Chlorhydrate de *N*-chloroéthylpipéridine (2.0 éq.), KI (0.2 éq.), K₂CO₃ (3.0 éq.), DMF, 70°C

Schéma 23 : Synthèse de la molécule VIIa

III- Evaluation pharmacologique

Des études *in vitro* et *ex vivo* des molécules synthétisées ont été réalisées à la fin de ma 1^{ère} année de thèse. Dans un premier temps, la mesure de la cytotoxicité cellulaire sur cellule neuronale SY5Y a été effectuée. Dans un second temps, j'ai réalisé des études d'affinité vis-à-vis du récepteur A_{2A} au sein de l'Unité de Neurosciences de l'Institut de Médecine Moléculaire (IMM) du Dr Luisa Lopes, à Lisbonne (Portugal). Durant 8 semaines de stage, j'ai été formé aux études de mesure

¹⁷¹ Frechette S. et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2008**, *18*, 1502–1506

d'affinité par compétition de radioligand. J'ai ainsi réalisé les mesures d'affinité de mes ligands et surtout, j'ai pu transférer les compétences au sein de la plate-forme de binding de la Faculté de Pharmacie de Lille. Ceci m'a permis d'être autonome et d'évaluer mes composés au fur et à mesure de leur synthèse au cours de ma 2^{ème} et 3^{ème} année de thèse.

1- Cytotoxicité

L'évaluation de la cytotoxicité des composés a été réalisée par Amélie Barczyk (U-995). La mesure de la prolifération cellulaire s'effectue *via* l'activité enzymatique de la succinyl déshydrogénase mitochondriale (Test MTT). L'étude a été réalisée en triplicata sur une lignée cellulaire de neuroblastomes humains SY5Y. Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la croissance cellulaire à des concentrations de 100 µM (résultats sur les tableaux 6 et 7). La détermination de l'IC₅₀ pour les composés présentant un pourcentage supérieur à 50% a aussi été réalisée.

2- Mesure d'affinité

L'évaluation de l'affinité vis-à-vis du récepteur A_{2A} pour cette famille de composés a été réalisée par compétition de nos molécules avec un radioligand.

L'affinité est mesurée par la quantification directe du complexe ligand récepteur (LR) sur une préparation de membranes de cellules HEK293 exprimant le récepteur (membranes Perkin Elmer). Dans un premier temps, la détermination de la constante de dissociation (K_D) a été réalisée car cette valeur est indispensable pour évaluer la constante d'inhibition (K_i) de nos molécules selon l'équation de Cheng et Prusoff ci-dessous :

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[L^*]}{K_D}}$$

Figure 42 : Equation de Cheng et Prusoff

Cette courbe de saturation représente la confirmation expérimentale de l'isotherme de Langmuir par rapport à l'absorption d'une substance sur une surface (ici le [³H]ZM-241385 sur le récepteur A_{2A}). Cette courbe permet, d'une part la détermination de l'affinité du radioligand pour le récepteur *via* le calcul d'une constante de dissociation, et d'autre part de déterminer le nombre maximal de sites de liaison (B_{max}). Cette courbe est tracée en augmentant la concentration du radioligand ([³H]-ZM-241385) (0.1 nM à 7 mM) pour une quantité fixe de membranes (figure 43).

Cette courbe est tracée selon l'équation suivante :

$$[L * R] = \frac{[L*][Bmax]}{[L*]+KD}$$

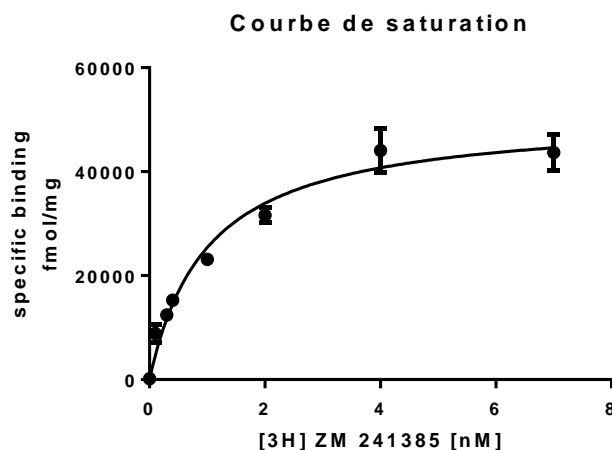


Figure 43 : Représentation de la courbe de saturation

Pour les mesures de K_i , les membranes sont incubées en présence d'une concentration fixe en radioligand ($[^3\text{H}]\text{-ZM-241385}$, $[2\text{nM}]$), formant le complexe L^*R , et notre ligand qui est ajouté à concentration croissante (6 nM à 600 μM). L'affinité vis-à-vis du récepteur est mesurée par déplacement de l'antagoniste radiomarqué.

64 molécules appartenant à différentes familles ont été testées. Dans un premier temps un screening à 10 μM de toutes les molécules est réalisé (test réalisé en duplica). Pour les molécules présentant un déplacement du radioligand de plus de 70%, le calcul de la constante d'affinité est effectué pour obtenir des courbes comme montré sur la figure 44.

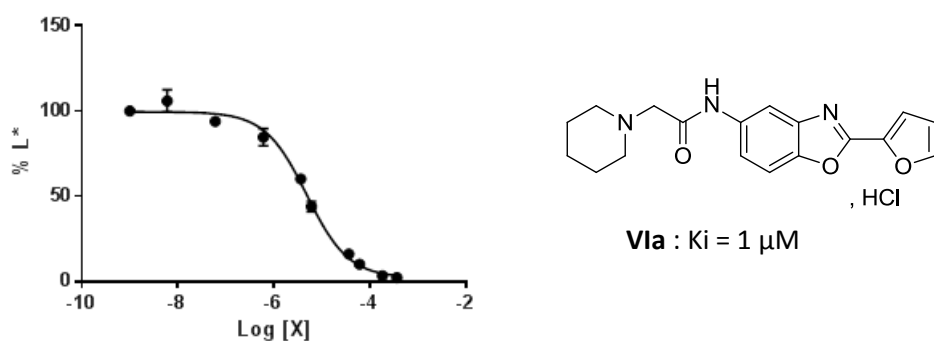


Figure 44 : Courbe de compétition obtenue pour le composé VIa

3- Relation structure-affinité

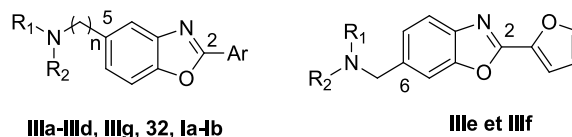
Dans un souci de clarté pour présenter les résultats d'affinité, toutes les molécules n'ont pas été rapportées dans les tableaux 6 et 7. Les molécules non illustrées n'ont présenté aucune affinité pour le récepteur A_{2A}. A la lecture des tableaux 6 et 7, il est possible de tirer les relations structure-affinités suivantes :

- *Modulation des amines*

La première série de molécules avec un méthylène comme linker (n = 1) nous permet dans un premier temps de dégager des premières relations structures/affinités (tableau 6). En comparant les molécules **IIIa-d**, **32** et **Ib**, la pipéridine apparaît comme l'amine tertiaire de choix. En effet, une perte importante d'affinité est observée pour toutes les autres amines. Ce résultat est particulièrement étonnant, notamment pour la phénylpipérazine, qui est largement utilisée pour les antagonistes A_{2A} mais donc pas tolérée pour notre série.

- *Modulation des aryles en position 2*

Pour ce qui est de l'aryle en position 2 du benzoxazole, le remplacement du furane du composé **IIIa** par le 3,4-diméthoxyphényle (**IIIg**) entraîne une perte totale d'affinité (tableau 6). Ce résultat est en accord avec de nombreuses données de la littérature puisqu'un grand nombre d'antagonistes A_{2A}Rs présente un hétérocycle furane comme décrit lors du chapitre 2 (pages 48-57). La même tendance est observée pour les autres analogues où le furane s'avère toujours meilleur que le 3,4-diméthoxyphényle.



Cpd.	Ar	NR ₁ R ₂	Ki(μM) ^a / ^b %inhib ^b	CC ₅₀ ^c / % inhib ^d	
n = 1	IIIa		19 ± 3.1 μM	1%	
	IIIb		10%	33%	
	IIIc		15%	30%	
	IIIc			15%	0%
	32			11%	27%
	lb			14%	37%
	IIIe			5%	0%
n = 2	IIIc		12%	45%	
	IIIg		18%	0%	
	IIIg			18%	0%
	IVa		7 ± 1.4 μM	1%	
	IVb		3%	0%	
	IVc		11 ± 0.5 μM	11%	
	la			10%	/
n = 3	IVd		10%	40%	
	IVe		5%	19%	
	IVe			5%	19%
	Va			28%	/
	Vb			10%	73 μM
	Vc			11%	

^a ZM241385 utilisé comme référence des antagonistes des A_{2A}R (Ki = 2.3 nM). Déplacement spécifique du [³H]-ZM 241385 lié au récepteur hA_{2A} exprimé dans les cellules HEK293. ^b Pourcentage de déplacement du [³H]-ZM 241385 à 10 μM. ^c Concentration du composé provoquant 50% de cellules SY5Y mortes après 24 h de traitement. ^d Pourcentage de cellules SY5Y mortes après 24 h de traitement à 100 μM

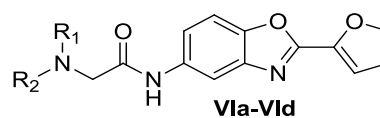
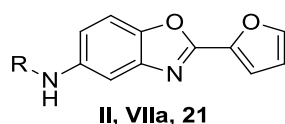
Tableau 6: Affinité pour les récepteurs A_{2A} et cytotoxicité des composés IIIa-IIIg, Ia-Ib et 32

- *Modulation du linker*

Tout d'abord, concernant la position de la chaîne protonable, les composés avec la chaîne en position C-5 ont une meilleure affinité que les composés avec une chaîne en position C-6 (**IIIa** vs **IIIe**) (tableau 6). Par comparaison de **IIIa** avec **IVa**, il apparaît que l'allongement de la chaîne à deux carbones est bénéfique pour l'affinité. Enfin, les valeurs d'affinité de **Vla** (11 μM) et **VIIa** (1 μM) (tableau 7) montrent qu'un « linker » à trois atomes est aussi bien toléré.

En comparant ces deux derniers, la rigidification du linker en incorporant un amide à la place d'une amine permet d'augmenter l'affinité (**Vla** > **VIIa**). La molécule **Vla** s'avère donc la plus affine pour cette première série de benzoxazole avec une affinité à 1 μM . Comme rapporté sur la figure 39 (cf page 58), ce linker à trois atomes semble nécessaire pour permettre une bonne interaction entre la pipéridine et le Glu169. De plus, le remplacement de l'amine protonable du composé **VIIa** par la chaîne aminoéthylphénol présente dans le ZM-241385 (**IIa**) conduit à une forte diminution d'affinité, montrant ainsi l'importance d'une amine tertiaire dans cette série. A partir de ce résultat et de celui de la molécule **Ia**, l'hypothèse de départ qui consistait à valider le noyau 2-furane-benzoxazole *via* la synthèse d'analogue du ZM241385 (**II**) et du Préladenant (**Ia**), ne peut donc pas être confirmée.

Le composé **21** malgré une affinité modérée ($K_i = 10 \mu\text{M}$) présente l'avantage de posséder un faible poids moléculaire ($\text{MW} = 200 \text{ g.mol}^{-1}$) et offre donc des possibilités de modulations notamment en position 7. Cette molécule apparaît donc comme un « hit » prometteur pour de futures études autour de cette série benzoxazole.



Cpd.	R	Ki (μM) ^a / % inhib ^b	CC ₅₀ ^c / % inhib ^d	Cpd.	NR ₁ R ₂	Ki (μM) ^a / % inhib ^b	CC ₅₀ ^c / % inhib ^d
21	H	10 ± 0.5 μM	4%	VIa		1 ± 0.08 μM	1%
VIIa		11 ± 0.02 μM	3%	VIb		12%	1%
IIa		15%	55 μM	VIc		25%	12%
				VIId		8%	0%

^a ZM241385 utilisé comme référence des antagonistes des A_{2A}R (Ki = 2.3 nM). Déplacement spécifique du [³H]-ZM 241385 lié au récepteur hA_{2A} exprimé dans les cellules HEK293. ^b Pourcentage de déplacement du [³H]-ZM 241385 à 10 μM. ^c Concentration du composé provoquant 50% de cellules SY5Y mortes après 24 h de traitement. ^d Pourcentage de cellules SY5Y mortes après 24 h de traitement à 100 μM

Tableau 7 : Affinité pour les récepteurs A_{2A} et cytotoxicité des composés VIa-VIId, II et 21

Pour la molécule la plus affine (**VIa**), la mesure de la solubilité a été effectuée. Celle-ci présente une très bonne solubilité (184 μM, pH 7,4), bien plus importante que beaucoup d'antagonistes de référence tels que l'Istradefylline (KW-6002), le Preladenant (SCH 420814) ou encore le SCH02814 qui ont une solubilité de 1,8 nM et 0,02 nM et 0,2 μM respectivement.^{172,173,174} Seule la pro-drogue MSX-3, présente quant à elle une très bonne solubilité (17 mM). Enfin, comme rapporté sur les tableaux 6 et 7, aucune toxicité n'est observée à 100 μM sur les lignées cellulaires de neuroblastes (SY5Y) pour les composés actifs.

En résumé, les modulations réalisées autour du noyau benzoxazole ont permis d'identifier deux « hits » prometteurs pour de futures optimisations (Chap. II, 2^{ème} partie). Cette première série permet aussi de voir qu'un furane en position C-2 combiné à une pipéridine avec un linker amide en position C-5 conduit au composé le plus affin de la série (**VIa**).

4- Enregistrement électrophysiologique

La découverte que le fonctionnement du système nerveux est fortement lié à son activité électrique remonte aux années 1700. La mesure de cette activité électrique permet d'évaluer les propriétés

¹⁷² Evaluation and Licensing Division, Pharmaceutical and Food Safety Bureau Ministry of Health, Labour and Welfare, <https://www.pmda.go.jp/files/000153870.pdf>, 2013

¹⁷³ Müller C.E., *Chemistry & Biodiversity*, **2009**, 6, 2071-208

¹⁷⁴ Slee D.H. et al., *J. Med. Chem.*, **2008**, 51, 400-406

électriques des cellules et tissus. Pour développer cette technique, il est nécessaire d'avoir une méthode permettant aux "tranches" du cerveau (dans notre cas de l'hippocampe) de rester en vie avec une activité métabolique et neuronale active. Il est montré que des tranches de l'hippocampe de 400 μm gardées dans un liquide céphalo-rachidien artificiel oxygéné (voir partie expérimentale) permettent à l'hippocampe de garder une activité neuronale.¹⁷⁵

La stimulation de fibre, comme le collatéral de Schaffer, permet de mesurer le potentiel excitatoire post synaptique (fEPSP) en plaçant l'électrode d'enregistrement dans une zone dendritique CA1 (figure 45).

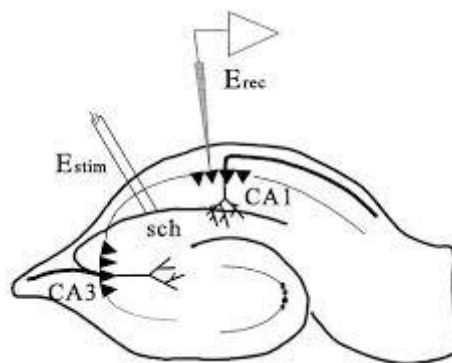


Figure 45 : Représentation d'un enregistrement électrophysiologique sur l'hippocampe

Le principal neurotransmetteur libéré par les neurones de l'hippocampe est le glutamate. Par conséquent, le potentiel exciteur post-synaptique obtenu résulte de la dépolarisation de la population post-synaptique due à un influx d'ions causé par la libération de glutamate. La pente du fEPSP est ainsi utilisée pour évaluer cette libération de glutamate. En présence d'un antagoniste des récepteurs A_{2A} , une diminution du signal devrait donc être observée, causée par une diminution de la libération du glutamate comme expliqué lors du chapitre 1. Dans notre cas, l'hippocampe provient de rats transgéniques surexprimant le récepteur A_{2A} [tg(CAMKII-hA2AR)].

Dans un premier temps, une tranche de l'hippocampe est perfusée avec un flux continu d'une solution de Krebs avec le meilleur ligand (**Via**) ($K_i = 1.0 \mu\text{M}$), à trois concentrations différentes : 10 μM , 56 μM et 100 μM . Comme le montre la figure 46, aux deux plus faibles concentrations, un effet exciteur surprenant est constaté semblable à un effet agoniste. Or, la présence d'une fonction ribose sur les agonistes des récepteurs A_{2A} semble indispensable, ce qui rend cette hypothèse peu probable. A 100 μM , cet effet exciteur est aussi observé dans un premier temps, suivi d'un effet inhibiteur, potentiellement dû à une action antagoniste de notre ligand. Il y aurait donc un bi-effet, sûrement dû à l'action du ligand sur un autre récepteur.

¹⁷⁵ Diogenes M.J. et al., *Neuropsychopharmacology*, 2011, 36, 1823-1836

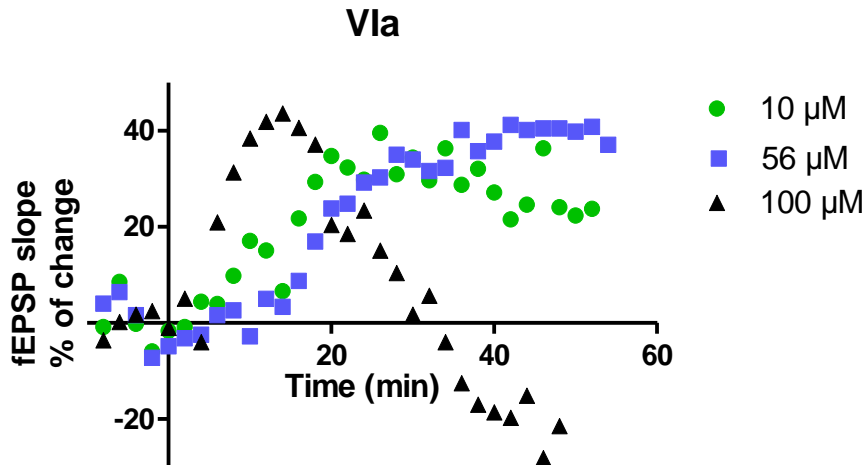


Figure 46: Représentation de l'enregistrement obtenus après perfusion de l'hippocampe avec la molécule (Vla) à trois différentes concentrations.

Cette augmentation pourrait s'expliquer de par une action antagoniste du ligand sur le récepteur A_1 (effet opposé par rapport à A_{2A} comme expliqué lors du chapitre 2). Pour vérifier cela, ce récepteur est tout d'abord bloqué par un ligand antagoniste des récepteurs A_1 , le DPCPX (100 nM). Une augmentation attendue du signal est observée (figure 47). Une fois le signal stabilisé, l'hippocampe est perfusé avec Vla. On peut facilement voir que l'on retrouve la même action du ligand avec ce bi-effet. Cela prouve que l'effet excitateur n'est pas lié à une action sur A_1R .

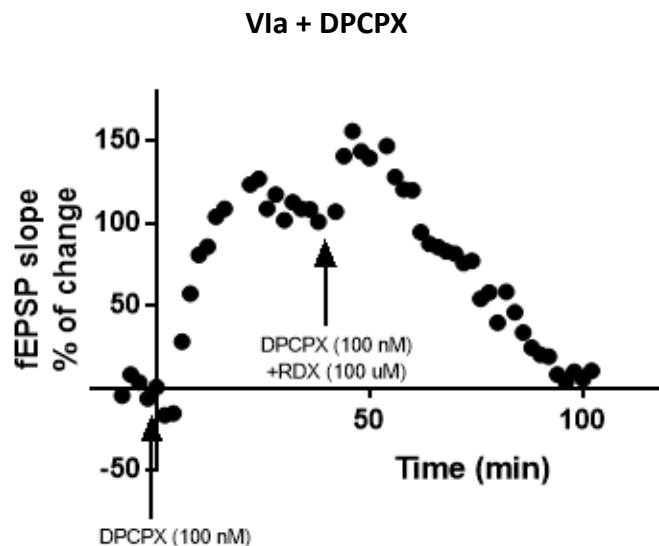


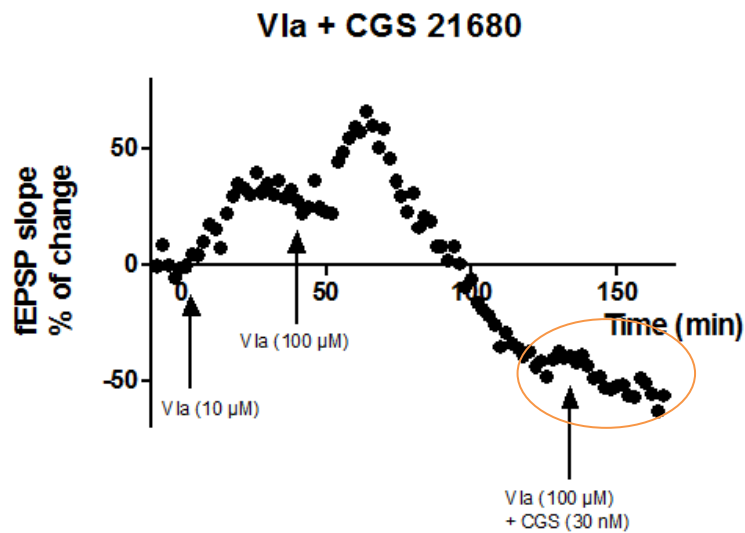
Figure 47: Représentation du signal en bloquant le récepteur A_1 puis en injectant la molécule Vla

Il est donc difficile de déterminer la cause de cet effet excitateur. Cela pourrait aussi bien être dû à une action sur des récepteurs ionotropiques provoquant une dépolarisation et une sortie de

glutamate. Une autre hypothèse serait une action sur des récepteurs tels que les récepteurs NMDA de par leurs effets excitateurs.

Afin de voir que notre ligand bloque bien $A_{2A}R$, le CGS-21680, un agoniste des $A_{2A}R$ est ajouté après **Vla**. Comme montré sur la figure 48, aucune augmentation du signal n'est observée, ce qui prouve que l'action de l'agoniste n'a pas lieu.

A



B

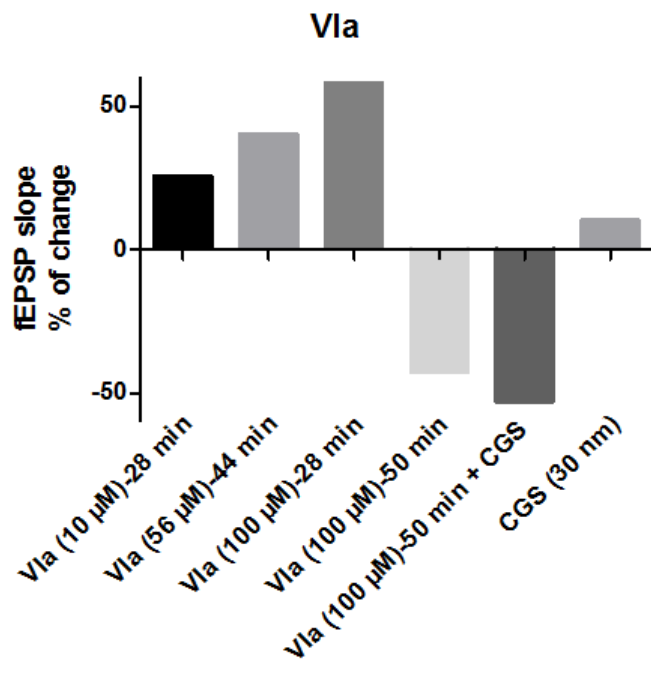


Figure 48: (A) Représentation du signal après injection de la molécule Vla suivi de l'agoniste CGS - 211680. (B) Diagramme récapitulant les différents manipulations et effets observés sur une tranche d'hippocampe.

De plus, en regardant le signal en fonction du temps, on constate que dans un premier temps que les signaux caractéristiques d'une surexpression du récepteur A_{2A} sont observés en phase montante (figure 49). Ce signal disparaît lors de la phase descendante et du plateau pour avoir une forme similaire à un rat WT (Wild Type). Ces résultats tendent donc à montrer que le récepteur A_{2A} est bloqué par notre ligand. Afin d'être certain que notre molécule bloque le récepteur et possède un caractère antagoniste, il conviendrait de réaliser un test plus approprié pour déterminer la fonctionnalité de nos molécules tel que le test du GTP γ S ou de l'AMPc.

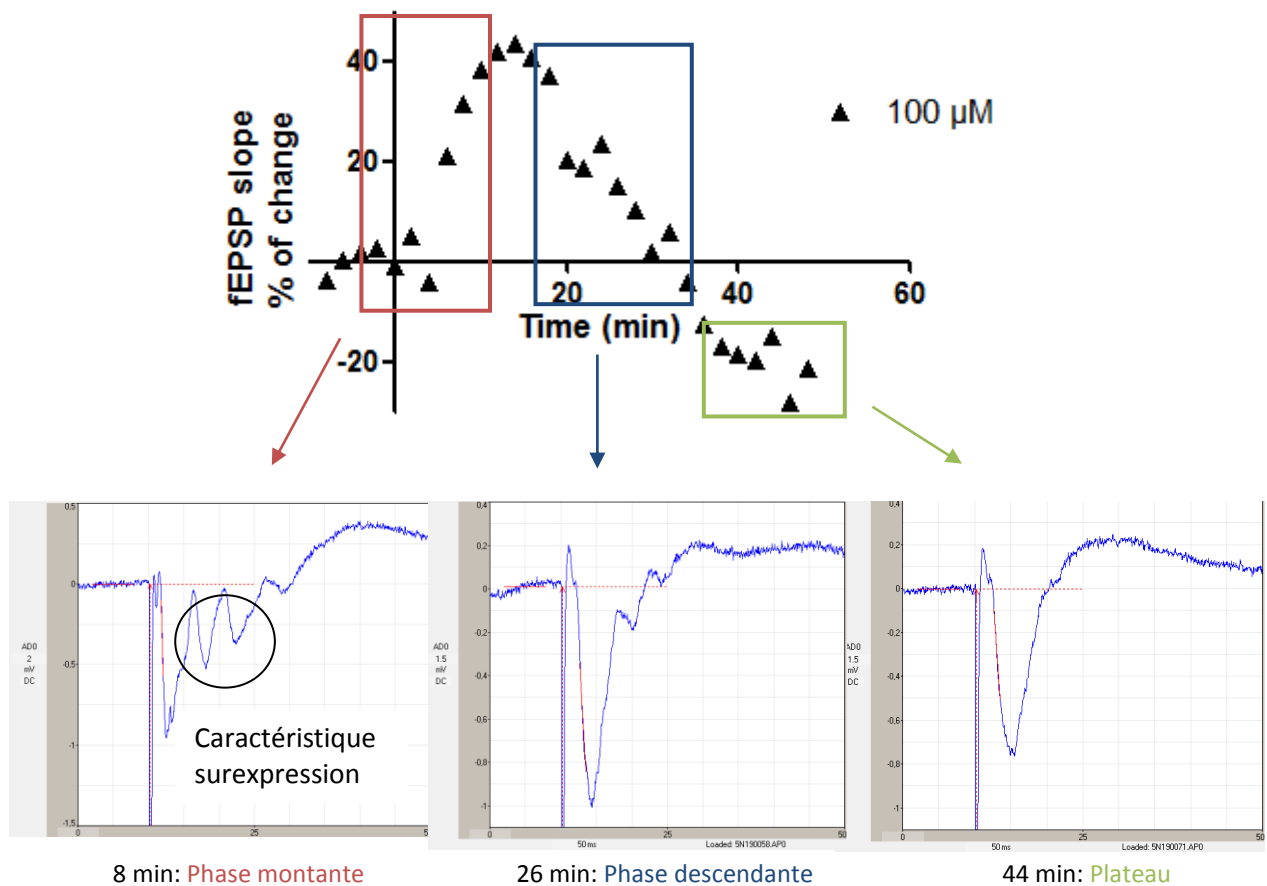


Figure 49 : Représentation du signal observé lors des différentes phases de la courbe après perfusion de la molécule VIa

Bien que l'enregistrement électrophysiologique soit très intéressant, ce test serait plus intéressant à utiliser pour des molécules plus affines et mieux caractérisées pharmacologiquement.

Chapitre 2 : La famille des benzoxazoles

2^{ème} partie

Comme rapporté précédemment, des molécules avec une affinité micromolaire ont été identifiées. Deux d'entre elles ont été sélectionnées (**21** et **Vla**) afin d'améliorer leur affinité. Pour cela, des études de modélisation moléculaire ont été poursuivies afin de visualiser dans le site de liaison comment il était possible de créer de nouvelles interactions. Par un souci d'accessibilité, le docking n'a pas été réalisé en utilisant le logiciel GOLD mais AutoDock Vina. Les mêmes poses de docking en utilisant les deux logiciels ont été retrouvées pour les molécules du chapitre précédent.

I- Modélisation moléculaire

Après avoir visualisé les ligands **21** et **Vla** et dans le site de liaison, deux hypothèses sont ressorties pour améliorer l'interaction ligand-récepteur.

- Hypothèse 1 :

En observant la molécule **Vla** dans le récepteur, l'interaction entre l'Asn253 et le ligand se fait *via* l'azote du benzoxazole et l'oxygène du furane qui jouent le rôle d'accepteur de liaison hydrogène (figure 50-A). A la vue de ce qui est décrit dans la littérature, il semblerait que cet acide aminé soit essentiel pour une bonne interaction ligand/récepteur. Or, la plupart des antagonistes de référence créent cette interaction *via* une amine primaire exocyclique donneuse de liaison hydrogène. L'absence de ce NH₂, qui ne semblait pas nécessaire à l'interaction de par l'utilisation du cycle benzoxazole, pourrait être une raison des résultats micromolaires obtenus pour la première série de molécules. L'ajout d'un NH₂ en position 7 pourrait ainsi renforcer cette interaction comme rapporté sur la figure 50-B.

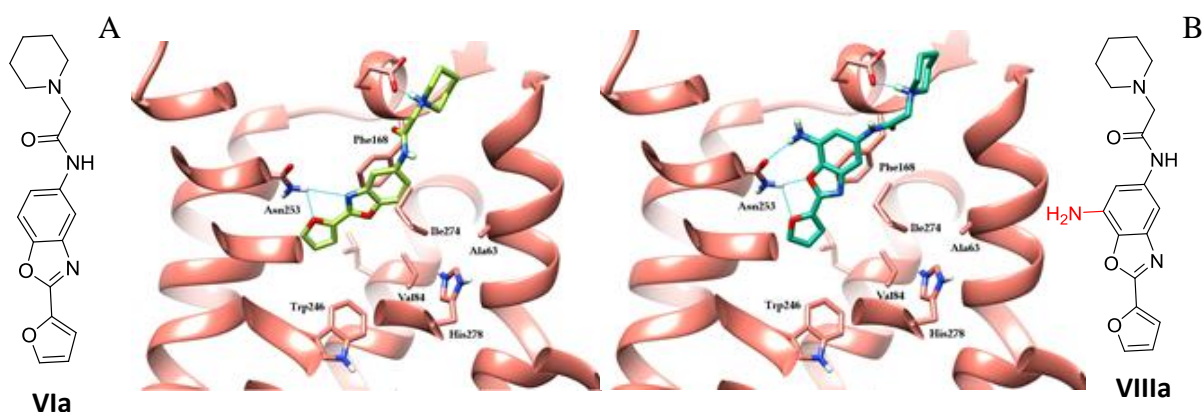


Figure 50 : (A) Mode de liaison in silico de Vla; (B) Mode de liaison in silico de VIIIa

La synthèse de l'isomère de position de la molécule **VIIIa** pourra aussi être envisagée afin d'étudier l'influence de la position de l'amine primaire aromatique (figure 51).

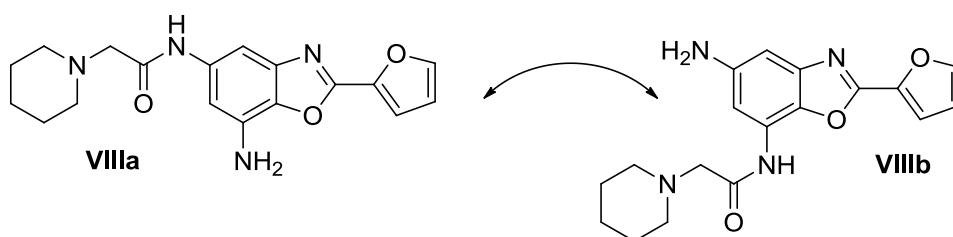


Figure 51 : Représentation de l'isomère de position VIIIb

- *Hypothèse 2 :*

Une deuxième hypothèse est d'explorer une poche hydrophobe, qui n'avait pas été étudiée lors du premier travail de modélisation moléculaire. En se basant sur la co-cristallisation de la 1,2,4-triazine avec le récepteur (PDB : 4UZC, figure 52), on constate que le noyau *o*-chlorophénol se trouve dans une poche hydrophobe délimitée par les acides aminés Ala63, Val84, Ile274 et His278. Une interaction de type π -stacking avec cette dernière est observée, de même qu'une liaison hydrogène avec l'oxygène du phénol.

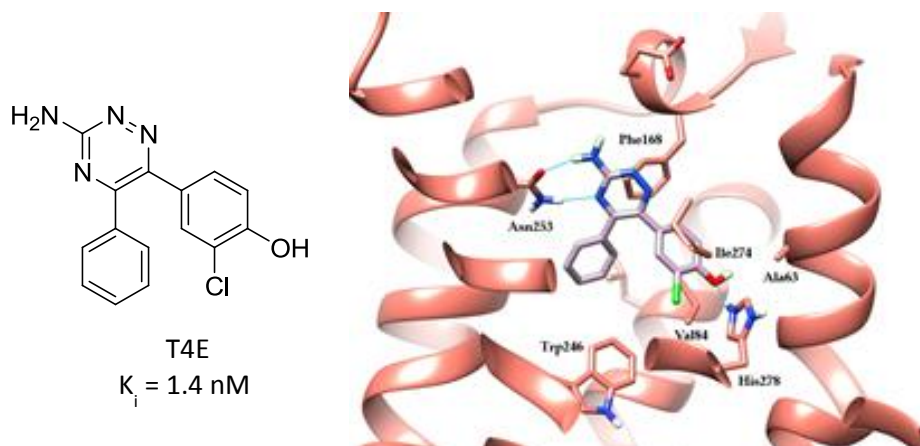


Figure 52 : Représentation de la triazine co-cristallisée dans le site de liaison (PDB : 4UZC)

Comme le montre la figure 53-B, l'ajout d'une fonction aryle, ici le furane (molécule IXa), en position 7 du benzoxazole **21** (figure 53-A) viendrait se positionner dans cette nouvelle poche. Dans ce mode de liaison putatif, l'interaction entre le NH₂ exocyclique et l'Asn253 ne se ferait pas. Seul le furane interagirait avec l'Asn253. La molécule IXa présenterait cependant le désavantage de ne pas être très soluble, critère essentiel établi lors du cahier des charges, de par la perte de la fonction basique.

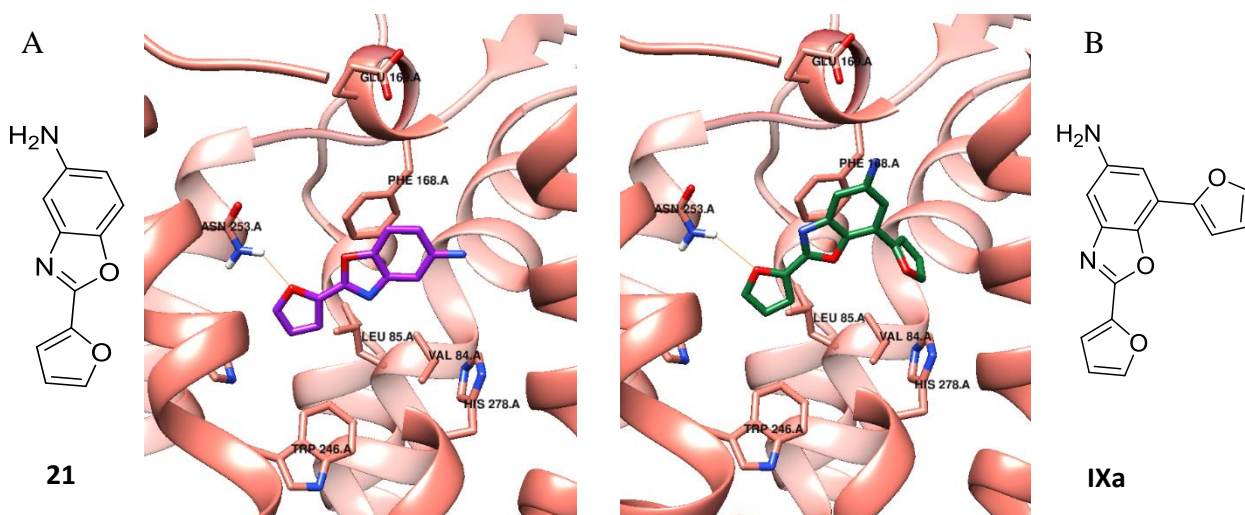


Figure 53 : Mode de liaison *in silico* de 21 (A) et IXa (B)

De ce fait, l'ajout d'un aryle sera aussi étudié sur la molécule **Vla**. Ce cycle aromatique viendrait se placer dans la poche hydrophobe latérale tandis que la pipéridine interagirait avec le Glu169 et permettrait d'apporter de la solubilité (figure 54-B). Dans ce mode de liaison, l'interaction avec l'Asn253 se ferait uniquement *via* l'oxygène du furane.

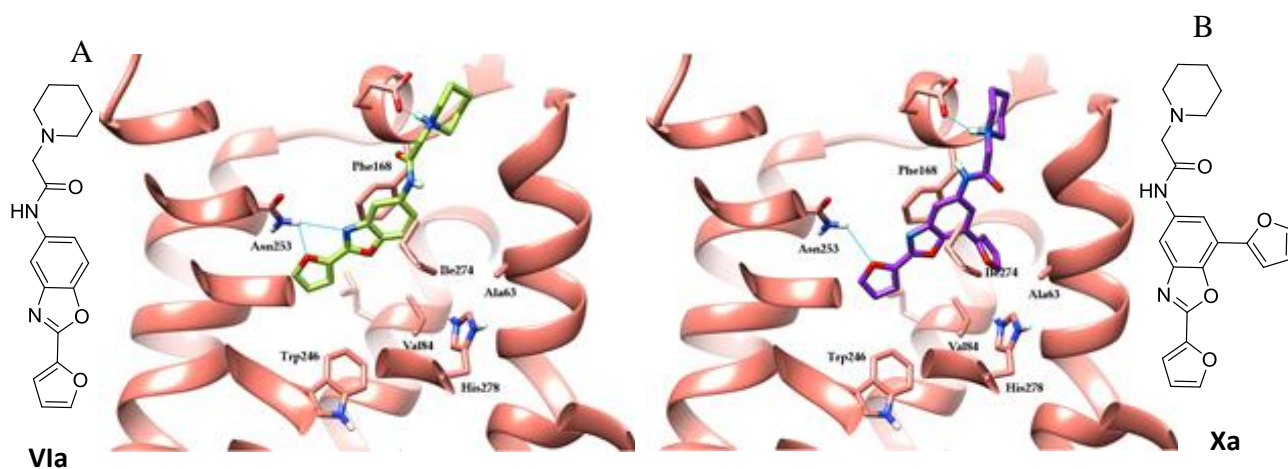


Figure 54 : Mode de liaison *in silico* de Vla (A) et Xa (B)

A partir de ce ligand **Xa**, d'autres modulations pourront être envisagées telles que l'utilisation de diverses amines tertiaires ou encore l'augmentation de la taille de l'espaceur carbonée entre l'amide et amine tertiaire. Le but étant de renforcer l'interaction entre l'amine tertiaire et le Glu169. Les différentes modulations envisagées sont représentées sur la figure 55.

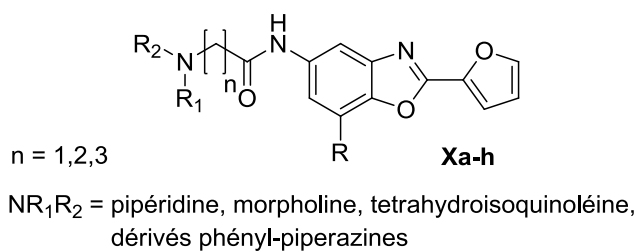


Figure 55 : Représentation des composés Xa-h

II- Synthèses des molécules cibles

1- Synthèse des molécules issues de l'hypothèse 1

1-1 Synthèse du chlorhydrate de *N*-(7-amino-2-(furan-2-yl)-1,3-benzoxazol-5-yl)-2-(piperidin-1-yl)acétamide (**VIIIa**)

Pour obtenir la molécule cible **VIIIa**, deux voies rétrosynthétiques ont été élaborées à partir des synthons **52** et **54** (schéma 24).

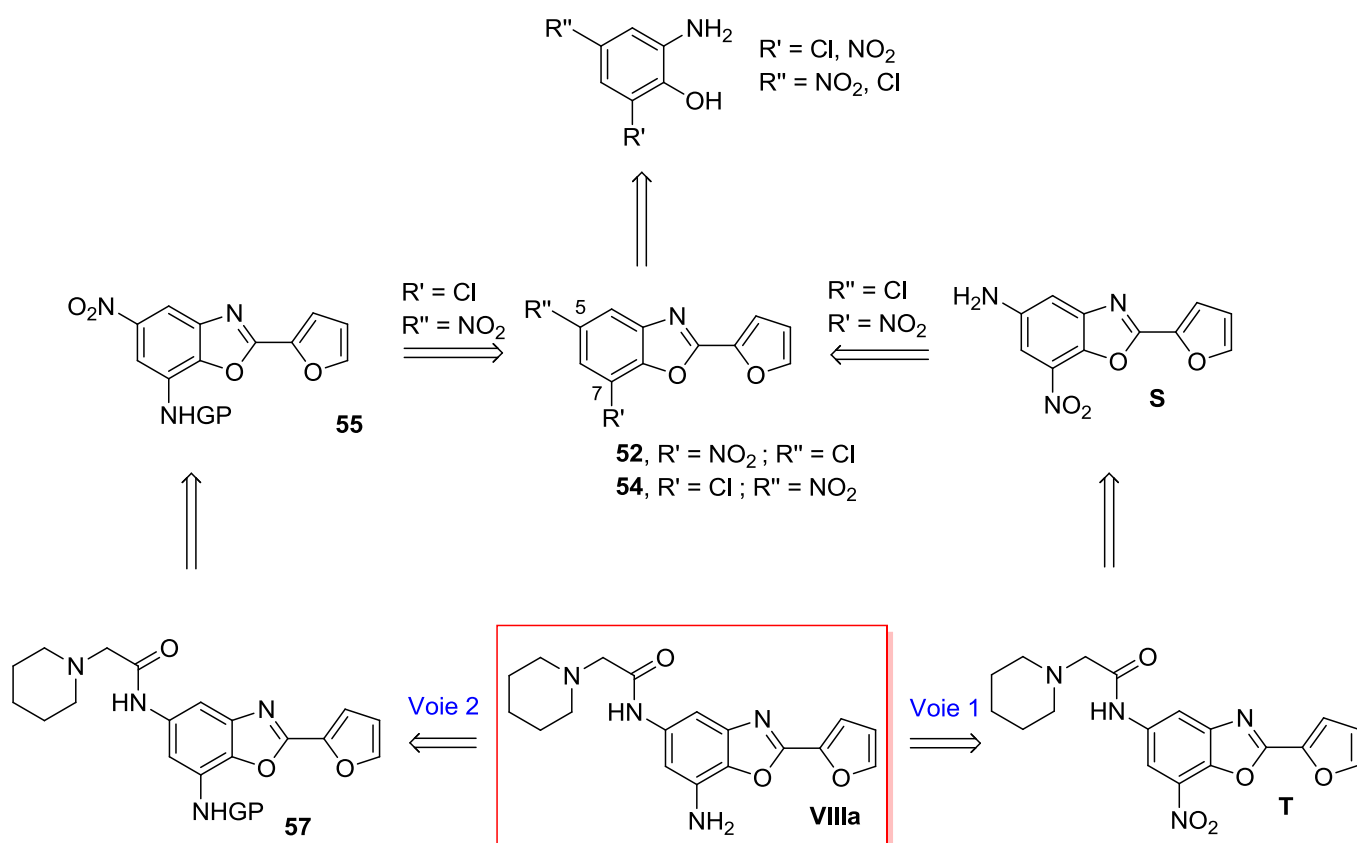


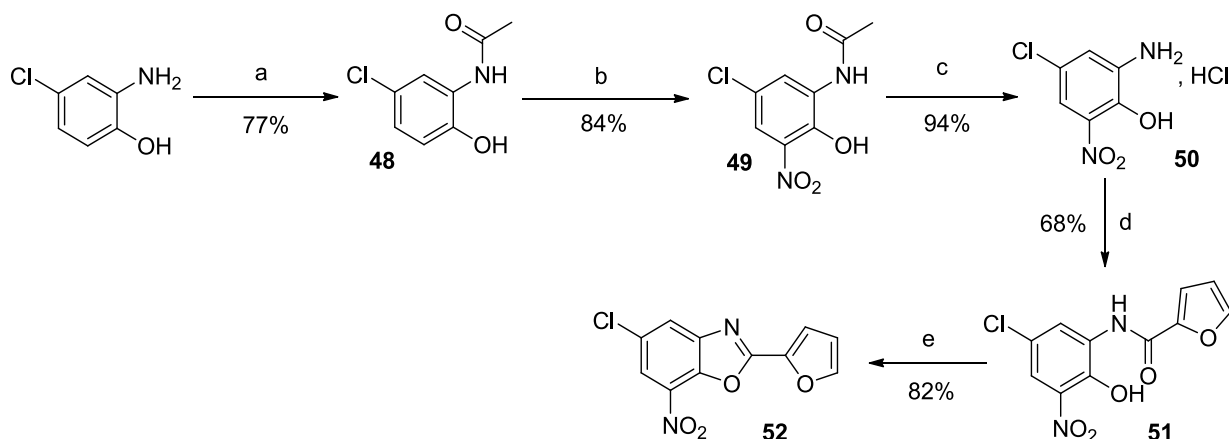
Schéma 24 : Rétrosynthèse pour l'obtention du composé VIIIa

Selon la voie 1, le composé **VIIIa** peut-être préparé par réduction du groupement nitré de la molécule **T**. Cette dernière serait obtenue par amidification et substitution nucléophile de l'amine **S**, elle même obtenue à partir de l'amination sur le 5-chloro-benzoxazole **52**.

Une deuxième voie de synthèse permettrait d'obtenir **VIIIa** par déprotection de l'amine du composé **57**. Ce dernier proviendrait du composé nitro **55** après trois étapes (réduction puis amidification et substitution nucléophile) de réaction. Ce dérivé nitré (**55**) serait synthétisé par réaction de Buchwald-Hartwig sur le dérivé 7-chloro-benzoxazole **54**. Enfin, les composés **52** et **54** seraient obtenus en deux étapes à partir des dérivés amino-phénols convenablement substitués comme décrit lors du chapitre précédent.

i. Voie 1

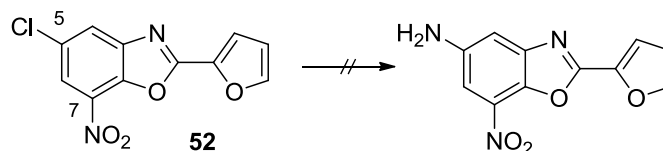
La voie de synthèse utilisée pour mettre en œuvre la première voie rétrosynthétique est rapportée sur le schéma 25. La nitration du 2-amino-4-chlorophénol commercial nécessite au préalable la protection de l'amine primaire aromatique. Cette protection est réalisée par action de l'anhydride acétique et conduit au dérivé *N*-acétylé (**48**) avec un rendement de 77%. Le traitement de **48** par HNO₃ concentré en milieu sulfurique permet d'obtenir le composé nitré **49** avec un bon rendement de 84%. La déprotection de l'acétamide est réalisée par action d'HCl concentré pour conduire au dérivé 2-amino-phénol **50** avec un rendement de 94%. Le benzoxazole **52** est enfin obtenu comme décrit lors des synthèses précédentes (Cf page 64) *via* la formation de l'amide **51** puis par cyclisation de ce dernier en présence d'APTS. Le rendement global de ces deux étapes a été de 56%.



Réactifs et conditions : a) Ac₂O (2.3 équ.), AcOEt, 0-25 °C ; b) HNO₃ 69% (1.3 équ.), H₂SO₄/H₂O, 0-25 °C ; c) HCl 37%, reflux ; d) (i) Et₃N (3.0 équ.), chlorure d'acide furoïque (1.0 équ.), AcOEt 0-25°C ; (ii) NaOH (3.0 équ.), H₂O, reflux ; (iii) HCl (6N) ; e) APTS (3.0 équ.), toluène, reflux

Schéma 25 : Synthèse du composé 52.

Des essais d'introduction d'une amine en position 5 ont été tentés (tableau 8). Toutes les réactions ont été effectuées en tube scellé et suivies par LCMS. Malheureusement, aucune de ces méthodes n'a permis de former le composé souhaité. Seul le produit de départ a été observé, avec dans certains cas, des produits de dégradation. Cependant, en utilisant les conditions 6, le composé attendu est observé en très faible proportion par LCMS.

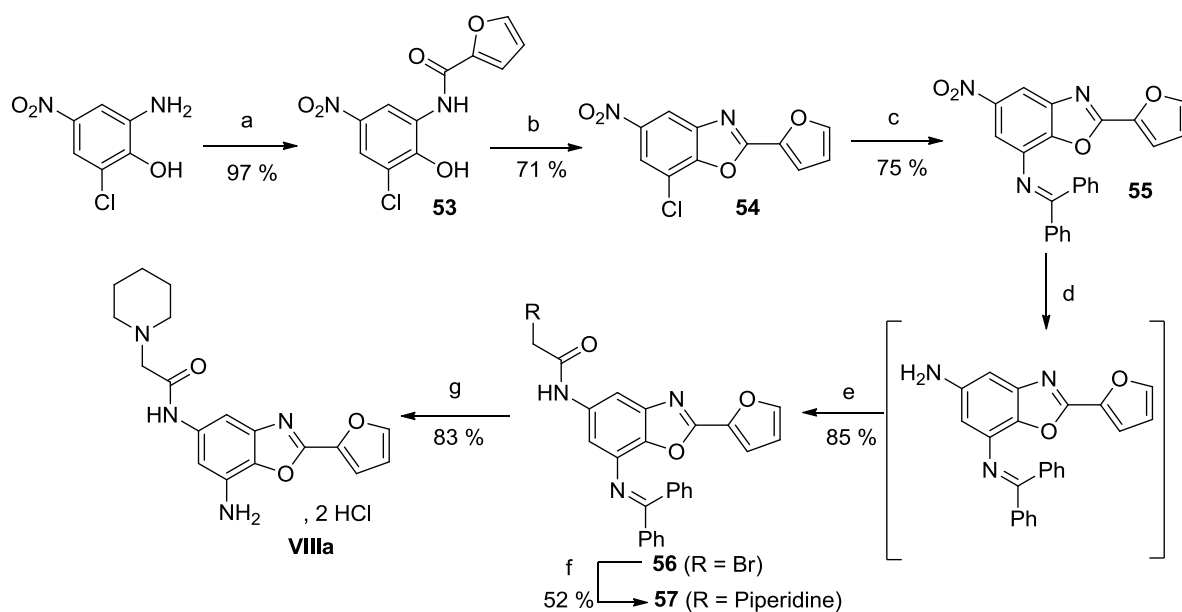


Conditions	
1	NH ₃ gaz, Pd ₂ dba ₃ (0.02 éq.), xantphos (0.02 éq.), Cs ₂ CO ₃ (1.5 éq.), toluène, reflux
2	LiNH ₂ (10 éq.), Dichloro-bis(triphenylphosphine)palladium(II) (0.02 éq.), DMF, 110 °C
3	Benzylamine (1.5 éq.), Pd(OAc) ₂ (0.02 éq.), Binap (0.04 éq.), Cs ₂ CO ₃ (1.4 éq.), toluène, reflux
4	NH ₂ Boc (1.5 éq.), Pd(OAc) ₂ (0.02 éq.), Binap (0.04 éq.), Cs ₂ CO ₃ (1.4 éq.), toluène, reflux
5	Benzophénone imine (1.5 éq.), Pd ₂ dba ₃ (0.02 éq.), xantphos (0.04 éq.), t-BuONa (1.4 éq.), toluène, reflux
6	Benzophénone imine (1.5 éq.), Pd(OAc) ₂ (0.03 éq.), Binap (0.04 éq.), Cs ₂ CO ₃ (2 éq.), toluène, reflux

Tableau 8 : Essais de couplage réalisés sur la molécule 52

ii. Voie 2

Pour cette deuxième voie de synthèse, le 2-amino-4-chloro-6-nitrophénol commercial est tout d'abord amidifié par le chlorure d'acide furoïque, puis cyclisé en benzoxazole **54** (schéma 26) selon les conditions décrites précédemment (Cf page 64).



Réactifs et conditions : a) (i) Chlorure d'acide furoïque (1.0 éq.), Et₃N (3.0 éq.), AcOEt, 0-25°C ; (ii) NaOH (3.0 éq.), H₂O, reflux ; (iii) HCl (6N) ; b) APTS (3.0 éq.), toluène, reflux ; c) Benzophénone imine (1.5 éq.), Pd(OAc)₂ (0.03 éq.), Binap (0.04 éq.), Cs₂CO₃ (2.0 éq.), toluène, 90 °C ; d) Hydrazine.H₂O (1.5 éq.), Ni de Raney, AcOEt, 0 °C ; e) Bromure de bromoacétyle (1.2 éq.), K₂CO₃ (2.5 éq.), AcOEt/H₂O, 25 °C ; f) Pipéridine (1.1 éq.), Et₃N (1.5 éq.), acétone, reflux ; g) HCl (4N) (4 éq.), THF, 25 °C

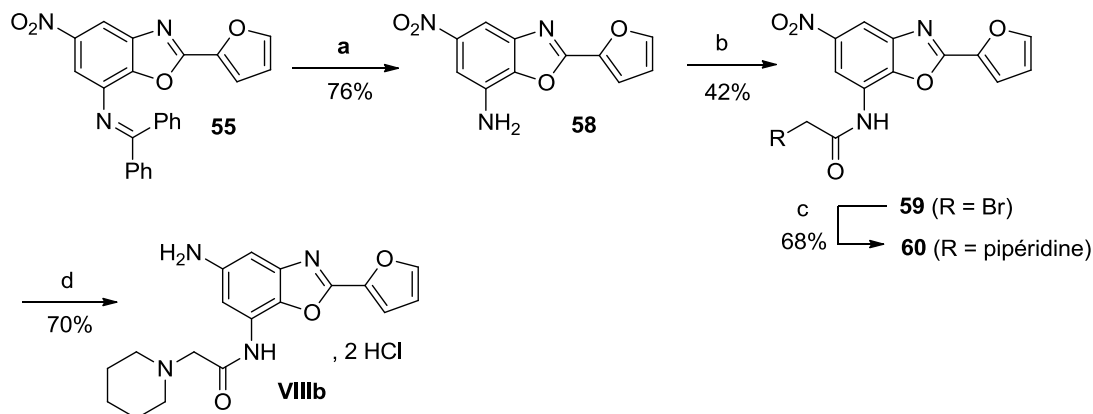
Schéma 26 : Synthèse de la molécule VIIIa

L'introduction d'une amine protégée en position 7 est réalisée par réaction de la benzophénone imine sur le dérivé chloré **54** selon les conditions de Buchwald-Harting n°6 (tableau 8)¹⁷⁶ qui semblaient les plus prometteuses. L'imine **55** est obtenue avec un très bon rendement de 75%. Cela montre que le chlore en position 7 du benzoxazole **54** est bien plus réactif que celui en position 5 du benzoxazole **52**. Une réduction de la fonction nitro (**55**) par action du monohydrate d'hydrazine et de nickel de Raney est ensuite réalisée pour former l'intermédiaire amine, sans toucher à l'imine. Ce dernier, non isolé, est directement engagé dans une réaction d'amidification en présence de bromure de bromoacétyle pour former le composé **56** avec un rendement de 85% sur ces deux étapes. Une réaction de substitution nucléophile en présence de pipéridine permet ensuite d'obtenir la molécule **57** avec un rendement de 52%. La molécule **VIIIa** est enfin obtenue par traitement de **57** par une solution aqueuse d'HCl 4N avec un rendement de 83%.

¹⁷⁶ Wolfe J.P. et al., *Tet. Lett.*, 1997, 38, 6367-6370

1-2- Synthèse du *N*-(5-Amino-2-(furan-2-yl)-1,3-benzoxazol-7-yl)-2-(piperidin-1-yl)acétamide (**VIIIb**)

La synthèse du composé **VIIIb** (isomère de position de **VIIIa**) est réalisée en 3 étapes à partir du composé **55** (schéma 27).



Réactifs et conditions : a) HCl_{aq.} 4N/THF (v/v : 1/2), 80 °C ; b) Bromure de bromoacétyle (1.2 éq.), K₂CO₃ (2.5 éq.), AcOEt/H₂O, 25 °C ; c) Pipéridine (1.1 éq.), K₂CO₃ (1.3 éq.), acétone, reflux ; d) (i) Hydrazine.H₂O (1.5 éq.), Ni de Raney, AcOEt, 25 °C ; (ii) HCl gaz, acétonitrile

Schéma 27 : Synthèse de la molécule VIIIb

Le composé **55** est tout d'abord déprotégé par chauffage en milieu chlorhydrique pour donner le composé **58** avec un rendement de 76%. L'amine (**58**) est ensuite traitée par le bromure de bromoacétyle pour former le composé **59** avec un rendement de 42%. Une étape de substitution nucléophile est ensuite réalisée afin de greffer la pipéridine sur le composé **59** (68%). La fonction nitro (**60**) est ensuite réduite par action d'hydrate d'hydrazine et de nickel de Raney pour former le composé **VIIIb** avec un rendement de 70%.

2- Synthèse des molécules issues de l'hypothèse 2

2-1- Approche rétrosynthétique pour l'obtention des molécules IX et X

Le schéma rétrosynthétique 28 montre que les molécules cibles **Xa-h** pourraient être obtenues en 2 étapes à partir des 5-amino-benzoxazoles **IX** par réaction d'amidification suivie d'une substitution nucléophile. Les composés **IXa-i** proviendraient de la réduction des dérivés nitrés **61**, eux-mêmes obtenus par réaction de couplage sur le 7-chloro-benzoxazole **54**.

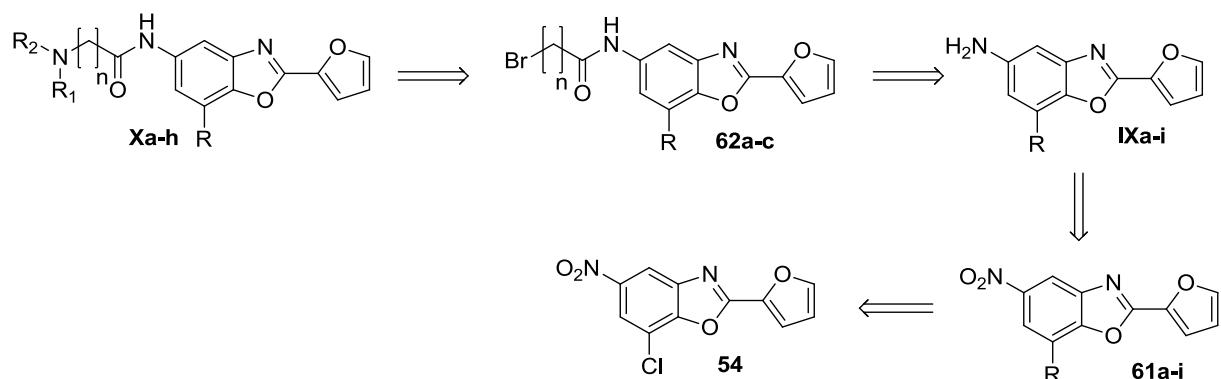
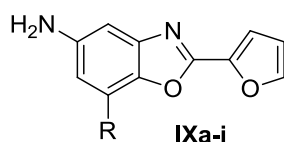


Schéma 28 : Rétrosynthèse pour l'obtention des molécules IXa-i et Xa-f

2-2- Synthèse des molécules IXa-i

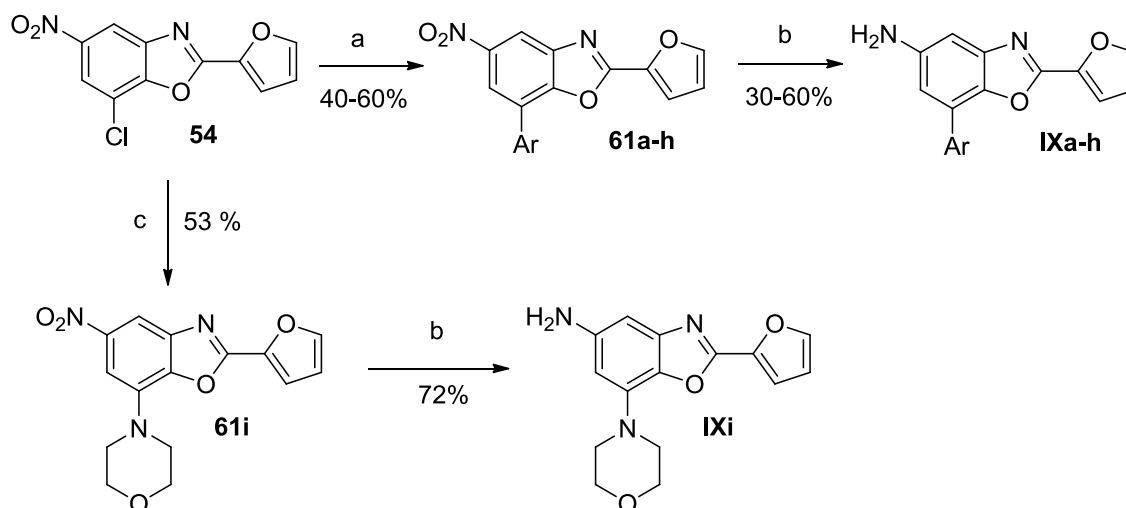
Les produits IXa-i préparés sont rapportés dans le tableau 9 ci-dessous.



Cpd.	R	Cpd.	R
IXa		IXf	
IXb		IXg	
IXc		IXh	
IXd		IXi	
IXe			

Tableau 9 : Représentation des molécules IXa-i synthétisées

La synthèse des composés IXa-i est réalisée en deux étapes à partir du composé 54 comme le montre le schéma 29 ci-dessous.



Réactifs et conditions : a) ArB(OH)₂ (1.2 éq.), K₃PO₄ (2.0 éq.), Pd(OAc)₂ (0.02 éq.), PPh₃ (0.04 éq.), dioxane/H₂O, 110 °C ; b) Hydrazine.H₂O (1.5 éq.), Ni Raney, AcOEt, 25 °C ; c) Morpholine (1.5 éq.), Pd(OAc)₂ (0.03 éq.), Binap (0.04 éq.), Cs₂CO₃ (2.0 éq.), toluène, reflux

Schéma 29: Synthèse des molécules IXa-i

Afin de réaliser la réaction de Suzuki sur le composé chloré **54**, une mise au point a tout d'abord été réalisée avec l'acide 2-furanylboronique en tube scellé. Les conditions utilisées sont résumées dans le tableau 10. L'utilisation de l'acétate de palladium comme catalyseur avec la triphénylphosphine comme ligand en présence de K₃PO₄ dans le dioxane sont les conditions optimales pour cette réaction (condition 4).¹⁷⁷ Elles ont été retenues pour réaliser les couplages de Suzuki des composés **61a-h**. Les rendements obtenus sont modestes mais cependant en adéquation avec la littérature pour ce type de couplage sur des composés chlorés. Le composé **61i** est obtenu par action de la morpholine sur le composé chloré **54** selon les conditions de Buchwald-Hartwig décrites pour l'obtention du composé **55** (Cf page 96).

¹⁷⁷ Faldu V.J. et al., *Tet. Lett.*, 2014, 55, 1456-1460

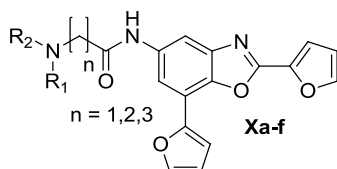
	Conditions	Rendement
1	2-FurylB(OH) ₂ (1.2 éq.), Cs ₂ CO ₃ (2 éq.), Pd ₂ (dba) ₃ (0.02 éq.), PPh ₃ (0.04 éq.), dioxane/H ₂ O, reflux	14%
2	2-FurylB(OH) ₂ (1.2 éq.), Na ₂ CO ₃ (2 éq.), Pd(PPh ₃) ₄ (0.04 éq.), toluène/EtOH/ H ₂ O, reflux	20%
3	2-FurylB(OH) ₂ (1.2 éq.), Na ₂ CO ₃ (2 éq.), Pd(OAc) ₂ (0.02 éq.), PPh ₃ (0.04 éq.), toluène/EtOH, reflux	26%
4	2-FurylB(OH) ₂ (1.2 éq.), K ₃ PO ₄ (2 éq.), Pd(OAc) ₂ (0.02 éq.), PPh ₃ (0.04 eq.), dioxane/H ₂ O, reflux	65%

Tableau 10 : Mise au point du couplage de Suzuki

Enfin, les molécules cibles (**IXa-e**) sont obtenues par réduction de la fonction nitro (dérivés **61**) en présence d'hydrate d'hydrazine et de nickel de Raney avec des rendements compris entre 30 à 60% selon le groupement en position 7.

2-3- Synthèse des molécules dérivées du composé **Xa-h**

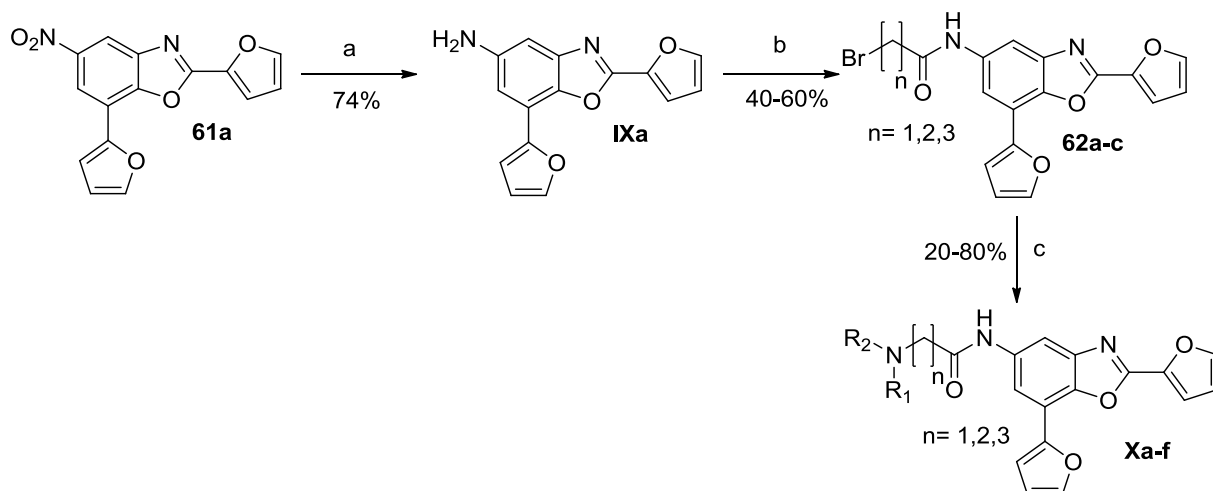
Les molécules **Xa-f** synthétisées sont les suivantes (tableau 11).



Cpd.	n =	NR ₁ R ₂	Cpd.	n =	NR ₁ R ₂
Xa	1		Xd	2	
Xb	2		Xe	2	
Xc	2		Xf	3	

Tableau 11 : Représentation des molécules **Xa-f synthétisées**

La synthèse des composés de la famille **X** peut facilement être réalisée en 3 étapes à partir de la molécule **61a** (schéma 30).



Réactifs et conditions : a) Hydrazine.H₂O (1.5 éq.), Ni de Raney, AcOEt, 25 °C ; b) Br(CH₂)_nCOX (X= Cl, Br) (1.2 éq.), K₂CO₃ (2.5 éq.), AcOEt/H₂O, 25 °C ; c) Amine (3.0 éq.), acétonitrile, reflux

Schéma 30 : Synthèse des molécules Xa-f

La réduction du groupement nitro du composé **61a** est réalisée par action de l'hydrate d'hydrazine dans l'acétate d'éthyle en présence de nickel de Raney. L'amine primaire est ensuite amidifiée par action de divers halogénures de bromoalkyle pour conduire aux dérivés bromés **62a-c** avec des rendements de l'ordre de 50%. Enfin, la substitution nucléophile du brome de ces derniers par l'amine secondaire adéquate est réalisée dans l'acétonitrile.

De plus, deux autres molécules (**Xg** et **Xh**) sont synthétisées afin de pallier un possible problème de stabilité métabolique dû au furane. En effet, il est connu que pour certains antagonistes A_{2A} de référence, le furane peut s'oxyder en α de l'oxygène pour former le 5-hydroxyfurane.¹⁷⁸ Le furane de la molécule **Xc** est ainsi remplacé pas à pas. Tout d'abord en position 7 par le 3,4-diméthoxyphényle (**Xg**) au vu des résultats de binding de la série **IX**, puis en position 2 par le 2-méthyl-furane, connu pour pallier le problème de d'instabilité métabolique. Le schéma de synthèse est le même que pour les autres molécules de la série **X** (schéma 31).

¹⁷⁸ Kobayashi T et al., *Drug Metab. Dispos.*, **1987**, *15*, 877-881.

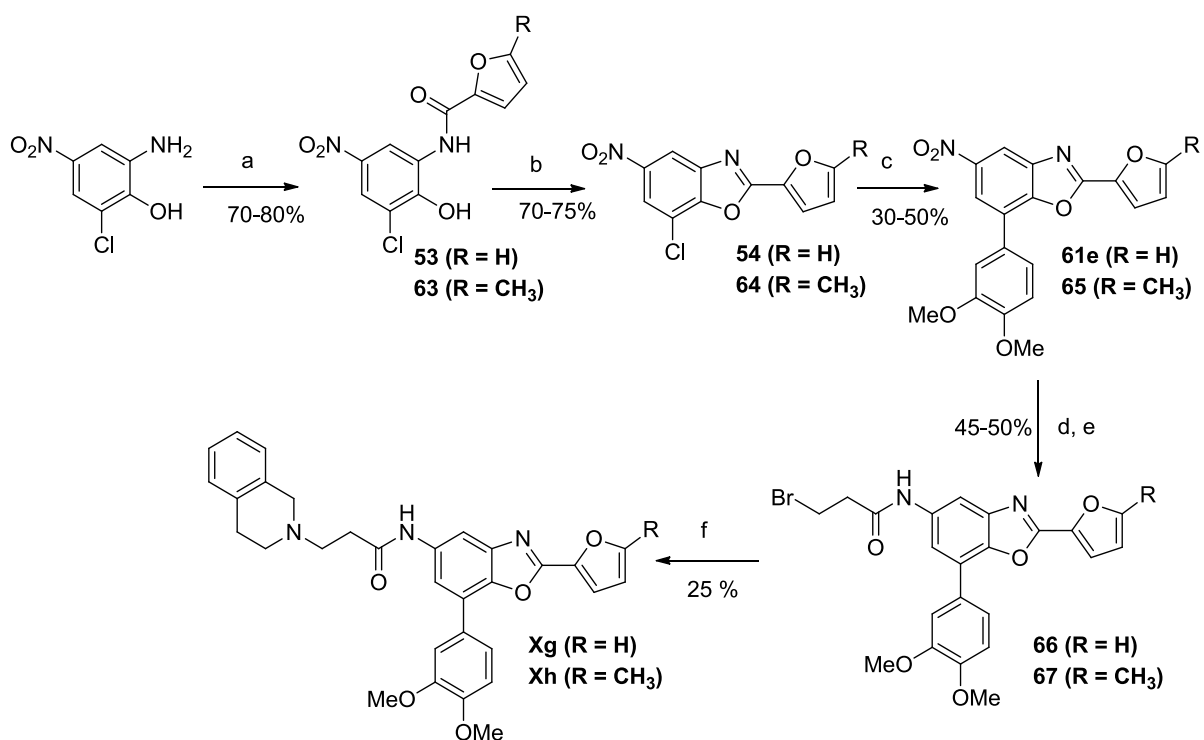


Schéma 31: Synthèse des molécules Xg-h

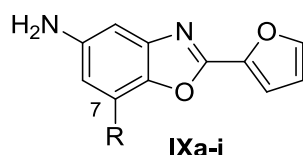
III- Évaluation des séries VIII, IX et X

1- Relation structure-affinité

Pour tous les composés synthétisés, j'ai réalisé les tests d'affinité au sein de la plate-forme de binding de Lille. J'ai ainsi commencé par mettre au point le protocole utilisé à l'IMM de Lisbonne lors de ma première année de thèse. Cela m'a ainsi permis d'évaluer mes molécules au fur et à mesure et de mettre un test au point utile pour le laboratoire pour la suite de ce projet.

- Modulation en position 7 autour de la molécule **21** (Série **IX**, tableau 12)

A la lecture des résultats rapportés dans le tableau 12, les relations structure-affinité suivantes peuvent être établies.



Cpd.	R	hA_{2A} (Ki nM) ^a	Cpd.	R	hA_{2A} (Ki nM) ^a
25	H	10000 ±	IXe		90 ± 32
IXa		40 ± 6	IXf		> 10000
IXb		71 ± 10	IXg		438 ± 35
IXc		202 ± 8	IXh		> 10000
IXd		135 ± 17	IXi		> 10000

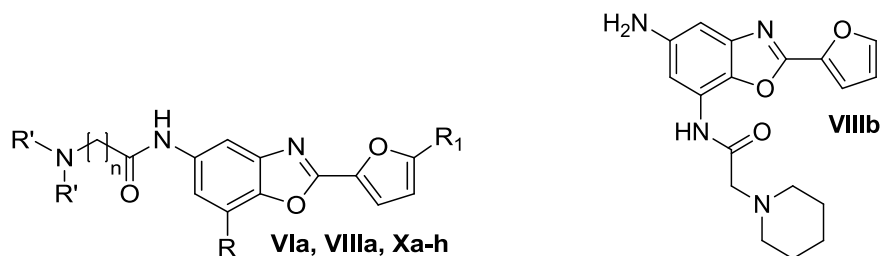
^a ZM241385 utilisé comme référence des antagonistes des $A_{2A}R$ ($K_i = 2.3$ nM). Déplacement spécifique du [³H]-ZM 241385 lié au récepteur hA_{2A} exprimé dans les cellules HEK293.

Tableau 12 : Affinité pour le récepteur hA_{2A} des composés IXa-i

L'introduction d'un cycle à 5 sommets en position 7 permet d'améliorer fortement l'affinité en passant d'un dérivé (**21**) à 10 μ M à un dérivé (**IXa**) avec une affinité de 40 nM. Le remplacement de ce cycle à 5 sommets par un cycle à 6 sommets conduit à une légère baisse d'affinité (**IXa** et **IXb** vs **IXc** et **IXd**). De manière surprenante, la substitution du cycle à 6 par différents groupements conduit en général à une perte d'affinité sauf pour le composé **IXe** ($K_i = 90$ nM). Ceci pourrait s'expliquer de par une éventuelle liaison hydrogène entre le méthoxy et l'His278 du récepteur. Enfin, comme attendu, un groupement non-aromatique tel que la morpholine (**IXi**) ne permet pas d'avoir une affinité pour le $hA_{2A}R$.

Ces résultats sont en accord avec notre 2^{ème} hypothèse (cf page 91) qui stipule que l'occupation de la poche hydrophobe est nécessaire pour améliorer l'interaction ligand/récepteur. Au vu des résultats, le groupement furane (**IXa**, $K_i = 40$ nM) en position 7 est donc retenu pour effectuer les autres modulations.

- *Modulations autour de la molécule **Vla** (série **VIII** & **X**, tableau 13)*



Cpd.	R	n	NR'R'	R1	Ki (nM) ^a
Vla	H	1		H	1000 ± 80
VIIIa	NH ₂	1		H	480 ± 30
VIIIb	/	/	/	H	> 10000
Xa		1		H	210 ± 15
Xb		2		H	81 ± 13
Xc		2		H	30 ± 1.5
Xd		2		H	90 ± 5
Xe		2		H	> 10000
Xf		3		H	98 ± 13
Xh		2		Me	600 ± 136

^a ZM241385 utilisé comme référence des antagonistes des A_{2A}R (K_i = 2.3 nM). Déplacement spécifique du [³H]-ZM 241385 lié au récepteur hA_{2A} exprimé dans les cellules HEK293.

Tableau 13 : Affinité pour le récepteur hA_{2A} des molécules VIIIa-b et Xa-h

Tout d'abord, en comparant sur le tableau 13 la molécule **Vla** (K_i = 1 μM) et **Xa** (K_i = 210 nM), on peut voir que l'ajout d'un furane permet de nouveau un gain d'affinité. Cela renforce ainsi notre 2^{ème} hypothèse.

De plus, l'ajout d'un NH₂ en cette même position 7 améliore aussi l'affinité de nos ligands (**VIIIa**, 480 nM vs **Vla**, 1000 nM). Cela valide notre 1^{ère} hypothèse qui suggérait que l'ajout d'un NH₂ pouvait

améliorer l'affinité par une interaction avec l'Asn253 (cf page 90). De manière intéressante, l'isomère de position (**VIIIb**) de la molécule **VIIIa** entraîne une perte totale d'affinité pour le récepteur.

Sachant que la molécule **Xa** ($K_i = 210$ nM) présente une meilleure affinité que la molécule **VIIIa** ($K_i = 480$ nM), des modulations autour de **Xa** ont été entreprises.

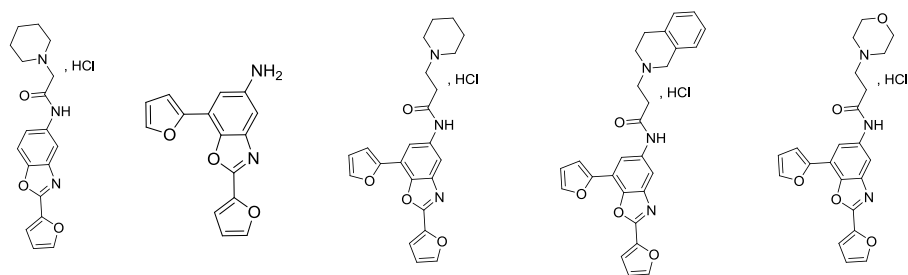
Ainsi une homologation de la taille du linker est réalisée. L'augmentation de la chaîne à 2 et 3 méthylènes entre la fonction amide et amine tertiaire est bénéfique avec une affinité qui passe de 210 nM (**Xa**) à 81 nM et 98 nM (**Xb** et **Xf** respectivement). Le composé **Xb** montrant la meilleure affinité pour $A_{2A}R$, cela suggère que 4 atomes comme linker semble la taille adaptée pour l'interaction pipéridine-Glu169. En se basant sur la molécule **Xb**, des modulations de l'amine ont ensuite été effectuées.

Seules quelques amines (**Xc-e**) ont été utilisées en tenant compte des résultats obtenus au chapitre 2 précédent. Si la morpholine permet d'obtenir une molécule aussi affine qu'avec la pipéridine (81 nM vs 90 nM), la tétrahydroisoquinoléine (**IXc**) apparaît comme l'amine de choix ($K_i = 30$ nM). Le fait d'augmenter l'hydrophobie en haut du site de liaison semble donc intéressant pour accroître l'affinité. D'une manière surprenante, l'utilisation du pharmacophore arylpipérazine du Préladenant (**Xe**) entraîne une perte d'affinité. Cela, confirme néanmoins nos résultats obtenus pour les premières séries de molécules (cf chap.2, page 82), qui montre qu'une phénylpipérazine n'est pas adaptée à notre série de molécule.

Enfin, et afin de s'affranchir de l'instabilité métabolique du furane, celui-ci a été remplacé en position 2 et 7 de la molécule **Xc**. Pour ce faire, le diméthoxyphényle est utilisé en position 7 au vu des résultats de série **IX** tandis que le 5-méthyl-furane est utilisé en position 2. Une perte importante d'affinité est malheureusement observée pour cette molécule (**Xh**, $K_i = 600$ nM).

Nous avons ensuite voulu évaluer l'affinité de certaines molécules (**VIa**, **IXa**, **Xb-d**) vis-à-vis du récepteur hA_1 (tableau 14). De manière surprenante, tous les composés testés avec ajout d'un furane en position 7, ne présentent pas de sélectivité pour le récepteur A_{2A} . Au contraire, une très forte affinité pour le récepteur A_1 est même observée.

Cette affinité mixte pour A_1R et $A_{2A}R$ fait de ces composés des molécules très intéressantes malgré tout. En effet, comme décrit dans l'introduction de ce mémoire, un intérêt pour développer des antagonistes mixtes A_1/A_{2A} a émergé de par leurs effets synergiques observés sur des modèles de la maladie de Parkinson. L'amélioration de l'activité motrice et des fonctions cognitives est observée chez les rongeurs lors de l'utilisation de ces ligands.^{138,139,140}



Cpd.	VIa	IXa	Xb	Xc	Xd
hA_{2A} (Ki nM) ^a	1000 ± 80	40 ± 6	81 ± 13	30 ± 1.5	90 ± 1.5
hA_1 (Ki nM) ^b	2900 ± 1100	7.7 ± 0.8	6.8 ± 1.0	11 ± 0.7	68 ± 8

^a Déplacement spécifique du [³H]-ZM 241385 lié au récepteur hA_{2A} exprimé dans les cellules HEK293.

^b Déplacement spécifique du [³H]-DPCPX (1 nM) lié au récepteur hA_1 exprimé dans les cellules CHO.

Tableau 14 : Affinités pour les récepteurs hA_1 et hA_{2A}

Ce résultat n'est toutefois pas illogique au vu de la grande homologie de séquence qui existe entre le récepteur A_1 et le récepteur A_{2A} , notamment au niveau du site de liaison orthostérique (cf page 54). Le récepteur A_1 bénéficie d'une co-cristallisation avec un ligand sélectif, le DU172, depuis février 2017.¹⁷⁹ Nous avons alors étudié la pose de docking de nos ligands dans le récepteur A_1 . Comme le montre la figure 56, nous pouvons voir que le ligand **IXa** par exemple se positionne de la même manière dans A_{2A} que dans A_1 (valeurs RMSD = 2.2 Å) en interagissant avec les mêmes acides aminés. Les valeurs de scores Autodock Vina sont même très similaires pour les deux meilleures poses (-8.3 pour A_{2A} et -8.0 pour A_1), ce qui tend à expliquer pourquoi cette molécule est affine pour les deux récepteurs. Il est cependant très difficile d'expliquer pourquoi **IXa** présente une meilleure affinité pour A_1 que pour A_{2A} par docking. Le même résultat est observé pour les autres molécules.

¹⁷⁹ Glukhova A. et al., *Cell*, 2017, 168, 867–877

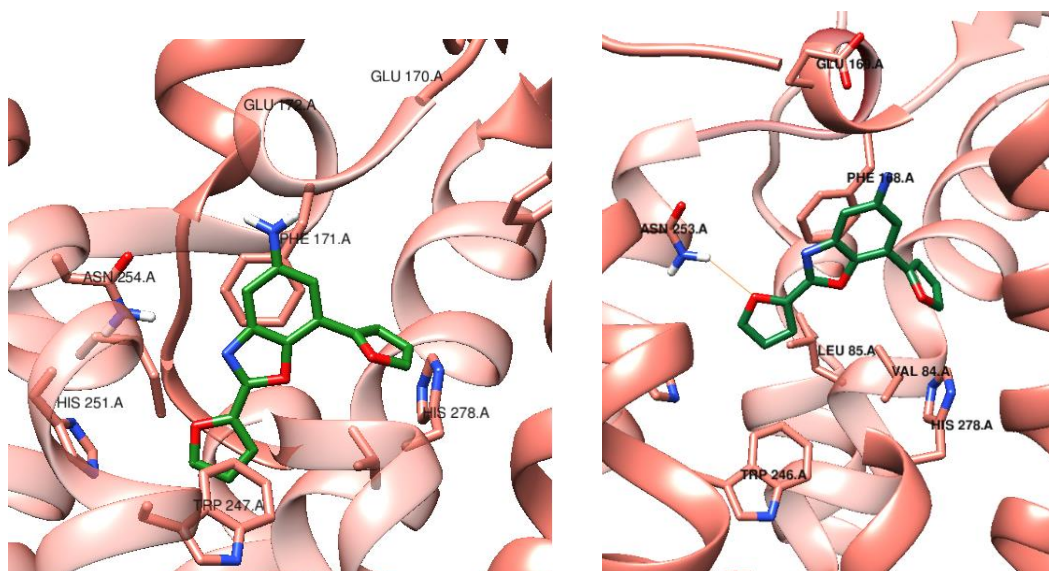


Figure 56 : Mode de liaison in silico de VIa dans A₁R (A) et A_{2A}R (B)

2- Fonctionnalité des ligands benzoxazoles

Le test de fonctionnalité a été mis au point durant ma thèse par le Dr. Christophe Furman. Si j'ai pu participer à la mise au point, je n'ai pas pu effectuer les manipulations car ce test nécessite la manipulation du ³⁵S et des autorisations particulières.

Pour effectuer le test de fonctionnalité de nos molécules, le test du GTPγ³⁵S est réalisé. En partant des mêmes membranes HEK293 A_{2A}R (Perkin Elmer) utilisées pour le test de binding, un test de compétition est de nouveau effectué entre un agoniste (le CGS-21680) à concentration constante [1 μM] et nos ligands. Le CGS va ainsi venir activer le récepteur, provoquant l'échange du GDP avec le GTPγ³⁵S (figure 57), non hydrolysable. Ce test consiste donc à étudier l'activation de ce récepteur en mesurant le GTP radiomarqué lié aux membranes cellulaires.

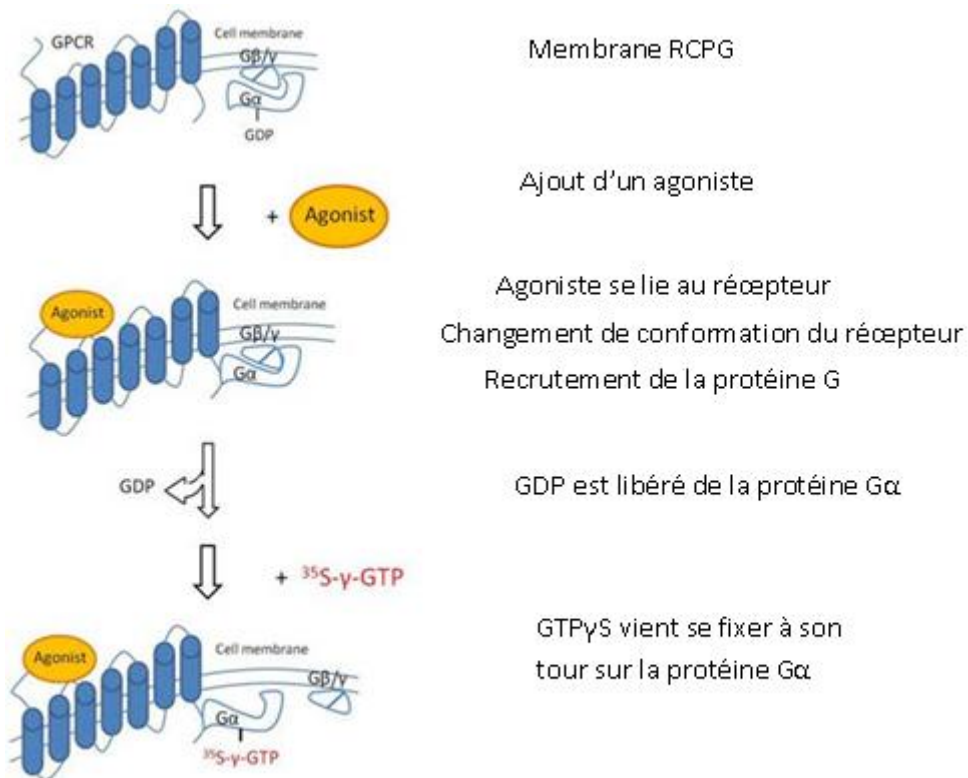
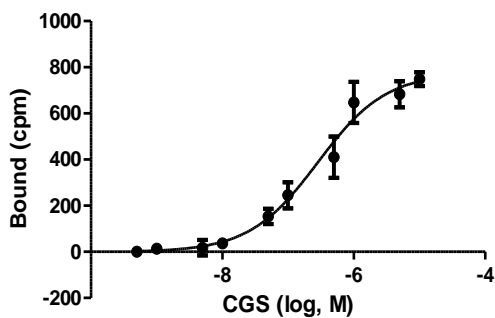


Figure 57 : Représentation du test [³⁵S] GTPγS

Par conséquent, en présence d'antagoniste du A_{2A}R, une diminution du recrutement du GTPγS devrait être observée, contrairement à un agoniste. Ce test est tout d'abord réalisé à partir d'un antagoniste (ZM-241335) et d'un agoniste (CGS-21680) de référence (figure 58).

Réponse en présence de CGS21680 (A)



Réponse en présence du ZM241385 (B)

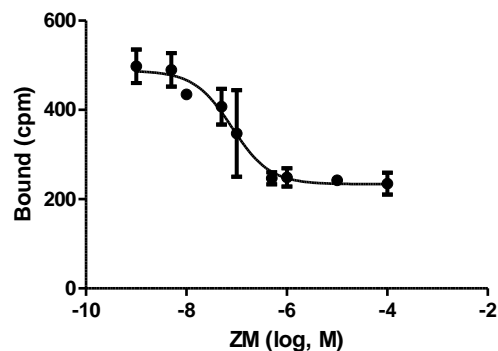


Figure 58 : Réponse observée en présence de CGS-21680 (A) et de ZM-241385 (B)

Nous pouvons bien voir qu'en présence du CGS-211680, le recrutement du GTP γ S augmente en même temps que la concentration de cet agoniste (figure 58-A). A l'inverse, l'action de l'antagoniste (ZM-241385) inhibe l'activation du récepteur et le recrutement du GTP γ S (figure 58-B).

Ce test est réalisé sur trois ligands (**VIIIa**, **IXa**, **Xa**). Un exemple est montré pour la molécule **Xa**.

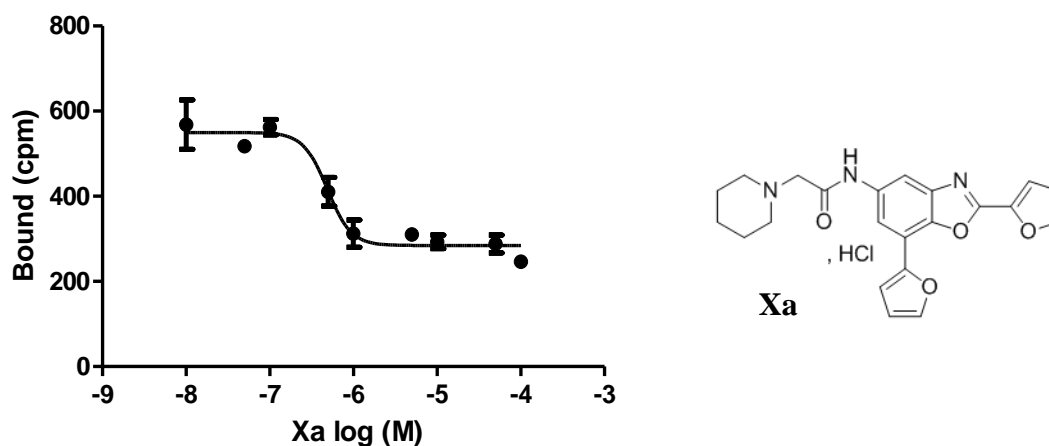


Figure 59 : Réponse observée pour la molécule Xa

Comme le montre la figure 59, le même type de courbe que pour le ZM241385 est observé. Cela permet donc de montrer le potentiel antagoniste de notre ligand. De plus, des valeurs d'IC₅₀ sont obtenues et rapportées sur le tableau ci-dessous.

Cpd.	IC ₅₀ (nM)
ZM-241385	80.8 ± 7.5
VIIIa	250 ± 29.6
IXa	70.6 ± 3.8
Xa	486 ± 15.9

Tableau 15 : Valeurs d'IC₅₀ obtenues après réalisation du test GTP γ S

Des résultats très prometteurs sont obtenus pour les trois composés en comparaison avec la valeur trouvée pour l'antagoniste de référence. La molécule **IXa**, s'avère être la plus intéressante avec une valeur proche, et même inférieure, de celle trouvée pour le ZM-241385. Cela montrerait que, malgré une affinité moindre, nos ligands et notamment le **IXa** présente une activité très intéressante sur le récepteur.

- Remarque

Le test de l'AMPC, qui est principalement utilisé dans la littérature, a été réalisé sur la molécule **IXa** par l'équipe du Dr. Jacobson du NIH/NIDDK. Comme le montre la figure 60 ci-dessous, plus la

concentration du CGS-21680 (agoniste) augmente, plus on a un recrutement de l'AMPc (courbe contrôle). Un déplacement de cette courbe vers la droite est observé en ajoutant le composé **IXa** à concentration croissante, ce qui est caractéristique du caractère antagoniste de notre molécule. Cela permet ainsi de valider le test du $\text{GTP}\gamma^{35}\text{S}$ effectué à Lille.

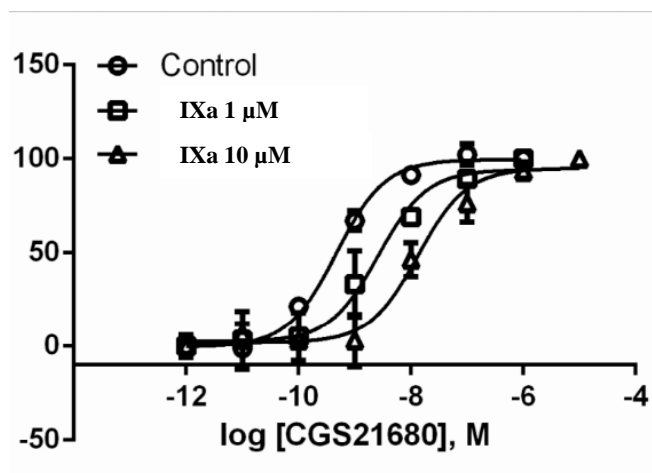
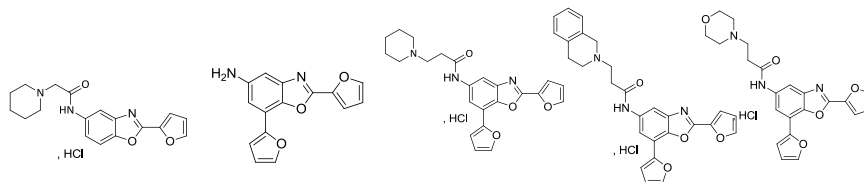


Figure 60 : Représentation du caractère antagoniste de IXa par le test de l'AMPc

3- Évaluation des paramètres ADME

- Tests préliminaires d'ADME

Des tests préliminaires d'analyses d'ADME (Adsorption, Distribution, Métabolisation et Élimination) ont été sous-traités par la CEREP. Plusieurs données sont évaluées comme le montre le tableau 16.



Composés		VIa	IXa	Xb	Xc	Xd
Solubilité (μM) ^a	Basic	159,2	38	119	200	172
	pH 7,4	184	31	165	8	173
	Acid	200	173	132	100	167
% de liaison aux protéines ^b		83	90	98	99.9	98
Perméabilité ^c Caco-2- pH 6.5-7.4 (10 ⁻⁶ cm/s)	A/B perméabilité	50	77	2.3	0.2	11.5
	B/A perméabilité	24.2	36.7	1.2	0	1.6
clogP ^d		3.25	2.49	4.02	4.50	2.96
Métabolisme <i>in vitro</i> ^e t _{1/2} (min)		11	> 60	41	> 60	> 60
Cl _{int} ^f (μL/min/mg)		630	< 115	171.6	< 115	< 115
Cytotoxicité IC ₅₀ (μM) ^g ou %I _{10μM} ^h		0	40	9	37%	77

^a Evaluée après 24h d'agitation dans à pH acide, PBS (pH 7.4) et basique. ^b Composé testé à 10 μM. ^c Perméabilité = Composé testé à 10 μM à pH 6.5/7.4. ^d Calculé par Molinspiration. ^e Réalisé sur microsome de foie humain. ^f Cl_{int} = Composé testé à 0.1 μM. ^g Concentration du composé provoquant 50% de cellules SY5Y mortes après 24 h de traitement. ^h Pourcentage de cellules SY5Y mortes après 24 h de traitement à 10 μM.

Tableau 16 : Résultats préliminaires des tests ADME

Comme attendu, de par leurs fonctions basiques, les molécules **VIa**, **Xb** et **Xd** présentent une forte solubilité comparée à **IXa** qui ne possède pas d'amine protonable. Le résultat est plus surprenant pour la molécule **Xc**. En effet, s'il est attendu que ce composé soit moins soluble que **Xb** de par la présence d'une tétrahydroisoquinoléine à la place d'une piperidine, un tel écart était difficilement

prévisible. Cette molécule présente même une plus faible solubilité à pH physiologique que la molécule **IXa**.

Toutes ces molécules se lient fortement aux protéines plasmatiques même si les molécules **Vla** et **IXa** le font de façon moindre. Ces valeurs, sauf pour la molécule **Xc**, ne sont pas de valeur rédhibitoires pour de possibles tests *in vivo* en comparaison avec les différents antagonistes A_{2A} en phase clinique (> 99% par exemple pour le Préladenant¹⁸⁰).

Les valeurs de perméabilité intestinale mettent en avant le fait qu'une molécule plus hydrophobe (**IXa**), sans chaîne cationique, a une vitesse de passage plus importante. Ainsi, à l'exception des molécule **Xb** et **Xc** qui présentent une faible perméabilité A-B (2×10^{-6} cm/s < Papp), les autres molécules possèdent une vitesse de passage modérée (**Xd**, 2×10^{-6} cm/s < Papp < 20×10^{-6} cm/s) à très élevée (**IXa**, Papp > 20×10^{-6} cm/s).

Ces molécules sont aussi évaluées sur microsomes hépatiques humains afin de voir leur stabilité métabolique. De manière intéressante, les composés des séries **IX** et **X** présentent une très bonne stabilité métabolique avec un temps de demi-vie supérieur à une heure pour certaines d'entre elles. L'ajout d'un furane en position 7 permet donc d'améliorer cette composante ($t_{1/2 \text{ Vla}} = 11$ min).

Concernant les valeurs de cytotoxicité, il est constaté une augmentation de celle-ci par rapport aux molécules des séries **I-VII**. En effet, si ces dernières ne présentaient peu, voire aucune cytotoxicité (*i.e.* **Vla**), les molécules des **IX** et **X** ont des valeurs bien plus élevées mais cependant acceptable, notamment **Xd** et **Xc**.

En se basant sur toutes ces données, il apparait que la molécule **Xc**, bien que la plus affine, ne représente pas un bon candidat pour de potentielles études *in vivo*. En effet, sa faible solubilité (8 µM dans le PBS), combinée à sa faible perméabilité nous a poussés à ne pas retenir cette molécule. Ainsi, **Xd** représente un bon compromis avec une valeur de perméabilité convenable de 11×10^{-6} cm/s et une faible clairance sur microsome humain mais surtout une forte solubilité et une cytotoxicité plus faible que les autres composés (excepté **Xc**). Ces deux derniers paramètres, prioritaires lors de l'établissement de notre cahier des charges, nous a amené à sélectionner ce composé (**Xd**) pour des études de passage de la BHE.

- *Passage de la Barrière hématoencéphalique (BHE)*

Afin d'évaluer le passage de la molécule **Xd** à travers la barrière hémato-encéphalique, des expériences ont été réalisées *in vitro* au sein du laboratoire LBHE de l'université d'Artois (EA2465) du Pr. Fabien Gosselet. J'ai ainsi pu réaliser les expériences avec l'aide d'Emmanuel Sevin.

¹⁸⁰ Ramirez C.Z. et al., *Futur Neurol.*, 2013, 6, 639-648

La BHE contrôle étroitement les échanges de molécules et de cellules entre le SNC et le compartiment sanguin.¹⁸¹ Elle est localisée au niveau des cellules endothéliales cérébrales (CEC) qui tapissent la paroi des micros vaisseaux sanguin. Une réelle barrière physique et métabolique est ainsi formée entre le SNC et le sang. La régulation des échanges entre ces deux compartiments se fait au travers du cytoplasme de ces CEC par des systèmes de transport spécialisés ou par des systèmes *solute carrier*. Les CEC expriment également de nombreuses enzymes permettant d'éliminer les substrats toxiques pour le SNC ou encore des pompes d'efflux pour rejeter les substances toxiques. Ainsi, depuis plus de 40 ans, des modèles *in vitro* ont été développés afin de mieux comprendre le fonctionnement cérébral, son rôle dans les maladies neurodégénératives mais aussi pour mieux prédire la perméabilité des molécules.

Différents modèles basés sur des cellules de rat, souris, bovines et humaines ont été établis. Afin d'avoir des modèles pertinents et fiables, les CEC doivent présenter la morphologie et les marqueurs traditionnels observés *in vivo* (protéines de jonctions et serrées et adhérentes, enzymes, pompes d'efflux). De plus, les CEC doivent présenter une perméabilité para cellulaire très faible aux petites molécules. La vitesse de ces molécules étant généralement calculée en vitesse de perméabilité (P_e) ou perméabilité apparente (P_{app}). Enfin, ces modèles doivent bien sûr être reproductibles, fiables et faciles à cultiver.

C'est un modèle humain qui a été utilisé pour nos études. Ce modèle a été développé à partir de cellules souches isolées du sang de cordon ombilical qui vont acquérir le phénotype de cellules endothéliales après mise en culture.¹⁸² Ces dernières vont être ensemencées en co-culture avec des péricytes cérébraux pour acquérir les propriétés des cellules endothéliales cérébrales, appelées « brain-like endothelial cells » (BLEC).

La vitesse de passage de la BHE a été estimée à trois concentrations différentes (1, 10 et 100 μM). En parallèle, la toxicité des molécules sur les cellules de la BHE est évaluée. Pour ce faire, la mesure de la perméabilité du Lucifer Yellow en présence de nos molécules est réalisée. Si, cette molécule référence passe plus vite la barrière en présence de nos ligands ($P_e > 1 \times 10^{-3} \text{cm/min}$), cela signifie que les cellules sont moins "étanches" due à une probable toxicité de nos molécules. Plusieurs paramètres sont évalués. Tout d'abord, la vitesse de passage *via* la valeur de perméabilité (P_e et/ou P_{app}). De plus, et ce afin de voir si nos résultats sont interprétables, deux autres paramètres sont étudiés, à savoir l'accumulation intracellulaire et le "recovery". L'accumulation intracellulaire correspond au pourcentage de notre molécule restée dans les cellules membranaires. La valeur de "recovery" correspond au pourcentage du ratio du nombre de moles de molécules retrouvées dans

¹⁸¹ Gosselet F. et al., *medecine/sciences*, 2017, 33, 423-431

¹⁸² Cecchelli R. et al., *PLoS One*, 2014, 9, e99733.

les deux compartiments sur le nombre de moles initial. Ainsi une valeur trop faible peut indiquer une solubilité trop faible de la molécule, le métabolisme par les cellules, ou encore une accumulation dans les cellules membranaires. Une valeur trop forte est généralement due à une erreur expérimentale.

Dans le cas de la molécule **Xd**, les résultats à 1 μM et 100 μM ne sont pas discutés (tableaux 17), du fait de la valeur de "recovery" à 1 μM (127%) ou de la toxicité de ce composé à 100 μM ($\text{Pe lucifer yellow} \geq 1 \times 10^{-3} \text{cm/min}$). A 10 μM , la vitesse de passage de l'endothélium cérébral est limitée ($\text{Pe} = 0.87 \times 10^{-3} \text{cm/min}$) mais certainement sous-estimée puisque l'on observe une l'accumulation intracellulaire importante (21%).

A titre de comparaison, l'expérience a été réalisée avec la caféine dont on sait qu'elle franchit très facilement la BHE. Comme on peut le voir, une vitesse de passage de l'endothélium cérébral très élevée est observée ($\text{Pe} > 10 \times 10^{-3} \text{cm/min}$) avec une accumulation intracellulaire négligeable

	C (μM)	Pe		Papp		Recovery %	Ac. Intracellul.		Toxicité Pe Lucifer Yellow		
		Moy.	s.d.	Moy.	s.d.		Moy.	s.d.	Moy.	s.d.	recovery
		10^{-3}cm/min		10^{-6}cm/sec		%		10^{-3}cm/min			
Xd	1	1.84	0.40	21.43	3.40	127	69	8	0.92	0.31	96
	10	0.87	0.30	11.94	3.43	68	21	1	0.95	0.24	95
	100	1.84	0.63	21.0	5.21	67	20	2	1.51	0.58	94
Caféine	1	-68.1	19.38	nd	nd	128	4	0	0.49	0.06	97
	10	29.86	24.39	nd	nd	116	2	0	0.65	0.03	102
	100	14.89	4.76	nd	nd	108	1	0	0.66	0.08	95

nd : non déterminé

Tableau 17 : Résultats de perméabilité et de toxicité sur modèle BHE humain pour le composé Xd

Du fait que **Xd** a une vitesse de passage de la BHE limitée additionnée à des propriétés ADME et une affinité peu importante, nous avons décidé de ne pas faire d'études *in vivo* pour nous consacrer à la famille des quinazolines.

Chapitre 3 : La famille des quinazolines

I- Identification de « hits » par criblage virtuel

Un criblage virtuel a été effectué par le Dr. Nicolas Renault (U995, Université de Lille). L'outil de docking *GOLD*¹⁸³ a été utilisé en retenant les paramètres algorithmiques menant aux meilleures performances de rendement, d'enrichissement et de vitesse de calcul. Dans notre cas, l'algorithme utilise 30% de ses possibilités en termes de paramétrage (fréquence de mutation, crossing over, migration, ...) pour la génération de la diversité conformationnelle.

Aux 60 000 composés issus de la chimiothèque nationale, sont ajoutés 35 antagonistes de référence des A_{2A}Rs pour effectuer cette campagne (figure 61). Un premier filtre permet d'obtenir 19 000 molécules. Celui-ci consiste à éliminer les molécules qui ne coïncident pas avec des critères structuraux communs à tous les ligands du récepteur A_{2A} (*i.e* au moins un cycle aromatique et un azote). De plus, des molécules de faible poids moléculaire (PM < 600 Da) sont privilégiées et les molécules possédant des groupes potentiellement toxiques sont éliminées (d'après une liste d'environ une centaine d'espèces réactives comme les phosphonates, halogénures de sulfonyles, peroxydes, halogénures d'acides, ou thiocyanates).

Puis les étapes clés du protocole de sélection vont utiliser deux filtres. Le premier consiste à retenir les molécules qui interagissent avec les acides aminés Trp246 et Asn253 tandis que le second utilise deux fonctions de scores d'interaction. Un premier score approprié pour évaluer la contribution des interactions hydrophobes de Van der Waals et les liaisons hydrogène (GoldScore) et un second pour estimer la contribution des interactions aromatiques (Ludi). Ainsi, les meilleures performances de criblage sont classées suivant un score composite des deux scores mentionnés précédemment. Le but étant d'avoir le rendement et le facteur d'enrichissement en antagonistes de référence le plus élevé possible dans le premier percentile de la chimiothèque classée par le score consensus et dont les poses de docking satisfont des interactions avec Asn253 et Trp246. Parmi les 4733 molécules satisfaisant les interactions avec les deux acides aminés clés, les 50 premières molécules classées sont sélectionnées sur la base du score composite (premier percentile). Dans le souci de considérer un maximum de diversité chimique, un sous-ensemble plus étendu de 365 molécules (cinq premiers percentiles) est retenu. Même si elles valident le protocole de criblage virtuel, 50 molécules sont écartées par manque d'originalité puisqu'elles contenaient un motif chimique de type purine. En calculant les indices de Tanimoto¹⁸⁴ sur la base d'empreintes moléculaires 2D, les 315 molécules restantes sont classées par famille chimique. L'inspection visuelle de ces familles a permis de retenir

¹⁸³ Jones G. et al., *J. Mol. Biol.*, **1997**, 267, 727–748.

¹⁸⁴ Willett P., *Drug Discov. Today*, **2006**, 11, 1046-1053

20 molécules sur des critères d'originalité, de solubilité et/ou de faible poids moléculaire et d'accessibilité chimique dans la perspective de moduler ces molécules.

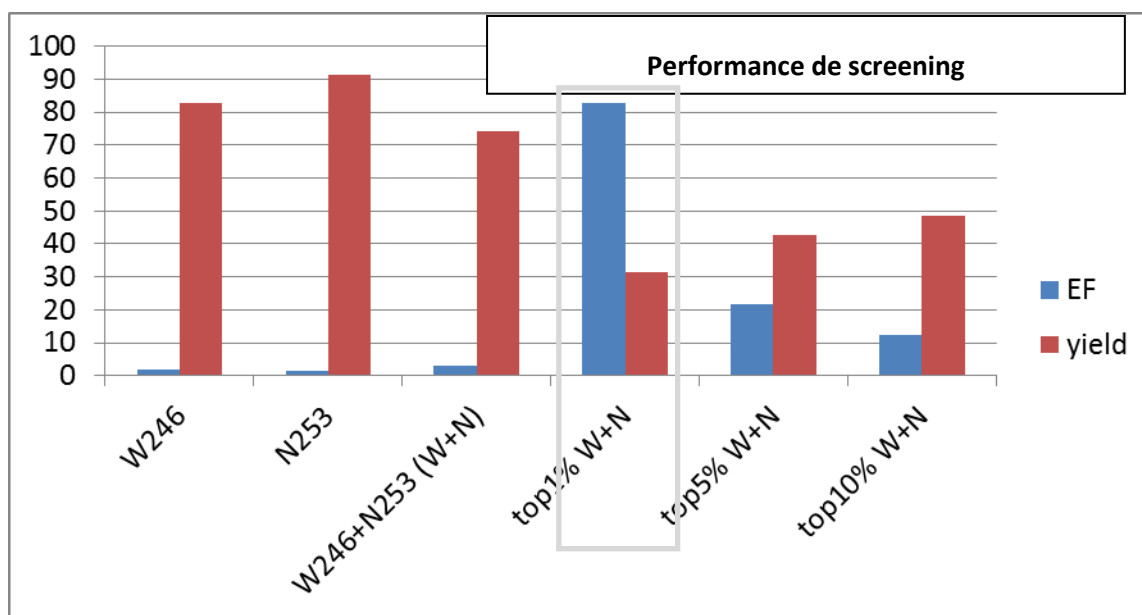
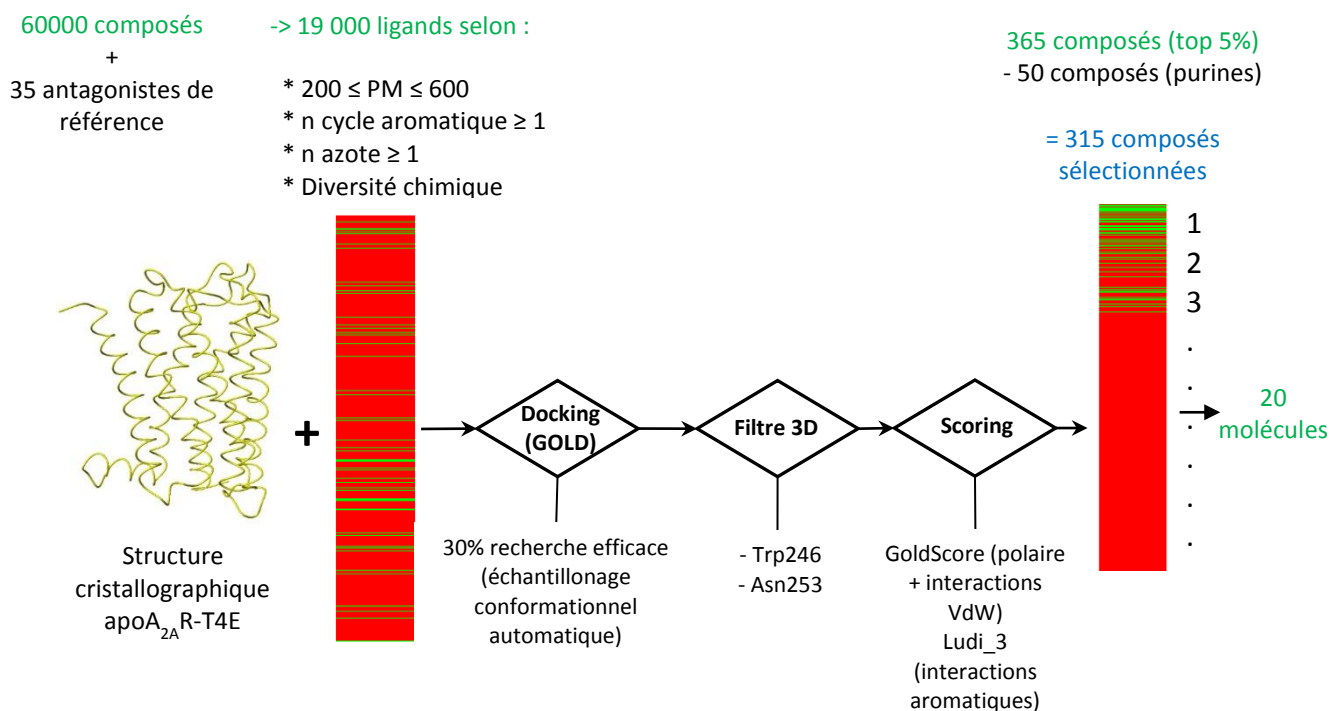


Figure 61 : Protocole et performances de criblage virtuel. Les performances de criblage virtuel par docking sont mesurées en terme de facteur d'enrichissement (EF) et de rendement (yield en %) en antagonistes de référence dans les fractions de la chimiothèque après : (i) filtrage des poses satisfaisant les poses avec Trp246 et/ou Asn253 puis (ii) scoring des filtrats et la sélection des premiers percentiles (1%, 5% et 10%) les mieux classés.

Ces molécules ont ensuite été testées par déplacement du radioligand [³H]-ZM241385 à l'IMM de Lisbonne. Deux molécules ont montré une affinité de l'ordre du micromolaire (figure 62). Pour ce travail de thèse, la famille des quinazoline sera étudiée (figure 62-B). Celle-ci présente l'avantage d'être une petite structure facilement modulable dont la chimie est connue comparée au composé C.

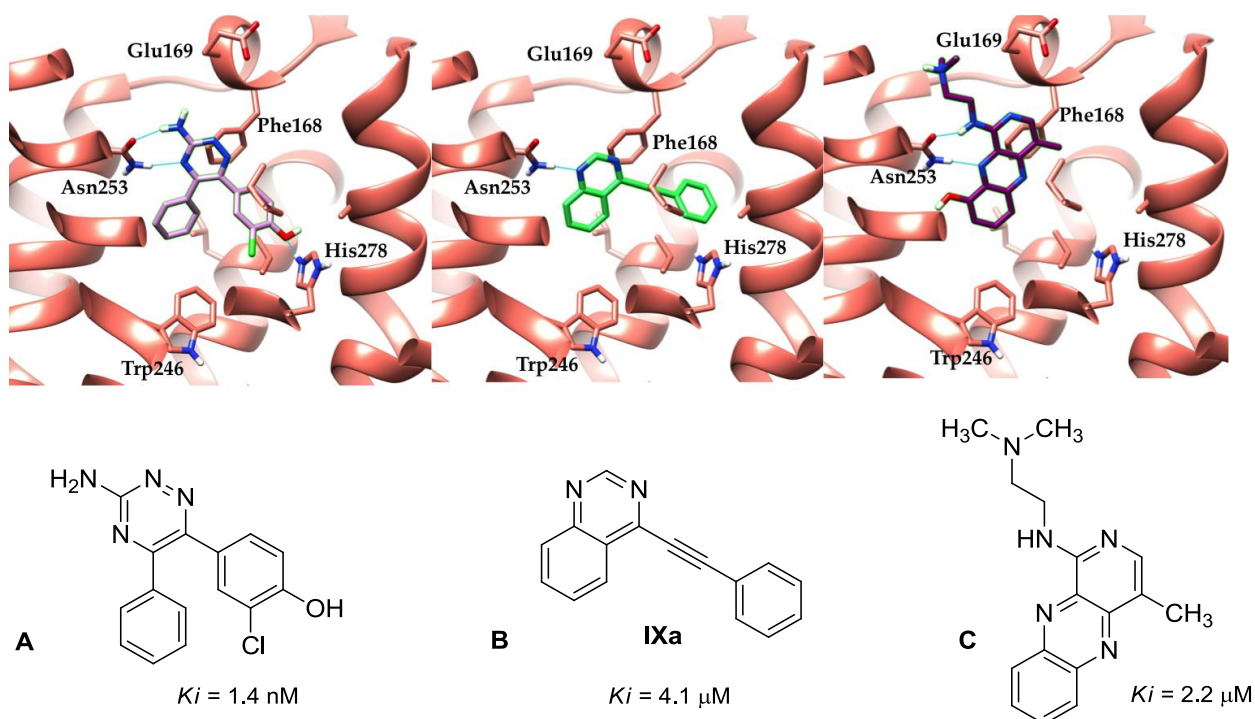


Figure 62 : Interaction de l'antagoniste de référence (A) et des deux hits (B,C) issus du criblage virtuel. L'illustration représente la pose co-cristallisée du ligand de référence dans la structure 3UZC.pdb (A) et la pose de docking sélectionnées des deux molécules présentant une activité micromolaire (B, C).

II- Modélisation moléculaire réalisée autour du « hit » quinazoline

La figure 62-B montre que le noyau quinazoline de la 4-(phényléthynyl)quinazoline (**IXa**) interagit d'une part, avec la Phe168 par interaction de type π -stacking et d'autre part, par liaison hydrogène avec l'Asn253. Des interactions hydrophobes, difficilement prédictibles par *docking*, sont aussi envisagées avec le Trp246. Le substituant en position 4 vient quant à lui occuper la poche hydrophobe délimitée par Ala63, Val84, Ile274 et His278 déjà étudiée pour les séries benzoxazoliques **IX** et **X** précédentes (cf page 92).

Il apparaît donc que le mode de liaison la molécule **IXa** se rapproche de celui de la triazine de référence comme on peut le voir en comparant les figures 62-A et 62-B.

En se basant sur la structure co-cristallisée de la triazine dans le récepteur, des modulations en position 2 et 4 du « hit » **X1a** ont été envisagées (figure 63).

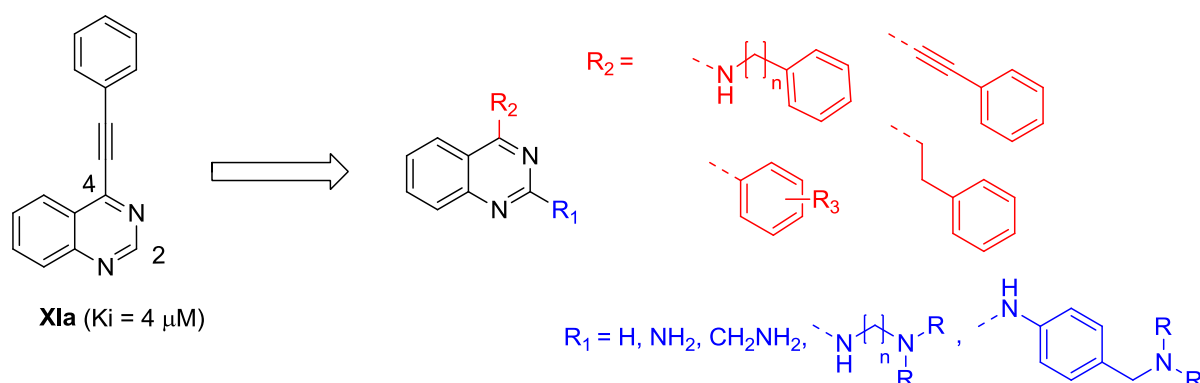


Figure 63 : Modulations envisagées autour du « hit » X1a

- Modulations de la position 2

Outre l'hydrogène dans cette position, nous avons voulu renforcer l'interaction avec l'Asn253, acide aminé clé pour l'interaction ligand/récepteur. Pour ce faire, trois sortes de groupements ont été introduits.

Tout d'abord, une fonction amine primaire viendrait créer cette interaction par le biais d'une liaison hydrogène (figure 64A). L'ajout d'une chaîne méthylamine à ce niveau permettrait d'une part, de créer cette même interaction et d'autre part, d'améliorer la solubilité de nos composés. Enfin, l'introduction d'une chaîne diaminée présenterait un triple avantage. En effet, outre l'interaction de l'amine secondaire aromatique avec l'Asn253, l'amine tertiaire en bout de chaîne créerait une nouvelle interaction avec le Glu169 et augmenterait la solubilité de nos molécules (figure 64B). De plus, l'ajout de cette chaîne aminoalkyle pourrait permettre de jouer sur la sélectivité et/ou l'activité en créant des interactions supplémentaires. Dans ce sens, la rigidification de la chaîne alkyle pourra aussi être envisagée pour jouer sur ces paramètres.

- Modulation de la position 4

Les modulations à ce niveau consisteraient surtout à conserver et/ou renforcer l'occupation de la poche hydrophobe, occupée par la fonction phényléthynyle du « hit » **X1a**. Pour cela nous avons introduit, en plus de ce groupement, des aryles, des phényles diversement substitués, des alkylphényles et enfin des dérivés aminoalkylphényles.

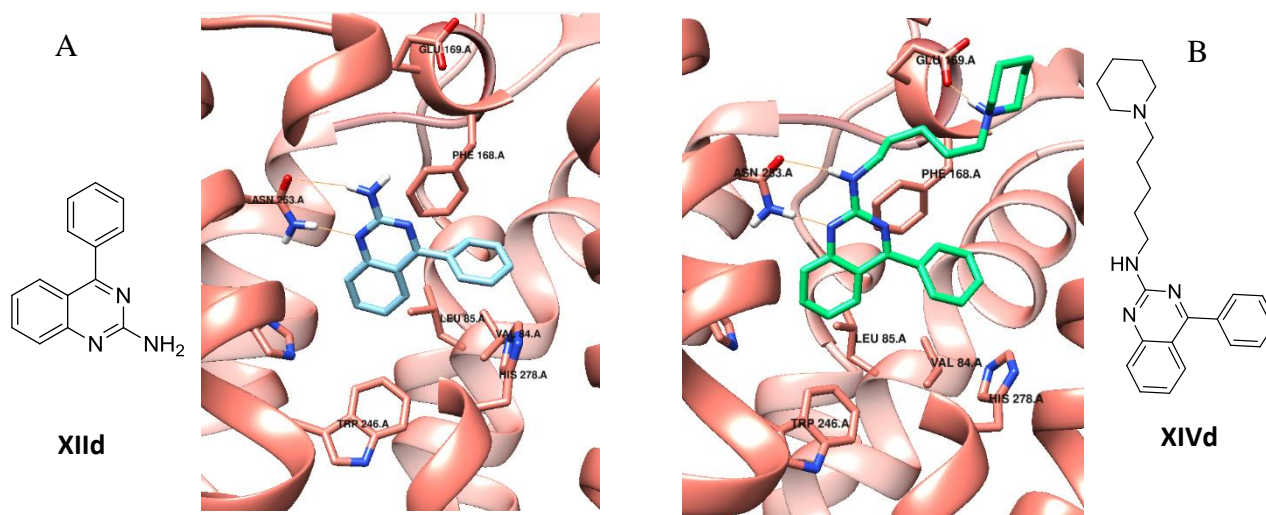


Figure 64 : Représentation de la molécule XIId (A) et XIVd (B)

Ainsi quatre séries de composés (séries **XI**, **XII**, **XIII** et **XIV**) seront synthétisées comme le montre la figure 65.

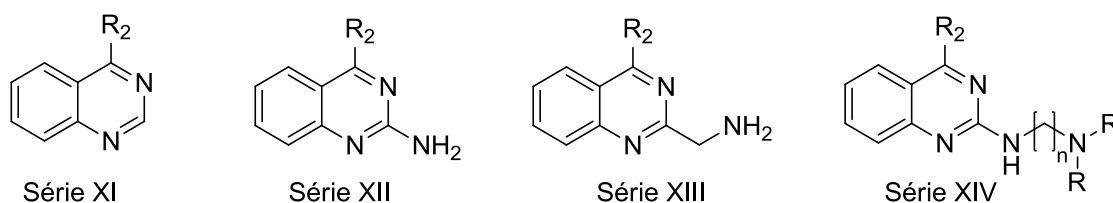


Figure 65 : Représentation des séries de molécules XI, XII, XIII et XIV

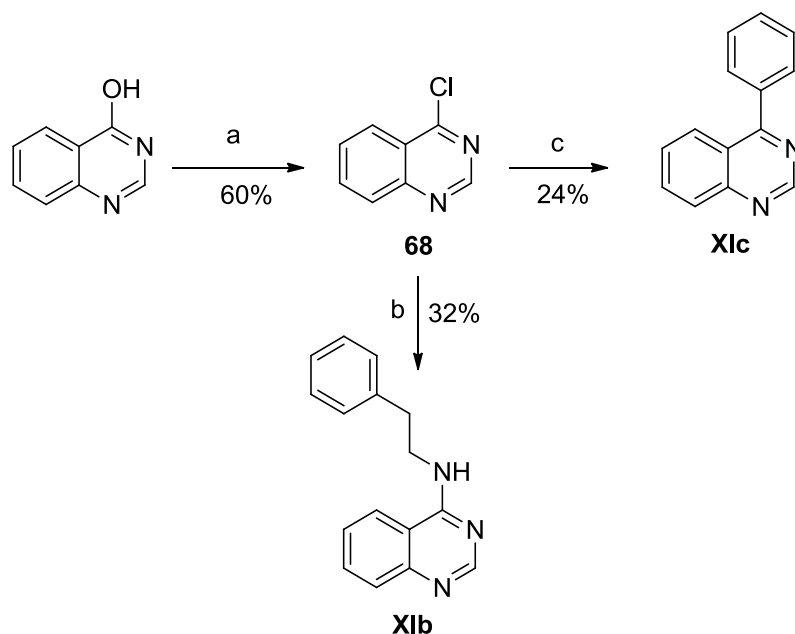
III- Synthèse des molécules cibles

Cet hétérocycle est particulièrement étudié en chimie médicinale et possède un large spectre d'activité biologique telle qu'une activité antibactérienne, antifongique, anti-HIV, anti-cancéreuse.¹⁸⁵ De plus le noyau quinazoline est largement utilisé du fait de sa robustesse, de sa chimie maîtrisée et de sa facilité à être produit à grande échelle. Ainsi, plusieurs médicaments possèdent ce noyau quinazoline tels que la Prazosin (bloquant alpha adrénergique), le Gefitinib (inhibiteur EGFR) ou encore le Vendetanib (antagoniste VEGFR). Tout cela confirme le potentiel du noyau quinazoline comme « scaffold » de base pour élaborer un candidat-médicament.

¹⁸⁵ Theivendren P.S. et al., *Research in Pharmacy*, 2011, 1, 1-21

1- Synthèse des molécules monosubstituées en position 4 (XIb-c)

La stratégie de synthèse adoptée permet d'obtenir en deux étapes les composés de la famille **XI** (schéma 32):



Réactifs et conditions : a) POCl₃ (4.0 éq.), 2,6-lutidine (0.07 éq.) toluène, reflux ; b) Phényléthylamine (1.2 éq.), Et₃N (1.5 éq.), THF, 25 °C ; c) Acide phénylboronique (1.3 éq.), K₃PO₄ (2 éq.), Pd(OAc)₂ (0.02 éq.), PPh₃ (0.04 éq.), dioxane/H₂O, 110 °C

Schéma 32 : Synthèse des composés XIb-c

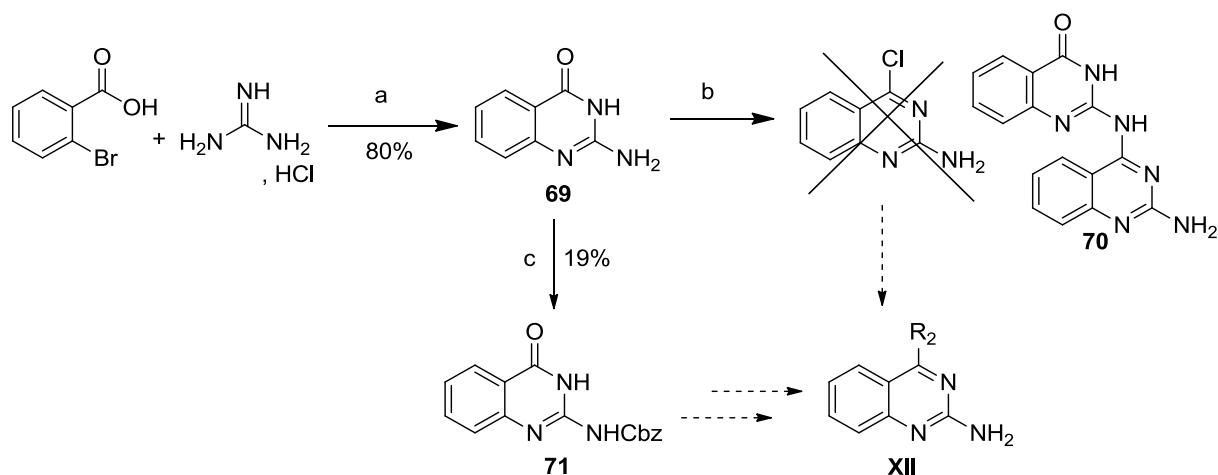
Bien que la 4-chloroquinazoline et la 4-phénylquinazoline soient commercialisées, nous avons voulu les préparer afin de se familiariser avec la chimie des quinazolines.

La chloration de la quinazolin-4-ol commerciale, réalisée avec du POCl₃ dans le toluène, conduit à la 4-chloroquinazoline (**68**) avec un faible rendement de l'ordre de 25%. L'ajout de 2,6-lutidine permet non seulement de réduire le temps de réaction mais aussi d'augmenter le rendement à 60%. La substitution nucléophile par la phényléthylamine ou une réaction de couplage de type Suzuki avec l'acide phénylboronique permet la synthèse des composés **XIb** et **XIc** respectivement.

2- Synthèses des composés 2-aminoquinazolines (XIIa-h)

Pour l'obtention des composés de la famille **XII**, deux voies de synthèse ont été envisagées.

Une première voie de synthèse consiste à synthétiser un intermédiaire clé, la 2-amino-4-chloroquinazoline sur laquelle on viendrait greffer les différents groupements désirés en position 4 (schéma 33).



Réactifs et conditions : a) K_2CO_3 (4.0 éq.), CuI (0.1 éq.), DMF, $110^\circ C$; b) 2,6-Lutidine (0.7 éq.), $POCl_3$, reflux ; (c) Chloroformiate de benzyle (1.1 éq.), Et_3N (1.3 éq.), DMF, $0-80^\circ C$

Schéma 33 : Synthèse envisagée pour l'obtention des molécules XII

La synthèse du composé **69** est tout d'abord effectuée par réaction entre l'acide 2-bromobenzoïque et le chlorhydrate de guanidine avec un bon rendement de 80%.¹⁸⁶ La chloration de ce dernier par action de $POCl_3$ conduit à la formation du composé attendu mais celui-ci réagit avec le composé **69** pour conduire au composé **70** avec un rendement de 30%. Afin de pallier ce problème, des essais de protection de l'amine exocyclique (**69**) par un groupement Cbz sont entrepris. Cette étape de protection conduit au produit **71** avec un faible rendement de 19%, à cause de la faible réactivité de l'amine primaire en cette position. Cette voie de synthèse a donc été abandonnée.

Pour synthétiser les molécules de la famille **XII**, une deuxième voie de synthèse a été mise au point comme le montre la rétrosynthèse suivante.

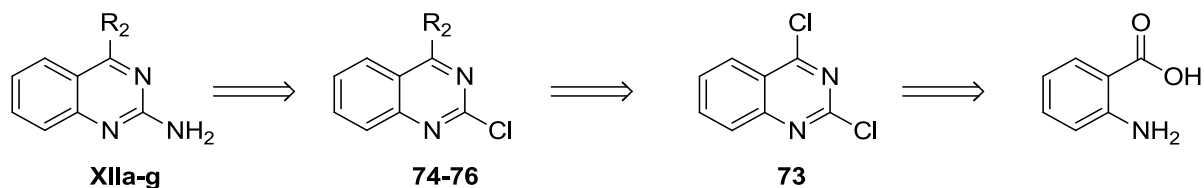
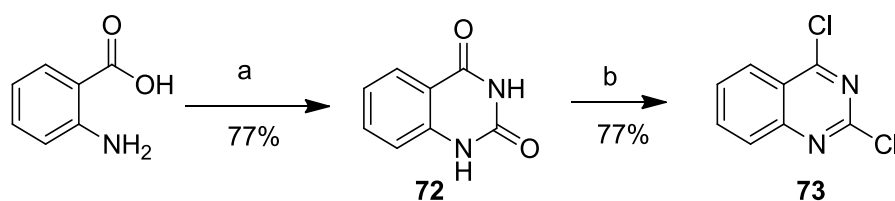


Schéma 34 : Rétrosynthèse pour l'obtention des molécules XIIa-g

¹⁸⁶ Huang X. et al., *Synthesis*, 2009, 16, 2679–2688

Pour ce faire, la molécule **73** est tout d'abord préparée (schéma 35).



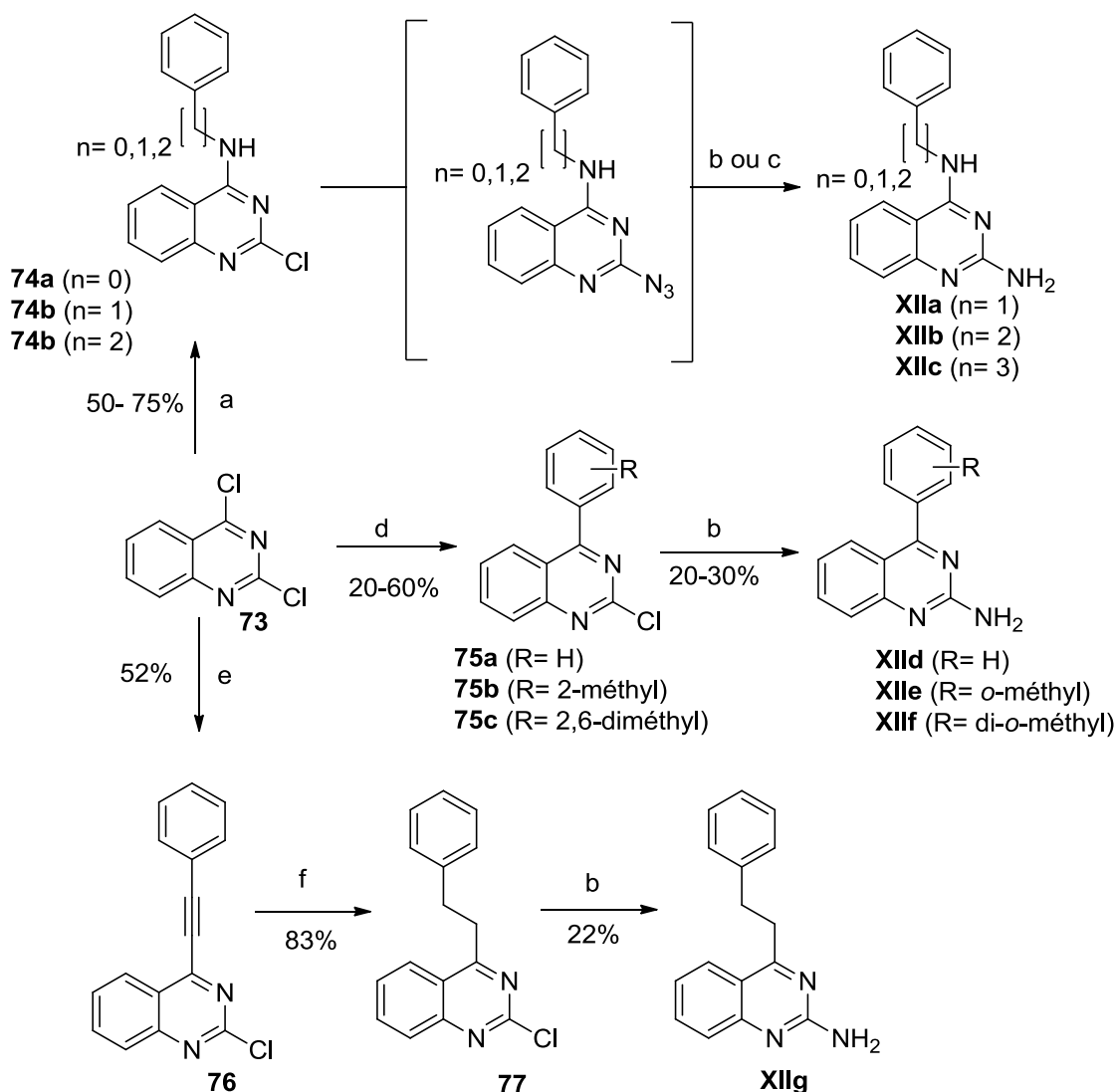
Réactifs et conditions : a) (i) KNCO (1.3 éq.), AcOH (1.0 éq.), H₂O, 35 °C ; (ii) NaOH (32.0 éq.), 0-25 °C; b) 2,6-Lutidine (0.7 éq.), POCl₃, reflux

Schéma 35 : Synthèse du composé 74

Cette synthèse, parfaitement décrite dans la littérature¹⁸⁷, consiste dans un premier temps à former l'intermédiaire **72** par action du cyanate de potassium sur l'acide 2-aminobenzoïque. Puis, la chloration de la quinazolin-di-one (**72**) est effectuée au reflux du POCl₃ en présence de 2,6-lutidine pour donner l'intermédiaire dichloré **73**.

Sachant que le chlore en position 4 est plus labile que celui en position 2, les composés finaux **XII** ont été obtenus en deux étapes à partir du composé **73** comme le montre le schéma 36 suivant.

¹⁸⁷ Van Horn K.S. et al., *J. Med. Chem.*, 2014, 57, 5141–5156



Réactifs et conditions : a) Phénylalkylamine ou aniline (1.2 éq.), Et₃N (1.5 éq.), THF, 25 °C ; b) (i) NaN₃ (1.1 éq.), EtOH, 90 °C ; (ii) H₂NNH₂.H₂O (1.5 éq.), Pd/C, 70 °C ; c) (i) NaN₃ (1.1 éq.), EtOH, 90 °C ; (ii) PPh₃, H₂O/THF, 60 °C ; d) Acide phénylboronique (0.8 éq.), K₃PO₄ (2 éq.), Pd(OAc)₂ (0.02 éq.), PPh₃ (0.04 éq.), dioxane/H₂O, 40 °C ; e) Phénylacétylène (1.0 éq.), Et₃N (6 éq.), CuI (0.02 éq.), Pd(PPh₃)₂Cl₂ (0.02 éq.), THF, 65 °C ; f) H₂, Pd/C, EtOH, 25 °C

Schéma 36 : Synthèse des molécules XIIa-g

La substitution sur le dérivé dichloré **73** par divers phénylalkylamines, conduit majoritairement au dérivé monosubstitué en position 4. Les composés **74a-c** ainsi obtenus, réagissent avec de l'azote de sodium au reflux de l'éthanol. Les intermédiaires azides ne sont pas isolés et subissent *in situ* une réduction en amine primaire de deux manières différentes : soit par action de PPh₃/H₂O¹⁸⁸ pour donner le composé **XIIb** (35%) du fait de la présence d'une fonction benzylamine ; soit, par action

¹⁸⁸ Lin F.L. et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 2686-2695

d'hydrate d'hydrazine et de Pd/C pour obtenir les molécules **XIIa** et **XIIc** avec un rendement de 50%.¹⁸⁹

Concernant la synthèse des composés **75a-c**, une réaction de Suzuki sur la molécule **73** est effectuée en appliquant les conditions utilisées précédemment (Cf page 99) pour conduire à un mélange de dérivés mono et di-substitués en proportion 60/30. Les dérivés 2-chloro-4-phénylquinazolines sont mis en réaction avec l'azoture de sodium pour ensuite être réduits par action d'hydrate d'hydrazine pour obtenir les composés 2-aminoquinazolines **XIId-f**.

Pour l'obtention du composé **XIIg**, une réaction de Sonogashira¹⁹⁰ entre le composé **73** et l'éthynylbenzène est tout d'abord effectuée pour synthétiser le composé **76** avec un rendement de 52%. La fonction alcyne est ensuite réduite sous atmosphère de H₂ en présence de Pd/C pour donner la molécule **77** avec un rendement de 51%. Enfin, l'amine exocyclique est introduite de la même manière que pour les composés **XIId-f**.

- Remarque : Essai de synthèse du composé 4-(phényléthynyl)quinazolin-2-amine

Plusieurs essais d'introduction d'une amine primaire en position 2 sur la molécule **76** ont été effectués en vain (schéma 37, tableau 18).

En effet, la substitution du chlore par l'azoture de sodium ou par la benzophénone imine n'a pas permis d'obtenir le produit attendu. L'utilisation de l'ammoniaque sous irradiation micro-onde à quant à elle conduit au composé **78** issu de l'addition de l'ammoniaque sur l'alcyne.

¹⁸⁹ Mohamed T. et al., *Tet. Lett.*, **2015**, *56*, 6882–6885

¹⁹⁰ Hrdina R. et al., *Adv. Synth. Catal.*, **2007**, *6*, 822-826

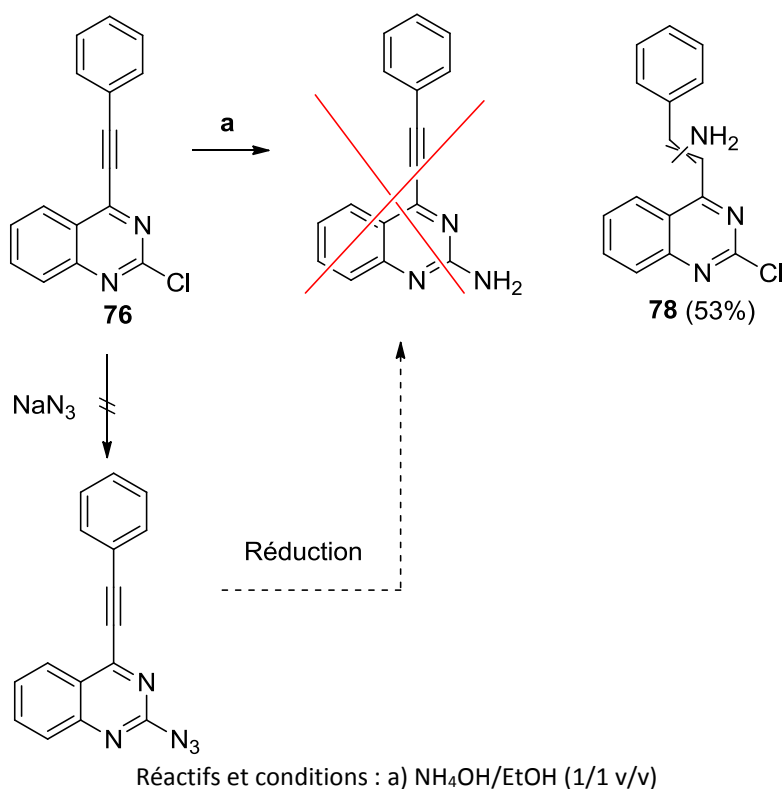


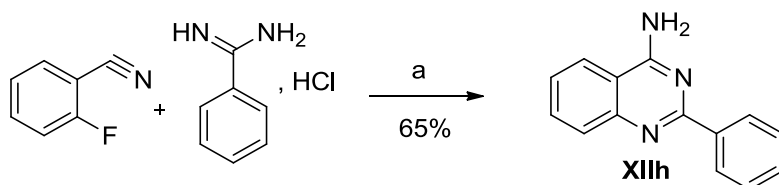
Schéma 37 : Essais d'amination sur la molécule 76

Essai	Conditions	Remarques
1	NaN_3 (1.1 éq.), PPh_3 (1 éq.), EtOH/AcOH	Pas de produit observé par LCMS
2	NaN_3 (1.1 éq.), $\text{H}_2\text{NNH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1.5 éq.), EtOH/AcOH	Pas de produit observé par LCMS
3	$\text{NH}_4\text{OH}/\text{EtOH}$ (4/1), MW	Formation de 78
4	benzophénone imine (1.5 éq.), $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (0.03 éq.), Binap (0.04 éq.), Cs_2CO_3 (2 éq.), toluène	Pas de produit observé par LCMS

Tableau 18: Essais d'amination de la molécule 76

Enfin, la synthèse de l'isomère de position de la molécule **XIId** a été réalisée comme décrit par Feng¹⁹¹ (schéma 38). Celle-ci peut être effectuée en une étape par réaction entre le 2-fluorobenzonitrile et le benzimidamide pour donner **XIIh** avec un rendement de 65%.

¹⁹¹ Feng J.B. et al., *Org. Biomol. Chem.*, 2015, 13, 10656–10662

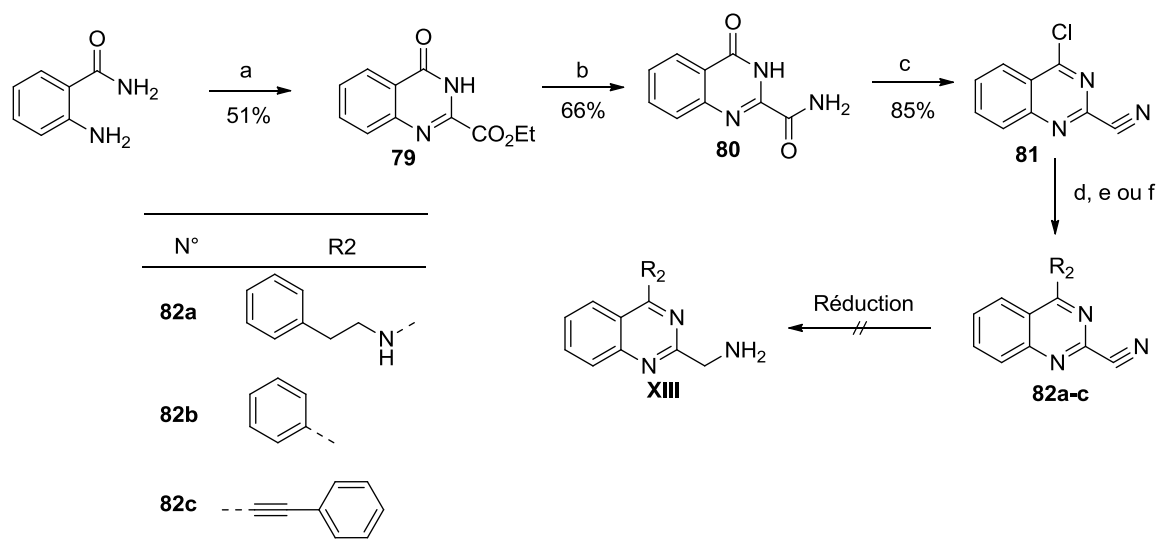


Réactifs et conditions : a) tBuOK (3.0 éq.), DMac, 110 °C

Schéma 38 : Synthèse du composé XIIIh

3- Synthèses des composés quinazolin-2-méthanamine (XIIIa-c)

Afin de synthétiser les composés XIII, une première voie de synthèse a été élaborée (schéma 39) en passant par le dérivé 2-carbonitrile-quinazoline **81**.

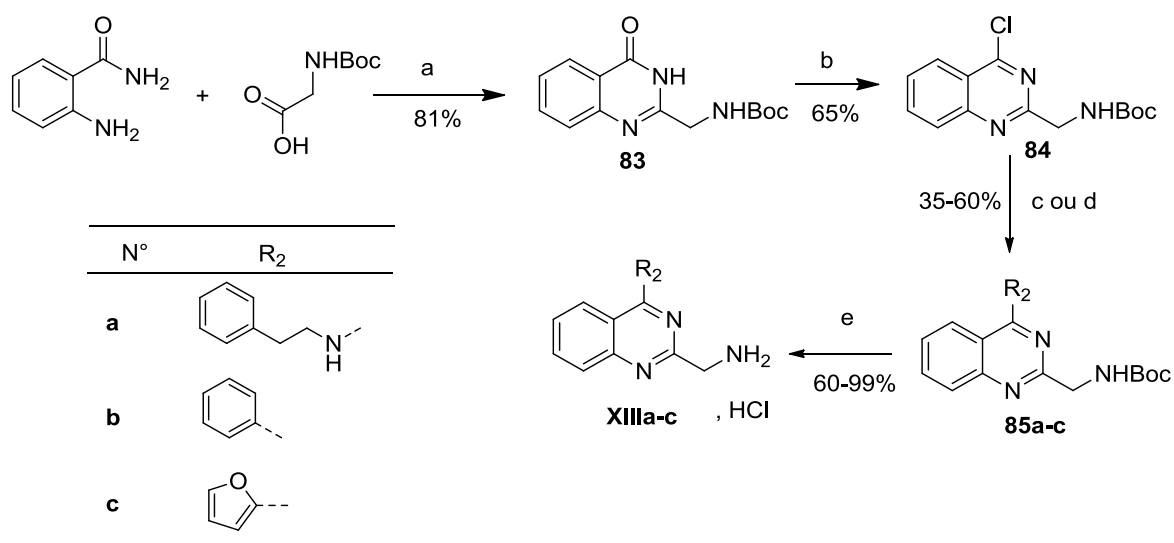


Réactifs et conditions : a) Oxalate de diéthyle (3.0 éq.), EtONa (3 éq.), EtOH, Micro-ondes, 80 °C ; b) NH₄OH, 70 °C ; c) POCl₃ (13 éq.), 2,6-lutidine (0.7 éq.), CH₃CN, 90 °C ; d) Acide phénylboronique (1.3 éq.), K₃PO₄ (2.0 éq.), Pd(OAc)₂ (0.02 éq.), PPh₃ (0.04 éq.), dioxane/H₂O, 110 °C ; e) Phénylacétylène (1 éq.), Et₃N (6 éq.), CuI (0.02 éq.), Pd(PPh₃)₂Cl₂ (0.02 éq.), THF ; f) Phényléthylamine (1.2 éq.), Et₃N (1.5 éq.), THF, 65 °C

Schéma 39 : Essai de synthèse des molécules XIII

La synthèse du dérivé **79** est réalisée par réaction entre l'antranilamide et l'oxalate de diéthyle, sous irradiation micro-onde, avec un rendement de 51%. L'ester (**79**) est ensuite traité par l'ammoniaque pour donner l'amide primaire **80** avec un rendement de 66%. Le traitement par POCl₃ permet, en une étape, de chlorer la quinazolinone (**80**) et de transformer la fonction amide primaire en fonction nitrile par réaction de déshydratation. La molécule **81** est obtenue avec un bon rendement de 85%. Selon le composé **82** souhaité, différentes réactions en position 4 sont réalisées comme décrit pour les familles précédentes. Malheureusement, la réduction de la fonction nitrile par action de LiAlH₄, LiAlH₄/AlCl₃ ou encore de BH₃/THF a été tentée en vain.

Une autre voie de synthèse a ainsi été élaborée afin d'obtenir les composés **XIIIa-c** en 4 étapes (schéma 40).



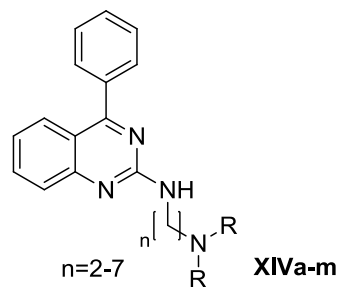
Réactifs et conditions : a) (i) Chloroformiate d'isobutyle (1.1 éq.), *N*-méthylmorpholine (1.1 éq.), THF, reflux ; (ii) NaOMe, reflux, (iii) HCl ; b) Diméthylaniline (3 éq.), POCl₃ (4 éq.), toluène, 0-80 °C ; (c) Phényléthylamine (1.2 éq.), DIPEA (1.5 éq.), THF, 25 °C ; (d) Acide arylboronique (1.3 éq.), K₃PO₄ (2 éq.), Pd(OAc)₂ (0.02 éq.), PPh₃ (0.04 éq.), dioxane/H₂O, 110 °C ; (e) HCl gaz, DCM, 50 °C

Schéma 40 : Synthèse des molécules XIIIa-c

Dans un premier temps, la réaction entre l'anthralinamide et la *N*-Boc-glycine conduit à la synthèse du composé **83** avec un bon rendement de 81%. Puis la chloration de ce dernier par le POCl₃ en présence de la diméthylaniline permet l'obtention de la molécule **84** avec un rendement de 65%. Des réactions de substitutions nucléophiles ou de couplage sont ensuite réalisées sur le composé chloré **84** pour obtenir les dérivés **85a-c**. Enfin, une dernière étape de déprotection de l'amine en présence d'HCl gaz permet la synthèse des molécules cibles **XIIIa-c** avec des rendements allant de 60 à 100%.

4- Synthèses des composés XIVa-o

Les molécules synthétisées sont rapportées sur le tableau 19 ci-dessous.



Cpd.	n =	NRR	Cpd.	n =	NRR
XIVa	2		XIVh	5	
XIVb	3		XIVi	5	
XIVc	4		XIVj	5	
XIVd	5		XIVk	5	
XIVe	6		XIVl	5	
XIVf	7		XIVm	5	H ₂ N
XIVg	5		/		

Tableau 19 : Représentation des molécules XIVa-m

Comme le montre le schéma rétrosynthétique suivant, la préparation des molécules **88a-m** a tout d'abord été nécessaire afin d'obtenir les molécules de la série **XIV**.

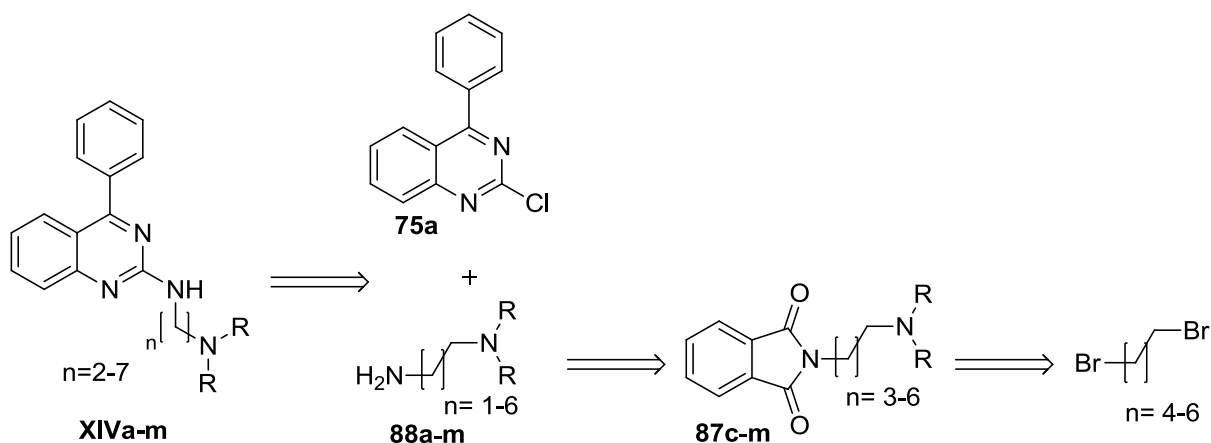
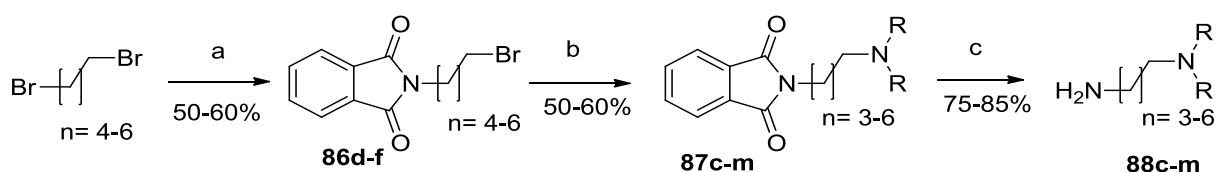


Schéma 41 : Rétrosynthèse pour l'obtention des composés XIVa-m

- Préparation des matières premières **88c-m** (schéma 42)

Les diaminoalkyles **88c-m** sont préparés en 2 ou 3 étapes en fonction de la longueur de la chaîne alkyle. En effet, les dérivés *N*-bromopentylphthalimide, *N*-bromohexylphthalimide, et *N*-bromoheptylphthalimide (**87c-m**) sont tout d'abord synthétisés par action du phthalimide potassique sur les dérivés dibromoalcanes. Leurs homologues inférieurs étant commerciaux. La substitution nucléophile par les amines souhaitées est ensuite réalisée, avant une réaction d'hydrazinolyse pour conduire aux dérivés **88c-m**. Il est à noter que les dérivés 2-pipéridinéthanamine (**88a**) et 2-pipéridinepropanamine (**88b**) sont commercialisés.



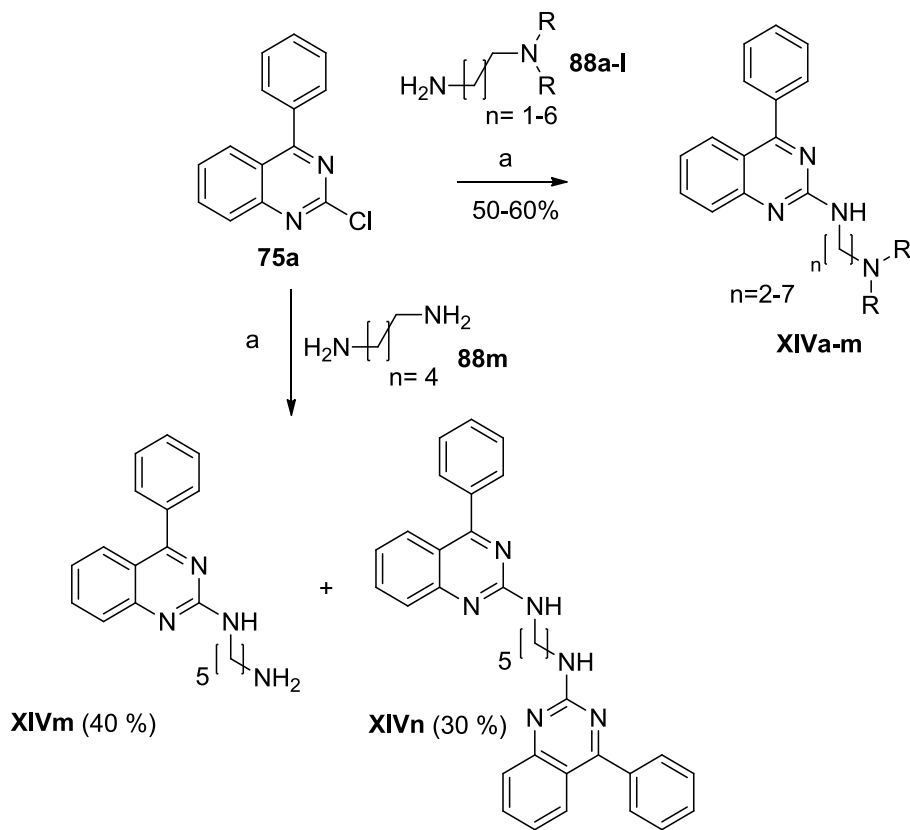
Réactifs et conditions : a) Phthalimide potassique (1.0 éq.), TBABr (0.01 éq.) DMF, 110 °C ; b) Et₃N (1.2 éq.), amine (1.2 éq.), acétone, reflux ; c) H₂NNH₂.H₂O (2.5 éq.), EtOH, reflux

Schéma 42 : Synthèse des dérivés 88c-m

- Préparation des composés XIVa-n (schéma 43)

La réaction de substitution nucléophile entre la 2-chloroquinazoline **75a** et les dérivés **88a-m** est ensuite entreprise. Dans un premier temps, la synthèse est réalisée dans un solvant (THF ou butan-2-ol) en chauffant au reflux. La molécule XIVa est dans ce cas obtenue avec un faible rendement de l'ordre de 15%. En réalisant cette réaction sans solvant, le rendement passe à 50-60%, et le temps de

réaction diminuée de 16 h à 30 min. Cette réaction marche aussi sous irradiation micro-onde, sans solvant, et donne des rendements similaires.



Réactifs et conditions : a) Sans solvant, 80 °C

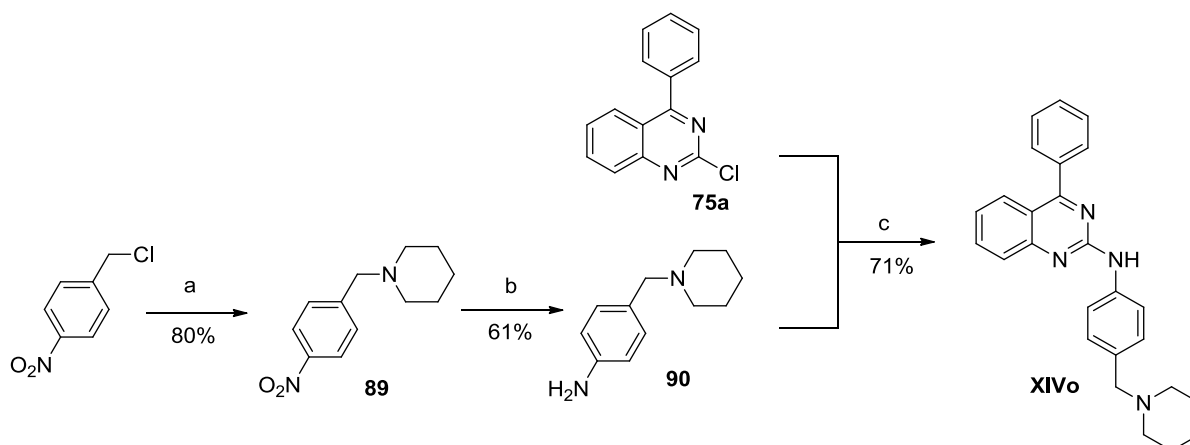
Schéma 43: Synthèse et représentation des molécules XIVa-m

Il est à noter que lors de la substitution nucléophile du dérivé chloré **75a** par le 1,5-diaminopentane, deux produits ont été isolés : le composé attendu **XIVm** avec un rendement de 40% et le dimère **XIVn** avec un rendement de 30%.

- Préparation de la molécule XIVo (schéma 44)

Afin de synthétiser la molécule **XIVo**, le composé **90** a tout d'abord été préparé.

Pour cela, une réaction de substitution nucléophile entre la pipéridine et le 1-(chlorométhyl)-4-nitrobenzène est effectuée pour donner le composé **89** avec un rendement de 80%. Ce dernier est ensuite réduit par action d'hydrate d'hydrazine et de nickel de Raney pour obtenir **90** avec un rendement de 61%. Enfin une réaction de type Buchwald-Hartwig entre **75a** et l'amine primaire **90** permet la synthèse de **XIVo**.



Réactifs et conditions : a) Pipéridine (1.2 éq.), Et₃N (1.2 éq.), acétone, reflux ; b) H₂NNH₂.H₂O (1.5 éq.), Ni de Raney, éthanol, 25 °C ; c) BINAP (0.1 éq.), Pd(OAc)₂ (0.05 éq.), Cs₂CO₃ (2 éq.), dioxane, 130 °C

Schéma 44 : Synthèse du composé XIVo

IV- Evaluation des molécules cibles.

1- Relation structure-affinité

Dans un premier temps, nous avons cherché à nous affranchir du groupement phénylacétylène, peu stable chimiquement, en position 4 du hit de départ **XIa**. Le remplacement de ce dernier par un phényle entraîne un léger gain d'affinité (figure 66). De plus, l'ajout d'une amine primaire en position 2, utilisée chez beaucoup d'antagonistes, apparait comme essentiel pour l'affinité ligand/récepteur (**XIId**, $K_i = 7.4$ nM).

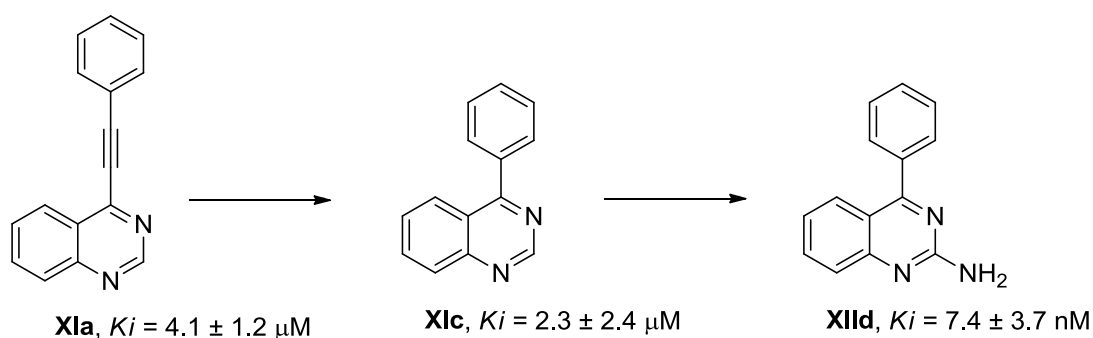
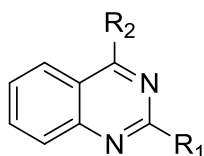


Figure 66 : Affinité pour hA_{2A}R des molécules XIa et XIc

De ce fait, les différentes modulations ont été réalisées autour de ce chef de file (**XIId**) et les résultats obtenus sont rapportés sur les tableaux 20, 21 et 22.



Cpd.	R ₁	R ₂	hA _{2A} (K _i nM) ^a / inhib ^b	Cpd.	R ₁	R ₂	hA _{2A} (K _i nM) ^a / inhib ^b
XIIa	NH ₂		10.2 ± 1.8 μM	XIIg	NH ₂		19%
XIIb	NH ₂		16%	XIIh		NH ₂	224 ± 138
XIIc	NH ₂		21%	XIIia	CH ₂ NH ₂		20%
XIId	NH ₂		7.4 ± 3.7	XIIib	CH ₂ NH ₂		5500 ± 700
XIIf	NH ₂		55000 ± 18000	XIIic	CH ₂ NH ₂		1300 ± 430

^a ZM241385 utilisé comme référence des antagonistes des A_{2A}R (*K_i* = 2.3 nM). Déplacement spécifique du [³H]-ZM 241385 lié au récepteur hA_{2A} exprimé dans les cellules HEK293. b) Pourcentage de déplacement du [³H]-ZM 241385 à 10 μM

Tableau 20 : Affinité des molécules XIIa-h et XIIa-c pour le hA_{2A}R

- **Modulation du phényle en position 4 (tableau 20)**
 - o Remplacement par différents groupements (XIIa-d)

Le remplacement du phényle par des groupements tels que l'aniline, l'aminométhylphényle, la phényléthylamine ou encore le phényléthyle conduit à une diminution importante de l'affinité. Cela prouve que la poche hydrophobe identifiée et délimitée par les acides aminés Leu249, ILE274, Ala277 et l'His278 est une poche de dimension relativement restreinte.

- o Substitution par 1 ou 2 méthyles en ortho (XIIId-f)

En comparant les molécules XIIId-f, une perte d'affinité est observée en ajoutant des méthyles en ortho du noyau phényle (XIIId > XIIIf > XIIIf). En effet, plus une contrainte est imposée au phényle par

l'ajout d'un ou deux méthyles en position ortho, plus celui-ci privilégiera une position orthogonale par rapport au noyau quinazoline. Cela laisse donc supposer que le phényle se place avec un angle compris entre 0 et 65° vis-à-vis du noyau quinazoline pour créer une bonne interaction avec le récepteur. L'encombrement stérique peut aussi être une hypothèse. Cependant par docking, il semblerait que le phényle substitué ait la place pour s'insérer dans la poche hydrophobe.

- **Modulation de l'amine primaire en position 2**

o *Remplacement par une méthylamine (XIIIa-c) (tableau 20)*

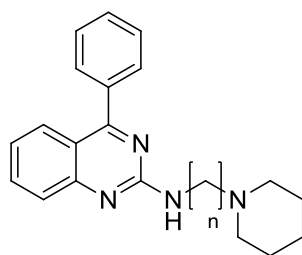
Le remplacement de l'amine par une méthylamine en position 2 entraîne une forte baisse d'affinité pour le récepteur puisqu'on passe d'une affinité de 7.4 nM (**XIIId**) à une affinité de 5.5 µM (**XIIIb**). Il est donc essentiel d'avoir une amine exocyclique dans cette position. De manière intéressante, la position du phényle en C-4 et du NH₂ en C-2 de la quinazoline apparaît comme essentielle puisqu'une perte d'affinité notable est observée pour l'isomère de position **XIIh** (*K_i* = 224 nM).

o *Alkylation par une chaîne aminoalkyle (XIVa-o)*

L'alkylation de l'amine exocyclique (**XIIId**) a ensuite été réalisée par des groupements alkyl-pipéridine de tailles variables. Le but étant d'essayer d'améliorer les propriétés pharmacocinétiques, notamment la solubilité *via* l'ajout d'une amine tertiaire, et potentiellement la sélectivité et/ou l'activité de cette petite molécule **XIIId**.

▪ *Variation de la longueur de la chaîne (XIVa-f) (tableau 21)*

En comparant les molécules **XIVa-f**, on peut voir qu'en augmentant la taille de l'espaceur de 2 à 5 méthylènes, un gain d'affinité est observé pour ne plus augmenter (*K_i* = 45-50 nM). L'interaction entre l'amine tertiaire et le Glu169 ne semble donc pas optimale en dessous de 5 carbones. Bien que les molécules **XIVe** (n = 6) et **XIVf** (n = 7) présentent une affinité similaire, le composé **XIVd** (n = 5) a été gardé pour réaliser les modulations des amines en bout de chaîne afin d'avoir des molécules solubles avec le plus faible poids moléculaire possible.



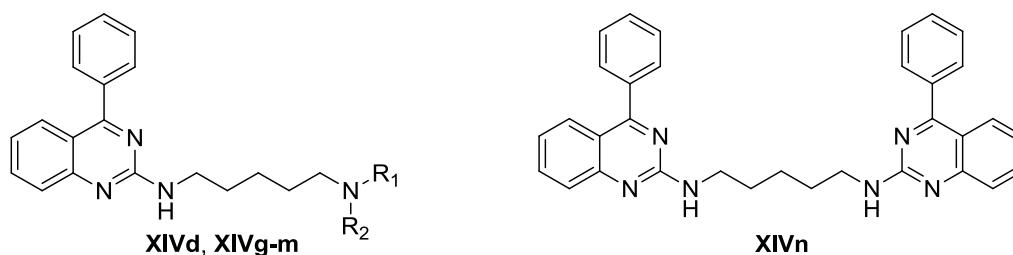
Cpd.	n	Ki (nM) ^a	Cpd.	n	Ki (nM) ^a
XIVa	2	1600 ± 220	XIVd	5	45 ± 15
XIVb	3	480 ± 132	XIVe	6	50 ± 13
XIVf	7	202 ± 83	XIVf	7	51 ± 22

^a ZM-241385 utilisé comme référence des antagonistes des A_{2A}R (K_i = 2.3 nM). Déplacement spécifique du [³H]-ZM-241385 lié au récepteur hA_{2A} exprimé dans les cellules HEK293.

Tableau 21 : Affinité des molécules XIVa-f pour le hA_{2A}R

▪ *Modulations des amines (XIVd et XIVg-n) (tableau 22)*

En comparant **XIVg-m** à **XIVd** (tableau 22), la pipéridine apparaît comme l'amine de choix avec la tétrahydroisoquinoléine (**XIVk**). Une légère perte d'affinité est observée pour la plupart des autres amines et s'avère plus accentuée dans le cas d'une amine primaire (**XIVm**, K_i = 304 nM) et d'une méthylpipérazine (**XIVh**, K_i = 365 nM). Le dimère **XIVn** présente quant à lui aucune affinité pour le récepteur (K_i > 10 μM).



Cpd.	NRR	hA_{2A} (Ki nM) ^a	Cpd.	NRR	hA_{2A} (Ki nM) ^a
XIVd		45 ± 15	XIVk		42 ± 28
XIVg		119 ± 51	XIVl		163 ± 134
XIVh		365 ± 25	XIVm	H ₂ N-	304 ± 53
XIVi		189 ± 103	XIVn		> 10 μM
XIVj		164 ± 26			

^a ZM-241385 utilisé comme référence des antagonistes des A_{2A}R (K_i = 2.3 nM). Déplacement spécifique du [³H]-ZM 241385 lié au récepteur hA_{2A} exprimé dans les cellules HEK293.

Tableau 22 : Affinité des molécules XIVd-n pour le hA_{2A}R

- Rigidification de la molécule XIVd (XIVo)

De manière intéressante, la rigidification de la chaîne pentane par un benzyle (XIVo) permet un gain d'affinité (K_i = 15 ± 8 nM) (figure 67). Cette stratégie permet généralement de limiter le nombre de conformères et par conséquent d'améliorer la sélectivité, de diminuer les effets secondaires et d'améliorer la biodisponibilité.¹⁹² De plus, cette rigidification permet un gain entropique pouvant augmenter l'activité de la molécule en comparaison avec une molécule flexible.

¹⁹² Patrick G.L., Oxford, 2017, 6, chap.13, pp. 247-249

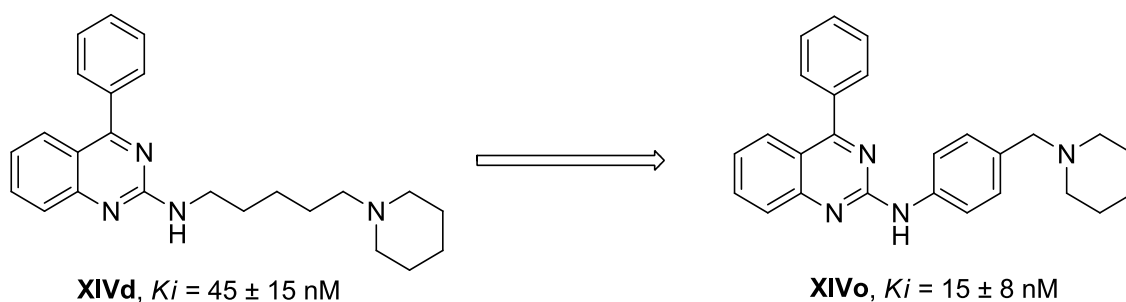


Figure 67 : Affinité des molécules XIVd et XIVo pour le $hA_{2A}R$

Pour résumer (figure 68), en partant de **XIa** issue d'un criblage virtuel ($K_i = 4 \mu\text{M}$), la première étape a été de substituer la fonction phénylacétylène, peu stable chimiquement, par un phényle. Un léger gain d'affinité est obtenu (**XIc**, $K_i = 2.3 \mu\text{M}$), ce qui nous a amené à travailler autour de cette molécule. L'introduction d'une amine primaire en position 2 de cette dernière permet d'améliorer fortement l'affinité (**XIId**, $K_i = 7.4$ nM). Le remplacement du phényle en position 4 de **XIId** par divers groupements entraîne quant à lui une perte d'affinité pour le $hA_{2A}R$. Les modulations ont de ce fait été réalisées sur l'amine en position 2 afin de moduler les caractéristiques pharmacocinétiques et potentiellement la sélectivité de ce chef de file par ajout d'une amine tertiaire. L'introduction de chaînes *N*-alkylpipéridines de longueur variable met en évidence qu'une chaîne à 5 méthylènes est optimale (**XIVd**, $K_i = 45$ nM). Ensuite, la substitution de la pipéridine par diverses amines sur **XIVd** montre que seule la tétrahydroisoquinoléine permet d'avoir une affinité similaire à la pipéridine. Enfin, la rigidification de la chaîne pentyle (**XIVo**) s'est aussi montrée très intéressante et ouvre des perspectives de modulations futures.

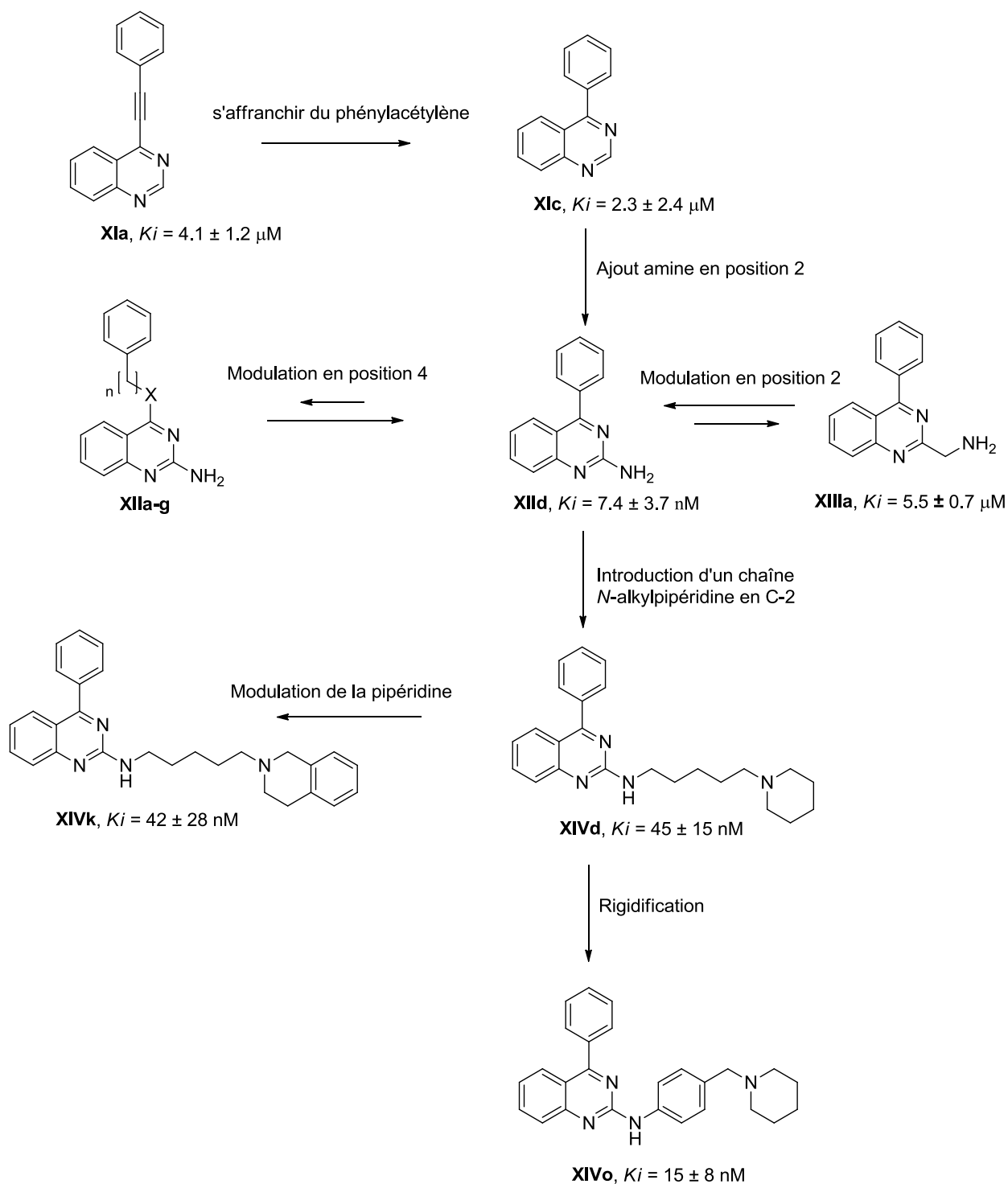
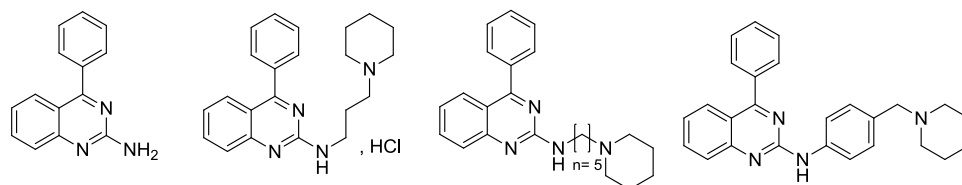


Figure 68 : Résumé des pharmacomodulations effectuées sur la famille des quinazolines

Étant donné les problèmes rencontrés quant à la reproductibilité du test au $\text{GTP}\gamma^{35}[\text{S}]$, l'activité de cette série quinazoline sera étudiée par le test de l'AMPC. Ces études sont en cours dans le laboratoire du Dr. Jacobson (NIH, NIDDK).

L'affinité sur le hA_1 r a aussi été évaluée (tableau 23). Une faible sélectivité ($S(A_1/A_{2A}) = 13$) est observée pour les molécules **XIVb** et **XIVd**. De manière surprenante, la molécule **XIVb** avec la chaîne di-aminopropane en position 2 n'est pas plus sélective que la petite molécule **XIVb** vis-à-vis du récepteur A_1 . Cela prouve que l'ajout d'une amine protonable en bout de chaîne ne permet pas d'être sélectif par rapport à ce récepteur comme on a pu le voir pour la série des benzoxazole. L'affinité de **XIVd** et **XIVo** vis-à-vis de ce récepteur est en cours afin de pouvoir vraiment conclure si l'ajout d'une chaîne en position 2 a une influence sur la sélectivité ou non.



Cpd.	XIId	XIVb	XIVd	XIVo
hA_{2A} (Ki nM) ^a	7.4 ± 3.7	480 ± 132	45 ± 15	15 ± 8 nM
hA_1 (Ki nM) ^b	90 ± 0.7	6200 ± 1300	n.d.	n.d.

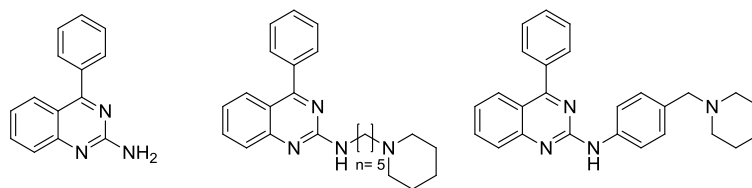
^a Déplacement spécifique du [³H]-ZM 241385 lié au récepteur hA_{2A} exprimé dans les cellules HEK293.

^b Déplacement spécifique du [³H]-DPCPX (1 nM) lié au récepteur hA_1 exprimé dans les cellules CHO. n.d. : Non déterminé

Tableau 23 : Affinité pour les récepteurs hA_1 et hA_{2A}

2- Évaluation des paramètres ADME

Des études préliminaires ADME ont été réalisées (tableau 24) sur trois molécules (**XIId**, **XIVd** et **XIVo**) par la CEREP. Celles-ci présentent une excellente solubilité de par le faible poids moléculaire de la molécule (**XIId**, MW = 221.10 g/mol) ou la présence d'une amine tertiaire (**XIVd** et **XIVo**). De plus, si **XIId** et **XIVd** se lient très peu aux protéines plasmatiques, **XIVo** présente un fort pourcentage de liaison (99.7%). Une bonne perméabilité intestinale est aussi observée pour **XIId** et **XIVd**, contrairement au composé **XIVo** de manière surprenante. Cependant, une très faible valeur de « recovery » rend ces résultats peu interprétables. Il est aussi intéressant de noter que l'alkylation de l'amine aromatique en position 2 permet d'augmenter la stabilité hépatique métabolique (**XIVd** et **XIVo** vs **XIId**). Enfin, une cytotoxicité modérée est observée pour ces molécules sur cellules neuronales SY5Y. Ces trois molécules présentant un profil ADME satisfaisant, la perméabilité de la BHE a ensuite été réalisée.



Composés		XIId	XIVd	XIVo
Solubilité (μM) ^a	Basic	184.2	162.5	149.5
	pH 7,4	181.6	184.4	15.6
	Acide	200	196.7	191.7
% de liaison aux protéines ^b		88	91	99.7
Perméabilité ^c Caco-2- pH 6.5-7.4 (10^{-6} cm/s)	A/B perméabilité	89.7 (76) ⁱ	19.5 (49) ⁱ	1.9 (12) ⁱ
	B/A perméabilité	42.8 (86) ⁱ	19.7 (59) ⁱ	1.5 (32) ⁱ
clogP ^d		3.01	5.02	6.23
Métabolisme <i>in vitro</i> ^e $t_{1/2}$ (min)		14	> 60	> 60
Cl _{int} ^f ($\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$)		500.5	< 115	< 115
Cytotoxicité IC ₅₀ (μM) ^g ou %I _{10μM} ^h		77	37	n.d.

^a Évalué après 24h d'agitation dans à pH acide, PBS (pH 7.4) et basique. ^b Compound testé à 10 μM . ^c Perméabilité = Compound testé à 10 μM à pH 6.5/7.4. ^d Calculé par Molinspiration. ^e Réalisé sur microsome de foie humain. ^f Cl_{int} = Composé testé à 0.1 μM . ^g Concentration du composé provoquant 50% de cellules SY5Y mortes après 24 h de traitement. ^h Pourcentage de cellules SY5Y mortes après 24 h de traitement à 10 μM . ⁱ valeur de "recovery" en %

Tableau 24 : Résultats préliminaires des tests ADME

Comme pour la famille des benzoxazoles (cf tableau 17, page 114), le passage de la BHE a été déterminé à trois concentrations (tableau 25). Contrairement à la famille précédente, aucune toxicité n'est observée pour les cellules endothéliales aux concentrations testées (Pe lucifer yellow $\leq 1 \times 10^{-3}$ cm/min). De plus, une vitesse de passage de l'endothélium cérébral élevée (Pe $> 2 \times 10^{-3}$ cm/min) avec une accumulation intracellulaire négligeable ($\leq 2\%$) est observée pour **XIId**. De même, la vitesse de passage de l'endothélium cérébral est élevée pour **XIVd** (Pe $> 2 \times 10^{-3}$ cm/min), mais certainement

sous-estimée puisque l'on observe une l'accumulation intracellulaire importante (46% pour la concentration 1 μM et 16% à 10 μM). Si ces deux molécules présentent donc une vitesse de passage de l'endothélium cérébrale importante, celle-ci reste cependant très inférieure à celle de la caféine ($Pe > 10 \times 10^{-3} \text{cm/min}$). Enfin, les résultats obtenus pour la molécule **XIVo** ne permettent pas malheureusement de conclure sur le passage de cette molécule. En effet, des faibles valeurs de « recovery » sont observées en plus d'une accumulation intracellulaire importante à 1 et 10 μM .

	C (μM)	Pe		Papp		Recovery %	Ac. Intracellul.		Toxicité Pe Lucifer Yellow		
		Moy.	s.d.	Moy.	s.d.		Moy.	s.d.	Moy.	s.d.	recovery
		10^{-3}cm/min		10^{-6}cm/sec			%		10^{-3}cm/min		
XIId	1	5.00	1.32	46.63	7.16	95	1	0	0.77	0.12	95
	10	3.41	1.34	36.76	9.18	98	0	0	0.80	0.05	99
	100	6.76	2.68	62.30	11.3	117	1	0	0.68	0.08	95
XIVd	1	2.57	0.65	20.81	1.86	46	46	3	1.03	0.10	95
	10	2.25	1.36	18.69	6.11	65	16	1	0.80	0.19	98
	100	3.79	2.61	21.73	9.17	97	6	1	1.35	0.56	95
XIVo	1	-4.2	1.88	n.d.	n.d.	23	69	1	0.47	0.05	86
	10	0.89	0.30	n.d.	n.d.	15	28	1	0.52	0.06	90
	100	0.95	0.18	n.d.	n.d.	23	4	0	0.70	0.24	95
Caféine	1	-68.1	19.38	n.d.	n.d.	128	4	0	0.49	0.06	97
	10	29.86	24.39	n.d.	n.d.	116	2	0	0.65	0.03	102
	100	14.89	4.76	n.d.	n.d.	108	1	0	0.66	0.08	95

n.d. : non déterminé

Tableau 25 : Résultats de passage de la BHE

Du fait d'une affinité importante combinée à des propriétés ADME très intéressantes et un passage de la BHE probable, ces 3 molécules feront l'objet d'études *in vivo* en août 2017 par le Dr. David Blum (UMR-S-1172).

L'évaluation de la motricité sur des souris sera ainsi évaluée dans un premier temps *via* deux tests différents. D'une part, l'augmentation de la locomotion spontanée, mesurable en open-field, sera testée. D'autre part, la capacité de nos molécules à reverser la catalepsie induite par l'halopéridol, un antagoniste des récepteurs dopaminergiques D_2 , sera observée.

**Chapitre 4 : Synthèse de
sondes fluorescentes comme
antagonistes des récepteurs
A_{2A}**

Au cours de ma troisième année de thèse, j'ai effectué un stage de 4 mois (Novembre-Mars) au sein du laboratoire du Dr. Jacobson au NIH/NIDDK à Bethesda aux États-Unis. Cette collaboration, lancée à mon initiative et appuyée par le Dr. David Blum, m'a donné une expérience des plus enrichissantes dans une équipe mondialement reconnue pour ses travaux sur les récepteurs purinergiques.

Durant ce stage, j'ai travaillé sur la synthèse de ligands et de sondes fluorescentes pour les récepteurs A_{2A} , A_3 , $P2Y_1$ et $P2Y_{14}$. Dans un souci d'homogénéité pour mon rapport de thèse, j'ai décidé de ne présenter que les travaux réalisés sur le récepteur A_{2A} .

I- Introduction

Si actuellement l'affinité ligand-récepteur se mesure principalement *via* l'utilisation de radioligand, il serait préférable de pouvoir utiliser d'autres méthodes moins dangereuses pour la santé. Ainsi l'utilisation de sondes fluorescentes a connu un intérêt certain ces dernières années. Des méthodes comme la fluorescence de polarisation (FP), la cytométrie de flux (FCM) ou encore le transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (FRET) sont maintenant bien maîtrisées et largement utilisées. De plus, une visualisation en temps réel du récepteur est possible. En effet, des changements dynamiques tels que l'internalisation, l'endocytose ou le recyclage du récepteur par action d'un agoniste, peuvent être observés. La colocalisation de deux récepteurs (par exemple A_{2A} et D_2) peut aussi être identifiée en utilisant la technique FRET. Dans ce sens, de nombreuses sondes fluorescentes agonistes et antagonistes des récepteurs à adénosine ont été synthétisées ces dernières années.^{193,194}

La plupart des antagonistes $A_{2A}R$ fluorescents utilisent le 5-amino-7-(3-(4-méthoxy)phénylpropyl)-2-(2-furyl)pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidine (SCH442416, figure 69) comme pharmacophore. En effet, le phénol permet d'apporter un lien éther pour greffer différents groupements fonctionnels fluorescents. Ces derniers se positionnent ainsi à l'extérieur du site de liaison orthostérique pour atteindre d'autres sites de liaison en haut de la poche.

Le MRS5346, avec le fluorophore AlexaFluor488, présente des propriétés intéressantes. En effet, il est utilisé en fluorescence par polarisation en raison de son temps de demi-vie suffisant de 4.1 ns.¹⁹⁵ Cependant, en plus d'une affinité moyenne ($K_i = 111$ nM), ce composé émet à une longueur d'onde se situant dans la couleur verte. Or, pour une application en microscopie par fluorescence, ce composé ne peut pas être utilisé à cause de l'autofluorescence des cellules dans le vert. Il est donc

¹⁹³ Ciruela F. et al., *Neuropharmacology*, **2015**, 98, 58-67

¹⁹⁴ Kumar E. et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2013**, 23, 26-36

¹⁹⁵ Kecskés M. et al., *Biochem. Pharmacol.*, **2010**, 80, 506-511

préférable d'utiliser un fluorophore émettant à une longueur d'onde plus grande, se situant dans le rouge. Par conséquent, il existe toujours un besoin à développer des antagonistes A_{2A} fluorescents. Afin d'améliorer l'affinité de ces sondes, nous avons tout d'abord augmenté la longueur de la chaîne diaminée de la molécule **93a**, déjà décrite.¹⁹³ Le but était de voir si nous pouvions améliorer l'affinité et/ou la sélectivité de ces molécules en créant de nouvelles liaisons hydrogène dans la partie extracellulaire. Puis, différents fluorophores ont été greffés sur les dérivés aminés les plus intéressants.

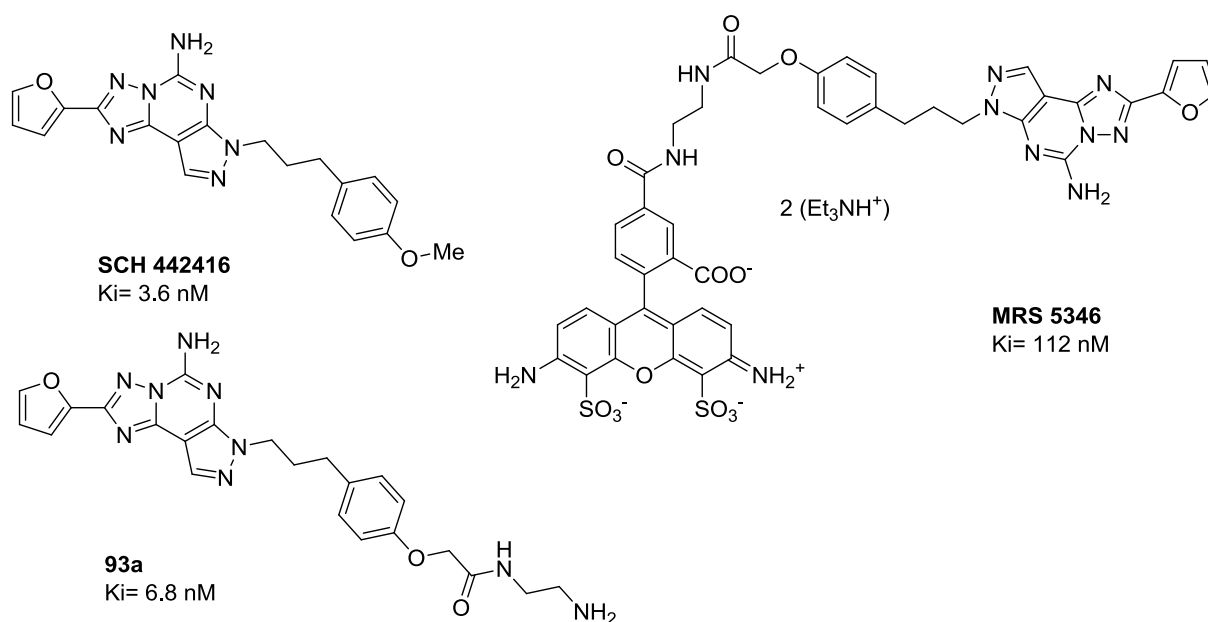
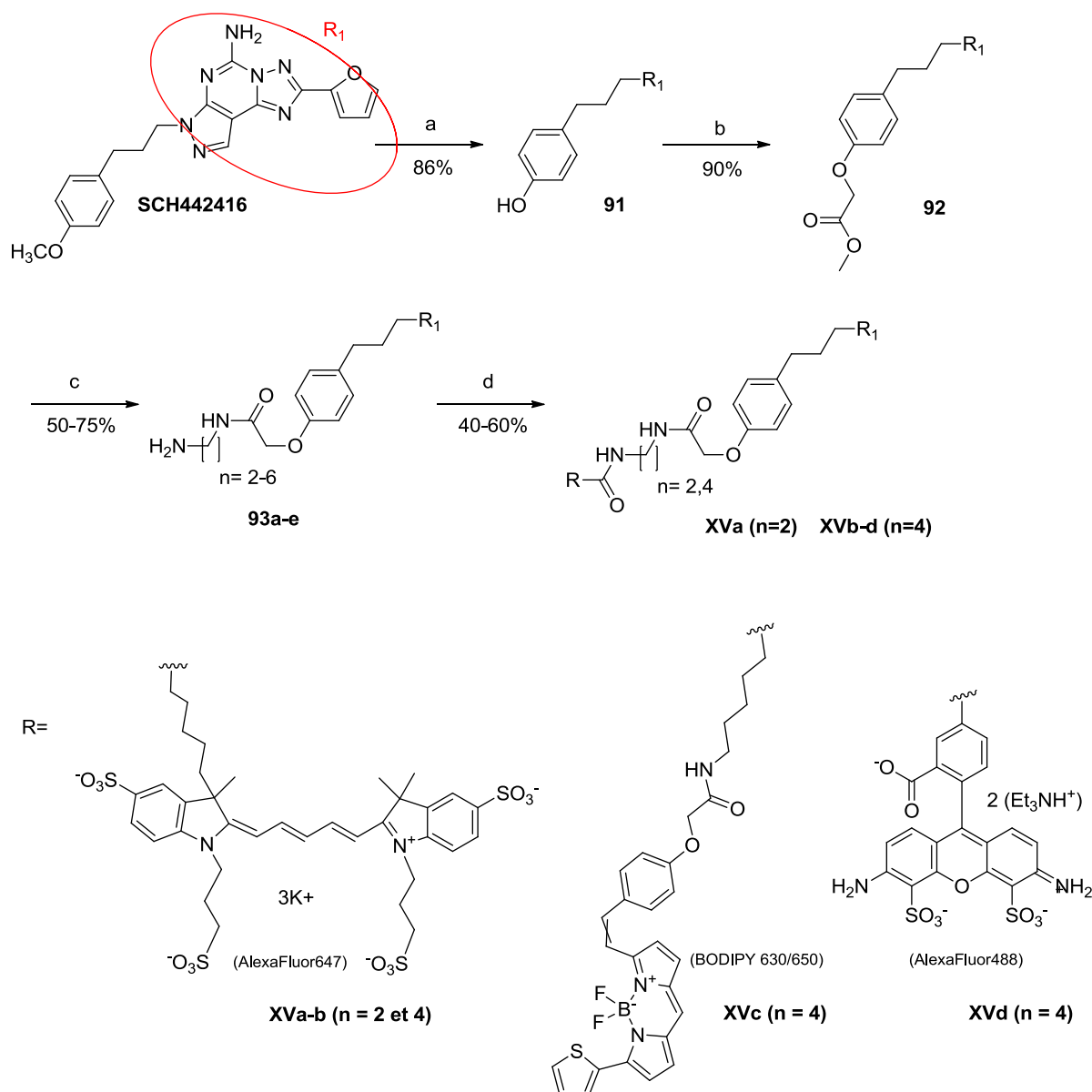


Figure 69 : Représentation du SCH-442416, 93a et du MRS 5346

II- Synthèse et résultats

La synthèse des sondes fluorescentes a été réalisée en 4 étapes à partir du SCH442416 disponible commercialement (schéma 45). Une première étape de déméthylation de ce dernier est effectuée par action de BBr₃ pour conduire au composé phénolique **91** avec un rendement de 86%. La *O*-alkylation par le bromoacétate de méthyle en présence de Cs₂CO₃ permet d'obtenir le composé **92** avec un rendement de 90%. Celui-ci est ensuite mis en réaction avec les différentes *N*-dialkylamines pour obtenir une série de dérivés aminés **93a-e**. Enfin, sur les amines les plus affines pour le récepteur (n= 2 et n= 4), le fluorophore présentant un groupement ester activé est ajouté par simple amidification en présence de Et₃N pour donner, après purification par HPLC semi-préparative, les sondes fluorescentes **XVa-d** avec de bons rendements (40-60%). Les fluorophores choisis sont l'AlexaFluor647, le BODIPY 630/650 et l'AlexaFluor488.



Réactifs et conditions : a) BBr_3 (5.0 éq.), CH_2Cl_2 , 25 °C ; b) 2-bromoacétate de méthyle (12.0 éq.), Cs_2CO_3 (5.0 éq.), MeOH, 40 °C ; c) dialkylamine/MeOH (9:1 v/v), 25 °C ; d) Fluorophore activé (0.8 éq.) (AlexaFluor 647 Ester succinimide pour **XVa-b**, BODIPY 630/650 Ester succinimide pour **XVc**, AlexaFluor 488 ester 2,3,5,6-tétrafluorophényle pour **XVd**), Et_3N (1.1 éq.), DMF, 25 °C

Schéma 45 : Synthèse des sondes fluorescentes (XVa-d)

L'affinité des amines **93a-e** a été évaluée afin de déterminer la longueur de chaîne optimale. Pour ce qui concerne l'affinité vis-à-vis de hA_{2A} , tous les composés présentent une affinité similaire comprise (tableau 26) entre 6 et 10 nM, sauf l'homologue à 6 carbones **93e** qui possède une affinité de 22 nM. Le choix de la chaîne a donc été déterminé en fonction de la sélectivité vis-à-vis des récepteurs A_1 et A_3 . Le composé **93c** présente la meilleure sélectivité ($S(A_1/A_{2A}) = 373$ et $S(A_3/A_{2A}) = 936$), avec **93a** déjà décrit.¹⁹⁴ Ce sont donc les longueurs de chaîne $n = 2$ et $n = 4$ qui ont été retenues pour greffer les groupements fluorescents.

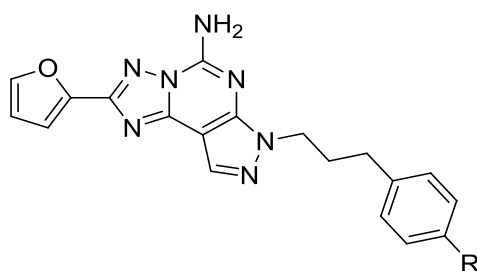
Parmi les dérivés fluorescents de **XVb-d**, les plus fortes affinités et sélectivités sont observées avec les dérivés BODIPY **XVc** et AlexaFluor488 **XVd**. De manière intéressante, le composé **XVd** (n = 4) présente une meilleure affinité que son homologue inférieur **MRS5346** (n = 2), contrairement aux ligands présentant le groupement AlexaFluor647 (**XVb** vs **XVa**).

Le caractère antagoniste du dérivé **XVc** a été confirmé par le test de l'AMPC.

- Remarque:

L'affinité sur les récepteurs à adénosine de souris a été réalisée et montre une différence par rapport au récepteur humain. En effet, si un gain d'affinité est observé pour **XVc** ($K_i (m) = 2.1$ nM vs $K_i (h) = 24.6$ nM), l'inverse est observé pour **XVd** ($K_i (m) = 585$ nM vs $K_i (h) = 30.3$ nM).

Enfin les composés **XVc** et **XVd** ont été testés comme marqueurs pour des analyses de cytométrie de flux sur des cellules HEK293 exprimant le $hA_{2A}R$. Le composé **XVd** s'avère être le plus intéressant de par son faible pourcentage de liaison non spécifique comparé à **XVc**. Une courbe de saturation est réalisée pour le composé **XVd** et donne un K_d de 45.4 nM. Un déplacement de cette sonde par 2 antagonistes de référence (le SCH442416 et le XAC) permet aussi de retrouver une valeur de K_i pour ces derniers (3.8 et 17.2 nM, respectivement), semblable à ce qui est décrit en utilisant des radioligands (4.1 nM et 18 nM respectivement). Cette sonde pourrait donc s'avérer très intéressante pour des études d'affinité et ainsi remplacer les méthodes utilisant des radioligands.



N°	Structure	K _i (nM) ou %inhib			
		A ₁ ^a	A _{2A} ^a	A ₃ ^a	
MRS5346^b	Dérivé Alexa488 sur 93a	(20±3%) ^c	111±16	(4±2%) ^c	
Dérivés aminés	93a^b	R = -OCH ₂ CONH(CH ₂) ₂ NH ₂	1270±140 ^c	6.8±1.1	3970±120
	93b	R = -OCH ₂ CONH(CH ₂) ₃ NH ₂	1300±350	9.3±6.9	2170±660
	93c	R = -OCH ₂ CONH(CH ₂) ₄ NH ₂	2390±100	6.4±1.6	5990±2900
	93d	R = -OCH ₂ CONH(CH ₂) ₅ NH ₂	1910±120	6.4±3.6	656±132
	93e	R = -OCH ₂ CONH(CH ₂) ₆ NH ₂	6500±2830	22.8±8.45	2070±850
Sondes fluorescentes	XVa	R = -OCH ₂ CONH(CH ₂) ₂ NH-Alexa647	(13±6%) ^c	332±165 458±24 (m)	(19%) ^c
	XVb	R = -OCH ₂ CONH(CH ₂) ₄ NH-Alexa647	(20±3%) ^c	295±176	(21±2%) ^c
	XVc	R = -OCH ₂ CONH(CH ₂) ₄ NH-BODIPY	(40±3%) ^c (0%) (m) ^c	24.6±17 2.09±0.16 (m) ^c	(33±5%) ^c
	XVd	R = -OCH ₂ CONH(CH ₂) ₄ NH-Alexa488	1680±470 (0%) (m) ^c	30.3±4.9 585±73 (m) ^c	(32±3%) (5±2%) (m) ^c
	XVe	R = -OCH ₂ -Ph- <i>p</i> -SO ₃ H	4990±750 (21±4%) (m) ^c	6.2±2.4 64.1±5.3 (m) ^c	2660± 1250 (4±1%) (m) ^c

^a Tests d'affinité par compétition du radioligand réalisés sur membranes préparées à partir de cellules mammifères exprimant les récepteurs A₁, A_{2A}, or A₃ humain, sauf si noté. Les radioligands utilisés sont : A₁R, [³H]8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine; A_{2A}R, [³H]2-[p-(2-carboxyéthyl)phényl-éthylamino]-5'-N-éthylcarboxamidoadénosine; A₃R, [¹²⁵I]N⁶-(4-amino-3-iodobenzyl)adénosine-5'-N-méthyl-uronamide. Les valeurs sont exprimées avec une moyenne ± SEM. ^b Valeurs à partir de Kumar *et al.* et Kecskés *et al.*^{194,195} ^c Pourcentage d'inhibition à 10 μM.

Tableau 26 : Résultats d'affinité des dérivés diaminés (93a-e) et des sondes (XVa-e)

Le mode de liaison de cette molécule **XVc** a été étudié par modélisation moléculaire en utilisant la structure cristallographique du ZM-241385 (PDB ID: 4EIY). La sonde conserve les mêmes interactions que le SCH-442416 dans le site de liaison orthostérique (figure 70-A), en interagissant principalement avec la Phe168, l'Asn253 et le Glu169 comme décrit pour le ZM241385 lors du chapitre 2 (cf pages 53). De plus, on peut voir que la partie fluorescente est orientée dans le domaine extracellulaire et se replie dans le domaine transmembranaire à travers une liaison hydrogène avec la Thr68. Cette interaction oriente donc la position de la partie fluorescente de la molécule. Cependant, en considérant que le logiciel de docking cherche à maximiser les interactions ligands/protéines, il est difficile de savoir comment cette molécule se localise exactement. Afin de nous aider à prédire le mode de liaison de **XVc**, des études de docking sur le précurseur aminé **94c** sont réalisées. Cela aboutit à deux modes de liaisons (figure 70-B), ensuite ensuite confirmés par dynamique moléculaire. Pour ces deux poses les plus favorables énergétiquement, une recherche de régions riches en résidus aromatiques à proximité de l'amine terminale (6, 12 et 17 Å) est réalisée. De manière surprenante, ces deux orientations sont compatibles avec le placement de groupements aromatiques, dans notre cas le fluorophore. Cela confirme donc la difficulté à prévoir le mode de liaison dans ces parties extracellulaires. Dans ce sens, une co-cristallisation de cette molécule avec le récepteur est actuellement en cours d'étude par le laboratoire du Dr. R. Stevens (SCRIPPS Institute). Cela permettrait de mieux comprendre les interactions dans le domaine extracellulaire et ainsi d'ouvrir la voie à la conception de nouveaux ligands pour ce récepteur.

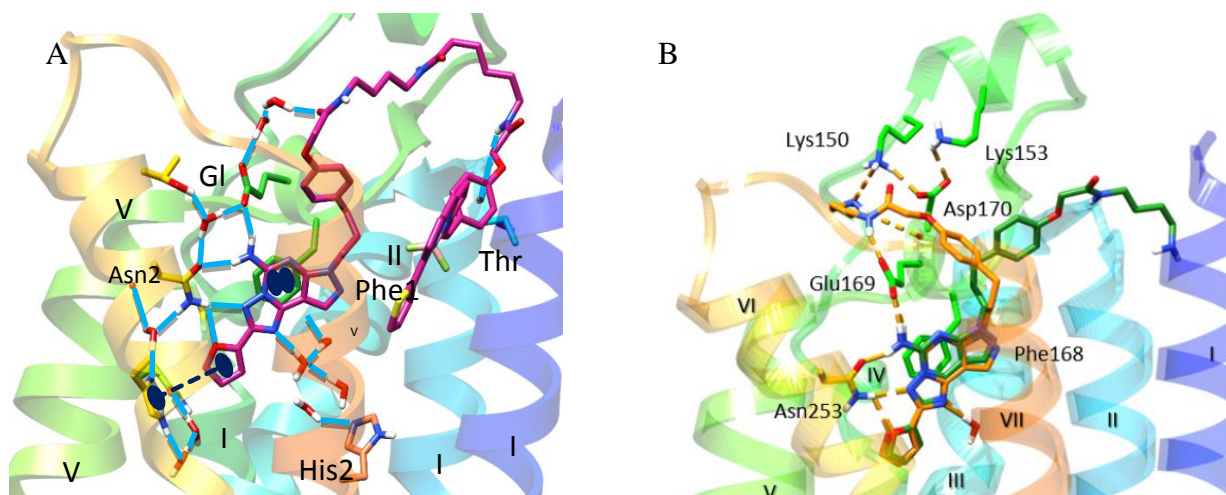


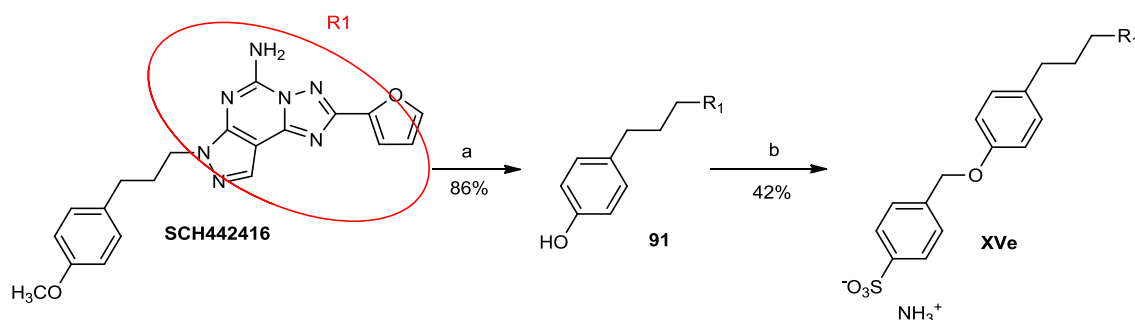
Figure 70: Représentation des molécules XVc (A) et 93d (B) après docking dans le site de liaison (PDB ID: 4EIY)

Un autre type de sonde a été synthétisé durant mon stage, à savoir une molécule arylsulfonate, dérivée du SCH-442416. Ce groupement terminal sulfonate présente l'avantage d'être en

permanence chargé à pH physiologique, ce qui empêche un passage de la BHE.¹⁹⁶ Cette sonde pourrait donc être très utile pour des études *in vivo* nécessitant cette caractéristique, par exemple pour l'étude de A_{2A} au niveau périphérique. Ce travail fait partie d'une collaboration avec le Dr. Reitman du NIDDK pour étudier l'impact d'un antagoniste A_{2A}R ne passant pas la BHE sur l'hypothermie des souris.

Afin de réaliser la synthèse du composé **XVe**, une première étape de déméthylation du SCH442416 est réalisée comme décrit précédemment (schéma 46). Puis une alkylation de **91** par action du 4-(bromométhyl)benzènesulfonate de sodium en présence d'hydrure de sodium permet d'obtenir le dérivé sulfonate **XVe** avec un rendement de 42%.

Ces conditions avaient été utilisées pour la synthèse du composé **92** mais conduisait à un mélange du composé mono, di et tri-alkylé, même en présence d'un équivalent de bromoacétate de méthyle. A l'inverse, pour la synthèse du composé sulfonate **XVe**, l'utilisation du 4-(bromométhyl)benzènesulfonate de sodium en présence de Cs₂CO₃ ne permet pas l'obtention de la molécule souhaitée.



Réactifs et conditions : a) BBr₃ (5 équ.), CH₂Cl₂, 25 °C ; b) 4-(bromométhyl)benzènesulfonate de sodium (1.1 équ.), NaH (1 équ.), DMF, 25 °C

Schéma 46 : Synthèse de la molécule XVe

La molécule **XVe** montre une affinité très intéressante pour le hA_{2A}R avec un *K_i* de 6.24 nM, sélectif vis-à-vis de hA₁R (4990 nM) et hA₃R (2660 nM) (tableau 26). Il est à noter que pour les récepteurs murins, une baisse d'affinité est observée avec un *K_i*(m) de 64.1 nM pour le A_{2A}R et une perte totale d'affinité pour A₁R et A₃R. Cette molécule est actuellement en cours d'étude sur des modèles *in vivo*.

¹⁹⁶ Paoletta S. et al., *J. Med. Chem.*, 2013, 56, 5949–5963.

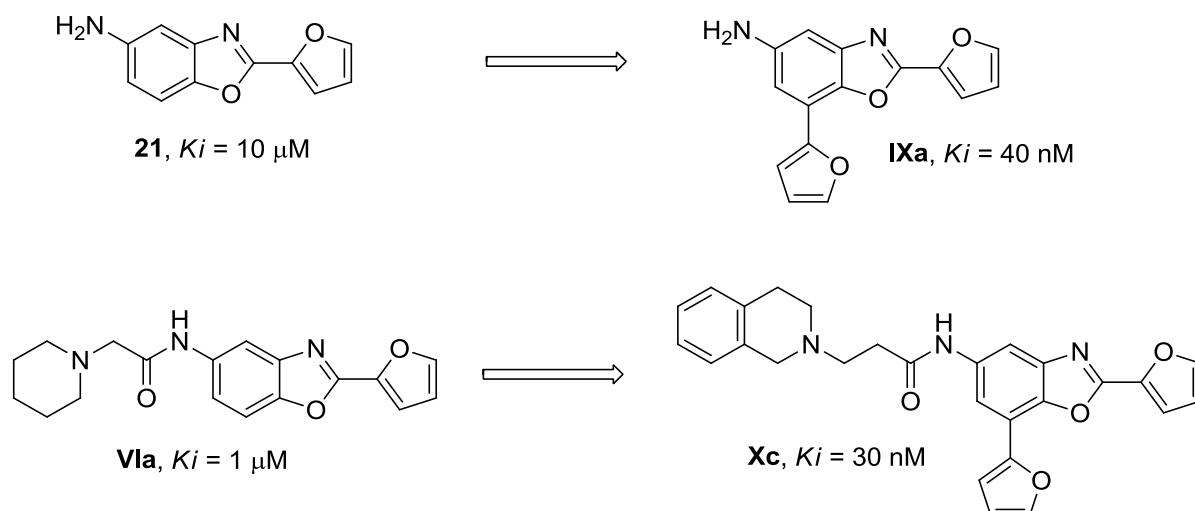
Conclusion et perspectives

En conclusion, les travaux réalisés portent sur la conception, la synthèse et l'évaluation pharmacologique d'antagonistes du récepteur A_{2A} . L'objectif était d'obtenir des molécules originales avec une affinité et activité nanomolaires pour A_{2A} mais surtout des molécules qui possèdent de bonnes caractéristiques pharmacocinétiques, plus particulièrement une bonne solubilité.

Deux familles chimiques ont été ainsi développées à savoir la famille des benzoxazoles et la famille des quinazolines.

- Famille des benzoxazoles

Pour cette série de molécules, un premier travail de synthèse a permis de synthétiser environ 25 molécules présentant des modulations en position 2 et 5 ou 6 du scaffold benzoxazole à partir d'études de modélisation moléculaire. Cela a permis de mettre en évidence 2 molécules « hit » potentiellement intéressantes (**21** et **Vla**) avec une affinité micromolaire. Diverses modulations en position 7 de ces molécules destinées à explorer une poche du site d'interaction non étudiée dans un premier temps, ont permis d'améliorer fortement l'affinité pour le $hA_{2A}R$. L'ajout d'un furane s'est ainsi révélé particulièrement important dans notre série. En plus de cet ajout en position 7, une homologation du « linker » de **Vla** a permis de renforcer l'interaction pour le récepteur. Des composés avec une affinité nanomolaire ont donc été obtenus. De plus, ces molécules présentent aussi une affinité très importante sur le récepteur A_1 , ce qui en fait des ligands mixtes A_1/A_{2A} particulièrement étudié ces derniers temps pour la maladie de Parkinson. Le caractère antagoniste a aussi été déterminé par le test du $GTP\gamma^{35}S$ et confirmé par le test de l'AMPC. La molécule **IXa** présente même une IC_{50} du même ordre de grandeur que le ZM-241385 de référence.



Des études préliminaires ADME ont été réalisées sur une série de molécules. Si la molécule **IXa** présente une bonne perméabilité intestinale (modèle sur cellules caco-2) ou encore une bonne stabilité métabolique, sa faible solubilité est un frein pour des études *in vivo*. Les molécules

présentant une amine protonable améliorent fortement cette composante mais souffrent d'un fort pourcentage de liaison aux protéines et d'une faible perméabilité intestinale et de la BHE. De ce fait, aucune étude sur modèle animal n'a été réalisée.

Ce travail a tout de même permis de développer une nouvelle série d'antagonistes présentant un « scaffold » benzoxazole avec une bonne affinité pour les récepteurs A_{2A}. De plus, la voie de synthèse élaborée permet de synthétiser plusieurs grammes de produit final sans avoir recours à une purification sur colonne.

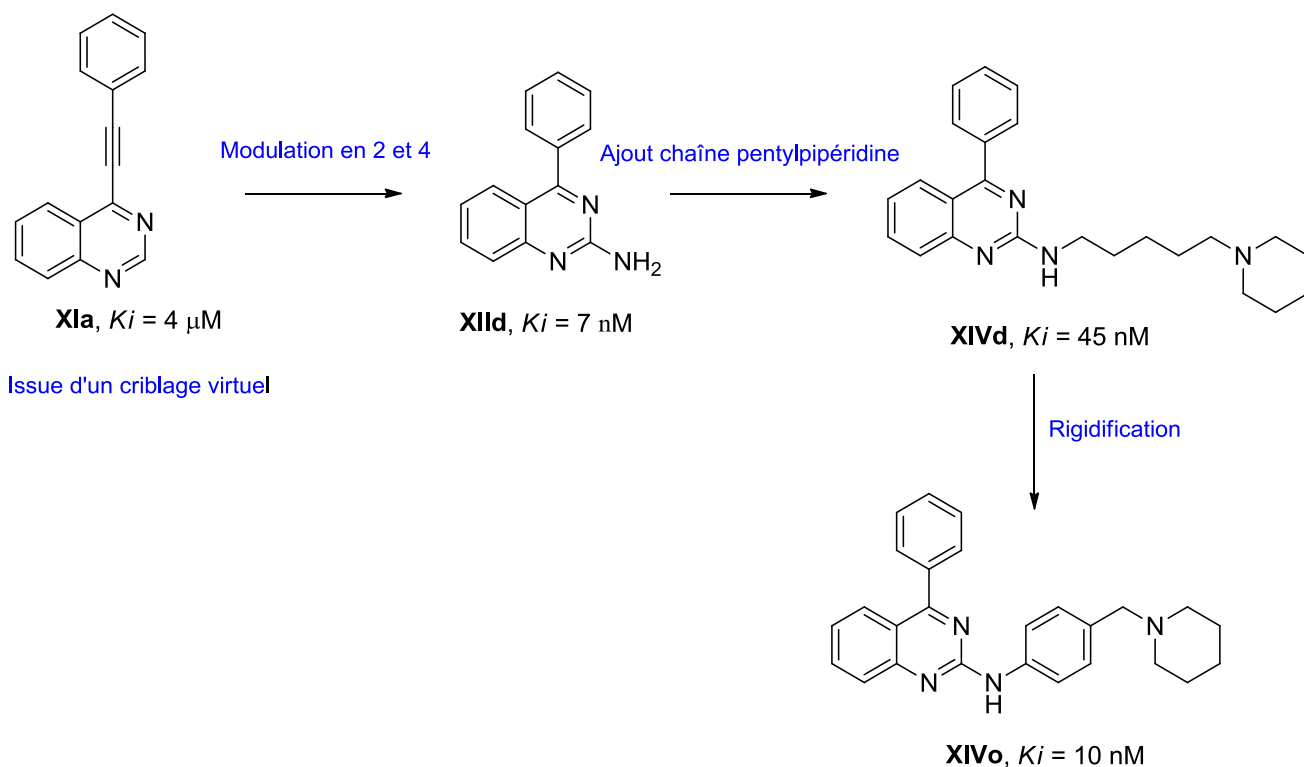
Enfin, cette série a fait l'objet de deux articles (1 accepté¹⁹⁷ et 1 soumis¹⁹⁸) dont j'ai entièrement réalisé la rédaction.

- *Famille des quinazolines*

Concernant la série des quinazolines, à partir d'une molécule issue d'un criblage virtuel (**XIa**, $K_i = 4 \mu\text{M}$), des modulations en positions 2 et 4 ont permis de mettre en évidence l'importance d'un NH₂ exocyclique en C2 et d'un phényle en C4. Une molécule de forte affinité (**XIId**, $K_i = 7 \text{ nM}$), avec un très faible poids moléculaire (MW = 221.26 g/mol) et des propriétés ADME très intéressantes a ainsi été obtenue. Des alkylations de l'amine de ce nouveau chef de file *via* l'introduction d'une chaîne *N*-pentylpipéridine permet de conserver une bonne affinité (**XIVd**, $K_i = 45 \text{ nM}$) tout en améliorant la solubilité et la stabilité métabolique. Des études de fonctionnalité et de sélectivité sont actuellement en cours pour ces deux molécules ainsi que sur l'analogue rigidifié de **XIVd** (**XIVo**, $K_i = 15 \text{ nM}$).

¹⁹⁷ Duroux R. et al., *J. Enz. Inhib. Med. Chem.*, **2017**, 32, 850-864

¹⁹⁸ Duroux R. et al., *Eur. J. Med. Chem.*, soumis

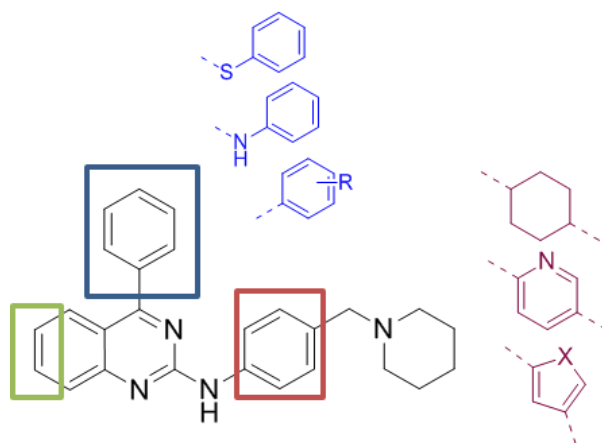


Ces 3 molécules (**XIId**, **XIVd**, **XIVo**) présentant un passage de la BHE très important sur modèle *in vitro* ainsi que de bonnes propriétés ADME, celles-ci feront l'objet d'études *in vivo* par le Dr. David Blum (UMR-S-1172). Comme précisé précédemment (cf page 141), l'impact de nos molécules sur l'activité motrice des souris sera évalué par deux tests différents. Ces molécules pourront aussi faire l'objet d'évaluation sur modèle souris surexprimant le récepteur A_{2A} pour des tests de mémoire spatiale grâce à notre collaboration avec le Dr. Luisa Lopes (IMM Lisbonne).

De plus, le chef de file **XIId** est actuellement en cours de co-cristallisation avec le récepteur A_{2A} grâce à une nouvelle collaboration avec le Dr R. Stevens du SCRIPPS Institute. Des résultats préliminaires très prometteurs montrent que cette petite molécule stabiliserait le récepteur aussi bien que le ZM-241385 de référence. Les résultats sont attendus courant septembre.

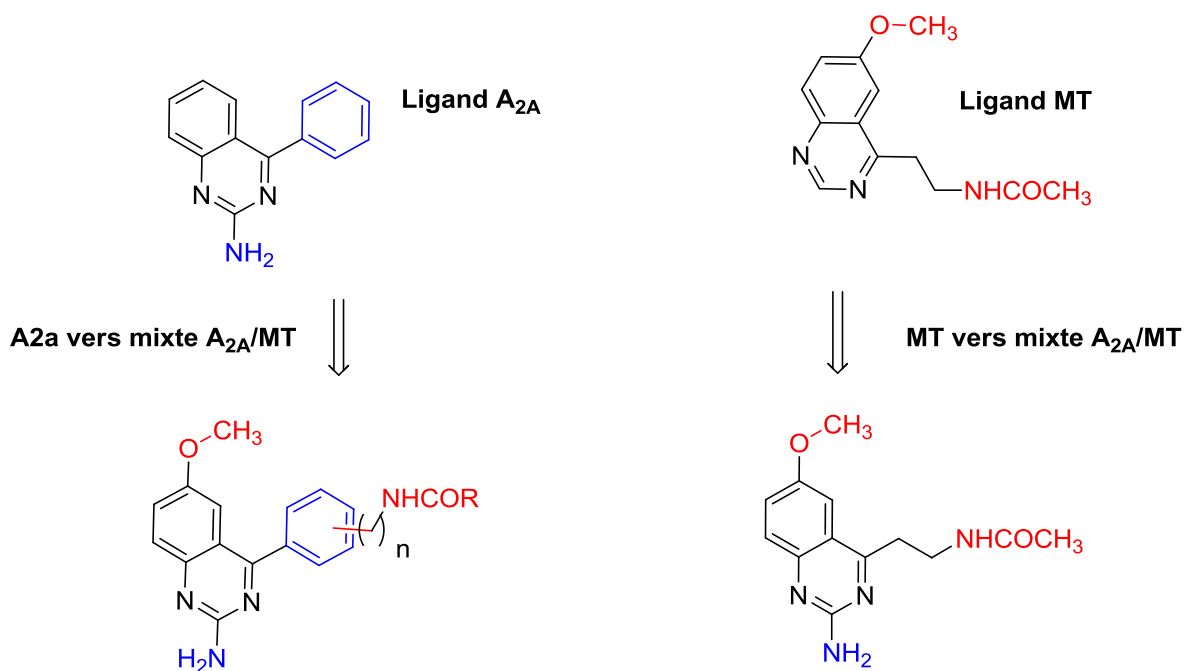
Cette série de molécules ouvre des perspectives très intéressantes pour des travaux futurs.

Tout d'abord, plusieurs modulations peuvent être envisagées autour de la molécule **XIVo** que ce soit en position 4 ou 6/7 par exemple. Un remplacement du benzyle par d'autres cycles pourrait aussi se révéler très intéressant.

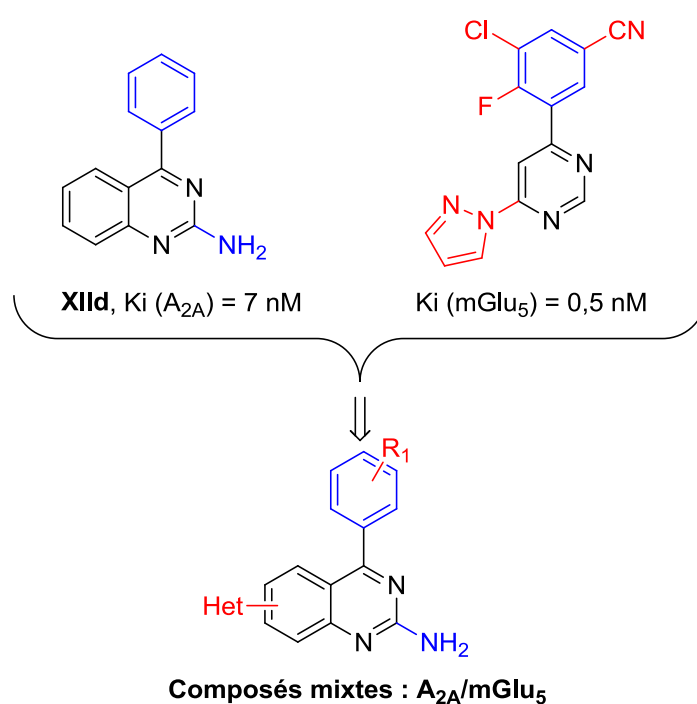


Le fait que **XIId** soit une molécule de faible poids moléculaire, facilement modulable, avec une très forte affinité pour $A_{2A}R$ la rend très intéressante pour des études de mixité avec d'autres récepteurs. Par exemple une mixité avec les récepteurs mélatoninergiques (MT), très étudiés au sein de notre laboratoire, pourrait être envisagée. Les maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson,...) sont en général accompagnées de troubles du rythme de veille/sommeil ainsi que d'autres rythmes circadiens tels que la température corporelle. Sachant que la composante agoniste mélatoninergique devrait permettre une restauration et/ou une consolidation de ces rythmes, la synthèse de ligands mixtes pourrait être intéressante.

L'analogue quinazolinique strict de la mélatonine a été synthétisé au laboratoire (travail non publié) et montre une affinité de l'ordre de 10^{-8} M pour les récepteurs MT_1 et MT_2 . Ce dernier présente une analogie structurale avec le composé de **XIId**. Ceci nous a amené à proposer les structures mixtes (A_{2A}/MT) rapportées sur la figure suivante.



Une autre mixité avec le récepteur métabotrope au glutamate mGlu₅ (mGluR₅) est aussi envisageable. En effet, l'hétérodimérisation du A_{2A}R avec mGluR₅ est très bien décrite et il semblerait que ces deux récepteurs agissent de façon synergique. En effet, mGluR₅ semble également jouer un rôle important dans les conditions pathologiques, notamment associées à la MA.^{199,200} Le blocage de l'activité du mGluR₅ réduit ainsi la neurotoxicité et la synaptotoxicité du peptide amyloïde *in vitro* mais également *in vivo* et les troubles mnésiques associés. Le blocage de mGluR₅ et d'A_{2A} pourrait donc apporter une plus-value au développement de composés ciblant les MND. A la vue de la structure des antagonistes mGlu₅,²⁰¹ la synthèse de ligands mixtes apparaît comme intéressante de par leurs similitudes structurales avec **XIId**. Cela constitue donc une perspective intéressante pour de futurs projets.



Durant mes trois ans de thèse, en plus d'avoir été formé en modélisation moléculaire, j'ai eu l'occasion d'effectuer 2 mois au sein de l'IMM de Lisbonne pour me former aux tests de binding. J'ai aussi eu l'occasion de réaliser un stage de 4 mois au sein du NIH/NIDDK à Bethesda. Au cours de mon séjour aux Etats-Unis, j'ai pu me familiariser avec un autre type de chimie en synthétisant des sondes fluorescentes. Ces dernières ont donné des résultats très intéressants pour de futures études du récepteur A_{2A} (microscopie par fluorescence, détermination de l'affinité par cytométrie de flux, ...). Ce travail a ainsi abouti à la publication d'un article accepté.²⁰²

¹⁹⁹ Kuszczuk M. et al., *Neurochem. Int.*, **2009**, 55, 174-180

²⁰⁰ Zhang D. et al., *Neuropharmacology*, **2017**, 121, 231-246

²⁰¹ Christopher J.A. et al., *J. Med. Chem.*, **2015**, 58, 6653-6664

²⁰² Duroux R. et al., *Med. Chem. Commun.*, **2017**, X, XX-XX

Partie expérimentale

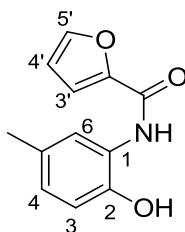
I- Chemistry

Material and instrumentation

All reagents and solvents were purchased and used without further purification. Reactions were monitored by TLC performed on MachereyNagel Alugram[®] Sil 60/UV254 sheets (thickness 0.2 mm). Some purification of products was carried out by column chromatography using MachereyNagel silica gel (230-400 mesh). Melting points were determined on a BÜCHI B-540 apparatus and are uncorrected. NMR spectra were recorded on a Bruker Avance 300 spectrometer operating at 300 MHz (¹H) or 75 MHz (¹³C). Chemical shifts are in parts per million (ppm) and were referenced to the residual proton peaks in deuterated solvents. Mass spectra were recorded with an LCMS (Waters Alliance Micromass ZQ 2000). LCMS analysis was performed using a Waters XBridge C18 column (5 µm particle size column, dimensions 50 mm x 4.6 mm). A gradient starting from 98% H₂O/formate buffer 5 mM (pH 3.8) and reaching 100% CH₃CN/ formate buffer 5 mM (pH 3.8) within 4 min at a flow rate of 2 mL/min was used followed by a return to the starting conditions within 1 min. The purity of final compounds was verified by two types of high pressure liquid chromatography (HPLC) columns: C18 Interchrom UPTISPHERE and C4 Interchrom UPTISPHERE. Analytical HPLC was performed on a Shimadzu LC-2010AHT system equipped with a UV detector set at 254 nm and 215 nm. Compounds were dissolved in 50 mL acetonitrile and 950 mL buffer B, and injected into the system. The following eluent systems were used: buffer A (H₂O/TFA, 100:0.1) and buffer B (CH₃CN/H₂O/TFA, 80:20:0.1). HPLC retention times (HPLC t_R) were obtained at a flow rate of 0.2 mL/min for 35 min using the following conditions: a gradient run from 100% of buffer A over 1 min, then to 100% of buffer B over the next 30 min.

1- Synthesis of benzoxazoles (Chap.2, 1st part)

N-(2-Hydroxy-5-methylphenyl)furan-2-carboxamide (1)



Procedure:

To a solution of furoic acid (1 eq., 2 g, 17.8 mmol) in 100 mL of DCM at 0 °C was added thionyl chloride (4 eq., 5.2 mL, 71.4 mmol) and 5 drops of DMF. This solution was stirred for 3h at reflux, cooled to room temperature and concentrated *in vacuo*. The residue was diluted in 45 mL of EtOAc and added dropwise to a solution of 4-methyl 2-aminophenol (0.9 eq., 1.98 g, 16.1 mmol) with Et₃N (2 eq., 4.9 mL, 35.7 mmol) in 35 mL of EtOAc at 0 °C. The reaction mixture was stirred at room temperature for a night, hydrolyzed with water and extracted twice with EtOAc. An acid-base work-up with saturated NaHCO₃ solution and 1 M HCl solution was performed and the organic layer was concentrated *in vacuo*. The solid was then suspended in a mixture of EtOH/H₂O and NaOH was added (4 eq., 2.86 g, 71.38 mmol). The reaction mixture was stirred at reflux for 4h, cooled to room temperature, acidified slowly with 6 M HCl solution up to acidic pH. Resulting solid was filtered, washed with water and recrystallized from acetonitrile to afford compound **1** (3.1 g, 80%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, J Hz): 9.76 (br s, 1H, OH), 9.09 (br s, 1H, NH), 7.92 (m, 1H, H_{5'}), 7.72 (m, 1H, H₆), 7.28 (dd, 1H, *J* = 2.2 Hz and *J* = 8.4 Hz, H₄), 6.79 (m, 2H, H₃ and H_{3'}), 6.70 (dd, 1H, *J* = 1.7 Hz and *J* = 3.5 Hz, H_{4'}), 2.21 (s, 3H, CH₃).

IR (ν, cm⁻¹): 3380 (NH), 2750-3100 (OH), 1640 (C=O).

LC-MS (ESI) *m/z* found: 218 [M+H]⁺.

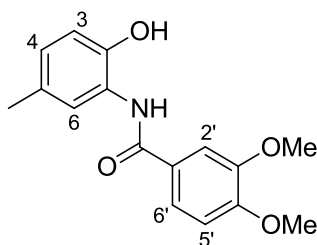
Molecular formula: C₁₂H₁₁NO₃

Molecular weight: 217.22 g/mol

Melting point: 186 °C

Aspect: Brown solid

N-(2-Hydroxy-5-methylphenyl)-3,4-dimethoxybenzamide (2)



Procedure:

Same procedure as described for compound **1** was used starting from 3,4-dimethoxybenzoic acid (1 eq., 5 g, 27.45 mmol) with Et₃N (2 eq., 7.6 mL, 54.9 mmol) and 4-methyl-2-aminophenol (0.9 eq., 3 g, 24.7 mmol) to afford compound **2** (5.4 g, 82%) after recrystallization from acetonitrile.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 9.47 (br s, 1H, OH), 9.41 (br s, 1H, NH), 7.61 (dd, 1H, J = 2.0 Hz and J = 8.4 Hz, H₄), 7.55 (d, 1H, J = 2.0 Hz, H₆), 7.42 (m, 1H, H₂'), 7.07 (d, 1H, J = 8.4 Hz, H₃'), 6.83 (dd, 1H, J = 1.7 Hz and J = 8.3 Hz, H₆'), 6.79 (d, 1H, J = 8.3 Hz, H₅'), 3.84 (s, 3H, OMe), 3.82 (s, 3H, OMe), 2.22 (s, 3H, CH₃).

IR (u, cm⁻¹): 3368 (NH), 3182-2854 (OH), 1653 (C=O).

LC-MS (ESI) m/z found: 288 [M+H]⁺.

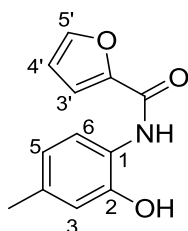
Molecular formula: C₁₆H₁₇NO₄

Molecular weight: 287.12 g/mol

Melting point: 164 °C

Aspect: white solid

***N*-(2-Hydroxy-4-methylphenyl)furan-2-carboxamide (3)**



Procedure:

Same procedure as described for compound **1** was used starting from furoic acid (1 eq., 6 g, 53.53 mmol) with Et₃N (3 eq., 22.3 mL, 160 mmol) and 5-methyl 2-aminophenol (1 eq., 6.6 g, 53.53 mmol) to afford compound **3** (6.97 g, 72%) after recrystallization from acetonitrile.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8.85 (br s, 1H, OH), 8.34 (br s, 1H, NH), 7.5 (m, 1H, H₅'), 7.28 (m, 1H, H₃'), 7.10 (d, 1H, J = 8.1 Hz, H₆'), 6.87 (m, 1H, H₃'), 6.72 (m, 1H, H₅'), 6.58 (dd, 1H, J = 1.7 Hz and J = 3.5 Hz, H₄'), 2.30 (s, 3H, CH₃).

IR (u, cm⁻¹): 3388 (NH), 3182-2854 (OH), 1649 (C=O).

LC-MS (ESI) m/z found: 218 [M+H]⁺.

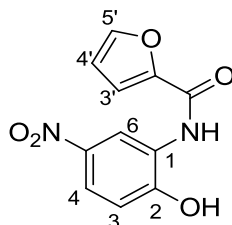
Molecular formula: C₁₂H₁₁NO₃

Molecular weight: 217.22 g/mol

Melting point: 170 °C

Aspect: brown solid

***N*-(2-Hydroxy-5-nitrophenyl) furane-2-carboxamide (4)**



Procedure:

Same procedure as described for compound **1** was used starting from furoic acid (1 eq., 3 g, 26.8 mmol) with Et₃N (3 eq., 11.2 mL, 80.3 mmol) and 4-nitro-2-aminophenol (1 eq., 4.13 g, 26.8 mmol) to afford compound **4** (4.9 g, 84%) after recrystallization from methanol.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 9.77 (br s, 1H, OH), 9.13 (br s, 1H, NH), 8.79 (d, 1H, *J* = 1.9 Hz, H₆), 8.25 (dd, 1H, *J* = 1.9 Hz and *J* = 8.6 Hz, H₄), 8.07 (m, 1H, H₅), 7.81 (d, 1H, *J* = 3.5 Hz, H₃), 7.32 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz, H₃), 6.78 (dd, 1H, *J* = 1.7 Hz and *J* = 3.5 Hz, H₄).

IR (u, cm⁻¹): 3376 (NH), 3000-2500 (OH), 1640 (C=O).

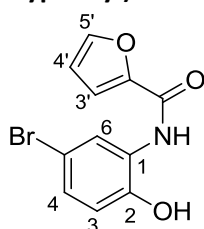
Molecular formula: C₁₁H₈N₂O₅

Molecular weight: 248.19 g/mol

Melting point: 165 °C

Aspect: Yellow solid

***N*-(5-Bromo-2-hydroxyphenyl) furane-2-carboxamide (5)**



Procedure:

Same procedure as described for compound **1** was used starting from furoic acid (1 eq., 1.12 g, 10.02 mmol) with Et₃N (3 eq., 4.2 mL, 30 mmol) and 4-bromo 2-aminophenol (1 eq., 2.25 g, 10.02 mmol) to afford compound **5** (1.67 g, 60%) after recrystallization from acetonitrile.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 10.52 (br s, 1H, OH), 9.11 (br s, 1H, NH), 8.11 (d, 1H, H₆, *J* = 2.5 Hz), 7.94 (m, 1H, H₅), 7.32 (m, 1H, H₃), 7.14 (dd, 1H, H₄, *J* = 2.5 Hz and *J* = 8.6 Hz), 6.89 (d, 1H, H₄, *J* = 8.6 Hz), 6.63 (1H, dd, H₄, *J* = 1.7 Hz and *J* = 3.5 Hz).

IR (u, cm⁻¹): 3380 (NH), 3000-2500 (OH), 1640 (C=O).

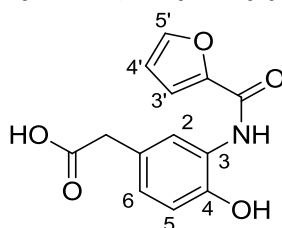
Molecular formula: C₁₁H₈Br NO₃

Molecular weight: 282.09 g/mol

Melting point: 250 °C

Aspect: Beige solid

2-[3-(Furan-2-carboxylamino)-4-hydroxy-phenyl]acetic acid (6)



Procedure:

Same procedure as described for compound **1** was used starting from furoic acid (1 eq., 1.38 g, 12.35 mmol) with Et₃N (3 eq., 5.1 mL, 36.9 mmol) and 2-(3-amino-4-hydroxyphenyl)acetic acid (1 eq., 2.06 g, 12.35 mmol) to afford compound **6** (1.1 g, 34%) after recrystallization from methanol.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, J Hz): 10.20 (br s, 1H, CO₂H), 9.98 (s, 1H, OH), 9.13 (br s, 1H, NH), 7.94 (dd, 1H, *J* = 0.8 and 1.8 Hz, H₃), 7.81 (d, 1H, *J* = 1.6 Hz, H₂), 7.29 (dd, 1H, *J* = 0.7 and 3.5 Hz, H₅), 6.89 (dd, 1H, *J* = 1.6 and 8.2 Hz, H₆), 6.84 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz, H₅), 6.71 (dd, 1H, *J* = 1.7 Hz and *J* = 3.5 Hz, H₄), 3.45 (s, 2H, CH₂).

IR (ν , cm^{-1}): 3388 (NH), 3182-2854 (OH), 1649 (C=O), 1692 (C=O).

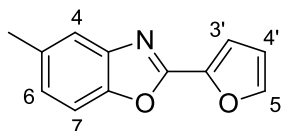
Molecular formula: $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{NO}_5$

Molecular weight: 261.23 g/mol

Melting point: 234 °C

Aspect: White solid

2-(Furan-2-yl)-5-methyl-1,3-benzoxazole (8)



Procedure:

A suspension of **1** (1 eq., 480 mg, 2.21 mmol) with PTSA (2.5 eq., 952 mg, 5.53 mmol) was refluxed in toluene (11 mL) equipped with a Dean-Stark apparatus until complete dissolution overnight. The solution was then cooled to room temperature, hydrolyzed with water and basified with 6 M NaOH solution up to basic pH (10-12) and the mixture was extracted. Organic layer was dried over K_2CO_3 and concentrated *in vacuo*. Solid was crystallized from petroleum ether to afford compound **8** (361 mg, 82%).

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , δ ppm, J Hz): 7.67 (m, 1H, $\text{H}_{5'}$), 7.54 (m, 1H, $\text{H}_{3'}$), 7.44 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz, H_7), 7.25 (m, 1H, H_4), 7.17 (m, 1H, H_6), 6.70 (dd, 1H, $J = 1.7$ Hz and $J = 3.5$ Hz, $\text{H}_{4'}$), 2.49 (s, 3H, CH_3).

LC-MS (ESI) m/z found: 200 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

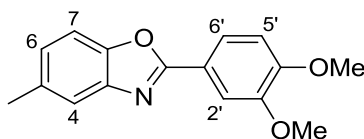
Molecular formula: $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{NO}_2$

Molecular weight: 199.21 g/mol

Melting point: 64 °C

Aspect: beige solid

2-(3,4-Dimethoxyphenyl)-5-methyl-1,3-benzoxazole (9)



Procedure:

Same procedure as described for compound **8** was used starting from amide **2** (1 eq., 4.38 g, 15.24 mmol) with PTSA (2.5 eq, 6.56 g, 38.1 mmol). Final solid was suspended in diethyl ether and filtered to afford compound **9** (3.3 g, 80%).

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , δ ppm, J Hz): 7.83 (dd, 1H, $J = 1.9$ Hz and $J = 8.4$ Hz, $\text{H}_{6'}$), 7.75 (d, 1H, $J = 1.9$ Hz, $\text{H}_{2'}$), 7.53 (m, 1H, H_6), 7.43 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, $\text{H}_{5'}$), 7.13 (m, 1H, H_4), 6.98 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, H_7), 4.02 (s, 3H, OMe), 3.97 (s, 3H, OMe), 2.48 (s, 3H, CH_3).

LC-MS (ESI) m/z found: 270 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

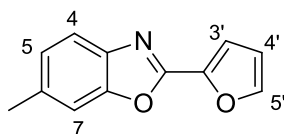
Molecular formula: $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{NO}_3$

Molecular weight: 269.30 g/mol

Melting point: 136 °C

Aspect: Beige solid

2-(Furan-2-yl)-6-methyl-1,3-benzoxazole (10)



Procedure:

Same procedure as described for compound **8** was used starting from amide **3** (1 eq., 3.5 g, 16.11 mmol) with PTSA (2.5 eq, 6.93 g, 40.2 mmol). Final solid was suspended solid with diethyl ether and filtered to afford compound **10** (2.18 g, 68%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8.04 (m, 1H, H_{5'}), 7.61 (d, 1H, J = 8.1 Hz, H₄), 7.40 (d, 1H, J = 3.5 Hz, H_{3'}), 7.38 (m, 1H, H₇), 7.27-7.18 (m, 1H, H₅), 6.79 (dd, 1H, J = 1.7 Hz and J = 3.5 Hz, H_{4'}), 2.44 (s, 3H, CH₃).

LC-MS (ESI) m/z found: 200 [M+H]⁺.

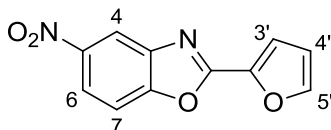
Molecular formula: C₁₂H₉NO₂

Molecular weight: 199.21 g/mol

Melting point: 54 °C

Aspect: Beige solid

2-(Furane-2-yl)-5-nitro-1,3-benzoxazole (11)



Procedure:

Same procedure as described for compound **8** was used starting from amide **4** (1 eq., 3.5 g, 14.1 mmol) with PTSA (2.5 eq, 6.07 g, 35.3 mmol). Final solid was suspended with diethyl ether and filtered to afford compound **11** (2.7 g, 82%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8.62 (d, 1H, H₄, J = 2.1 Hz), 8.34 (dd, 1H, H₆, J = 2.1 Hz and J = 8.4 Hz), 7.75 (d, 1H, H₇, J = 8.4 Hz), 7.68 (m, 1H, H_{5'}), 7.39 (d, 1H, H_{3'}, J = 3.5 Hz), 6.68 (dd, 1H, H_{4'}, J = 1.7 Hz and J = 3.5 Hz).

LC-MS (ESI) m/z found: 231 [M+H]⁺.

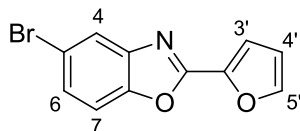
Molecular formula: C₁₁H₆N₂O₄

Molecular weight: 230.18 g/mol

Melting point: 182 °C

Aspect: Orange-brown solid

5-Bromo-2-(furan-2-yl)-1,3-benzoxazole (12)



Procedure:

Same procedure as described for compound **8** was used starting from amide **5** (1 eq., 1.62 g, 5.74 mmol) with PTSA (2.5 eq, 2.47 g, 14.4 mmol). Final solid was suspended with diethyl ether and filtered to afford compound **12** (1 g, 66%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 7.87 (m, 1H, H_{5'}), 7.68 (m, 1H, H_{3'}), 7.47 (1H, d, H₄, J = 2.5 Hz), 7.43 (dd, 1H, H₆, J = 2.4 Hz and J = 8.6 Hz), 7.29 (d, 1H, H₇, J = 8.6 Hz), 6.63 (1H, dd, H_{4'}, J = 1.7 Hz and J = 3.5 Hz).

IR (ν, cm⁻¹): 750 (C-Br).

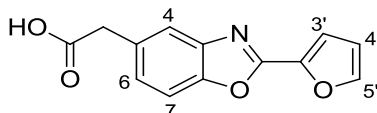
Molecular formula: C₁₁H₆Br NO₂

Molecular weight: 264.07 g/mol

Melting point: 235 °C

Aspect: Brown solid

2-[2-(Furan-2-yl)-1,3-benzoxazol-5-yl] acetic acid (13)



Procedure:

1st method:

Same procedure as described for compound **8** was used starting from amide **6** (1.6 g, 6.13 mmol) with PTSA (2.5 eq, 2.64 g, 15.3 mmol). Final solid was suspended with diethyl ether and filtered to afford compound **13** (488 mg, 25%).

Second method:

A solution of **15** (1 eq., 1.1 g, 4.91 mmol) in AcOH (5.5 mL), H₂SO₄ (5.5 mL) and H₂O (5.5 mL) was refluxed for 24h. After cooling to room temperature, cold water was added and the solution was extracted with EtOAc. The organic layer was extracted twice with saturated NaHCO₃ solution, and then aqueous layer was acidified with 1 M HCl solution and extracted twice with EtOAc. Combined organic layer were dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. Solid was suspended in diethyl ether and filtered to afford compound **13** (702 mg, 60%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 12.38 (br s, 1H, OH), 8.07 (m, 1H, H_{5'}), 7.68 (d, 1H, J = 8.4 Hz, H₇), 7.66 (m, 1H, H₇ and H_{3'}), 7.45 (m, 1H, H₄), 7.32 (dd, 1H, J = 1.8 Hz and J = 8.4 Hz, H₆), 6.80 (dd, 1H, J = 1.7 Hz and J = 3.5 Hz, H_{4'}), 3.72 (s, 2H, CH₂).

IR (ν, cm⁻¹): 1710 (C=O).

LC-MS (ESI) m/z found: 244 [M+H]⁺.

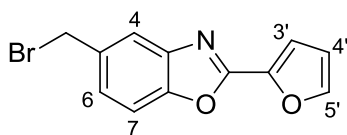
Molecular formula: C₁₃H₉NO₄

Molecular weight: 243.21 g/mol

Melting point: 203 °C

Aspect: White solid

5-(Bromomethyl)-2-(furan-2-yl)-1,3-benzoxazole (14)



Procedure:

To a solution of **8** (1 eq., 4 g, 20.1 mmol) in CCl_4 (150 mL) was added NBS (1.2 eq., 4.29 g, 24.1 mmol) and benzoyl peroxide (7%, 0.34 g, 1.41 mmol) and the reaction mixture was refluxed under a halogen lamp (150 W). After 3h30 stirring, the mixture was cooled to room temperature and the succinimide was filtered off. Then the reaction mixture was concentrated *in vacuo*, and the solid was suspended in diethyl ether and filtered to afford **14** (3.9 g, 70%).

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , δ ppm, J Hz): 7.77 (m, 1H, $\text{H}_{5'}$), 7.67 (m, 1H, $\text{H}_{3'}$), 7.54 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, H_7), 7.42 (dd, 1H, $J = 1.8$ Hz and $J = 8.4$ Hz, H_6), 7.30 (m, 1H, H_4), 6.64 (dd, 1H, $J = 1.7$ Hz and $J = 3.5$ Hz, $\text{H}_{4'}$), 4.64 (s, 2H, CH_2).

LC-MS (ESI) m/z found: 278, 280 $[\text{M}+\text{H}]^+$

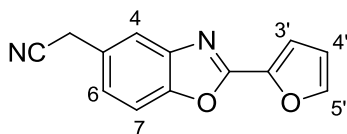
Molecular formula: $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{BrNO}_2$

Molecular weight: 278.1 g/mol

Melting point: 130 °C

Aspect: Red solid

2-[2-(Furan-2-yl)-1,3-benzoxazol-5-yl]acetonitrile (15)



Procedure:

To a solution of **14** (1 eq., 1.23 g, 3.53 mmol) in a mixture of EtOH (56 mL) and H_2O (15 mL) were added tetrabutylammonium bromide (0.1 eq., 0.114 g, 0.35 mmol) and KCN (5 eq., 1.15 g, 17.7 mmol). After one night stirring at reflux, the reaction mixture was cooled to room temperature and concentrated *in vacuo*. Solid was suspended in water and extracted three times with EtOAc. Combined organic layer were dried over MgSO_4 and concentrated *in vacuo* to afford **15** (582 mg, 56%) after recrystallization from MeOH.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , δ ppm, J Hz): 7.71-7.70 (m, 2H, $\text{H}_{5'}$ and $\text{H}_{3'}$), 7.58 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz, H_7), 7.36-7.31 (m, 2H, H_4 and H_6), 6.64 (dd, 1H, $J = 1.7$ Hz and $J = 3.5$ Hz, $\text{H}_{4'}$), 3.90 (s, 2H, CH_2).

IR (ν , cm^{-1}): 2240 (CN).

LC-MS (ESI) m/z found: 225 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

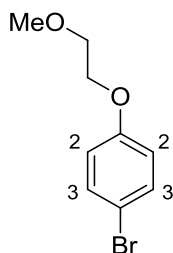
Molecular formula: $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2$

Molecular weight: 224.21 g/mol

Melting point: 140 °C

Aspect: Pale yellow solid

1-(2-Methoxyethoxy)-4-bromobenzene (16)



Procedure:

K_2CO_3 (3 eq., 6.78 g, 49.1 mmol) was suspended in DMF (41 mL) and then 4-bromophenol (1 eq., 2.83 g, 16.4 mmol) and 1-bromo-2-methoxyethane (1.1 eq., 2.5 g, 18 mmol) were added. The suspension was stirred overnight at 60 °C, cooled to room temperature, hydrolyzed with water and extracted three times with EtOAc. Combined organic layers were washed with brine, dried over $MgSO_4$ and concentrated *in vacuo*. Oil was purified by flash chromatography (Petroleum Ether:EtOAc = 9:1) to afford compound **16** (3.23 g, 88%).

1H NMR ($CDCl_3$, δ ppm, J Hz): 7.10 (m, 2H, H_3), 6.66 (m, 2H, H_2), 4.16 (t, 2H, $J = 4.6$ Hz, OCH_2), 3.63 (t, 2H, $J = 4.6$ Hz, CH_2OMe), 3.21 (s, 3H, OCH_3).

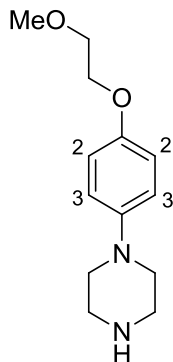
Molecular formula: $C_9H_{11}BrO_2$

Molecular weight: 231.09 g/mol

Melting point: /

Aspect: Yellow oil

1-[4-(2-Methoxyethoxy)phenyl]piperazine (17)



Procedure:

1st method:

A mixture of **16** (1 eq., 3.2 g, 13.8 mmol), piperazine (6 eq., 7.16 g, 83.1 mmol), sodium *tert*-butoxide (1.4 eq., 1.86 g, 19.4 mmol), BINAP (3%, 0.259 g, 0.415 mmol) and $Pd_2(dba)_3$ (1%, 0.127 g, 0.138 mmol) in dry toluene (166 mL) was refluxed under N_2 atmosphere overnight. The mixture was filtrated on a pad of celite and washed with toluene. The filtrate was washed with brine, dried over $MgSO_4$ and evaporated *in vacuo*. The product was purified by flash chromatography (DCM:MeOH sat $NH_3 = 90/10/0.1$) to afford compound **17** (320 mg, 10%).

2nd method:

A mixture of **19** (1 eq., 1.96 g, 7.04 mmol) in a 3 N HCl aqueous solution (25.1 eq., 59 mL, 176 mmol) was heated at 80 °C for 1h. After cooling, 6M NaOH solution was added up to basic pH (pH= 9-11) and the mixture was extracted three times with EtOAc. After washing with brine, organic layer was

dried over MgSO_4 and concentrated *in vacuo*. Solid was suspended in diethyl ether and filtered to afford **17** (1.29 g, 80%).

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , δ ppm, J Hz): 6.89 (m, 4H, H_2 and H_3), 4.08 (t, 2H, $J = 4.6$ Hz, OCH_2), 3.73 (t, 2H, $J = 4.6$ Hz, CH_2OMe), 3.44 (s, 3H, OCH_3), 3.03 (s, 8H, $\text{H}_{\text{piperazine}}$), 1.90 (br s, 1H, NH).

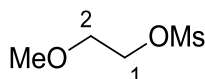
Molecular formula: $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2$

Molecular weight: 236.31 g/mol

Melting point: 83 °C

Aspect: White solid

2-Methoxyethyl methanesulfonate (**18**)



Procedure:

To a solution of 2-methoxyethanol (1 eq., 2 g, 26.28 mmol) in DCM (150 mL) with Et_3N (1.1 eq, 4 mL, 26.28 mmol) was added dropwise mesyl chloride (1.1 eq., 2.24 mL, 28.91 mmol) at 0 °C. After one night stirring at room temperature, reaction mixture was hydrolyzed with water and organic layer was extracted, dried over MgSO_4 and concentrated *in vacuo* to afford **18** (6.7 g, 80%).

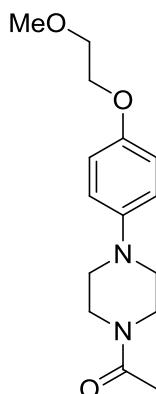
$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , δ ppm, J Hz): 4.27 (t, 2H, $J = 6.8$ Hz, H_1), 3.57 (t, 2H, $J = 6.8$ Hz, H_2), 3.30 (s, 3H, Me), 2.97 (s, 3H, OMe).

Molecular formula: $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_4\text{S}$

Molecular weight: 154.18 g/mol

Aspect: Yellow oil

1-{4-[4-(2-Methoxyethoxy)phenyl]piperazin-1-yl}ethan-1-one (**19**)



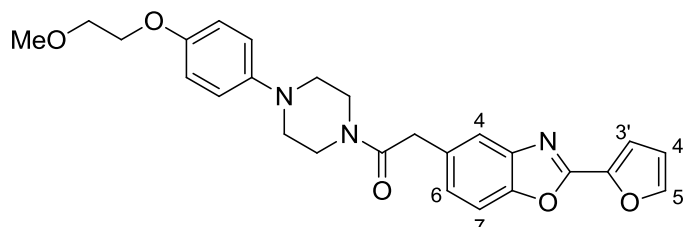
Procedure:

To a solution of 4-(1-acetylpiperazin-4-yl)phenol (1 eq., 3.03 g, 13.7 mmol) in DMF (20 mL) was added NaH (2 eq., 0.659 g, 27.5 mmol) and mixture was stirred for 30 min at 25 °C before adding **18** (1.1 eq., 2.33 g, 15.1 mmol). After one night stirring at 70 °C, reaction mixture was hydrolyzed with water and basified with 6M NaOH solution up to basic pH (11-13) and extracted three times with EtOAc. Combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO_4 and concentrated *in vacuo*. Crude was suspended in diethyl ether to afford **19** (3.13 g, 49%).

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , δ ppm, J Hz): 6.88 (m, 4H, H_{phenyl}), 4.07 (m, 2H, OCH_2), 3.74 (m, 4H, $\text{H}_{\text{piperazine}}$), 3.60 (m, 2H, CH_2OMe), 3.44 (s, 3H, OMe), 3.04 (m, 4H, $\text{H}_{\text{piperazine}}$), 2.13 (s, 3H, CH_3).

Molecular formula: C₁₅H₂₂N₂O₃
Molecular weight: 278.35 g/mol
Melting point: 102 °C
Aspect: Pink solid

**2-[2-(Furan-2-yl)-1,3-benzoxazol-5-yl]-1-[4-[4-(2-methoxyethoxy)phenyl]piperazin-1-yl]ethan-1-one
(20)**



Procedure:

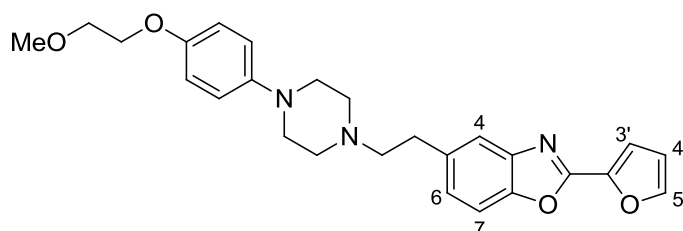
A solution of **13** in toluene (14 mL) with SOCl₂ (3 eq., 0.5 mL, 7.09 mmol) was refluxed during 1 h and then concentrated *in vacuo*. Oil was diluted in EtOAc (30 mL) and added dropwise to a solution of Et₃N (2 eq., 0.66 mL, 4.73 mmol) and **17** (1 eq., 558 mg, 2.36 mmol) in EtOAc (50 mL), while being stirred and cooled in an ice bath. After one night stirring at room temperature, the mixture was hydrolyzed with water and extracted twice with EtOAc. Combined organic layer were washed with saturated NaHCO₃ solution, dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. The solid was suspended in diethyl ether and filtered to afford compound **20** (800 mg, 73%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, J Hz): 7.67 (m, 1H, H_{5'}), 7.62 (m, 1H, H_{3'}), 7.51 (d, 1H, J = 8.4 Hz, H₇), 7.29 (m, 2H, H₆ and H₄), 6.84 (m, 4H, H_{phenyl} and H_{phenyl}), 6.63 (dd, 1H, J = 1.7 Hz and J = 3.5 Hz, H_{4'}), 4.05 (t, 2H, J = 4.6 Hz, CH₂O), 3.89 (s, 2H, CH₂), 3.81 (t, 2H, J = 4.7 Hz, H_{piperazine}), 3.71 (t, 2H, J = 4.6 Hz, CH₂O), 3.63 (t, 2H, J = 4.7 Hz, H_{piperazine}), 3.43 (s, 3H, OCH₃), 3.02 (t, 2H, J = 4.7 Hz, H_{piperazine}), 2.88 (t, 2H, J = 4.7 Hz, H_{piperazine}).

IR (ν, cm⁻¹): 1630 (C=O).

Molecular formula: C₂₆H₂₇N₃O₅
Molecular weight: 461.51 g/mol
Melting point: 114 °C
Aspect: Beige solid

2-(Furan-2-yl)-5-(2-{4-[4-(2-methoxyethoxy)phenyl]piperazin-1-yl}ethyl)-1,3-benzoxazole (1a)



Procedure:

To a solution of amide **20** (1 eq, 350 mg, 0.76 mmol) in THF (9 mL) was added LAH (3 eq, 86 mg, 2.27 mmol). After 1h stirring at room temperature, water (0.08 mL), 1 N NaOH solution (0.08 mL) and water (0.24 mL) were added to get a white solid which is filtered off and washed with EtOAc. Filtrate was washed water and acidified with HCl 6N solution up to acid pH (1-4) and extracted with EtOAc. Aqueous layer was basified with 6 N NaOH solution up to basic pH and extracted three times with

EtOAc. Combined organic layers were dried over MgSO_4 , concentrated *in vacuo* and the solid was recrystallized from acetonitrile to afford compound **1a** (248 mg, 73%).

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , δ ppm, J Hz): 7.67 (m, 1H, $\text{H}_{5'}$), 7.62 (m, 1H, $\text{H}_{3'}$), 7.48 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz, H_7), 7.27 (m, 2H, H_6 and H_4), 6.90 (m, 4H, H_{phenyl} and H_{phenyl}), 6.63 (dd, 1H, $J = 1.7$ Hz and $J = 3.5$ Hz, $\text{H}_{4'}$), 4.09 (t, 2H, OCH_2 , $J = 4.6$ Hz), 3.73 (t, 2H, $J = 4.6$ Hz, MeOCH_2), 3.45 (s, 3H, OMe), 3.15 (m, 4H, $\text{H}_{\text{piperazine}}$), 2.98 (m, 2H, CH_2CH_2), 2.73 (m, 6H, $\text{H}_{\text{piperazine}}$ and CH_2CH_2).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , δ ppm): 155.5 (C), 152.9 (C), 148.8 (C), 145.9 (C), 145.7 (CH), 142.7 (C), 141.9 (C), 137.3 (C), 126.1 (CH), 119.9 (CH), 118.1 (2 CH), 115.4 (2 CH), 114.1 (CH), 112.3 (CH), 110.2 (CH), 71.2 (CH_2), 67.7 (CH_2), 60.8 (CH_2), 59.2 (CH_2), 53.4 (2 CH_2), 50.6 (2 CH_2), 33.7 (CH_3).

LC-MS (ESI) m/z found: 448 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

HPLC: C_4 column: $t_R = 15.2$ min, purity 99%.

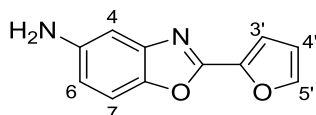
Molecular formula: $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_4$

Molecular weight: 447.53 g/mol

Melting point: >300 °C

Aspect: Beige solid

2-(Furan-2-yl)-1,3-benzoxazol-5-amine (**21**)



Procedure:

To a solution of **11** (1 eq., 3.07 g, 13.3 mmol) in MeOH (140 mL) was added Pd/C (300 mg) and hydrazine monohydrate (1.2 eq., 0.78 mL, 16 mmol). After 3h stirring at 50 °C, the solution was cooled to room temperature, the Pd/C was filtered off and the filtrate was concentrated *in vacuo*. The mixture was suspended in EtOAc and washed with water, brine, dried over MgSO_4 and concentrated *in vacuo*. Solid was recrystallized from hexane to afford compound **21** (2.25 g, 89%).

$^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$, δ ppm, J Hz): 8.01 (m, 1H, $\text{H}_{5'}$), 7.4 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz, H_7), 7.34 (d, 1H, $J = 3.5$ Hz, $\text{H}_{3'}$), 6.84 (d, 1H, $J = 2.1$ Hz, H_4), 6.77 (dd, 1H, $J = 1.7$ Hz and $J = 3.5$ Hz, $\text{H}_{4'}$), 6.66 (dd, 1H, $J = 2.1$ Hz and $J = 8.7$ Hz, H_6), 5.16 (br s, 2H, NH_2).

$^{13}\text{C NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$, δ ppm): 154.9 (C), 147.3 (C), 147.0 (CH), 142.6 (C), 142.5 (C), 142.4 (C), 114.4 (CH), 113.6 (CH), 113.1 (CH), 110.9 (CH), 103.0 (CH).

LC-MS (ESI) m/z found: 201 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

HPLC: C_4 column: $t_R = 14.2$ min, purity 98%.

IR (ν , cm^{-1}): 3424 (NH_2).

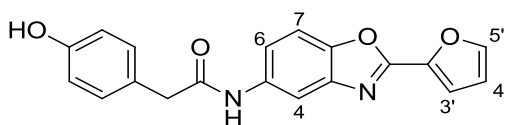
Molecular formula: $\text{C}_{11}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2$

Molecular weight: 200.19 g/mol

Melting point: 112 °C

Aspect: Grey solid

***N*-[2-(Furan-2-yl)-1,3-benzoxazol-5-yl]-2-(4-hydroxyphenyl)acetamide (22)**



Procedure:

To a solution of 4-(hydroxyphenyl)-acetic acid (1 eq., 0.276 g, 1.8 mmol) in dichloromethane (20 mL), was added EDCI (1 eq., 0.28 g, 1.8 mmol), DMAP (1 eq., 0.222 g, 1.8 mmol), and HOBT (1 eq., 0.245 g, 1.8 mmol) and compound **21** (1 eq., 360 mg, 1.8 mmol). Reaction mixture was stirred at 25 °C for 12h, hydrolyzed with water and extracted twice with DCM. Combined organic layers were washed with 1 M HCl solution, saturated NaHCO₃ solution and extracted 3 times with DCM, dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. Solid was recrystallized from ethanol to afford compound **22** (282 mg, 47%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J* Hz): 10.27 (br s, 1H, NH), 9.26 (br s, 1H, OH), 8.12 (m, 1H, H_{5'}), 8.06 (m, 1H, H₄), 7.68 (d, 1H, H₇, *J* = 8.6 Hz), 7.54 (dd, 1H, H₆, *J* = 8.6 Hz and *J* = 2.1 Hz), 7.43 (d, 1H, H_{3'}, *J* = 3.5 Hz), 7.14 (d, 2H, H_{phenyl}, *J* = 8.4 Hz), 6.80 (dd, 1H, H_{4'}, *J* = 1.7 Hz and *J* = 3.5 Hz), 6.72 (d, 2H, H_{phenyl}, *J* = 8.4 Hz), 3.53 (s, 2H, CH₂).

LC-MS (ESI) m/z found: 335 [M+H]⁺.

IR (ν, cm⁻¹): 3450-3100 (OH), 3270 (NH), 1650 (C=O).

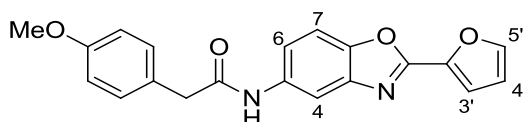
Molecular formula: C₁₉H₁₄N₂O₄

Molecular weight: 334.33 g/mol

Melting point: 140 °C

Aspect: White solid

***N*-[2-(Furan-2-yl)-1,3-benzoxazol-5-yl]-2-(4-methoxyphenyl)acetamide (23)**



Procedure:

To a solution of 4-(hydroxyphenyl)-acetic acid (1 eq., 299 mg, 1.8 mmol) in dichloromethane (20 mL), was added EDCI (1 eq., 0.28 g, 1.8 mmol), DMAP (1 eq., 0.222 g, 1.8 mmol), and HOBT (1 eq., 0.245 g, 1.8 mmol) and compound **21** (1 eq., 360 mg, 1.8 mmol). Reaction mixture was stirred at 25 °C for 12h, hydrolyzed with water and extracted twice with DCM. Combined organic layers were washed with 1 M HCl solution, saturated NaHCO₃ solution, dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. Solid was recrystallized from ethanol to afford compound **23** (426 mg, 68%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J* Hz): 10.30 (br s, 1H, NH), 8.11 (m, 1H, H_{5'}), 8.06 (m, 1H, H_{3'}), 7.68 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, H₇), 7.51 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz and *J* = 8.8 Hz, H₆), 7.43 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz, H₄), 7.25 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz, H_{phenyl}), 6.88 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz, H_{phenyl}), 6.80 (dd, 1H, *J* = 1.7 Hz and *J* = 3.5 Hz, H_{4'}), 3.72 (s, 3H, OCH₃), 3.56 (s, 2H, CH₂).

IR (ν, cm⁻¹): 3270 (NH), 1650 (C=O)

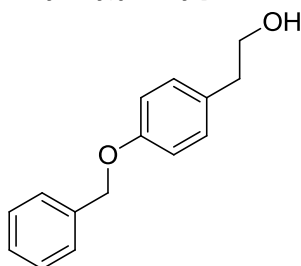
Molecular formula: C₂₀H₁₆N₂O₄

Molecular weight: 348.35 g/mol

Melting point: 134 °C

Aspect: orange solid

2-[4-(Benzyloxy)phenyl]ethan-1-ol (24)



Procedure:

A solution of 4-hydroxy-benzenethanol (1 eq., 5 g, 36.2 mmol) and K_2CO_3 (1.5 eq., 7.5 g, 54.3 mmol) in acetone (250 mL) was refluxed during 30 min before adding benzyl bromide (1 eq., 4.33 mL, 36.2 mmol). After 4h stirring at reflux, reaction mixture was cooled to room temperature, hydrolyzed with water and extracted three times with EtOAc. Combined organic layers were washed with 1 M NaOH solution, brine, dried over $MgSO_4$ and concentrated *in vacuo* to afford compound **24** (6.52 g, 79%).

1H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 7.46-7.33 (m, 5H, H_{benzyl}), 7.16 (d, 2H, J = 8.2 Hz, H_{phenyl}), 6.94 (d, 2H, J = 8.2 Hz, H_{phenyl}), 5.06 (s, 2H, CH₂), 3.84 (t, 2H, J = 6.5 Hz, CH₂CH₂), 2.83 (t, 2H, J = 6.5 Hz, CH₂CH₂), 1.37 (br t, 1H, J = 5.9 Hz, OH).

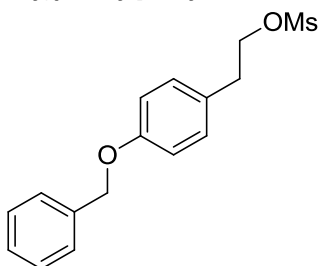
Molecular formula: C₁₅H₁₆O₂

Molecular weight: 228.29 g/mol

Melting point: 150 °C

Aspect: White solid

2-[4-(Benzyloxy)phenyl]ethylmethanesulfonate (25)



Procedure:

To a solution of **24** (1 eq., 2 g, 8.76 mmol) and Et₃N (2.3 eq., 2.8 mL, 20.2 mmol) in CH₂Cl₂ (15 mL) at 0 °C was added mesyl chloride (2 eq., 1.36 mL, 17.5 mmol) dropwise. After 72h stirring at 25 °C, the mixture was hydrolyzed with water and extracted twice with DCM. Combined organic layers were washed with saturated NaHCO₃ solution, dried over $MgSO_4$ and concentrated *in vacuo* to afford **25** (2.65 g, 99%).

1H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 7.46-7.33 (m, 5H, H_{benzyl}), 7.16 (d, 2H, J = 8.2 Hz, H_{phenyl}), 6.94 (d, 2H, J = 8.2 Hz, H_{phenyl}), 5.06 (s, 2H, CH₂), 4.38 (t, 2H, J = 6.9 Hz, CH₂CH₂), 3.01 (t, 2H, J = 6.9 Hz, CH₂CH₂), 2.84 (s, 3H, CH₃).

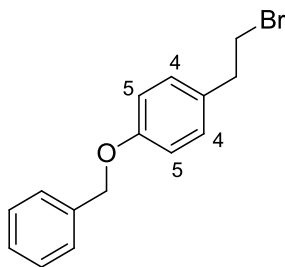
Molecular formula: C₁₆H₁₈O₄S

Molecular weight: 306.38 g/mol

Melting point: 62 °C

Aspect: White solid

1-(Benzyloxy)-4-(2-bromoethyl)benzene (26)



Procedure:

To a solution **25** (1 eq., 1.5 g, 4.9 mmol) in acetone (15 mL) was added LiBr (2.5 eq., 1.08 g, 12.25 mmol) and the reaction mixture was refluxed for 1 night. After cooling to room temperature, the mixture was concentrated *in vacuo*, suspended in water and extracted three times with EtOAc. Combined organic layer were dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo* to afford **26** (1.9 g, 85%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 7.46-7.34 (m, 5H, H_{benzyl}), 7.15 (d, 2H, J = 8.2 Hz, H₄), 6.94 (d, 2H, J = 8.2 Hz, H₅), 5.06 (s, 2H, CH₂), 3.54 (t, 2H, J = 7.7 Hz, CH₂CH₂), 3.12 (t, 2H, J = 7.7 Hz, CH₂CH₂).

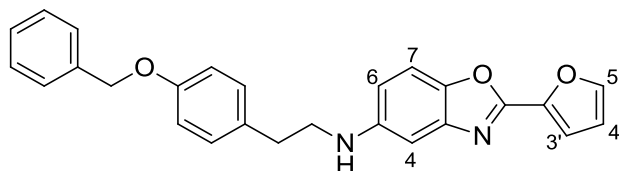
Molecular formula: C₁₅H₁₅BrO

Molecular weight: 291.18 g/mol

Melting point: 64 °C

Aspect: White solid

N-{2-[4-(Benzyloxy)phenyl]ethyl}-2-(furan-2-yl)-1,3-benzoxazol-5-amine (27)



Procedure:

To a solution of **21** (1 eq., 800 mg, 4 mmol) in DMF (15 mL) was added **26** (1.2 eq., 1.4 g, 4.8 mmol) and K₂CO₃ (1.5 eq., 828 mg, 5.99 mmol). The reaction mixture was stirred at 80 °C overnight, cooled to room temperature, hydrolyzed with water and 1 M HCl solution, and extracted with EtOAc three times. Combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo* to give a yellow oil. A purification by chromatography was realized with EtOAc/Cyclohexane as solvent (1/9 up to 3/7) to give the product as a yellow oil which was suspended in diethyl ether and filtered to afford **27** (430 mg, 26%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, J Hz): 8.10 (m, 1H, H_{5'}), 7.75 (m, 1H), 7.58 (m, 1H), 7.46–7.26 (m, 7H), 7.21 (d, 2H, J = 8.7 Hz, H_{phenyl}), 6.96 (d, 2H, J = 8.7 Hz, H_{phenyl}), 6.83 (dd, 1H, J = 1.7 Hz and J = 3.5 Hz, H_{4'}), 5.06 (s, 2H, CH₂), 3.52 (t, 2H, J = 7.5 Hz, CH₂CH₂), 2.99 (t, 2H, J = 7.5 Hz, CH₂CH₂).

LC-MS (ESI) m/z found: 411 [M+H]⁺.

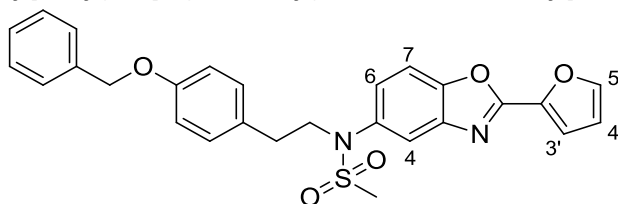
Molecular formula: C₂₆H₂₂N₂O₃

Molecular weight: 410.46 g/mol

Melting point: 184 °C

Aspect: brown solid

***N*-{2-[4-(Benzyloxy)phenyl]ethyl}-*N*-[2-(furan-2-yl)-1,3-benzoxazol-5-yl]methanesulfonamide (27')**



Procedure:

A solution of **21** (1 eq., 1.09 g, 5.44 mmol) with **25** (1.3 eq., 2.17 g, 7.08 mmol) and K₂CO₃ (1.5 eq., 1.13 g, 8.17 mmol) in DMF (20 mL) was stirred at 70 °C for 1 night. The mixture was hydrolyzed with 1 M HCl solution, and extracted with EtOAc three times. Combined organic layers were washed with water, brine, dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. Solid was suspended in diethyl ether and filtered to give the unexpected product **27'** (399 mg, 15%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J* Hz): 8.10 (m, 1H, H_{5'}), 7.81-7.79 (m, 2H, H_{3'} and H₇), 7.50 (d, 1H, H₄, *J* = 3.3 Hz), 7.42-7.37 (m, 6H, H₇ and H_{benzyloxy}), 7.06 (d, 2H, H_{phenyl}, *J* = 8.6 Hz), 6.89 (d, 2H, H_{phenyl}, *J* = 8.6 Hz), 6.83 (dd, 1H, H_{4'}, *J* = 1.7 Hz and *J* = 3.5 Hz), 5.04 (s, 2H, CH₂), 3.90 (t, 2H, CH₂CH₂, *J* = 7.0 Hz), 2.96 (s, 3H, CH₃), 2.63 (t, 2H, CH₂CH₂, *J* = 7.0 Hz).

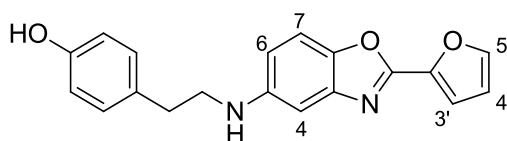
Molecular formula: C₂₇H₂₄N₂O₅S

Molecular weight: 488.55 g/mol

Melting point: 124 °C

Aspect: White solid

4-(2-{[2-(Furan-2-yl)-1,3-benzoxazol-5-yl]amino}ethyl)phenol (IIa)



Procedure:

A solution of **27** (1 eq., 740 mg, 1.66 mmol) in MeOH (15 mL) with Pd/C (70 mg) under H₂ atmosphere was stirred at 25 °C for one night. Pd/C was filtered off and the filtrate was concentrated *in vacuo*. Solid was recrystallized from CH₃CN to afford **IIa** (310 mg, 45%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J* Hz): 9.16 (br s, 1H, OH), 8.01 (m, 1H, H_{5'}), 7.43 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz, H₇), 7.33 (d, 1H, *J* = 3.5 Hz, H_{3'}), 7.07 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz, H_{phenyl}), 6.80 (m, 1H, H₄), 6.77 (dd, 1H, *J* = 1.7 Hz and *J* = 3.5 Hz, H_{4'}), 6.69 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz, H_{phenyl}), 6.71 (m, 1H, H₆), 5.73 (br t, 1H, *J* = 5.6 Hz, NH), 3.24-3.17 (m, 2H, *J* = 6.9 Hz, CH₂CH₂), 2.75 (t, 2H, *J* = 7.6 Hz, CH₂CH₂).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm): 156.1 (C), 154.9 (C), 147.7 (C), 147.0 (CH), 142.8 (C), 142.5 (C), 142.2 (C); 130.3 (C), 130.0 (2 CH), 115.5 (2 CH), 114.4 (CH), 113.1 (CH), 112.8 (CH), 111.1 (CH), 100.2 (CH); 46.1 (CH₂), 34.4 (CH₂).

LC-MS (ESI) m/z found: 321 [M+H]⁺.

HPLC: C₄ column: t_R = 14.8 min, purity 97%.

IR (ν, cm⁻¹): 3340 (OH)

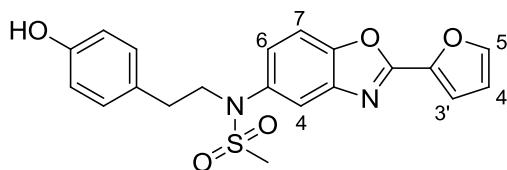
Molecular formula: C₁₉H₁₆N₂O₃

Molecular weight: 320.34 g/mol

Melting point: 174 °C

Aspect: yellow crystal

N-[2-(Furan-2-yl)-1,3-benzoxazol-5-yl]-N-[2-(4-hydroxyphenyl)ethyl] methanesulfonamide (IIb)



Procedure:

A solution of **27'** (1 eq., 200 mg, 0.41 mmol) in THF (4 mL) with Pd/C (20 mg) was heated at 60 °C for 10 min and then ammonium formate (4 eq., 103 mg, 1.64 mmol) was added. The Pd/C was filtered off and the filtrate was concentrated *in vacuo*. Oil was diluted in CH₂Cl₂, washed with water, brine, dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. The solid was then recrystallized from EtOH to afford **IIb** (80 mg, 48%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, J Hz) : 9.19 (br s, 1H, OH), 8.11 (m, 1H, H_{5'}), 7.82-7.80 (m, 2H, H₇ and H_{3'}), 7.50 (d, 1H, *J* = 3.4 Hz, H₄), 7.40 (dd, 1H, *J* = 3.4 Hz and *J* = 8.3 Hz, H₆), 6.93 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz, H_{phenyl}), 6.84 (dd, 1H, *J* = 1.7 Hz and *J* = 3.5 Hz, H_{4'}), 6.64 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz, H_{phenyl}), 3.86 (t, 2H, *J* = 7.0 Hz, CH₂CH₂), 2.96 (s, 3H, CH₃), 2.57 (t, 2H, CH₂CH₂, *J* = 7.0 Hz)

NMR ¹³C (DMSO-*d*₆, δ ppm): δ 156.3 (C), 156.2 (C), 149.2 (C), 147.9 (CH), 142.2 (C), 141.9 (C), 136.9 (C), 130.1 (2 CH), 128.7 (C), 127.2 (CH), 120.4 (CH), 116.1 (CH), 115.6 (2 CH), 113.4 (CH), 111.6 (CH), 52.5 (CH₂), 37.2 (CH₂), 34.1(CH₃)

LC-MS (ESI) m/z found: 399 [M+H]⁺.

IR (ν, cm⁻¹): 3400-2800 (OH)

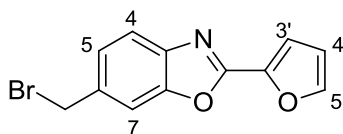
Molecular formula: C₂₀H₁₈N₂O₅S

Molecular weight: 398.43 g/mol

Melting point: 192 °C

Aspect: White solid

6-(Bromomethyl)-2-(furan-2-yl)-1,3-benzoxazole (28)



Procedure:

Same procedure as described for compound **14** was used starting from compound **10** (1 eq., 3 g, 15.06 mmol) with NBS (1.2 eq., 3.22 g, 18.1 mmol) and peroxyde de benzoyle (7%, 0.255 g, 1.05 mmol). Final solid was suspended in diethyl ether and filtered to afford compound **28** (2.66 g, 65%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 7.72-7.68 (m, 2H, H_{5'} and H₄), 7.60 (m, 1H, H₇), 7.40 (dd, 1H, *J* = 8.2 Hz and *J* = 1.6 Hz, H₅), 7.30 (dd, 1H, *J* = 0.7 Hz and *J* = 3.5 Hz, H_{3'}), 6.63 (dd, 1H, *J* = 1.7 Hz and *J* = 3.5 Hz, H_{4'}), 4.64 (s, 2H, CH₂).

IR (ν, cm⁻¹): 750 (C-Br).

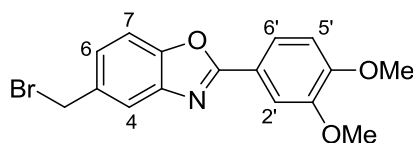
Molecular formula: C₁₂H₈BrNO₂

Molecular weight: 278.1 g/mol

Melting point: 122 °C

Aspect: Brown solid

5-(Bromomethyl)-2-(3,4-dimethoxyphenyl)-1,3-benzoxazole (29)



Procedure:

Same procedure as described for compound **14**, starting from compound **9** (1 eq., 4.35 g, 16.15 mmol) with NBS (1.2 eq., 3.45 g, 19.4 mmol) and benzoyl peroxide (0.07 eq., 0.274 g, 1.13 mmol) was used. Final solid was suspended in diethyl ether and filtered to afford compound **29** (4.22 g, 75%).

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , δ ppm, J Hz): 7.86 (dd, 1H, $J = 1.9$ Hz and $J = 8.4$ Hz, $\text{H}_{6'}$), 7.76 (m, 2H, H_4 and $\text{H}_{2'}$), 7.53 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, H_7 or $\text{H}_{5'}$), 7.39 (dd, 1H, $J = 1.7$ Hz and $J = 8.4$ Hz, H_6), 7.00 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, H_7 or $\text{H}_{5'}$), 4.65 (s, 2H, H_8), 4.02 (s, 3H, OMe), 3.99 (s, 3H, OMe).

IR (ν , cm^{-1}): 750 (C-Br)

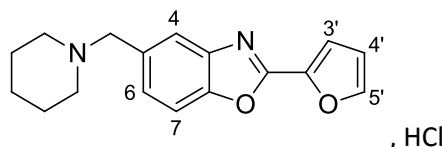
Molecular formula: $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{BrNO}_3$

Molecular weight: 348.19 g/mol

Melting point: 140 °C

Aspect: Beige solid

2-(Furan-2-yl)-5-(piperidine-1-ylmethyl)-1,3-benzoxazole hydrochloride (IIIa)



Procedure:

To a solution of piperidine (1.1 eq., 0.20 mL, 2.057 mmol) in acetone (15 mL) with Et_3N (1.1 eq., 0.29 mL, 2.06 mmol), was added compound **14** (1 eq., 0.52 g, 1.87 mmol). The reaction mixture was refluxed for 1h, cooled to room temperature and concentrated *in vacuo*. Crude was suspended in water with 6 M HCl solution and extracted with EtOAc. The aqueous layer was basified up to basic pH with 6 M NaOH solution and extracted three times with EtOAc. Combined organic layers were dried over MgSO_4 and concentrated *in vacuo* to afford a solid. The latter was suspended in diethyl ether with HCl gas, concentrated *in vacuo* and recrystallized from acetonitrile to afford compound **IIIa** (279 mg, 74%).

$^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$, δ ppm, J Hz): 12.43 (br s, 1H, NH^+), 8.02 (m, 1H, H_6), 7.75 (m, 1H, $\text{H}_{5'}$), 7.70 (m, 1H, H_4), 7.66 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, H_7), 7.32 (d, 1H, $J = 3.5$ Hz, $\text{H}_{3'}$), 6.65 (dd, 1H, $J = 1.7$ Hz and $J = 3.5$ Hz, $\text{H}_{4'}$), 4.26 (d, 2H, $J = 5.0$ Hz, CH_2), 3.47 (m, 2H, $\text{H}_{\text{piperidine}}$), 2.61 (m, 2H, $\text{H}_{\text{piperidine}}$), 2.33 (m, 2H, $\text{H}_{\text{piperidine}}$), 1.92-1.80 (m, 3H, $\text{H}_{\text{piperidine}}$), 1.35 (m, 1H, $\text{H}_{\text{piperidine}}$)

$^{13}\text{C NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$, δ ppm): 156.5 (C), 151.0 (C), 146.3 (CH), 142.1 (C), 142.0 (C); 129.1 (CH), 125.1 (C), 122.9 (CH), 115.3 (CH), 112.5 (CH), 111.8 (CH), 60.9 (CH_2), 52.3 (2 CH_2), 22.5 (2 CH_2), 22.1 (CH_2)

LC-MS (ESI) m/z found: 283 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

HPLC: C_4 column: $t_R = 16.2$ min, purity 98%.

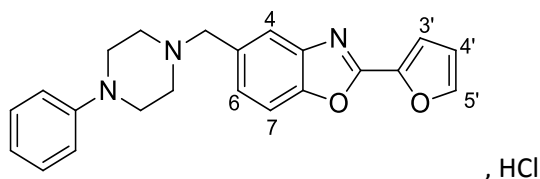
Molecular formula: $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{ClN}_2\text{O}_2$

Molecular weight: 318.80 g/mol

Melting point: > 300 °C

Aspect: White solid

2-(Furan-2-yl)-5-[(4-phenylepiperazine-1-yl)methyl]-1,3-benzoxazole hydrochloride (IIIb)



Procedure:

Same procedure as described for compound IIIa was used starting from compound 14 (1 eq., 520 mg, 1.87 mmol) with phenylpiperazine (1 eq., 0.32 mL, 2.06 mmol) to afford compound IIIb (437 mg, 65%) after recrystallization from EtOH.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J* Hz): 13.12 (br s, 1H, NH⁺), 8.04 (m, 1H, H_{5'}), 7.83 (m, 1H, H₆), 7.68 (m, 2H), 7.33 (d, 1H, *J* = 3.5 Hz, H_{3'}), 7.30-7.25 (m, 2H), 6.98-6.89 (m, 3H), 6.66 (dd, 1H, *J* = 1.7 Hz and *J* = 3.5 Hz, H_{4'}), 4.37 (s, 2H, CH₂), 3.75-3.52 (m, 6H, H_{piperazine}), 3.06 (m, 2H, H_{piperazine}).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm): 156.0 (C), 150.6 (C), 150.0 (C), 148.0 (CH), 141.9 (C); 141.7 (C), 129.6 (2 CH), 129.4 (CH), 127.5 (C), 123.5 (CH), 120.4 (CH), 116.4 (2 CH), 116.2 (CH), 113.4 (CH), 111.6 (CH), 58.7 (CH₂), 50.6 (2 CH₂), 45.7 (2 CH₂).

LC-MS (ESI) m/z found: 360 [M+H]⁺.

HPLC: C₄ column: t_R = 15.5 min, purity >99%.

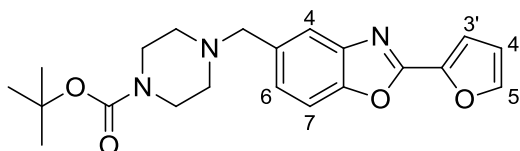
Molecular formula: C₂₂H₂₂N₃O₂Cl

Molecular weight: 395.88 g/mol

Melting point: > 300 °C

Aspect: White solid

tert-Butyl 4-[[2-(Furan-2-yl)-1,3-benzoxazole-5-yl]methyl]piperazine-1-carboxylate (IIIc)



Procedure:

Same procedure as described for compound IIIa was used starting from compound 14 (1 eq., 510 mg, 1.81 mmol) with boc-piperazine (1.1 eq., 375 mg, 2.02 mmol) to afford compound IIIc (577 mg, 83%) into base form after recrystallization from MeOH.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, *J* Hz): 7.69 (m, 1H, H_{5'}), 7.67 (m, 1H, H₄), 7.49 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz, H₇), 7.34 (dd, 1H, *J* = 1.5 Hz and *J* = 8.3 Hz, H₆), 7.26 (m, 1H, H_{3'}), 6.62 (dd, 1H, *J* = 1.7 Hz and *J* = 3.5 Hz, H_{4'}), 3.63 (s, 2H, CH₂), 3.44 (t, 4H, *J* = 4.9 Hz, H_{piperazine}), 2.42 (t, 4H, *J* = 3.5 Hz, H_{piperazine}), 1.45 (s, 9H, 3 CH₃).

¹³C NMR (CDCl₃, δ ppm): 163.0 (C), 155.6 (C), 154.0 (C), 149.8 (C), 147.7 (C), 141.9 (C), 141.8 (CH), 132.2 (CH), 127.9 (C), 121.5 (CH), 115.8 (CH), 113.3 (CH), 111.2 (CH), 79.6 (2 CH₂), 60.8 (CH₂), 51.9 (2 CH₂), 26.5 (3 CH₃).

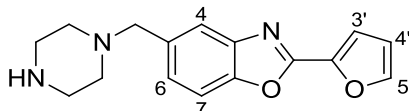
LC-MS (ESI) m/z found: 328 [M-tBu+H]⁺, 384 [M+H]⁺.

HPLC: C₄ column: t_R = 14.7 min, purity >99%.

IR (u, cm⁻¹): 1679 (C=O)

Molecular formula: C₂₁H₂₅N₃O₄
Molecular weight: 383.44 g/mol
Aspect: White solid
Melting point: 128 °C

2-(Furan-2-yl)-5-(piperazin-1-ylmethyl)-1,3-benzoxazole (III d)



Procedure:

To a solution of **III c** (1 eq., 100 mg, 0.35 mmol) diluted in 5 ml of DCM was added TFA (6 eq., 2 mL, 26 mmol) and the reaction mixture was stirred for 3h at room temperature. Solution was then hydrolyzed with 1 M NaOH solution up to neutral pH and extracted three times with DCM. Combined organic layers were dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. Solid was suspended in diethyl ether with a drop of ethanol and filtered to afford compound **III d** (60 mg, 60%) into base form.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, J Hz) : 8.08 (m, 1H, H_{5'}), 7.74-7.71 (m, 2H, H₄ and H₇), 7.46 (dd, 1H, J = 0.7 Hz and J = 3.5 Hz, H_{3'}), 7.38 (dd, 1H, J = 1.6 Hz and J = 8.3 Hz, H₆), 6.83 (dd, 1H, J = 1.7 Hz and J = 3.5 Hz, H_{4'}), 3.65 (s, 2H, CH₂), 3.45-3.39 (m, 4H, H_{piperazine}), 2.43 (m, 4H, H_{piperazine}).

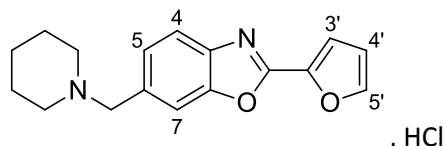
¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm): 156.1 (C), 149.9 (C), 148.0 (CH), 142.4 (C), 141.7 (C), 129.0 (C), 127.8 (CH), 120.1 (CH), 116.3 (CH), 114.4 (CH), 113.4 (CH), 59.1 (CH₂), 52.0 (2 CH₂), 22.6 (2 CH₂), 21.9 (CH₂).

LC-MS (ESI) m/z found: 284 [M+H]⁺.

HPLC: C₄ column: t_R = 15.8 min, purity 99%.

Molecular formula: C₁₆H₁₇N₃O₂
Molecular weight: 283.33 g/mol
Melting point: 192 °C
Aspect: White solid

2-(Furan-2-yl)-6-(piperidine-1-ylmethyl)-1,3-benzoxazole hydrochloride (III e)



Procedure:

Same procedure as described for compound **III a** was used starting from compound **28** (1 eq., 400 mg, 1.44 mmol) with piperidine (1 eq., 0.13 mL, 1.29 mmol) to afford compound **III e** (276 mg, 68%) after recrystallization from acetonitrile.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, J Hz): 11.08 (br s, 1H, NH⁺), 8.16-8.10 (m, 2H, H₇ and H_{5'}), 7.82 (d, 1H, J = 8.1 Hz, H₄), 7.63 (m, 1H, H₅), 7.51 (d, 1H, J = 3.2 Hz, H_{3'}), 6.83 (m, 1H, H_{4'}), 4.38 (m, 2H, CH₂), 3.28 (m, 2H, H_{piperidine}), 2.83 (m, 2H, H_{piperidine}), 1.76-1.66 (m, 5H, H_{piperidine}), 1.35 (m, 1H, H_{piperidine}).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm): 156.1 (C), 149.9 (C), 148.0 (CH), 142.4 (C), 141.7 (C), 129.0 (C), 127.8 (CH), 120.1 (CH), 116.3 (CH), 114.4 (CH), 113.4 (CH), 59.1 (CH₂), 52.0 (2 CH₂), 22.6 (2 CH₂), 21.9 (CH₂).

LC-MS (ESI) m/z found: 283 [M+H]⁺.

HPLC: C₄ column: t_R = 15.7 min, purity 96%.

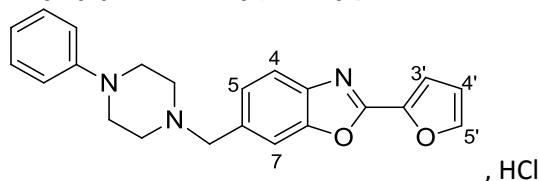
Molecular formula: C₁₇H₁₉N₂O₂Cl

Molecular weight: 318.80 g/mol

Melting point: >300 °C

Aspect: White solid

2-(Furan-2-yl)-6-[(4-phenylepiperazine-1-yl)methyl]-1,3-benzoxazole hydrochloride (III f)



Procedure:

Same procedure as described for compound IIIa was used starting from compound **28** (1 eq., 400 mg, 1.44 mmol) with phenylpiperazine (0.9 eq., 0.20 mL, 1.29 mmol) to afford compound III f (233 mg, 68%) after recrystallization from EtOH.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J* Hz): 11.38 (br s, 1H, NH⁺), 8.14 (m, 2H, H_{5'} and H_{3'}), 7.87 (m, 1H, H₄), 7.66 (m, 1H, H₅), 7.54 (m, 1H, H₇), 7.25 (m, 2H, H_{phenyl}), 6.96 (m, 2H, H_{phenyl}), 6.84 (m, 2H, H_{4'} and H_{phenyl}), 4.47 (s, 2H, CH₂), 3.30 (m, 8H, H₁₀ and H_{piperazine}).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm): 156.1 (C), 149.9 (C), 148.0 (CH), 141.8 (C), 142.6 (C), 129.6 (C), 129.0 (2 CH), 127.5 (CH), 120.4 (CH), 120.3 (CH), 116.2 (CH), 116.4 (CH), 114.5 (2 CH), 113.4 (CH), 58.8 (CH₂), 50.7 (2 CH₂), 45.7 (2 CH₂).

LC-MS (ESI) m/z found: 360 [M+H]⁺.

HPLC: C₄ column: t_R = 15.8 min, purity 97%.

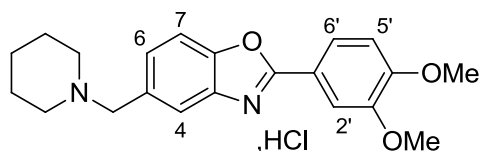
Molecular formula: C₂₂H₂₂ClN₃O₂

Molecular weight: 395.14 g/mol

Melting point: 260 °C

Aspect: grey solid

2-(3,4-Dimethoxyphenyl)-5-(piperidin-1-ylmethyl)-1,3-benzoxazole hydrochloride (III g)



Procedure:

Same procedure as described for compound IIIa was used starting from compound **29** (1 eq., 300 mg, 0.86 mmol) with piperidine (1.1 eq., 0.08 mL, 0.86 mmol) to afford compound III g (200 mg, 60%) after recrystallization from acetonitrile.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, *J* Hz) : 12.31 (br s, 1H, NH⁺), 7.90 (dd, 1H, *J* = 1.6 Hz and *J* = 8.4 Hz, H_{6'}), 7.82 (dd, 1H, *J* = 1.9 Hz and *J* = 8.4 Hz, H₆), 7.78 (d, 1H, *J* = 1.6 Hz, H_{2'}), 7.71 (d, 1H, *J* = 1.9 Hz, H₄), 7.62 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, H_{5'}), 6.97 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, H₇), 4.27 (d, 2H, *J* = 5.1 Hz, CH₂), 3.99 (s, 3H, OMe), 3.96 (s, 3H, OMe), 3.45 (m, 2H, H_{piperidine}), 2.64 (m, 2H, H_{piperidine}), 2.34 (m, 2H, H_{piperidine}), 1.86 (m, 3H, H_{piperidine}), 1.35 (m, 1H, H_{piperidine}).

¹³C NMR (CDCl₃, δ ppm): δ 164.4 (C), 152.4 (C), 151.5 (C), 149.3 (C), 142.6 (C), 128.4 (CH), 124.7 (C), 122.5 (CH), 121.5 (C), 119.0 (CH), 111.5 (CH), 111.1 (CH), 110.1 (CH), 60.9 (CH₂), 56.1 (CH₃), 56.1 (CH₃), 52.6 (2 CH₂), 22.5 (2 CH₂), 22.0 (CH₂).

LC-MS (ESI) m/z found: 353 [M+H]⁺.

HPLC: C₄ column: t_R = 14.3 min, purity 99%.

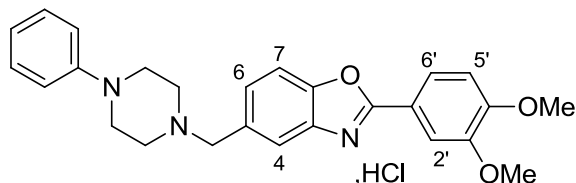
Molecular formula: C₂₁H₂₅ClN₂O₃

Molecular weight: 388.89 g/mol

Melting point: > 300 °C

Aspect: White solid

2-(3,4-Dimethoxyphenyl)-5-[(4-phenylpiperazine-1-yl)methyl]-1,3-benzoxazole hydrochloride (IIIh)



Procedure:

Same procedure as described for compound **IIIa** was used starting from compound **29** (1 eq., 400 mg, 1.15 mmol) with phenylpiperazine (0.9 eq., 0.16 mL, 1.03 mmol) to afford compound **IIIh** (310 mg, 63%) after recrystallization from acetone.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J* Hz): 11.86 (br s, NH⁺), 8.16 (d, 1H, *J* = 1.6 Hz, H₄), 7.81 (m, 2H, H_{6'} and H₇), 7.68 (m, 2H, H_{2'} and H₆), 7.21 (m, 6H, H_{phenyl} and H_{5'}), 5.08 (m, 8H, H_{piperazine}), 4.51 (s, 2H, CH₂), 3.88 (s, 3H, OMe), 3.86 (s, 3H, OMe).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm): δ 163.9 (C), 153.0 (C), 151.3 (C), 149.9 (C), 149.8 (C), 142.6 (C), 129.6 (2 CH), 128.9 (C), 127.7 (C), 123.3 (CH), 120.5 (CH), 119.1 (CH), 116.7 (CH), 116.5 (2 CH), 112.9 (CH), 111.2 (CH), 111.1 (CH), 58.9 (CH₂), 56.4 (2 CH₃), 50.6 (2 CH₂), 45.8 (2 CH₂).

LC-MS (ESI) m/z found: 430 [M+H]⁺.

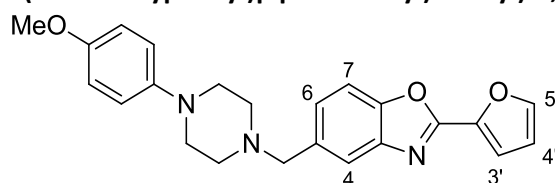
Molecular formula: C₂₆H₂₈ClN₃O₃

Molecular weight: 465.18 g/mol

Melting point: > 300 °C

Aspect: White solid

2-(Furan-2-yl)-5-[(4-(4-methoxyphenyl)piperazin-1-yl)methyl]-1,3-benzoxazole (30)



Procedure:

To a solution of 1-(4-methoxyphenyl)piperazine (1 eq., 826 mg, 4.33 mmol) and Et₃N (4 eq., 2.4 ml, 17.26 mmol) in DCM (25 mL), was added dropwise **14** (1 eq., 1.2 g, 4.33 mmol). After 3h stirring at reflux, the reaction mixture was cooled at room temperature, hydrolyzed with water and extracted twice with DCM. Organic layer was dried over MgSO₄, concentrated *in vacuo*, suspended in diethyl ether and filtered. Solid was recrystallized from EtOH to afford compound **30** (1.34 g, 80%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J* Hz): 8.07 (m, 1H, H_{5'}), 7.70 (m, 2H, H₇ and H₄), 7.45 (d, 1H, *J* = 3.5 Hz, H_{3'}), 7.38 (dd, 1H, *J* = 1.2 Hz and *J* = 8.4 Hz, H₆), 6.81 (dd, 1H, *J* = 1.7 Hz and *J* = 3.5 Hz, H_{4'}), 6.87-7.77 (m, 4H, H_{phenyl}), 3.66 (s, 3H, OMe), 3.63 (s, 2H, CH₂), 2.99 (m, 4H, H_{piperazine}), 2.50 (m, 4H, H_{piperazine}).

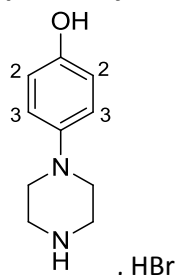
Molecular formula: C₂₃H₂₃N₃O₃

Molecular weight: 389.17 g/mol

Melting point: > 300 °C

Aspect: Beige solid

4-Piperazinephenol hydrobromide (31)



Procedure:

To a solution of 1-(4-methoxyphenyl) piperazine (1 eq, 2 g, 10.4 mmol) in 50 mL of AcOH was added a solution of HBr (48%) (1.5 eq, 1.26 g, 15.6 mmol). After 12 h stirring at reflux, the mixture was cooled to room temperature and concentrated *in vacuo*. Solid was suspended in EtOAc, washed with water, dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo* to afford compound **31** (1.6 g, 65%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J* Hz): 9.07 (br s, 1H, OH), 6.75 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz, H₃), 6.64 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz, H₂), 2.82 (m, 8H, H_{piperazine}), 2.08 (br s, 2H, NH₂)

IR (ν, cm⁻¹): 3270 (NH), 3000-2400 (OH)

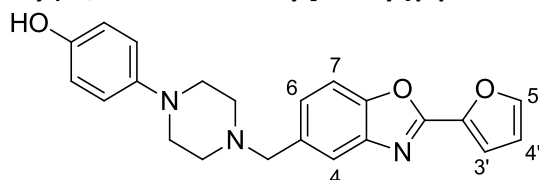
Molecular formula: C₁₀H₁₆Br₂N₂O

Molecular weight: 340.05 g/mol

Melting point: 227 °C

Aspect: Brown solid

4-(4-{[2-(Furan-2-yl)-1,3-benzoxazol-5-yl]methyl}piperazin-1-yl)phenol (32)



Procedure:

Same procedure as described for compound **30** was used, starting from compound **14** with **31** (0.9 eq., 0.7 g, 3.89 mmol). Purification by chromatography was performed using DCM/AcOEt (9/1) as solvent to afford compound **32** (1.2 g, 83%) into base form.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, *J* Hz): 8.79 (br s, 1H, OH), 8.07 (m, 1H, H_{5'}), 7.71 (m, 2H, H₇ and H₄), 7.46 (d, 1H, *J* = 3.5 Hz, H_{3'}), 7.41 (dd, 1H, *J* = 1.2 Hz and *J* = 8.4 Hz, H₆), 6.82 (dd, 1H, *J* = 1.8 Hz and *J* = 3.5 Hz, H_{4'}), 6.78 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz, H_{phenyl}), 6.63 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz, H_{phenyl}), 3.64 (s, 2H, CH₂), 2.96 (m, 4H, H_{piperazine}), 2.55 (m, 4H, H_{piperazine}).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm): 155.4 (C), 151.3 (C), 149.2 (C), 147.6 (CH), 144.7 (C), 142.1 (C), 141.7 (C), 135.9 (C), 126.9 (CH), 120.2 (CH), 118.2 (2 CH), 115.9 (2 CH), 115.5 (CH), 113.3 (CH), 110.8 (CH), 62.2 (CH₂), 53.2 (2 CH₂), 50.5 (2 CH₂).

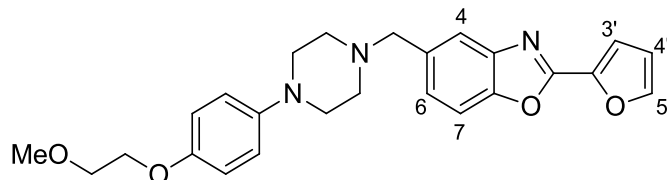
IR (ν, cm⁻¹): 3195-2780 (OH)

LC-MS (ESI) m/z found: 376 [M+H]⁺.

HPLC: C₄ column: t_R = 14.3 min, purity 99%.

Molecular formula: C₂₂H₂₁N₃O₃
Molecular weight: 375.42 g/mol
Melting point: 212 °C
Aspect: White solid

2-(Furan-2-yl)-5-({4-[4-(2-methoxyethoxy)phenyl]piperazin-1-yl)methyl}-1,3-benzoxazole (Ib)



Procedure:

- *First method*

To a solution of compound **32** (1 eq., 0.5 g, 1.33 mmol) in DMF (10 mL) at 0 °C was added by portion NaH (2 eq., 64 mg, 2.664 mmol) and the reaction mixture was stirred for 30 min before adding **18** (1.1 eq., 225 mg, 1.465 mmol). After 12h stirring at 60 °C, the reaction mixture was hydrolyzed with water and extracted three times with diethyl ether. Combined organic layers were washed with NaOH 1 N solution, brine, dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. Solid was recrystallized from EtOH to afford compound **Ib** (190 mg, 33%).

- *Second method*

To a solution of **14** (1.1 eq., 258 mg, 0.931 mmol) in DMF (8 mL) was added **17** (1 eq., 200 mg, 0.846 mmol) and Et₃N (1.2 eq., 102 mg, 0.14 mL, 1.02 mmol). Reaction mixture was stirred for 3h at 60 °C, cooled to room temperature, hydrolyzed with water and extracted three times with diethyl ether. Combined organic layers were dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. Solid was recrystallized from EtOH to afford compound **Ib** (231 mg, 63%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8.08 (m, 1H, H_{5'}), 7.72 (m, 2H, H₇ and H₄), 7.46 (dd, 1H, J = 0.7 Hz and J = 3.5 Hz, H_{3'}), 7.40 (dd, 1H, J = 1.4 Hz and J = 8.4 Hz, H₆), 6.88-6.79 (m, 5H, H_{4'} and H_{phenyl}), 3.99 (m, 2H, OCH₂), 3.64 (s, 2H, CH₂), 3.61 (m, 2H, CH₂O), 3.29 (s, 3H, OCH₃), 3.01 (m, 4H, H_{piperazine}), 2.54 (m, 4H, H_{piperazine}).

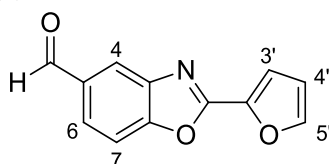
¹³C NMR (CDCl₃, δ ppm): 155.4 (C), 152.5 (C), 149.2 (CH), 147.5 (C), 145.9 (C), 142.1 (C), 141.7 (C), 135.9 (C), 126.1 (C), 119.9 (CH), 118.1 (2 CH), 115.4 (2 CH), 114.1 (CH), 112.3 (CH), 110.2 (CH), 71.2 (CH₂), 67.7 (CH₂), 60.8 (CH₂), 53.4 (2 CH₂), 50.6 (2 CH₂), 33.7 (CH₃).

LC-MS (ESI) m/z found: 434 [M+H]⁺.

HPLC: C₄ column: t_R = 16.1 min, purity 99%.

Molecular formula: C₂₅H₂₇N₃O₄
Molecular weight: 433.5 g/mol
Melting point: 123 °C
Aspect: White solid

2-(Furan-2-yl)-1,3-benzoxazole-5-carbaldehyde (33)



Procedure:

To a solution of **14** (1 eq, 2.93 g, 10.54 mmol) in acetonitrile (100 mL), was added *N*-oxyde *N*-methylmorpholine (3 eq., 3.7 g, 31.61 mmol) and 4 g of molecular sieve 4A. The reaction mixture was refluxed for 4h, cooled to room temperature and molecular sieve was filtered off and washed with AN. Filtrate was concentrated *in vacuo*, suspended in water and extracted with EtOAc three times. Combined organic layer were dried over MgSO₄, concentrated *in vacuo* and the solid was recrystallized from acetonitrile to afford compound **33** (1.4 g, 62%).

¹H NMR (DMSO, δ ppm, J Hz): 10.1 (br s, 1H, CHO), 8.32 (m, 1H, H_{5'}), 8.13 (m, 1H, H₆), 7.99 (m, 2H, H₇ and H₄), 7.55 (m, 1H, H_{3'}), 6.85 (dd, 1H, J = 1.7 Hz and J = 3.5 Hz, H_{4'}).

IR (ν, cm⁻¹): 2870-2800 (C-H), 1695 (C=O)

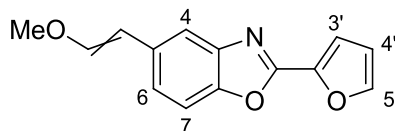
Molecular formula: C₁₂H₇NO₃

Molecular weight: 213.19 g/mol

Melting point: 150 °C

Aspect: Beige solid

2-(furan-2-yl)-5-(2-methoxyvinyl)-1,3-benzoxazole (34)



Procedure:

To a solution of (methoxymethyl)triphenylphosphonium chloride (1.5 eq., 482 mg, 1.41 mmol) in THF (1.3 mL) at -30°C under N₂ was added NaHMDS (2 eq., 344 mg, 0.37 mL, 1.88 mmol) in solution in THF/Cyclohexane. After 30min stirring, **33** (1 eq., 200 mg, 0.938 mmol) diluted in THF (1.3 mL) was added dropwise and the mixture was stirred at -30°C for 30 min and at room temperature for a night. NaHCO₃ solution was added and the mixture was extracted three times with EtOAc, dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. Purification by flash chromatographie with EtOAc/Cyclohexane (1/2) as eluant was performed to afford **34** (90 mg, 40%) as a mixture of (Z) and (E) compounds.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8.05 (m, 1H, H_{5'}), 7.66-7.65 (m, 2H), 7.58-7.53 (m, 2H), 7.46-7.42 (m, 1H), 7.25 (d, 2H, J = 3.5 Hz, H_{3'}), 7.22 (dd, 2H, J = 1.7 Hz and J = 8.6 Hz, H₆), 7.05 (d, 1H, J = 13.0 Hz, CH₂ (E)), 6.61 (dd, 2H, J = 1.7 Hz and J = 3.5 Hz, H_{4'}), 6.18 (d, 1H, J = 7.0 Hz, CH₂ (Z)), 5.92 (d, 1H, J = 13.0 Hz, CH₂ (E)), 5.33 (d, 1H, J = 7.0 Hz, CH₂ (Z)), 3.81 (s, 3H, Me), 3.72 (s, 3H, Me).

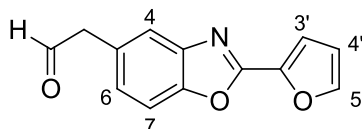
Molecular formula: C₁₄H₁₁NO₃

Molecular weight: 241.24 g/mol

Aspect: White solid

Melting point: >300 °C

2-(2-(Furan-2-yl)-1,3-benzoxazol-5-yl)acetaldehyde (35)



Procedure:

To a solution of **34** (1 eq., 90 mg, 0.373 mmol) in DCM (5.5 mL) was added TFA (3.61 eq., 0.1 mL, 1.35 mmol) and H₂O (14.9 eq., 0.1 mL, 5.55 mmol). Mixture was stirred 30 min at room temperature, hydrolyzed with water and extracted 3 times with DCM. Combined organic layers were dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. Solid was suspended in diethyl ether and filtered to afford **35** (27 mg, 43%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J* Hz): 11.2 (br s, 1H, CHO), 8.45 (m, 1H, H_{5'}), 8.12 (m, 1H, H₆), 7.97 (m, 2H, H₇ and H₄), 7.50 (m, 1H, H_{3'}), 6.84 (dd, 1H, *J* = 1.7 Hz and *J* = 3.5 Hz, H_{4'}), 3.66 (s, 2H, CH₂).

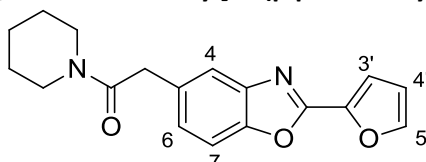
Molecular formula: C₁₄H₁₁NO₃

Molecular weight: 241.24 g/mol

Aspect: White solid

Melting point: 165 °C

2-[2-(Furan-2-yl)-1,3-benzoxazol-5-yl]-1-(piperidin-1-yl)ethan-1-one (36a)



Procedure:

A solution of **13** (1 eq., 363 mg, 1.49 mmol) in toluene (4 mL) with SOCl₂ (4 eq., 0.4 mL, 5.97 mmol) was refluxed for 1h, cooled to room temperature and concentrated *in vacuo*. The oil was diluted in EtOAc (26 mL) and added dropwise to a solution of piperidine (1.1 eq., 0.162 mL, 1.64 mmol) and Et₃N (1.5 eq., 0.3 mL, 2.24 mmol) in EtOAc (26 mL) while being stirred and cooled in an ice bath. After 1h30 stirring at room temperature, the mixture was hydrolyzed with water, extracted twice with EtOAc. Combined organic layers were washed with saturated NaHCO₃ solution, brine, dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo* to give a solid which was suspended in diethyl ether and filtered to afford compound **36a** (351 mg, 76%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, *J* Hz): 8.16 (d, 1H, *J* = 1.7 Hz, H_{5'}), 7.71 (m, 2H, H₄ and H₇), 7.68 (m, 1H, H₆), 7.34 (d, 1H, *J* = 3.5 Hz, H_{3'}), 6.81 (dd, 1H, *J* = 1.7 Hz and *J* = 3.5 Hz, H_{4'}), 3.78 (s, 2H, CH₂), 3.39 (m, 4H, H_{piperidine}), 1.68 (m, 4H, H_{piperidine}), 1.47 (m, 2H, H_{piperidine}).

IR (ν, cm⁻¹): 1640 (C=O)

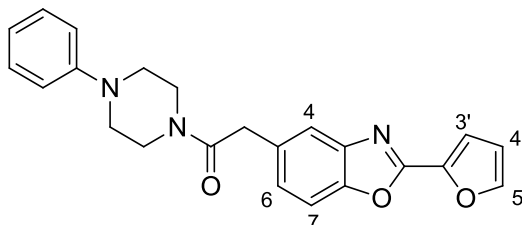
Molecular formula: C₁₈H₁₈N₂O₃

Molecular weight: 310.35 g/mol

Melting point: 112 °C

Aspect: White solid

2-[2-(Furan-2-yl)-1,3-benzoxazol-5-yl]-1-(4-phenylpiperazin-1-yl)ethan-1-one (36b)



Procedure:

Same procedure as described for compound **36a** was used, starting from compound **13** (1 eq., 500 mg, 2.06 mmol) with phenylpiperazine (1.1 eq., 0.35 mL, 2.26 mmol) to afford compound **36b** (620 mg, 78%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, *J* Hz): 7.68 (m, 1H, H_{5'}), 7.63 (m, 1H, H_{3'}), 7.52 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, H₇), 7.32-7.23 (m, 4H, H_{phenyl}), 6.89-6.87 (m, 3H, H₄, H₆ and H_{phenyl}), 6.63 (dd, 1H, *J* = 1.7 Hz and *J* = 3.5 Hz, H_{4'}), 3.91

(s, 2H, CH₂), 3.83 (t, 2H, *J* = 4.6 Hz, H_{piperazine}), 3.66 (t, 2H, *J* = 4.6 Hz, H_{piperazine}), 3.16 (t, 2H, *J* = 4.6 Hz, H_{piperazine}), 3.02 (t, 2H, *J* = 4.6 Hz, H_{piperazine}).

IR (ν, cm⁻¹): 1640 (C=O)

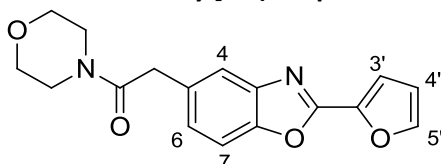
Molecular formula: C₂₃H₂₁N₃O₃

Molecular weight: 387.43 g/mol

Melting point: 128 °C

Aspect: White solid

2-[2-(Furan-2-yl)-1,3-benzoxazole-5-yl]-1-(morpholine-4-yl) ethan-1-one (36c)



Procedure:

Same procedure as described for compound **36a** was used, starting from compound **13** (1 eq., 350 mg, 1.44 mmol) with morpholine (1.1 eq., 0.14 mL, 1.58 mmol) to afford compound **36c** (255 mg, 57%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, *J* Hz): 7.67 (m, 1H, H_{5'}), 7.59 (m, 1H, H_{3'}), 7.52 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, H₇), 7.27 (m, 2H, H₄ and H₆), 6.63 (dd, 1H, *J* = 1.7 Hz and *J* = 3.5 Hz, H_{4'}), 3.85 (s, 2H, CH₂), 3.66 (m, 4H, H_{morpholine}), 3.50 (m, 4H, H_{morpholine}).

IR (ν, cm⁻¹): 1630 (C=O)

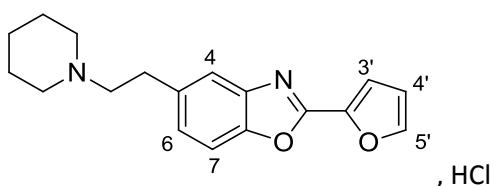
Molecular formula: C₁₇H₁₆N₂O₄

Molecular weight: 312.32 g/mol

Melting point: 118 °C

Aspect: Beige solid

2-(Furane-2-yl)-5-[2-(piperidine-1-yl) ethyl]-1,3-benzoxazol hydrochloride (IVa)



Procedure:

To a solution of **36a** (1 eq., 330 mg, 1.06 mmol) in THF (5 mL) was added LiAlH₄ (2.5 eq., 100 mg, 2.65 mmol). After 1h stirring at room temperature, water (0.1 mL), 1 M NaOH solution (0.1 mL) and water (0.3 mL) were added to get a white solid which was filtered off and washed with EtOAc. Filtrate was washed with 1 M HCl solution and extracted with EtOAc. Aqueous layer was basified with 6 M NaOH solution up to pH 10 and extracted three times with EtOAc. Combined organic layers were dried over MgSO₄, concentrated *in vacuo* and recrystallized from acetonitrile. Solid was suspended in diethyl ether with HCl gas and filtered to afford compound **IVa** (700 mg, 70%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J* Hz): 10.53 (br s, 1H, NH⁺), 8.0 (m, 1H, H_{5'}), 7.74 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, H₇), 7.69 (m, 1H, H₄), 7.46 (d, 1H, *J* = 3.5 Hz, H_{3'}), 7.33 (dd, 1H, *J* = 3.4 and *J* = 8.4 Hz, H₆), 6.82 (dd, 1H, *J* =

1.7 Hz and $J = 3.5$ Hz, $H_{4'}$), 3.52-3.48 (m, 2H, CH_2CH_2), 3.33-3.19 (m, 4H, $H_{\text{piperidine}}$), 2.93-2.90 (m, 2H, CH_2CH_2), 1.80-1.70 (m, 5H, $H_{\text{piperidine}}$), 1.43-1.39 (m, 1H, $H_{\text{piperidine}}$).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ ppm): 155.5 (C), 149.0 (C), 147.7 (CH), 142.0 (C), 141.9 (C), 134.9 (C), 126.8 (CH), 120.1 (CH), 115.7 (CH), 113.3 (CH), 111.3 (CH), 57.2 (CH_2), 52.5 (2 CH_2), 29.7 (CH_2), 22.8 (2 CH_2), 21.9 (CH_2).

LC-MS (ESI) m/z found: 297 $[M+H]^+$.

HPLC: C_4 column: $t_R = 16.3$ min, purity >99%.

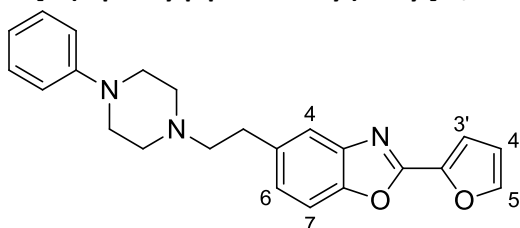
Molecular formula: $C_{18}H_{21}ClN_2O_2$

Molecular weight: 332.82 g/mol

Melting point: >300 °C

Aspect: White solid

2-(Furane-2-yl)-5-[2-(4-phenylpiperazin-1-yl) ethyl]-1,3-benzoxazole (IVb)



Procedure:

Same procedure as described for compound IVa was used, starting from compound 36b (1 eq., 470 mg, 1.21 mmol) with $LiAlH_4$ (2.5 eq., 115 mg, 3.03 mmol). Final solid was recrystallized from EtOH to afford compound IVb (942 mg, 60%) into base form.

^1H NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J Hz): 8.06 (m, 1H, $H_{5'}$), 7.65 (m, 1H, H_4), 7.56 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H_7), 7.43 (d, 1H, $J = 3.5$ Hz, $H_{3'}$), 7.31 (dd, 1H, $J = 1.3$ Hz and $J = 8.2$ Hz, H_6), 7.22-7.17 (m, 2H, H_{phenyl}), 6.92 (d, 2H, $J = 7.9$ Hz, H_{phenyl}), 6.80 (dd, 1H, $J = 1.7$ Hz and $J = 3.5$ Hz, $H_{4'}$), 6.78-6.73 (m, 1H, H_{phenyl}), 3.12 (m, 4H, $H_{\text{piperazine}}$), 2.88 (t, 2H, $J = 7.3$ Hz, CH_2CH_2), 2.57-2.64 (m, 6H, CH_2CH_2 and $H_{\text{piperazine}}$).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ ppm): 155.2 (C), 151.5 (C), 148.5 (C), 147.5 (CH), 141.7 (C), 142.1 (C), 138.2 (C), 129.4 (CH), 126.9 (CH), 120.0 (CH), 119.2 (CH), 115.8 (CH), 115.4 (CH), 113.2 (CH), 110.8 (CH), 60.4 (CH_2), 53.1 (2 CH_2), 48.7 (2 CH_2), 33.0 (CH_2).

LC-MS (ESI) m/z found: 374 $[M+H]^+$.

HPLC: C_4 column: $t_R = 15.8$ min, purity >99%.

Molecular formula: $C_{23}H_{23}N_3O_2$

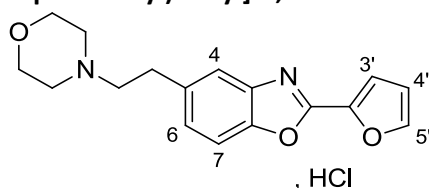
Molecular weight: 373.45 g/mol

Melting point: 160 °C

Aspect: White solid

Yield: 12%

2-(Furan-2-yl)-5-[2-(morpholin-4-yl) ethyl]-1,3-benzoxazole hydrochloride (IVc)



Procedure:

Same procedure as described for compound **IVa** was used, starting from compound **36c** (1 eq., 200 mg, 0.64 mmol) with LiAlH₄ (2.5 eq., 73 mg, 1.92 mmol). Final solid was recrystallized from acetonitrile to afford compound **IVc** (152 mg, 80%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, J Hz): 11.36 (br s, 1H, NH⁺), 8.06 (m, 1H, H_{5'}), 7.73-7.67 (m, 2H, H₇ and H₄), 7.43 (m, 1H, H_{3'}), 7.31 (m, 1H, H₆), 7.80 (m, 1H, H_{4'}), 3.92-3.82 (m, 4H, CH₂CH₂), 3.31-3.18 (m, 8H, H_{morpholine}).

LC-MS (ESI) m/z found: 299 [M+H]⁺.

HPLC: C₄ column: t_R = 14.8 min, purity >99%.

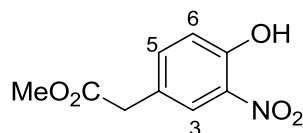
Molecular formula: C₁₇H₁₉N₂O₃Cl

Molecular weight: 334.80 g/mol

Aspect: White solid

Melting point: >300 °C

Methyl 2-(4-hydroxy-3-nitrophenyl) acetate (**37**)



Procedure:

To a solution of methyl 2-(4-hydroxyphenyl) acetate (1eq., 3.6 g, 0.02 mol) in AcOH (50 mL) at -5 °C was added dropwise nitric acid 68% (1eq., 1.32 mL, 0.02 mol). After 30 min stirring at 0 °C, the reaction mixture was poured on water and the solid was filtered to afford compound **37** (2.74 g, 65%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 10.54 (br s, 1H, OH), 8.03 (d, 1H, J = 2.1 Hz, H₃), 7.53 (dd, 1H, J = 2.1 Hz and J = 8.7 Hz, H₅), 7.14 (d, 1H, J = 8.7 Hz, H₆), 3.80 (s, 2H, CH₂), 3.68 (s, 3H, Me)

IR (ν, cm⁻¹): 3350-3150 (OH), 1735 (C=O), 1530 (N-O)

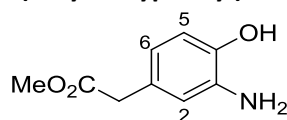
Molecular formula: C₉H₉NO₅

Molecular weight: 211.05 g/mol

Melting point: 60 °C

Aspect: Yellow solid

Methyl 2-(4-hydroxyphenyl) acetate (**38**)



Procedure:

37 (1 eq., 2.7 g, 12 mmol) was suspended in MeOH (30 mL) with Pd/C (270 mg) and heated at 60 °C for 15 min. Ammonium formiate was then added (5 eq., 3.8 g, 0.06 mol) and the reaction mixture was stirred for 30 min at this temperature. After cooling at room temperature, Pd/C was filtered off and the mixture was concentrated *in vacuo*. Oil was suspended in water and extracted three times with EtOAc. Combined organic layers were dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. Solid was suspended in petroleum ether and filtered to afford **38** (1.85 g, 85%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 10.54 (br s, 1H, OH), 6.54 (d, 1H, J = 7.8 Hz, H₅), 6.47 (d, 1H, J = 2.1 Hz, H₂), 6.25 (dd, 1H, J = 2.1 Hz and J = 7.8 Hz, H₆), 3.72 (s, 2H, CH₂), 3.56 (s, 3H, Me)

IR (ν , cm^{-1}): 1725 (C=O)

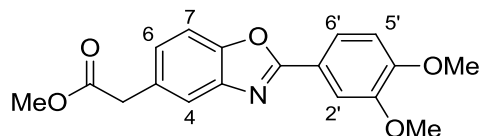
Molecular formula: $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_3$

Molecular weight: 181.07 g/mol

Melting point: 142 °C

Aspect: Beige solid

Methyl 2-[2-(3,4-dimethoxyphenyl)-1,3-benzoxazole-5-yl] acetate (39)



Procedure:

A suspension of **38** (1 eq., 1.6 g, 8.83 mmol) with T_3P (50% solution in EtOAc) (1.5 eq., 4.2 g, 13.3 mmol), 3,4-dimethoxybenzoic acid (1 eq., 1.61 g, 8.83 mmol) and DIPEA (1 eq., 1.46 mL, 8.83 mmol) was heated for a night at 120 °C, cooled to room temperature and diluted with EtOAc. Reaction mixture was washed with water, 1 M NaOH solution, dried over MgSO_4 and concentrated *in vacuo*. Solid was recrystallized from EtOH to afford compound **39** (1.59 g, 55%).

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , δ ppm, J Hz): 7.82 (dd, 1H, $J = 1.8$ Hz and $J = 8.4$ Hz, H_6'), 7.74 (d, 1H, $J = 1.8$ Hz, H_4), 7.64 (m, 1H, H_2'), 7.49 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, H_7), 7.24 (dd, 1H, $J = 1.8$ Hz and $J = 8.4$ Hz, H_6), 6.98 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, H_5'), 4.01 (s, 3H, OMe), 3.95 (s, 3H, OMe), 3.75 (s, 2H, CH_2), 3.70 (s, 3H, CO_2Me).

IR (ν , cm^{-1}): 1730 (C=O)

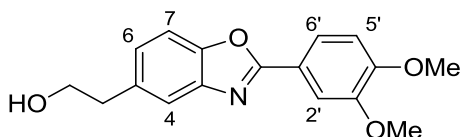
Molecular formula: $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{NO}_5$

Molecular weight: 327.11 g/mol

Melting point: 110 °C

Aspect: Beige solid

2-(2-(3,4-Dimethoxyphenyl)-1,3-benzoxazol-5-yl)ethanol (40)



Procedure:

To a solution of **39** (1 eq., 1 g, 3.06 mmol) in THF (10 mL) was added LiAlH_4 (3 eq., 340 mg, 9.2 mmol). After 1h stirring, water (0.3 mL), NaOH 1 N solution (0.3 mL) and water (1. mL) was added until get a white solid which was filtered off and washed with EtOAc. Filtrate was washed with water and aqueous layer was extracted three times with EtOAc. Combined organic layers were dried over MgSO_4 and concentrated *in vacuo*. Solid was recrystallized from acetonitrile to afford **40** (603 mg, 86%).

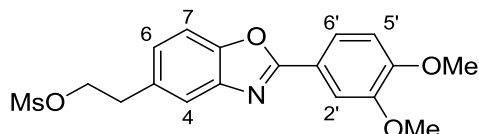
$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , δ ppm, J Hz): 9.13 (br s, 1H, OH) 7.86 (dd, 1H, $J = 1.8$ Hz and $J = 8.4$ Hz, H_6'), 7.76 (d, 1H, $J = 1.8$ Hz, H_2'), 7.61 (m, 1H, H_4), 7.50 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, H_7), 7.24 (dd, 1H, $J = 1.2$ Hz and $J = 8.4$ Hz, H_6), 7.00 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, H_5'), 4.03 (s, 3H, OMe), 3.98 (s, 3H, OMe), 3.92 (m, 2H, CH_2CH_2), 4.64 (t, 2H, $J = 6.6$ Hz, CH_2CH_2).

IR (ν , cm^{-1}): 3380-2800 (OH).

LC-MS (ESI) m/z found: 300 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Molecular formula: C₁₇H₁₇NO₄
Molecular weight: 299.32 g/mol
Melting point: 210 °C
Aspect: Beige solid

2-(2-(3,4-Dimethoxyphenyl)-1,3-benzoxazol-5-yl)ethyl methanesulfonate (41)



Procedure:

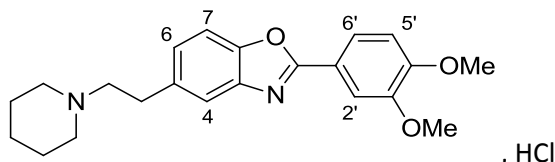
To a solution of **40** (1 eq., 800 mg, 2.37 mmol) in DCM (20 mL) with Et₃N (1.5 eq., 0.3 mL, 3.55 mmol) at 0 °C, was added dropwise mesyl chloride (1.5 eq., 0.3 mL, 3.55 mmol). After 4h stirring at room temperature, water was added and the reaction mixture was extracted twice with DCM. Combined organic layers were dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. Solid was suspended in diethyl ether and filtered to afford **41** (895 mg, 100%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 7.85 (dd, 1H, *J* = 8.4 Hz and *J* = 2.0 Hz, H₆), 7.76 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz, H₄), 7.61 (d, 1H, *J* = 1.6 Hz, H₄), 7.51 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz, H₇), 7.21 (dd, 1H, *J* = 8.3 Hz and *J* = 1.6 Hz, H₆), 7.00 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, H₅), 4.47 (t, 2H, *J* = 6.8 Hz, CH₂CH₂), 4.02 (s, 3H, OMe), 3.97 (s, 3H, OMe), 3.18 (t, 2H, *J* = 6.9 Hz, CH₂CH₂), 2.88 (s, 3H, CH₃).

LC-MS (ESI) m/z found: 378 [M+H]⁺.

Molecular formula: C₁₈H₁₉NO₆S
Molecular weight: 377.41 g/mol
Melting point: 112 °C
Aspect: Beige solid

2-(3,4-Dimethoxyphenyl)-5-(2-(piperidin-1-yl)ethyl)-1,3-benzoxazole (IVd)



Procedure:

To a solution of **41** (1 eq., 300 mg, 0.79 mmol) diluted in DMF (8 mL) were added K₂CO₃ (2 eq., 202 mg, 1.46 mmol) and piperidine (1.3 eq., 0.10 mL, 1.03 mmol). After 1 night stirring at 80 °C, the reaction mixture was cooled at room temperature, hydrolyzed with water, acidified with 1 M HCl solution and extracted with EtOAc. Aqueous layer was basified with 1 M NaOH solution and extracted three times with EtOAc. Combined organic layers were dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. Solid was suspended in diethyl ether with HCl gas, concentrated *in vacuo* and the solid was recrystallized from EtOH afford compound **IVd** (72 mg, 25%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, J Hz): 10.63 (br m, 1H, NH⁺), 7.79 (dd, 1H, *J* = 8.4 Hz and *J* = 2.0 Hz, H₆), 7.73 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz, H₇), 7.68 (d, 1H, *J* = 1.3 Hz, H₂), 7.66 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz, H₄), 7.31 (dd, 1H, *J* = 8.4 Hz and *J* = 1.7 Hz, H₆), 7.18 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz, H₅), 3.89 (s, 3H, OMe), 3.87 (s, 3H, OMe), 3.50 (m, 2H, CH₂CH₂), 3.27-3.20 (m, 4H, CH₂CH₂ and H_{piperidine}), 2.92 (m, 2H, H_{piperidine}), 1.82-1.70 (m, 5H, H_{piperidine}), 1.42 (m, 1H, H_{piperidine}).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm): 163.4 (C), 152.5 (C), 149.5 (C), 149.3 (C), 142.4 (C), 137.8 (C), 125.9 (C), 121.3 (CH), 119.2 (CH), 119.2 (CH), 112.4 (CH), 110.9 (CH), 110.2 (CH), 57.3 (CH₂), 56.2 (CH₃), 56.1 (CH₃), 52.4 (2 CH₂), 29.7 (CH₂), 22.8 (2 CH₂), 21.9 (CH₂).

LC-MS (ESI) m/z found: 367 [M+H]⁺.

HPLC: C₄ column: t_R = 16.1 min, purity 99%.

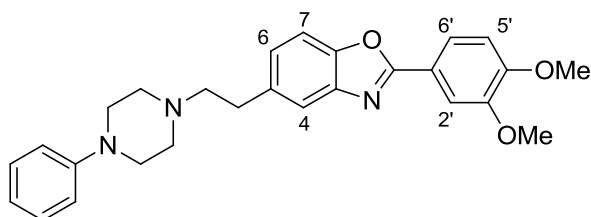
Molecular formula: C₂₂H₂₇ClN₂O₃

Molecular weight: 402.91 g/mol

Melting point: 260 °C

Aspect: Beige solid

2-(3,4-Dimethoxyphenyl)-5-[2-(4-phenylpiperazin-1-yl) ethyl]-1,3-benzoxazol (IVe)



Procedure:

The same procedure as described for the compound **IVd** starting from compound **41** (1 eq., 300 mg, 0.795 mmol) with phenylpiperazine (1.3 eq., 0.16 mL, 1.047 mmol). Final solid was recrystallized from EtOH to afford compound **IVe** (100 mg, 28%) into base form.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 7.85 (dd, 1H, J = 2.0 Hz and J = 8.4 Hz, H_{6'}), 7.76 (d, 1H, J = 2.0 Hz, H_{2'}), 7.61 (m, 1H, H₄), 7.48 (d, 1H, J = 8.4 Hz, H_{5'}), 7.31-7.26 (m, 2H, H₇ and H_{phenyl}), 7.20 (dd, 1H, J = 1.5 Hz and J = 8.3 Hz, H₆), 7.01-6.85 (m, 4H, H_{phenyl}), 4.03 (s, 3H, OMe), 3.98 (s, 3H, OMe), 3.27-3.24 (t, 4H, J = 4.8 Hz, H_{piperazine}), 3.01-2.96 (m, 2H, CH₂CH₂), 2.75-2.71 (m, 6H, CH₂CH₂ and H_{piperazine}).

¹³C NMR (CDCl₃, δ ppm): 163.4 (C), 152.0 (C), 151.3 (C), 149.4 (C), 149.2 (C), 142.5 (C), 136.9 (C), 129.1 (2 CH), 125.5 (CH), 121.1 (CH), 119.9 (C), 119.7 (CH), 119.4 (CH), 116.1 (2 CH), 111.0 (CH), 110.0 (2 CH), 60.9 (CH₂), 56.1 (CH₃), 56.0 (CH₃), 53.3 (2 CH₂), 49.2 (2 CH₂), 33.7 (CH₂).

LC-MS (ESI) m/z found: 444 [M+H]⁺.

HPLC: C₄ column: t_R = 15.7 min, purity 99%.

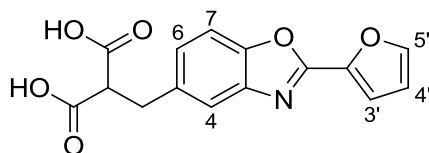
Molecular formula: C₂₇H₂₉N₃O₃

Molecular weight: 443.54 g/mol

Melting point: 140 °C

Aspect: White solid

2-((2-(Furan-2-yl)-1,3-benzoxazol-5-yl)methyl)malonique acid (42)



Procedure:

A solution of dimethyl malonate (2 eq., 1 mL, 9.06 mmol) in acetone (33 mL) with K₂CO₃ (3 eq., 1.88 g, 13.6 mmol) was stirred for 20 min at room temperature. Then **14** (1 eq., 1.26 g, 4.53 mmol) was added and the mixture was stirred at reflux for 2h, cooled at room temperature and solution was concentrated *in vacuo*. Solid was suspended in water and extracted twice with EtOAc. Combined organic layer were dried over MgSO₄ and then concentrated *in vacuo*. The solid was suspended in

H₂O (7 mL) and NaOH (4 eq., 0.725 g, 18.1 mmol) was added and left at 40 °C overnight. The mixture was extracted using EtOAc and the aqueous layer was then acidified with 6 M HCl solution up to acid pH (1-3). Formed solid was filtered to afford compound **42** (928 mg, 68%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J* Hz): 12.76 (br s, 2H, (CO₂H)₂), 8.06 (m, 1H, H_{5'}), 7.66 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, H₇), 7.62 (m, 1H, H₄), 7.43 (m, 1H, H_{3'}), 7.29 (dd, 1H, *J* = 1.6 Hz and *J* = 8.5 Hz, H₆), 6.80 (dd, 1H, *J* = 1.7 Hz and *J* = 3.5 Hz, H_{4'}), 3.66 (t, 1H, *J* = 7.5 Hz, CH), 2.59 (d, 2H, *J* = 7.4 Hz, CH₂).

IR (u, cm⁻¹): 1632 (C=O)

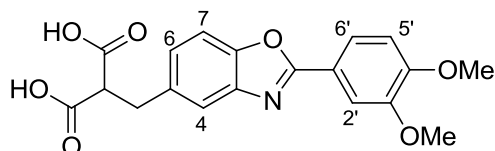
Molecular formula: C₁₅H₁₁NO₆

Molecular weight: 301.06 g/mol

Melting point: 136 °C

Aspect: White solid

2-((2-(3,4-Dimethoxyphenyl)-1,3-benzoxazol-5-yl)methyl)malonic acid (**43**)



Procedure:

The same procedure as described for the compound **42** was used starting from compound **29** (1 eq., 200 mg, 574 μmol) to afford compound **43** (155 mg, 70%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, *J* Hz): 12.79 (br s, 2H, (CO₂H)₂), 7.77 (m, 1H, H_{6'}), 7.60-7.67 (m, 3H, H₄, H_{2'} and H_{5'}), 7.25 (m, 1H, H₆), 7.17 (m, 1H, H₇), 3.88 (s, 3H, OMe), 3.86 (s, 3H, OMe), 2.65 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz, CH), 2.59 (d, 2H, *J* = 7.8 Hz, CH₂).

IR (u, cm⁻¹): 1636 (C=O)

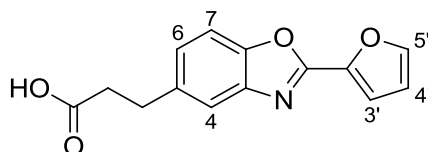
Molecular formula: C₁₉H₁₇NO₇

Molecular weight: 371.1 g/mol

Melting point: 220 °C

Aspect: White solid

3-[2-(Furan-2-yl)-1,3-benzoxazol-5-yl] propanoic acid (**44**)



Procedure:

A solution of **42** (1 eq., 240 mg, 0.797 mmol) in DMF (5 mL) was stirred at 80 °C for 3h, cooled at room temperature, hydrolyzed with water and acidified 1 M HCl solution and extracted three times with EtOAc. Combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. Solid was suspended in diethyl ether and filtered to afford compound **44** (130 mg, 63%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, *J* Hz): 12.19 (br s, 1H, OH), 8.05 (m, 1H, H_{5'}), 7.66-7.62 (m, 2H, H₆ and H₄), 7.42 (d, 1H, *J* = 3.5 Hz, H_{3'}), 7.28 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz, H₇), 6.79 (m, 1H, H_{4'}), 2.94 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz, CH₂CH₂), 2.59 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz, CH₂CH₂).

IR (u, cm⁻¹): 1686 (C=O).

LC-MS (ESI) m/z found: 258 $[M+H]^+$.

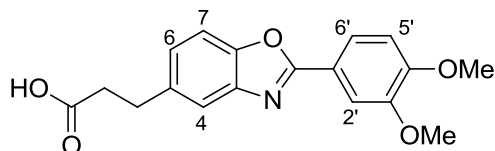
Molecular formula: $C_{14}H_{11}NO_4$

Molecular weight: 257.24 g/mol

Melting point: 207 °C

Aspect: White solid

3-[2-(3,4-Dimethoxyphenyl)-1,3-benzoxazole-5-yl] propanoic acid (45)



Procedure:

Same procedure as described for the compound **44** starting from compound **43** (1 eq., 240 mg, 646 mmol) was used to afford compound **45** (131 mg, 62%).

1H NMR ($CDCl_3$, δ ppm, J Hz): 12.14 (br s, 1H, OH), 7.77 (dd, 1H, $J = 2.0$ Hz and $J = 8.4$ Hz, $H_{6'}$), 7.67-7.60 (m, 3H, H_4 , $H_{2'}$ and $H_{5'}$), 7.25 (dd, 1H, $J = 1.6$ Hz and $J = 8.3$ Hz, H_6), 7.17 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz, H_7), 3.88 (s, 3H, OMe), 3.86 (s, 3H, OMe), 2.94 (t, 2H, $J = 7.7$ Hz, CH_2CH_2), 2.59 (t, 2H, $J = 7.7$ Hz, CH_2CH_2).

IR (ν , cm^{-1}): 1710 (C=O)

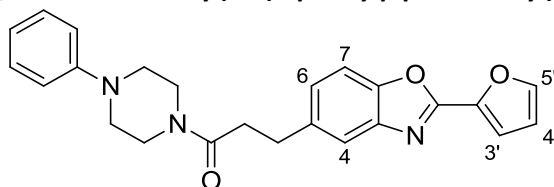
Molecular formula: $C_{18}H_{17}NO_5$

Molecular weight: 327.33 g/mol

Melting point: 182 °C

Aspect: White solid

3-(2-(Furan-2-yl)-1,3-benzoxazol-5-yl)-1-(4-phenylpiperazin-1-yl)propan-1-one (46a)



Procedure:

Same procedure as described for compound **36a** was used, starting from acid compound **44** (1 eq., 360 mg, 1.40 mmol) with phenylpiperazine (1.2 eq., 0.27 mL, 1.75 mmol) to afford compound **46a** (310 mg, 55%).

1H NMR ($CDCl_3$, δ ppm, J Hz): 7.66 (m, 1H, $H_{5'}$), 7.58 (m, 1H, $H_{3'}$), 7.48 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz, H_7), 7.29-7.23 (m, 4H, H_{phenyl}), 6.91-6.87 (m, 3H, H_4 , H_6 and H_{phenyl}), 6.62 (dd, 1H, $J = 1.7$ Hz and $J = 3.5$ Hz, $H_{4'}$), 3.57 (m, 2H, $J = 5.7$ Hz, $H_{piperazine}$), 3.55 (m, 2H, $H_{piperazine}$), 3.17-3.11 (m, 4H, CH_2CH_2 and $H_{piperazine}$), 3.04 (m, 2H, $H_{piperazine}$), 2.73 (t, 2H, $J = 7.7$ Hz, CH_2CH_2).

IR (ν , cm^{-1}): 1658 (C=O)

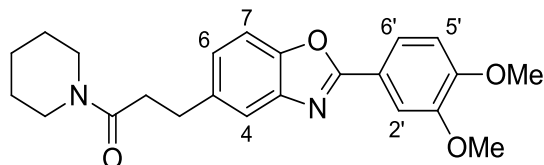
Molecular formula: $C_{24}H_{23}N_3O_3$

Molecular weight: 401.46 g/mol

Melting point: 164 °C

Aspect: Beige solid

3-[2-(3,4-Dimethoxyphenyl)-1,3-benzoxazole-5-yl]-1-(piperidin-1-yl)propan-1-one (46b)



Procedure:

Same procedure as described for compound **36a** was used, starting from acid compound **45** (1 eq., 250 mg, 0.764 mmol) with piperidine (1.0 eq., 0.07 mL, 0.763 mmol) to afford compound **46b** (200 mg, 66%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 7.85 (dd, 1H, *J* = 1.9 Hz and *J* = 8.4 Hz, H_{6'}), 7.75 (d, 1H, *J* = 1.9 Hz, H_{2'}), 7.56 (m, 1H, H₄), 7.58 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, H₇), 7.21 (dd, 1H, *J* = 1.5 Hz and *J* = 8.1 Hz, H₆), 7.17 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, H₇), 4.02 (s, 3H, OMe), 3.97 (s, 3H, OMe), 3.57 (t, 2H, *J* = 5.6 Hz, CH₂CH₂), 3.35 (t, 2H, *J* = 5.6 Hz, H_{piperidine}), 3.10 (t, 2H, *J* = 7.7 Hz, CH₂CH₂), 2.67 (t, 2H, *J* = 7.7 Hz, CH₂CH₂), 1.68-1.47 (m, 6H, H_{piperidine}).

IR (u, cm⁻¹): 1625 (C=O)

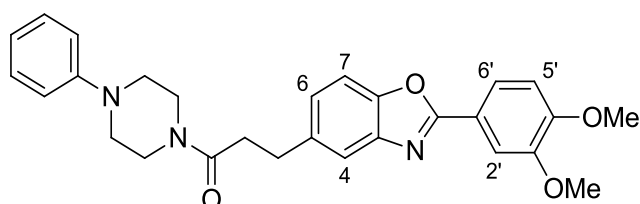
Molecular formula: C₂₃H₂₆N₂O₄

Molecular weight: 394.46 g/mol

Melting point: 130 °C

Aspect: White solid

3-(2-(3,4-Dimethoxyphenyl)-1,3-benzoxazol-5-yl)-1-(4-phenylpiperazin-1-yl)propan-1-one (46c)



Procedure:

Same procedure as described for compound **36a** was used, starting from acid compound **45** (1 eq., 250 mg, 0.763 mmol) with phenylpiperazine (1.0 eq., 0.12 mL, 0.763 mmol) to afford compound **46c** (195 mg, 54%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 7.85 (dd, 1H, *J* = 2.0 Hz and *J* = 8.5 Hz, H_{6'}), 7.75 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz, H_{2'}), 7.60 (d, 1H, *J* = 1.2 Hz, H₄), 7.47 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz, H₇), 7.28-7.20 (m, 3H, H₆ and H_{phenyl}), 6.99 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, H_{5'}), 6.87-6.82 (m, 3H, H_{phenyl}), 4.02 (s, 3H, OMe), 3.98 (s, 3H, OMe), 3.79 (m, 2H, H_{piperazine}), 3.55 (m, 2H, H_{piperazine}), 3.16-3.11 (m, 4H, CH₂CH₂ and H_{piperazine}), 3.03 (m, 2H, H_{piperazine}), 2.74 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, CH₂CH₂).

IR (u, cm⁻¹): 1639 (C=O)

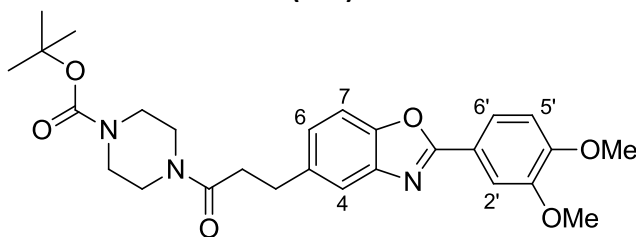
Molecular formula: C₂₈H₂₉N₃O₄

Molecular weight: 471.55 g/mol

Melting point: 160 °C

Aspect: White solid

tert-Butyl 4-(3-(2-(3,4-Dimethoxyphenyl)-1,3-benzoxazol-5-yl)propanoyl)piperazine-1-carboxylate (46d)



Procedure:

Same procedure as described for compound **36a** was used, starting from acid compound **45** (1 eq., 850 mg, 2.6 mmol) with boc-piperazine (1.0 eq., 484 mg, 2.60 mmol) to afford compound **46d** (849 mg, 66%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 7.84 (dd, 1H, *J* = 2.0 Hz and *J* = 8.4 Hz, H_{6'}), 7.57 (d, 1H, *J* = 1.5 Hz, H₄), 7.50 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz, H_{2'}), 7.47 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, H₇), 7.25 (dd, 1H, *J* = 1.5 Hz and *J* = 8.4 Hz, H₆), 7.00 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, H_{5'}), 4.02 (s, 3H, OMe), 3.97 (s, 3H, OMe), 3.60 (m, 2H, H_{piperazine}), 3.37 (m, 6H, H_{piperazine}), 3.10 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz, CH₂CH₂), 2.70 (t, 2H, *J* = 8.1 Hz, CH₂CH₂), 1.45 (s, 9H, 3 CH₃).

IR (ν, cm⁻¹): 1685- 1625 (C=O)

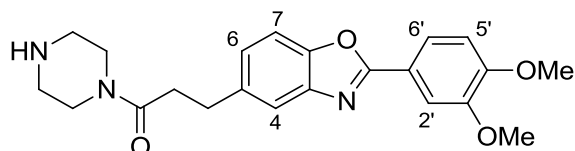
Molecular formula: C₂₇H₃₃N₃O₆

Molecular weight: 495.57 g/mol

Melting point: 148 °C

Aspect: White solid

3-[2-(3,4-Dimethoxyphenyl)-1,3-benzoxazol-5-yl]-1-(piperazin-1-yl)propan-1-one hydrochloride (46e)



Procedure:

To a solution **46d** (1 eq., 450 mg, 0.908 mmol) in DCM (30 mL), was added TFA (5 eq., 0.34 mL, 4.54 mmol). The reaction mixture was stirred at 50 °C for 2 days, hydrolyzed with 1 M NaOH solution up to basic pH (12-13) and extracted three times with DCM. Combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. Solid was suspended in diethyl ether with HCl gas and filtered to afford compound **46e** (213 mg, 60%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 9.50 (2H, NH₂⁺), 7.76 (dd, 1H, *J* = 1.9 Hz and *J* = 8.4 Hz, H_{6'}), 7.65-7.62 (m, 3H, H₄, H_{4'}, and H₇), 7.25 (dd, 1H, *J* = 1.5 Hz and *J* = 8.4 Hz, H₆), 7.16 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, H₇), 3.88 (s, 3H, OMe), 3.85 (s, 3H, OMe), 3.68 (t, 4H, H_{piperazine}, *J* = 4.7 Hz), 3.01 (t, 4H, H_{piperazine}, *J* = 4.7 Hz), 2.92 (t, 2H, CH₂CH₂, *J* = 7.8 Hz), 2.73 (t, 2H, CH₂CH₂, *J* = 7.0 Hz).

LC-MS (ESI) m/z found: 396[M+H]⁺.

IR (ν, cm⁻¹): 1620 (C=O)

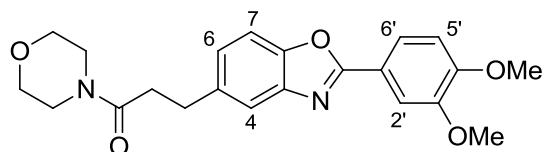
Molecular formula: C₂₂H₂₆ClN₃O₄

Molecular weight: 395.45 g/mol

Melting point: 206 °C

Aspect: Wight solid

3-(2-(3,4-Dimethoxyphenyl)-1,3-benzoxazol-5-yl)-1-morpholinopropan-1-one (46f)



Procedure:

Same procedure as described for compound **36a** was used, starting from acid compound **45** (1 eq., 350 mg, 1.44 mmol) with morpholine (1.1 eq., 0.14 mL, 1.44 mmol) to afford compound **46f** (255 mg, 57%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 7.83 (dd, 1H, *J* = 2.0 Hz and *J* = 8.4 Hz, H_{6'}), 7.74 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz, H_{2'}), 7.56 (m, 1H, H₄), 7.46 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, H_{5'}), 7.18 (dd, 1H, *J* = 1.7 Hz and *J* = 8.3 Hz, H₆), 6.98 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz, H₇), 4.01 (s, 3H, OMe), 3.96 (s, 3H, OMe), 3.63 (m, 4H, H_{morpholine}), 3.51 (m, 2H, H_{morpholine}), 3.38 (m, 2H, H_{morpholine}), 3.11 (t, 2H, *J* = 7.6 Hz, CH₂CH₂), 2.67 (t, 2H, *J* = 7.6 Hz, CH₂CH₂).

IR (ν, cm⁻¹): 1640 (C=O)

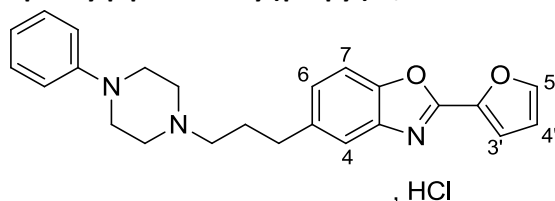
Molecular formula: C₂₂H₂₄N₂O₅

Molecular weight: 396.44 g/mol

Melting point: 163 °C

Aspect: Purple solid

2-(Furan-2-yl)-5-(3-(4-phenylpiperazin-1-yl)propyl)-1,3-benzoxazole hydrochloride (Va)



Procedure:

Same procedure as described for compound **IVa** was used, starting from compound **46a** (1 eq., 360 mg, 0.897 mmol) with LiAlH₄ (4 eq., 101 mg, 2.66 mmol). Final solid was recrystallized from acetonitrile to afford **Va** (200 mg, 12%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, J Hz): 11.00 (br s, 1H, NH⁺), 8.07 (m, 1H, H_{5'}), 7.71-7.67 (m, 2H, H₄ and H_{3'}), 7.44 (m, 1H, H₆), 7.32-7.24 (m, 3H, H₇ and H_{phenyl}), 6.98 (m, 2H, H_{phenyl}), 6.81 (m, 2H, H_{phenyl} and H_{4'}), 3.76 (m, 2H), 3.57 (m, 2H), 3.12 (m, 6H), 2.80 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂), 2.14 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm): 155.3 (C), 150.1 (C), 148.7 (C), 147.6 (CH), 142.0 (C), 141.9 (C), 138.3 (C), 129.6 (2 CH), 126.9 (CH), 120.4 (CH), 119.6 (CH), 116.4 (2 CH), 115.5 (CH), 113.3 (CH), 111.0 (CH), 55.5 (CH₂), 51.1 (2 CH₂), 45.9 (2 CH₂), 32.4 (CH₂), 25.6 (CH₂).

LC-MS (ESI) m/z found: 388 [M+H]⁺.

HPLC: C₄ column: t_R = 15.8 min, purity 98%.

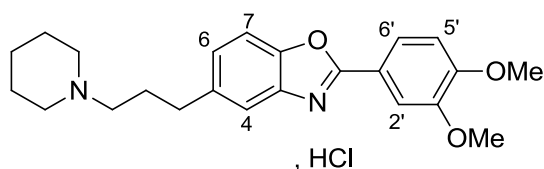
Molecular formula: C₂₄H₂₆ClN₃O₂

Molecular weight: 423.94 g/mol

Melting point: 227 °C

Aspect: White solid

2-(3,4-Dimethoxyphenyl)-5-[3-(piperidin-1-yl)propyl]-1,3-benzoxazole hydrochloride (Vb)



Procedure:

Same procedure as described for compound **IVa** was used, starting from compound **46b** (1 eq., 200 mg, 0.507 mmol) with LiAlH₄ (4 eq., 77 mg, 2.03 mmol). Final solid was recrystallized from EtOAc to afford **Vb** (139 mg, 72%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J* Hz): 10.20 (br s, 1H, NH⁺), 7.77 (dd, 1H, *J* = 2.0 Hz and *J* = 8.4 Hz, H_{6'}), 7.68 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, H_{5'}), 7.66-7.63 (m, 2H, H_{2'} and H₄), 7.21 (dd, 1H, *J* = 1.5 Hz and *J* = 8.3 Hz, H₆), 7.17 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz, H₇), 3.88 (s, 3H, OMe), 3.86 (s, 3H, OMe), 3.38 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂), 2.99 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂), 2.76 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂), 2.08 (m, 4H, H_{piperidine}), 1.75-1.65 (m, 5H, H_{piperidine}), 1.35 (m, 1H, H_{piperidine}).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm): 163.2 (C), 152.5 (C), 149.5 (C), 149.3 (C), 142.4 (C), 137.8 (C), 125.9 (C), 121.3 (CH), 119.2 (CH), 119.2 (CH), 112.4 (CH), 110.9 (CH), 110.2 (CH), 56.2 (CH₃), 56.1 (CH₃), 55.9 (CH₂), 52.4 (2 CH₂), 32.5 (CH₂), 25.6 (CH₂), 22.9 (2 CH₂), 21.9 (CH₂).

LC-MS (ESI) m/z found: 381 [M+H]⁺.

HPLC: C₄ column: t_R = 17.3 min, purity 98%.

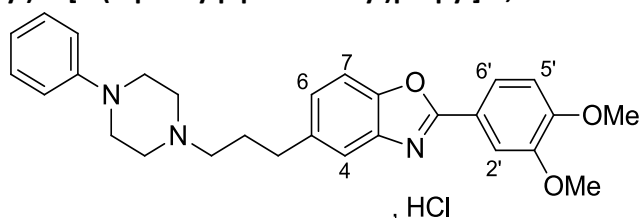
Molecular formula: C₂₃H₂₉ClN₂O₃

Molecular weight: 416.94 g/mol

Melting point: 214 °C

Aspect: White solid

2-(3,4-Dimethoxyphenyl)-5-[3-(4-phenylpiperazin-1-yl)propyl]-1,3-benzoxazole hydrochloride (Vc)



Procedure:

Same procedure as described for compound **IVa** was used, starting from compound **46c** (1 eq., 210 mg, 0.44 mmol) with LiAlH₄ (3 eq., 51 mg, 1.34 mmol). Final solid was recrystallized from EtOH to afford compound **Vc** (155 mg, 73%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J* Hz): 10.81 (br s, 1H, NH⁺), 7.77 (dd, 1H, *J* = 1.8 Hz and *J* = 8.4 Hz, H_{6'}), 7.65-7.70 (m, 3H, H₄, H₆ and H₇), 7.29-7.22 (m, 3H, H_{2'} and H_{phenyl}), 7.17 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, H_{5'}), 6.98 (m, 2H, H_{phenyl}), 6.87-6.82 (m, 1H, H_{phenyl}), 3.88 (s, 3H, OMe), 3.86 (s, 3H, OMe), 3.77 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂), 3.56 (m, 2H, H_{piperazine}), 3.11 (m, 6H, H_{piperazine}), 2.79 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, CH₂CH₂CH₂), 2.13 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm): 163.2 (C), 152.5 (C), 150.1 (C), 149.5 (C), 149.3 (C), 142.4 (C), 137.8 (C), 129.6 (2 CH), 125.9 (CH), 121.3 (CH), 120.4 (C), 119.3 (CH), 119.2 (CH), 116.4 (2 CH), 112.4 (CH), 110.9 (CH), 110.2 (CH), 56.2 (CH₂), 56.1 (CH₃), 55.5 (CH₃), 51.1 (2 CH₂), 45.9 (2 CH₂), 32.5 (CH₂), 25.7 (CH₂).

LC-MS (ESI) m/z found: 458 [M+H]⁺.

HPLC: C₄ column: t_R = 16.6 min, purity 99%.

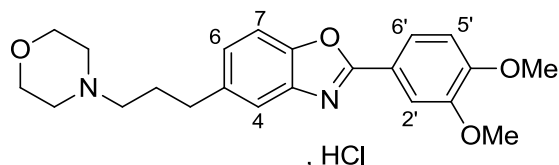
Molecular formula: C₂₈H₃₂N₃O₃Cl

Molecular weight: 494.02 g/mol

Melting point: 194 °C

Aspect: White solid

2-(3,4-Dimethoxyphenyl)-5-(3-morpholinopropyl)-1,3-benzoxazole hydrochloride (Vd)



Procedure:

Same procedure as described for compound **IVa** was used, starting from compound **46f** (1 eq., 204 mg, 0.51 mmol) with LiAlH₄ (3 eq., 59 mg, 1.54 mmol). Final solid was recrystallized from EtOAc to afford compound **Vd** (130 mg, 60%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J* Hz): 10.81 (br s, 1H, NH), 7.77 (dd, 1H, H_{6'}, *J* = 1.8 Hz and *J* = 8.4 Hz), 7.68 (d, 1H, H_{5'}, *J* = 8.4 Hz), 7.65-7.63 (m, 2H, H_{2'} and H₄), 7.26 (dd, 1H, H₆, *J* = 1.4 Hz and *J* = 8.6 Hz), 7.17 (d, 1H, H₇, *J* = 8.6 Hz), 3.94-3.83 (m, 4H, H_{morpholine}), 3.88 (s, 3H, OMe), 3.85 (s, 3H, OMe), 3.40 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂), 3.07-2.99 (m, 4H, H_{morpholine}), 2.77 (t, 2H, CH₂CH₂CH₂, *J* = 7.4 Hz), 2.09 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm): 163.2 (C), 152.5 (C), 149.5 (C), 149.3 (C), 142.4 (C), 137.8 (C), 125.9 (CH), 121.2 (CH), 119.3 (CH), 119.2 (C), 112.4 (CH), 110.9 (CH), 110.2 (CH), 63.6 (2 CH₂), 56.2 (CH₃), 56.1 (CH₃), 55.9 (CH₂), 51.4 (2 CH₂), 32.4 (CH₂), 25.3 (CH₂).

LC-MS (ESI) m/z found: 383 [M+H]⁺.

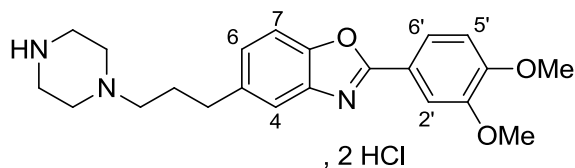
Molecular formula: C₂₂H₂₇N₂O₄Cl

Molecular weight: 418.17 g/mol

Melting point: 108 °C

Aspect: White solid

2-(3,4-Dimethoxyphenyl)-5-(3-(piperazin-1-yl)propyl)-1,3-benzoxazole dihydrochloride (Ve)



Procedure:

Same procedure as described for compound **IVa** was used, starting from compound **46e** (1 eq., 250 mg, 0.63 mmol) with LiAlH₄ (3 eq., 72 mg, 1.54 mmol). Final solid was recrystallized from EtOH to afford compound **Ve** (115 mg, 48%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J* Hz): 11.89 (br s, 1H, NH⁺), 9.71 (br s, 2H, NH₂⁺), 7.77 (dd, 1H, *J* = 1.8 Hz and *J* = 8.4 Hz, H_{6'}), 7.67 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, H_{5'}), 7.66-7.63 (m, 2H, H_{2'} and H₄), 7.26 (m, 1H, H₆), 7.17 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz, H₇), 3.88 (s, 3H, OMe), 3.85 (s, 3H, OMe), 3.66-3.13 (m, 10H, CH₂CH₂CH₂ and H_{piperazine}), 2.78 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz, CH₂CH₂CH₂), 2.09 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂).

LC-MS (ESI) m/z found: 383 [M+H]⁺.

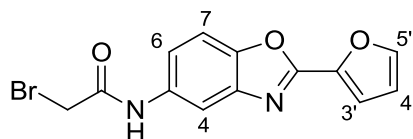
Molecular formula: C₂₂H₂₉Cl₂N₃O₃

Molecular weight: 453.16 g/mol

Melting point: 242 °C

Aspect: White solid

2-Bromo-N-(2-(furan-2-yl)-1,3-benzoxazol-5-yl)acetamide (47)



Procedure:

To a solution of **21** (1 eq., 210 mg, 1.05 mmol) with Et₃N (1.2 eq., 0.18 mL, 1.26 mmol) in DCM (10 mL) at 0 °C was added dropwise bromoacetyl bromide (1.2 eq., 0.11 mL, 1.26 mmol) diluted in DCM (5 mL). The reaction mixture was stirred at 25 °C for 2h, hydrolyzed with water and extracted twice with DCM. Combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. Solid was suspended in diethyl ether and filtered to afford compound **47** (249 mg, 74%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8.27 (br s, 1H, NH), 7.96 (m, 1H, H_{5'}), 7.70-7.69 (m, 1H, H₄), 7.56-7.50 (m, 2H, H₇ and H₆), 7.30 (dd, 1H, J = 0.7 Hz and J = 3.5 Hz, H_{3'}), 6.39 (dd, 1H, J = 1.7 Hz and J = 3.5 Hz, H_{4'}), 4.08 (s, 2H, CH₂).

IR (ν, cm⁻¹): 3246 (NH), 1643 (C=O)

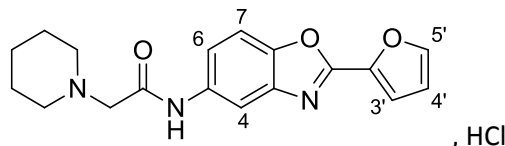
Molecular formula: C₁₃H₉BrN₂O₃

Molecular weight: 321.13 g/mol

Melting point: 206 °C

Aspect: White solid

N-[2-(Furan-2-yl)-1,3-benzoxazol-5-yl]-2-(piperidin-1-yl)acetamide hydrochloride (VIa)



Procedure:

To a solution of **47** (1 eq., 190 mg, 0.59 mmol) in acetone (5 mL) was added piperidine (1.1 eq., 0.06 mL, 0.651 mmol) and K₂CO₃ (1.5 eq., 122 mg, 0.89 mmol). The reaction mixture was refluxed for 2h, cooled to room temperature and concentrated *in vacuo*. The crude was suspended in water and extracted three times with EtOAc. Combined organic layer were washed with brine, dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. Solid was suspended in diethyl ether with HCl gas, concentrated *in vacuo* and recrystallized from EtOH to afford compound **VIa** (110 mg, 57%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, J Hz): 11.26 (br s, 1H, NH⁺), 9.99 (br s, 1H, NH), 8.17 (m, 1H, H_{5'}), 8.08 (m, 1H, H₄), 7.76 (d, 1H, J = 8.8 Hz, H₇), 7.58 (dd, 1H, J = 1.9 Hz and J = 8.8 Hz, H₆), 7.46 (d, 1H, J = 3.5 Hz, H_{3'}), 6.82 (dd, 1H, J = 1.7 Hz and J = 3.5 Hz, H_{4'}), 4.18 (s, 2H, CH₂), 3.50-3.47 (m, 2H, H_{piperidine}), 3.10 (m, 2H, H_{piperidine}), 1.80-1.67 (m, 5H, H_{piperidine}), 1.40 (m, 1H, H_{piperidine}).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm): 163.4 (C), 156.0 (C), 147.7 (CH), 146.6 (C), 141.9 (C), 141.8 (C), 135.9 (C), 118.2 (CH), 115.8 (CH), 113.3 (CH), 111.4 (CH), 110.8 (CH), 57.6 (CH₂), 53.4 (2 CH₂), 22.7 (2 CH₂), 21.6 (CH₂).

LC-MS (ESI) m/z found: 326 [M+H]⁺.

HPLC: C₄ column: t_R = 15.1 min, purity 98%.

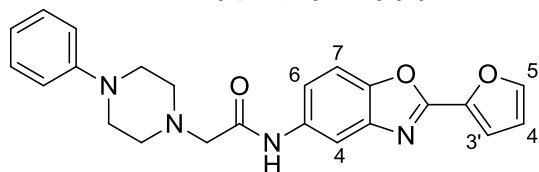
Molecular formula: C₁₈H₂₀ClN₃O₃

Molecular weight: 361.82 g/mol

Melting point: >300 °C

Aspect: White solid

***N*-[2-(Furan-2-yl)-1,3-benzoxazol-5-yl]-2-(4-phenylpiperazin-1-yl)acetamide (VIb)**



Procedure:

Same procedure as described for the compound **VIa** was used starting from compound **47** (1 eq., 500 mg, 1.55 mmol) with phenylpiperazine (1.1 eq., 0.26 mL, 1.71 mmol). Final solid was recrystallized from acetonitrile to afford **VIb** (300 mg, 48%) into base form.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz) : 9.26 (br s, 1H, NH), 8.02 (m, 1H, H₄), 7.68-7.67 (m, 1H, H_{5'}), 7.56 (dd, 1H, *J* = 2.0 Hz and *J* = 8.8 Hz, H₆), 7.51 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz, H₇), 7.3-7.29 (m, 3H, H_{phenyl} and H_{3'}), 6.98-6.88 (m, 3H, H_{phenyl}), 6.63 (dd, 1H, *J* = 1.7 Hz and *J* = 3.5 Hz, H_{4'}), 3.30 (t, 4H, *J* = 4.9 Hz, H_{piperazine}), 3.26 (s, 2H, CH₂), 2.83 (t, 4H, *J* = 4.9 Hz, H_{piperazine}).

¹³C NMR (CDCl₃, δ ppm): 168.2 (C), 156.2 (C), 152.9 (C), 146.9 (C), 145.8 (CH), 142.5 (C), 142.2 (C), 134.9 (C), 129.2 (2 CH), 120.2 (CH), 117.8 (CH), 116.3 (2 CH), 114.5 (CH), 112.3 (CH), 111.2 (CH), 110.5 (CH), 62.0 (CH₂), 50.6 (2 CH₂), 49.5 (2 CH₂).

LC-MS (ESI) m/z found: 403 [M+H]⁺.

HPLC: C₄ column: t_R = 14.7 min, purity >99%.

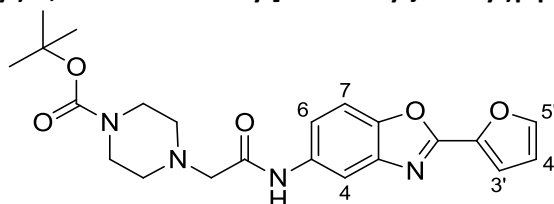
Molecular formula: C₂₃H₂₂N₄O₃

Molecular weight: 402.45 g/mol

Melting point: 174 °C

Aspect: White solid

***tert*-Butyl 4-({[2-(furan-2-yl)-1,3-benzoxazol-5-yl]carbamoyl}methyl)piperazine-1-carboxylate (VIc)**



Procedure:

Same procedure as described for the compound **VIa** was used starting from compound **47** (1 eq., 500 mg, 1.55 mmol) with boc-piperazine (1.1 eq., 319 mg, 1.71 mmol). Final solid was recrystallized from EtOH to afford **VIc** (600 mg, 90%) into base form.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 9.15 (br s, 1H, NH), 7.98 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz, H₄), 7.68-7.67 (m, 1H, H_{5'}), 7.55 (dd, 1H, *J* = 2.0 Hz and *J* = 8.6 Hz, H₆), 7.50 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz, H₇), 7.28 (m, 1H, H_{3'}), 6.62 (dd, 1H, *J* = 1.7 Hz and *J* = 3.5 Hz, H_{4'}), 3.54 (t, 4H, *J* = 4.9 Hz, H_{piperazine}), 3.19 (s, 2H, CH₂), 2.60 (t, 4H, *J* = 4.9 Hz, H_{piperazine}), 1.48 (s, 9H, 3 CH₃).

¹³C NMR (CDCl₃, δ ppm): 167.9 (C), 156.2 (C), 154.6 (C), 147.0 (C), 145.9 (CH), 142.5 (C), 142.2 (C), 134.8 (C), 117.8 (CH), 114.5 (CH), 112.3 (CH), 111.2 (CH), 110.5 (CH), 80.1 (CH₂), 62.1 (2 CH₂), 53.3 (2 CH₂), 28.4 (3 CH₃).

LC-MS (ESI) m/z found: 371 [M-tBu+H]⁺, 427 [M+H]⁺.

HPLC: C₄ column: t_R = 15.1 min, purity 99%.

IR (ν , cm^{-1}): 1684-1673 (C=O)

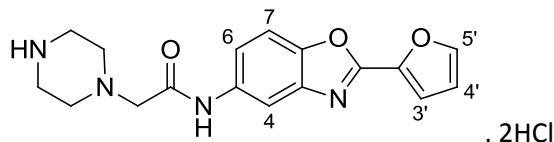
Molecular formula: $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_5$

Molecular weight: 426.47 g/mol

Melting point: 186 °C

Aspect: White solid

2-(4-Chloropiperazin-1-yl)-N-[2-(furan-2-yl)-1,3-benzoxazol-5-yl]acetamide dihydrochloride (VIId)



Procedure:

A solution of **VIc** (1 eq., 180 mg, 0.422 mmol) in MeOH (10 mL) with HCl (5 eq., 6N, 0.35 mL, 2.11 mmol) was stirred at 40 °C for 1 night. The precipitated product was filtered and washed with diethyl ether to afford compound **VIId** (121 mg, 72%).

^1H NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J Hz): 11.16 (br s, 1H, NH), 9.88 (br s, 2H, NH_2^+), 8.16 (d, 1H, $J = 1.8$ Hz, H_4), 8.07 (m, 1H, $\text{H}_{5'}$), 7.75 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz, H_7), 7.59 (dd, 1H, $J = 1.8$ Hz and $J = 8.8$ Hz, H_6), 7.45-7.44 (m, 1H, $\text{H}_{3'}$), 6.81 (dd, 1H, $J = 1.7$ Hz and $J = 3.5$ Hz, $\text{H}_{4'}$), 4.22 (s, 2H, CH_2), 3.57 (s, 4H, $J = 4.9$ Hz, $\text{H}_{\text{piperazine}}$), 3.43 (s, 4H, $J = 4.9$ Hz, $\text{H}_{\text{piperazine}}$).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ ppm): 163.7 (C), 155.9 (C), 147.7 (CH), 146.5 (C), 141.9 (C), 141.8 (C), 135.9 (C), 118.2 (CH), 115.7 (CH), 113.3 (CH), 111.4 (CH), 110.8 (CH), 57.6 (CH_2), 49.1 (4 CH_2).

LC-MS (ESI) m/z found: 327 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

HPLC: C_4 column: $t_R = 14.9$ min, purity 99%.

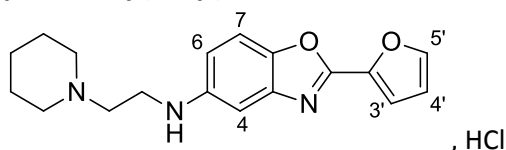
Molecular formula: $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_3$

Molecular weight: 399.27g/mol

Melting point: 192 °C

Aspect: White solid

2-(Furan-2-yl)-N-(2-(piperidin-1-yl)ethyl)-1,3-benzoxazol-5-amine hydrochloride (VIIa)



Procedure:

To a solution of **21** (1 eq., 800 mg, 4 mmol) in DMF (16 mL) was added K_2CO_3 (3 eq., 1.7 g, 12 mmol), KI (0.66 eq., 437 mg, 2.64 mmol) and *N*-2-chloroethyl piperidine hydrochloride (2 eq., 1.47 g, 7.99 mmol). The mixture was stirred at 70 °C for a night and *N*-2-chloroethyl piperidine hydrochloride (2 eq., 1.47 g, 7.99 mmol) was added again. After one more night at 70 °C, the reaction mixture was cooled to room temperature, hydrolyzed with water and extracted three times with EtOAc. Combined organic layer were dried over MgSO_4 and concentrated *in vacuo*. Purification by chromatographie was performed with DCM/EtOH/ NH_3 (90/10/1) as solvent. Yellow oil was suspended in diethyl ether with HCl gas and filtered to afford compound **VIIa** (11 mg, 8%).

^1H NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J Hz): 10.69 (br m, 1H, NH^+), 8.04 (m, 1H, $\text{H}_{5'}$), 7.55 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz, H_7), 7.38 (m, 1H, $\text{H}_{3'}$), 7.09 (m, 1H, H_4), 6.88 (dd, 1H, $J = 1.9$ Hz and $J = 8.8$ Hz, H_6), 6.79 (dd, 1H, $J = 1.7$ Hz

and $J = 3.5$ Hz, H_4'), 5.37 (br m, 1H, NH), 3.57 (t, 2H, $J = 6.3$ Hz, CH_2CH_2), 3.49-3.46 (m, 2H, $H_{\text{piperidine}}$), 3.24 (t, 2H, $J = 6.2$ Hz, CH_2CH_2), 2.90 (m, 2H, $H_{\text{piperidine}}$), 1.79 (m, 5H, $H_{\text{piperidine}}$), 1.39 (m, 1H, $H_{\text{piperidine}}$).
 ^{13}C NMR (DMSO, δ ppm): 155.3 (C), 147.2 (CH), 145.0 (C), 143.6 (C), 142.7 (C), 124.3 (C), 114.9 (CH), 114.1 (CH), 113.2 (CH), 111.5 (CH), 102.6 (CH), 54.5 (CH_2), 52.7 (2 CH_2), 39.2 (CH_2), 22.8 (2 CH_2), 21.8 (CH_2).

LC-MS (ESI) m/z found: 312 $[M+H]^+$.

HPLC: C_4 column: $t_R = 15.9$ min, purity 99%.

Molecular formula: $C_{18}H_{22}N_3O_2Cl$

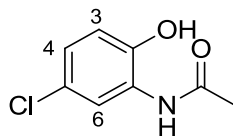
Molecular weight: 347.14 g/mol

Melting point: 212 °C

Aspect: Brown solid

2- Synthesis of benzoxazoles (Chap.2, 2nd part)

N-(5-Chloro-2-hydroxyphenyl)acetamide (**48**)



Procedure:

To a solution of 5-chloro-2-hydroxyaniline (1 eq., 14 g, 97.5 mmol) in EtOAc (100 mL) at 0 °C was added dropwise Ac₂O (2.3 eq., 21 mL, 224 mmol). Reaction mixture was stirred for 2h at room temperature, hydrolyzed with cold water and extracted three times with EtOAc. Combined organic layers were washed with 1 M HCl solution, dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. Red solid was suspended in diethyl ether and filtered to afford **48** (13.8 g, 77%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J* Hz): 10.10 (br s, 1H, NH), 9.26 (br s, 1H, OH), 7.95 (d, 1H, *J* = 3.0 Hz, H₆), 6.94 (dd, 1H, *J* = 9.0 Hz and *J* = 3.0 Hz, H₄), 6.85 (d, 1H, *J* = 9.0 Hz, H₃), 2.10 (s, 3H, CH₃).

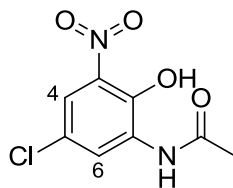
Molecular formula: C₈H₈NO₂Cl

Molecular weight: 185.61 g/mol

Melting point: 183 °C

Aspect: beige solid

N-(5-Chloro-2-hydroxy-3-nitrophenyl)acetamide (**49**)



Procedure:

A suspension of **48** (1 eq., 13.9 g, 74.8 mmol) in H₂O (160 mL) with a solution of HNO₃ at 69% (1.5 eq., 7.3 mL, 112 mmol) was stirred during 10 min at 0 °C before adding dropwise concentrated H₂SO₄ (35 mL). After one night stirring at room temperature, cold water was added and the brown solid formed was filtered, washed twice with water and dried at 60 °C in the oven for 48h to afford **49** (10.2 g, 84%).

¹H NMR (acetone-*d*₆, δ ppm, *J* Hz): 10.84 (br s, 1H, NH), 9.13 (br s, 1H, OH), 8.65 (d, 1H, *J* = 2.7 Hz, H₆), 7.78 (d, 1H, *J* = 2.7 Hz, H₄), 2.25 (s, 3H, CH₃).

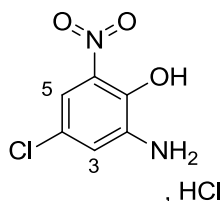
Molecular formula: C₈H₇ClN₂O₄

Molecular weight: 230.61 g/mol

Melting point: 154 °C

Aspect: orange-yellow solid

2-Amino-4-chloro-6-nitrophenol hydrochloride (50)



Procedure:

A suspension of **49** (1 eq., 10.2 g, 44.2 mmol) in 12 N HCl solution (30 mL) was refluxed for 2h until solid was diluted. Mixture was cooled to room temperature and concentrated *in vacuo*. Formed solid was suspended in acetonitrile and filtered to afford **50** (9.38 g, 94%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J* Hz): 8.70 (br m, 4H, NH₃ and OH), 7.24 (d, 1H, *J* = 2.7 Hz, H₅), 7.09 (d, 1H, H₃, *J* = 2.7 Hz).

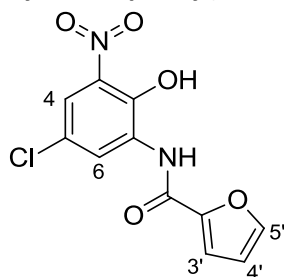
Molecular formula: C₆H₆Cl₂N₂O₃

Molecular weight: 225.03 g/mol

Melting point: 166 °C

Aspect: dark brown solid

N-(5-Chloro-2-hydroxy-3-nitrophenyl)furan-2-carboxamide (51)



Procedure:

A solution of furoic acid (1 eq., 5.19 g, 46.3 mmol) with SOCl₂ (4 eq., 13.4 mL, 185 mmol) in DCM (95 mL) with 4 drops of DMF was refluxed for 2h, cooled to room temperature and concentrated *in vacuo*. Oil was suspended in EtOAc (40 mL) and added dropwise to a solution of **50** (0.9 eq., 9.15 g, 40.7 mmol) and Et₃N (3 eq., 19.3 mL, 138 mmol) in EtOAc (100 mL) at 0 °C.

After 2h stirring at room temperature, the mixture was hydrolyzed with water and extracted twice with EtOAc. Combined organic layers were washed with NaHCO₃ saturated solution, 1 M HCl solution, brine, dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*.

Red oil was suspended in H₂O (100 mL) and EtOH (5 mL), and NaOH (2 eq., 3.7 g, 92.6 mmol) was added. The mixture was stirred at 70 °C for a night, cooled to room temperature, acidified with 6 M HCl solution and filtered. Solid was then suspended in diethyl ether and filtered to afford **51** (7.8 g, 68%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, *J* Hz): 11.05 (br s, 1H, NH), 8.92 (d, 1H, *J* = 2.7 Hz, H₄), 8.86 (br s, 1H, OH), 7.85 (d, 1H, *J* = 2.7 Hz, H₆), 7.59 (m, 1H, H₅), 7.32 (dd, 1H, *J* = 0.9 Hz and *J* = 3.6 Hz, H₃), 6.62 (dd, 1H, *J* = 1.7 Hz and *J* = 3.5 Hz, H_{4'}).

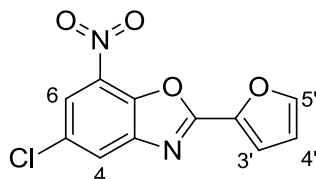
Molecular formula: C₁₁H₇ClN₂O₅

Molecular weight: 282.64 g/mol

Melting point: 166 °C

Aspect: yellow solid

5-Chloro-2-(furan-2-yl)-7-nitro-1,3-benzoxazole (52)



Procedure:

A solution of **51** (1 eq., 2.8 g, 9.91 mmol) with PTSA (2.5 eq., 4.26 g, 24.8 mmol) in toluene (70 mL) was refluxed for 17h until dilution with a Dean-Stark apparatus. Solution was then cooled to room temperature, hydrolyzed with water and basified with 0.5 M NaOH solution. Solid formed was filtered, washed with diethyl ether and recrystallized from EtOAc to afford **52** (2.14 g, 82%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J* Hz): 8.35 (d, 1H, *J* = 2.7 Hz, H₆), 7.85 (d, 1H, *J* = 2.7 Hz, H₄), 8.15 (m, 1H, H₅), 7.61 (m, 1H, H₃), 6.86 (dd, 1H, *J* = 1.7 Hz and *J* = 3.5 Hz, H₄).

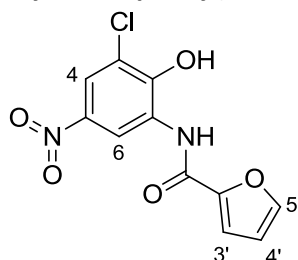
Molecular formula: C₁₁H₅ClN₂O₄

Molecular weight: 264.62 g/mol

Melting point: 214 °C

Aspect: yellow solid

***N*-(3-Chloro-2-hydroxy-5-nitrophenyl)furan-2-carboxamide (53)**



Procedure:

A solution of furoic acid (1 eq., 3.4 g, 0.03 mol) with SOCl₂ (2 eq., 4.7 mL, 0.06 mol) in DCM (90 mL) with 4 drops of DMF was refluxed for a night, cooled to room temperature and concentrated *in vacuo*. Oil was diluted in EtOAc (30 mL) and added dropwise to a solution of 2-amino-4-chloro-6-nitrophenol (1 eq., 3.76 g, 0.02 mol) with Et₃N (2 eq., 5.5 mL, 0.04 mol) in EtOAc (100 mL) at 0 °C. After 2h stirring at room temperature, the mixture was hydrolyzed with water and extracted twice with EtOAc. Combined organic layers were washed with water, 0.5 M HCl solution and brine, dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. Orange solid was suspended in H₂O/EtOH (150/20 mL) with NaOH (3 eq., 2.4 g, 0.06 mol) and the mixture was heated at 70 °C for 3h, cooled to room temperature, acidified with 6 M HCl solution, filtered, washed with water and then diethyl ether to afford **53** (5.5 g, 97%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J* Hz): 11.15 (br s, 1H, NH), 9.73 (br s, 1H, OH), 8.60 (d, 1H, *J* = 2.7 Hz, H₄), 7.14 (d, 1H, *J* = 2.7 Hz, H₆), 7.99 (m, 1H, H₅), 7.37 (dd, 1H, *J* = 0.7 Hz and *J* = 3.5 Hz, H₃), 6.74 (dd, 1H, *J* = 1.7 Hz and *J* = 3.5 Hz, H₄).

¹³C NMR (DMSO, δ ppm): 156.9 (C), 152.8 (C), 147.2 (C), 146.7 (CH), 139.2 (C), 127.6 (C), 122.2 (CH), 121.5 (C), 118.3 (CH), 116.3 (CH), 113.0 (CH).

LC-MS (ESI) m/z found: 283, 285 [M+H]⁺.

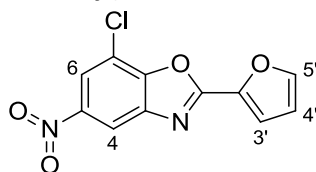
Molecular formula: C₁₁H₇ClN₂O₅

Molecular weight: 282.64 g/mol

Melting point: > 300 °C

Aspect: yellow solid

7-chloro-2-(furan-2-yl)-5-nitro-1,3-benzoxazole (54)



Procedure:

A solution of **53** (1 eq., 5.2 g, 0.018 mol) with PTSA (3 eq., 10.5 g, 0.054 mol) in toluene (130 mL) was refluxed for a night with a Dean-Stark apparatus, cooled to room temperature and hydrolyzed with 0.5 M NaOH solution. Organic layer was extracted, dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. Solid was suspended in diethyl ether, filtered and then recrystallized from EtOAc to afford **54** (3.4 g, 71%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8.52 (d, 1H, *J* = 2.7 Hz, H₄), 8.33 (d, 1H, *J* = 2.7 Hz, H₆), 7.78 (m, 1H, H_{5'}), 7.45 (dd, 1H, *J* = 0.6 Hz and *J* = 3.6 Hz, H_{3'}), 6.71 (dd, 1H, *J* = 1.7 Hz and *J* = 3.5 Hz, H_{4'}).

¹³C NMR (DMSO, δ ppm): 157.9 (C), 150.5 (C), 147.4 (CH), 145.8 (C), 142.9 (C), 140.9 (C), 121.5 (CH), 117.2 (CH), 116.7 (C), 114.7 (CH), 112.8 (CH).

LC-MS (ESI) m/z found: 265, 267 [M+H]⁺.

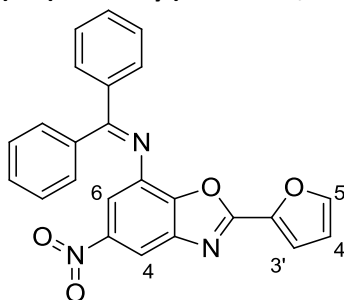
Molecular formula: C₁₁H₅ClN₂O₄

Molecular weight: 264.62 g/mol

Melting point: 146 °C

Aspect: yellow solid

***N*-(diphenylmethylene)-2-(furan-2-yl)-5-nitro-1,3-benzoxazol-7-amine (55)**



Procedure:

To a solution of **54** (1 eq., 1.2 g, 4.53 mmol) in toluene (20 mL) was added benzophenone imine (1.5 eq., 1.14 mL, 6.8 mmol), diacetate palladium (0.03 eq., 30.5 mg, 0.14 mmol), binap (0.04 eq., 112 mg, 0.18 mmol) and cesium carbonate (2 eq., 2.95 g, 9.07 mmol) in a sealed tube. The mixture was degassed and then heated at 90 °C for 3h, cooled to room temperature and diluted with EtOAc. Precipitate was filtered off and organic layer was washed with water, 0.5 M HCl solution and then dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. Solid was suspended in diethyl ether and filtered to afford **55** (1.37 g, 75%).

¹H NMR (DMSO-d₆, δ ppm, J Hz): 8.22 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz, H₄), 8.10 (m, 1H, H_{5'}), 7.81-7.78 (m, 2H, H_{3'} and H_{diphenyl}), 7.67 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz, H₆), 7.65-7.62 (m, 1H, H_{diphenyl}), 7.57-7.53 (m, 3H, H_{diphenyl}), 7.27 (m, 5H, H_{diphenyl}), 6.82 (dd, 1H, *J* = 1.7 Hz and *J* = 3.5 Hz, H_{4'}).

¹³C NMR (DMSO, δ ppm): 173.6 (C), 157.4 (C), 148.6 (CH), 145.6 (2 C), 144.5 (C), 142.4 (C), 140.9 (C), 138.1 (C), 136.0 (CH), 135.6 (CH), 132.6 (CH), 130.0 (2 CH), 129.1 (2 CH), 128.8 (2 CH), 128.7 (2 CH), 117.5 (CH), 113.6 (2 CH), 110.7 (CH).

LC-MS (ESI) m/z found: 410 [M+H]⁺.

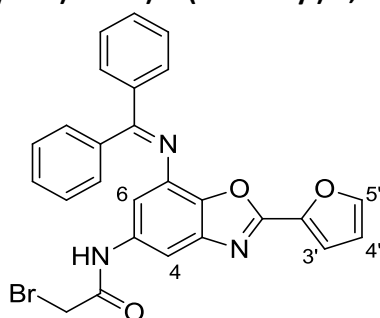
Molecular formula: C₂₄H₁₅N₃O₄

Molecular weight: 409.39 g/mol

Melting point: 216 °C

Aspect: yellow solid

2-Bromo-N-(7-((diphenylmethylene)amino)-2-(furan-2-yl)-1,3-benzoxazol-5-yl)acetamide (56)



To a solution of **55** (1 eq., 200 mg, 0.49 mmol) in EtOAc (20 mL) was added Raney nickel and hydrazine hydrate (1.5 eq., 0.04 mL, 0.73 mmol). The mixture was stirred for 30 min at room temperature, catalyst was filtered off and the mixture was concentrated *in vacuo*. Solid was diluted in EtOAc (40 mL) and water (8 mL) with K₂CO₃ (2 eq., 135 mg, 0.98 mmol) at 0 °C and then bromo acetyl bromide (1.5 eq., 0.06 mL, 0.733 mmol) diluted in EtOAc (40 mL) was added dropwise. After 1h stirring at this temperature, mixture was hydrolyzed with water and organic layer was extracted three times with EtOAc. Combined organic layer were dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. Solid was suspended in diethyl ether and filtered to afford compound **56** (208 mg, 85%).

¹H NMR (DMSO-d₆, δ ppm, J Hz): 9.68 (br s, 1H, NH), 8.01 (m, 1H, H_{5'}), 7.77-7.74 (m, 2H, H_{phenyl}), 7.72 (d, 1H, J = 1.8 Hz, H₄), 7.61-7.50 (m, 3H, H_{phenyl}), 7.38 (d, 1H, J = 3.3 Hz, H_{3'}), 7.27-7.18 (m, 5H, H_{phenyl}), 7.10 (d, 1H, J = 1.8 Hz, H₆), 6.75 (dd, 1H, J = 1.7 Hz and J = 3.5 Hz, H_{4'}), 4.02 (s, 2H, CH₂).

¹³C NMR (DMSO, δ ppm): 171.7 (C), 169.0 (C), 155.4 (C), 147.5 (2 C), 142.2 (C), 141.8 (C), 138.6 (C), 136.5 (CH), 136.1 (C), 135.3 (C), 132.1 (CH), 129.7 (2 CH), 129.6 (CH), 129.1 (2 CH), 128.7 (2 CH), 128.5 (2 CH), 115.6 (CH), 113.2 (CH), 110.3 (CH), 105.6 (CH), 63.1 (CH₂), 54.5 (2 CH₂), 25.9 (2 CH₂), 24.0 (CH₂).

LC-MS (ESI) m/z found: 501, 503 [M+H]⁺.

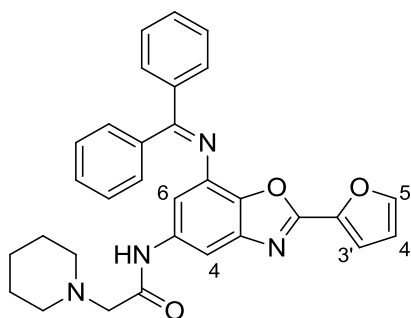
Molecular formula: C₂₆H₁₈BrN₃O₃

Molecular weight: 500.34 g/mol

Melting point: 201 °C

Aspect: Yellow solid

***N*-(7-((Diphenylmethylene)amino)-2-(furan-2-yl)-1,3-benzoxazol-5-yl)-2-(piperidin-1-yl)acetamide (57)**



Procedure:

A solution of **56** (1 eq., 200 mg, 0.517 mmol) in acetone (18 mL) was added piperidine (1.1 eq., 0.06 mL, 0.569 mmol) and Et₃N (1.5 eq., 0.07 mL, 0.77 mmol). Reaction mixture was refluxed for 6h, cooled to room temperature and concentrated *in vacuo*. Solid was suspended in water and extracted three times with EtOAc. Combined organic layers were dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo* to give a solid which was suspended in diethyl ether and filtered to afford compound **57** (80 mg, 52%).

¹H NMR (DMSO-d₆, δ ppm, J Hz): 9.68 (br s, 1H, NH), 8.01 (m, 1H, H_{5'}), 7.77-7.74 (m, 2H, H_{phenyl}), 7.72 (d, 1H, *J* = 1.8 Hz, H₄), 7.61-7.50 (m, 3H, H_{phenyl}), 7.38 (d, 1H, *J* = 3.3 Hz, H_{3'}), 7.27-7.18 (m, 5H, H_{phenyl}), 7.10 (d, 1H, *J* = 1.8 Hz, H₆), 6.75 (dd, 1H, *J* = 1.7 Hz and *J* = 3.5 Hz, H_{4'}), 3.04 (s, 2H, CH₂), 2.43 (m, 4H, H_{piperidine}), 1.55 (m, 4H, H_{piperidine}), 1.39 (m, 2H, H_{piperidine}).

¹³C NMR (DMSO, δ ppm): 171.7 (C), 169.0 (C), 155.4 (C), 147.5 (2 C), 142.2 (C), 141.8 (C), 138.6 (C), 136.5 (CH), 136.1 (C), 135.3 (C), 132.1 (CH), 129.7 (2 CH), 129.6 (CH), 129.1 (2 CH), 128.7 (2 CH), 128.5 (2 CH), 115.6 (CH), 113.2 (CH), 110.3 (CH), 105.6 (CH), 63.1 (CH₂), 54.5 (2 CH₂), 25.9 (2 CH₂), 24.0 (CH₂).

LC-MS (ESI) m/z found: 505 [M+H]⁺.

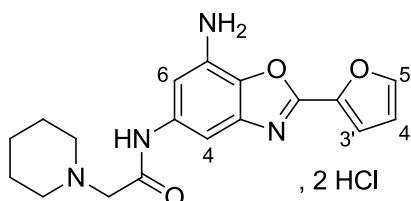
Molecular formula: C₃₁H₂₈N₄O₃

Molecular weight: 504.58 g/mol

Melting point: 194 °C

Aspect: yellow solid

***N*-(7-Amino-2-(furan-2-yl)-1,3-benzoxazol-5-yl)-2-(piperidin-1-yl)acetamide dihydrochloride (VIIIa)**



Procedure:

A solution of **57** (1 eq., 356 mg, 0.706 mmol) in THF (7 mL) with HCl (4 eq., 4 M, 0.7 mL, 2.82 mmol) was stirred for 30 min at room temperature. The precipitate formed was filtered and washed with EtOAc to afford **VIIIa** (220 mg, 83%).

¹H NMR (DMSO-d₆, δ ppm, J Hz): 10.90 (br s, 1H, NH), 10.00 (br s, 1H, NH), 8.05 (m, 1H, H_{5'}), 7.40 (m, 1H, H₄), 7.34 (m, 1H, H₆), 6.93 (m, 1H, H_{3'}), 6.80 (m, 1H, H_{4'}), 5.30 (br s, 3H, NH₃), 4.14 (s, 2H, CH₂), 3.47 (m, 2H, H_{piperidine}), 3.08 (m, 2H, H_{piperidine}), 1.79-1.67 (m, 5H, H_{piperidine}), 14.40 (m, 1H, H_{piperidine}).

¹³C NMR (DMSO, δ ppm): 163.1 (C), 154.0 (C), 147.2 (2 C), 142.3 (CH), 136.4 (C), 135.7 (C), 132.8 (C), 114.9 (CH), 113.2 (CH), 103.7 (CH), 99.1 (CH), 57.6 (CH₂), 53.4 (2 CH₂), 22.6 (2 CH₂), 21.6 (CH₂).

LC-MS (ESI) m/z found: 341[M+H]⁺.

HPLC: C4 column: t_R = 13.9 min, purity >99%; C18 column: t_R = 19.4 min, purity 99%.

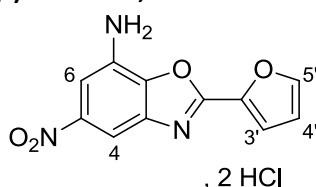
Molecular formula: C₁₈H₂₂ClN₄O₃

Molecular weight: 376.84 g/mol

Melting point: > 300 °C

Aspect: White solid

2-(Furan-2-yl)-5-nitro-1,3-benzoxazol-7-amine (58)



Procedure:

A suspension of **55** (1 eq., 585 mg, 1.43 mmol) in a mixture of 4 M aqueous HCl solution/THF (1/2) was heated at 80 °C for 30 min. Mixture was cooled to room temperature and concentrated *in vacuo* to give a solid which was suspended in EtOAc and filtered to afford **58** (265 mg, 76%).

¹H NMR (DMSO-d₆, δ ppm, J Hz): 8.12 (m, 1H, H_{5'}), 7.75 (d, 1H, J = 2.4 Hz, H₄), 7.55 (d, 1H, J = 2.4 Hz, H₆), 7.47 (dd, 1H, J = 0.6 Hz and J = 3.2 Hz, H_{3'}), 6.85 (dd, 1H, J = 1.7 Hz and J = 3.5 Hz, H_{4'}), 6.36 (br s, 2H, NH₂).

¹³C NMR (DMSO, δ ppm): 156.6 (C), 148.0 (CH), 146.5 (C), 142.1 (C), 141.7 (C), 141.6 (C), 134.6 (C), 116.4 (CH), 113.5 (CH), 105.2 (CH), 102.5 (CH).

LC-MS (ESI) m/z found: 246 [M+H]⁺.

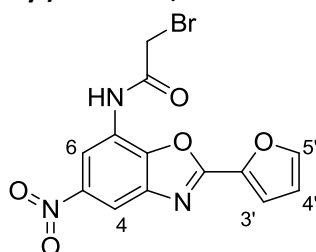
Molecular formula: C₁₁H₇N₃O₄

Molecular weight: 245.19 g/mol

Melting point: 258 °C

Aspect: yellow solid

2-Bromo-N-(2-(furan-2-yl)-5-nitro-1,3-benzoxazol-7-yl)acetamide (59)



Procedure:

To a solution of **58** (1 eq., 400 mg, 1.63 mmol) with K₂CO₃ (2.5 eq., 563 mg, 4.08 mmol) in a mixture of EtOAc (100 mL) and water (30 mL) at 0 °C was added dropwise bromoacetyl bromide (1.2 eq., 0.17 mL, 1.96 mmol) diluted in EtOAc (15 mL). After 30 min stirring at room temperature, aqueous layer

was extracted three times with EtOAc. Combined organic layers were dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. Solid was recrystallized from EtOH to afford **59** (248 mg, 42%).

¹H NMR (DMSO-d₆, δ ppm, J Hz): 10.25 (br s, 1H, NH), 8.76 (d, 1H, *J* = 2.7 Hz, H₄), 8.40 (d, 1H, *J* = 2.7 Hz, H₆), 8.17 (m, 1H, H_{5'}), 7.58 (m, 1H, H_{3'}), 6.88 (dd, 1H, *J* = 1.7 Hz and *J* = 3.5 Hz, H_{4'}), 4.18 (s, 2H, CH₂).

¹³C NMR (DMSO, δ ppm): 172.2 (C), 157.2 (C), 148.6 (CH), 145.5 (C), 145.3 (C), 142.5 (C), 141.0 (C), 123.3 (C), 117.5 (CH), 113.7 (CH), 113.6 (CH), 111.5 (CH), 62.1 (CH₂).

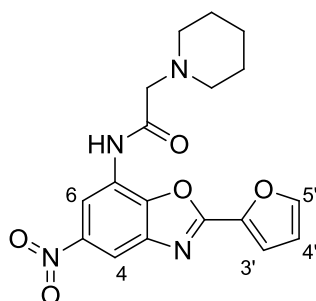
LC-MS (ESI) m/z found: 366, 368 [M+H]⁺.

Molecular formula: C₁₃H₈BrN₃O₅

Molecular weight: 366.12 g/mol

Melting point: 262 °C

***N*-(2-(Furan-2-yl)-5-nitro-1,3-benzoxazol-7-yl)-2-(piperidin-1-yl)acetamide (60)**



Procedure:

To a solution of **59** (1 eq., 248 mg, 0.677 mmol) in acetone (8 mL) was added piperidine (1.1 eq., 0.07 mL, 0.75 mmol) and Et₃N (1.3 eq., 0.12 mL, 0.88 mmol) and the mixture was heated at reflux for 1h, cooled to room temperature and concentrated *in vacuo*. Solid was suspended in water and extracted three times with EtOAc. Combined organic layers were extracted and washed with brine, dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo* to afford **60** (170 mg, 68%).

¹H NMR (DMSO-d₆, δ ppm, J Hz): 10.37 (br s, 1H, NH), 8.86 (d, 1H, *J* = 2.7 Hz, H₄), 8.38 (d, 1H, *J* = 2.7 Hz, H₆), 8.18 (m, 1H, H_{5'}), 7.52 (m, 1H, H_{3'}), 6.85 (dd, 1H, *J* = 1.7 Hz and *J* = 3.5 Hz, H_{4'}), 3.25 (s, 2H, CH₂), 2.54 (t, 4H, *J* = 9.9 Hz, H_{piperidine}), 1.62 (m, 4H, H_{piperidine}), 1.46 (m, 2H, H_{piperidine}).

¹³C NMR (DMSO, δ ppm): 170.1 (C), 157.1 (C), 148.7 (CH), 145.6 (C), 144.7 (C), 142.4 (C), 141.1 (C), 123.5 (C), 117.3 (CH), 113.7 (CH), 112.6 (CH), 111.3 (CH), 62.3 (CH₂), 54.5 (2 CH₂), 26.2 (2 CH₂), 23.9 (CH₂).

LC-MS (ESI) m/z found: 371 [M+H]⁺.

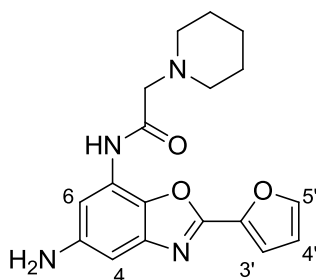
Molecular formula: C₁₈H₁₈N₄O₅

Molecular weight: 370.36 g/mol

Melting point: 252 °C

Aspect: pale yellow solid

N-(5-Amino-2-(furan-2-yl)-1,3-benzoxazol-7-yl)-2-(piperidin-1-yl)acetamide (VIIIb)



Procedure:

To a suspension of **60** (1 eq., 155 mg, 0.42 mmol) in EtOAc (20 mL) was added Raney nickel and hydrazine monohydrate (2 eq., 0.04 mL, 0.84 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 1h and Pd/C was filtered off. Organic layer was washed with water, brine, dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. Solid was recrystallized from EtOAc to afford **VIIIb** (100 mg, 70%).

For binding studies, compound was suspended in diethyl ether with HCl gas and solid was filtered.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 9.89 (br s, 1H, NH), 7.68 (d, 1H, *J* = 2.7 Hz, H₆), 7.67 (m, 1H, H_{5'}), 7.17 (d, 1H, *J* = 2.7 Hz, H₄), 6.77 (m, 1H, H_{3'}), 6.32 (dd, 1H, *J* = 1.7 Hz and *J* = 3.5 Hz, H_{4'}), 3.78 (br s, 2H, NH₂), 3.16 (s, 2H, CH₂), 2.63 (t, 4H, *J* = 9.9 Hz, H_{piperidine}), 2.75 (m, 4H, H_{piperidine}), 1.57 (m, 2H, H_{piperidine}).

¹³C NMR (CDCl₃, δ ppm): 169.3 (C), 155.6 (C), 145.6 (CH), 144.9 (C), 142.8 (C), 142.7 (C), 134.2 (C), 122.7 (C), 113.6 (CH), 112.2 (CH), 104.8 (CH), 100.1 (CH), 62.6 (CH₂), 54.9 (2 CH₂), 26.6 (2 CH₂), 23.7 (CH₂).

LC-MS (ESI) m/z found: 341 [M+H]⁺.

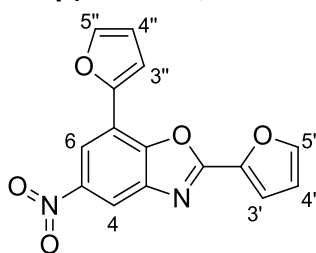
Molecular formula: C₁₈H₂₁ClN₄O₃

Molecular weight: 340.38 g/mol

Melting point: 260 °C

Aspect: beige solid

2,7-Di(furan-2-yl)-5-nitro-1,3-benzoxazole (61a)



Procedure:

A mixture of **54** (1 eq., 500 mg, 1.89 mmol), furan-2-boronic acid (1.5 eq., 317 mg, 2.83 mmol), K₃PO₄ (2 eq., 2 M, 1.89 mL, 3.78 mmol), PPh₃ (4%, 20 mg, 0.076 mmol) palladium diacetate (2%, 8.48 mg, 0.0378 mmol) in dioxane (8 mL) was degassed and then heated in a sealed tube at 110 °C for 4h. After cooling to room temperature, mixture was suspended in water and extracted three times with EtOAc. Combined organic layers were dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. Solid was recrystallized from EtOH to afford **61a** (235 mg, 42%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8.67 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz, H₄), 8.47 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz, H₆), 7.77 (m, 1H, H_{5'} or H_{5''}), 7.66 (m, 1H, H_{5'} or H_{5''}), 7.45 (m, 1H, H_{3'} or H_{3''}), 7.26 (m, 1H, H_{3'} or H_{3''}), 6.71 (dd, 1H, *J* = 1.7 Hz and *J* = 3.5 Hz, H_{4'} or H_{4''}) 6.64 (dd, 1H, *J* = 1.7 Hz and *J* = 3.5 Hz, H_{4'} or H_{4''}).

¹³C NMR (CDCl₃, δ ppm): 157.7 (C), 148.3 (C), 146.9 (CH), 146.4 (C), 146.1 (C), 143.8 (CH), 142.6 (C), 141.4 (C), 116.3 (CH), 115.9 (CH), 115.7 (C), 113.9 (CH), 112.7 (CH), 112.4 (CH), 111.9 (CH).

LC-MS (ESI) m/z found: 297 [M+H]⁺.

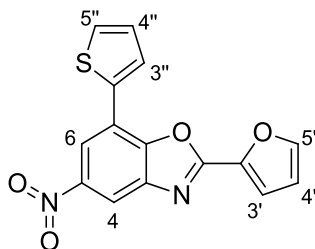
Molecular formula: C₁₅H₈N₂O₅

Molecular weight: 296.23 g/mol

Melting point: 222 °C

Aspect: beige solid

2-(Furan-2-yl)-5-nitro-7-(thiophen-2-yl)-1,3-benzoxazole (61b)



Procedure:

Same procedure as described for compound **61a** was used starting from have been used starting from **54** (1 eq., 250 mg, 0.945 mmol) with 2-thiopheneboronic acid (1.6 eq., 193 mg, 1.51 mmol), K₃PO₄ (2 eq., 2 M, 0.945 mL, 1.89 mmol), palladium diacetate (2%, 4.24 mg, 0.0189 mmol) and triphenylphosphine (4%, 9.91 mg, 0.0378 mmol) in dioxanne (5 mL). Final solid was suspended in cold diethyl ether and filtered to afford **61b** (125 mg, 42%).

¹H NMR (DMSO-d₆, δ ppm, J Hz): 8.51 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz, H₄), 8.48 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz, H₆), 8.20 (m, 1H, H_{5'}), 8.06 (dd, 1H, *J* = 1.1 Hz and *J* = 3.7 Hz, H_{5''}), 7.88 (dd, 1H, *J* = 1.1 Hz and *J* = 3.7 Hz, H_{3''}), 7.69 (dd, 1H, *J* = 0.6 Hz and *J* = 3.6 Hz, H_{3'}), 7.33 (dd, 1H, *J* = 3.7 Hz and *J* = 5.1 Hz, H_{4''}) 6.91 (dd, 1H, *J* = 1.7 Hz and *J* = 3.5 Hz, H_{4'}).

¹³C NMR (DMSO, δ ppm): 157.9 (C), 149.4 (C), 148.8 (CH), 146.1 (C), 142.9 (C), 141.1 (C), 134.9 (C), 129.4 (CH), 129.2 (CH), 129.0 (CH), 119.1 (C), 117.8 (CH), 117.7 (CH), 114.1 (CH), 113.7 (CH).

LC-MS (ESI) m/z found: 313 [M+H]⁺.

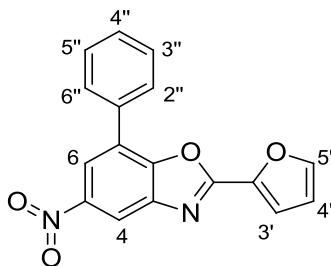
Molecular formula: C₁₅H₈N₂O₄S

Molecular weight: 312.3 g/mol

Melting point: 206 °C

Aspect: beige solid

2-(Furan-2-yl)-5-nitro-7-phenyl-1,3-benzoxazole (61c)



Procedure:

Same procedure as described for compound **61a** was used starting from **54** (1 eq., 400 mg, 1.51 mmol) with K_3PO_4 (2 eq., 2 M, 1.51 mL, 3.02 mmol), phenyl boronic acid (1.5 eq., 276 mg, 2.27 mmol), palladium diacetate (2%, 6.79 mg, 0.0302 mmol) and triphenylphosphine (4%, 15.9 mg, 0.0605 mmol) in dioxane (7.6 mL). Final solid was recrystallized from EtOAc to afford compound **61c** (290 mg, 63%).

1H NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J Hz): 8.58 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz, H_4), 8.45 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz, H_6), 8.16 (m, 1H, $H_{5'}$), 8.01-7.98 (m, 2H, $H_{6''}$ and $H_{2''}$), 7.65-7.57 (m, 3H, $H_{5''}$, $H_{3''}$ and $H_{3'}$), 7.56-7.51 (m, 1H, $H_{4''}$), 6.87 (dd, 1H, $J = 1.7$ Hz and $J = 3.5$ Hz, H_4).

^{13}C NMR (DMSO, δ ppm): 157.9 (C), 151.2 (C), 148.6 (CH), 146.1 (C), 143.0 (C), 141.2 (C), 133.3 (C), 129.9 (CH), 129.7 (2 CH), 128.8 (2 CH), 125.2 (C), 119.9 (CH), 117.6 (CH), 114.7 (CH), 113.6 (CH).

LC-MS (ESI) m/z found: 307 $[M+H]^+$.

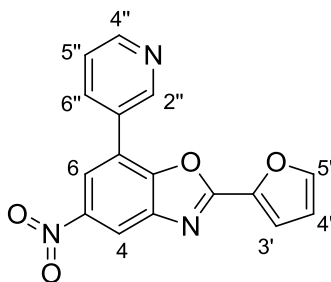
Molecular formula: $C_{17}H_{10}N_2O_4$

Molecular weight: 306.3 g/mol

Melting point: 193 °C

Aspect: pale yellow solid

2-(Furan-2-yl)-5-nitro-7-(pyridin-3-yl)-1,3-benzoxazole (61d)



Procedure:

Same procedure as described for compound **61a** was used starting from **54** (1 eq., 350 mg, 1.32 mmol) with K_3PO_4 (2 eq., 2 M, 1.32 mL, 2.65 mmol), 3-pyridinylboronic acid (1.5 eq., 243 mg, 1.98 mmol), palladium diacetate (2%, 5.94 mg, 0.027 mmol) and triphenylphosphine (4%, 13.9 mg, 0.053 mmol) in dioxane (7 mL). Final solid was suspended in EtOAc and filtered to afford **61d** (220 mg, 54%).

1H NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J Hz): 9.21 (m, 1H, $H_{2''}$), 8.74 (m, 1H, $H_{4''}$), 8.66 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz, H_6), 8.74 (m, 1H, $H_{5''}$), 8.57 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz, H_4), 8.16 (m, 1H, $H_{5'}$), 7.66-7.63 (m, 2H, $H_{6''}$ and $H_{3'}$), 6.87 (dd, 1H, $J = 1.7$ Hz and $J = 3.5$ Hz, H_4).

^{13}C NMR (DMSO, δ ppm): 157.9 (C), 153.1 (C), 150.6 (C), 149.4 (CH), 148.7 (C), 146.2 (C), 136.4 (C), 134.8 (CH), 133.3 (CH), 129.1 (2 CH), 124.7 (C), 120.3 (CH), 117.8 (CH), 115.5 (CH), 113.7 (CH).

LC-MS (ESI) m/z found: 308 [M+H]⁺.

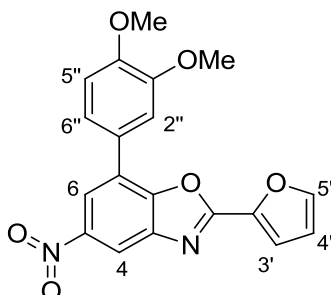
Molecular formula: C₁₆H₉N₃O₄

Molecular weight: 307.26 g/mol

Melting point: 246 °C

Aspect: white solid

7-(3,4-Dimethoxyphenyl)-2-(furan-2-yl)-5-nitro-1,3-benzoxazole (61e)



Procedure:

Same procedure as described for compound **61a** was used starting from **54** (1 eq., 250 mg, 0.94 mmol) with 3,4-dimethoxyphenylboronic acid (2 eq., 343 mg, 1.89 mmol), K₃PO₄ (2 eq., 2 M, 0.94 mL, 1.89 mmol), palladium diacetate (2%, 4.24 mg, 0.019 mmol) and triphenylphosphine (4%, 9.91 mg, 0.0378 mmol) in dioxane (5 mL). Final solid was suspended in EtOH and filtered to afford **61e** (175 mg, 51%).

¹H NMR (DMSO-d₆, δ ppm, J Hz): 8.50 (m, 1H, H₆), 8.43 (m, 1H, H₄), 8.15 (m, 1H, H_{5'}), 7.57-7.55 (m, 3H, H_{6''}, H_{2''} and H_{3'}), 7.16 (d, 1H, J = 8.4 Hz, H_{5''}), 6.86 (dd, 1H, J = 1.7 Hz and J = 3.5 Hz, H_{4'}), 3.89 (s, 3H, OMe), 3.85 (s, 3H, OMe).

¹³C NMR (DMSO, δ ppm): 157.7 (C), 150.9 (C), 150.3 (C), 149.5 (C), 148.6 (CH), 146.1 (C), 142.8 (C), 141.2 (C), 125.6 (C), 125.3 (C), 121.5 (CH), 119.3 (CH), 117.3 (CH), 113.9 (CH), 113.6 (CH), 112.6 (CH), 112.0 (CH), 56.1 (CH₃), 56.0 (CH₃).

LC-MS (ESI) m/z found: 367 [M+H]⁺.

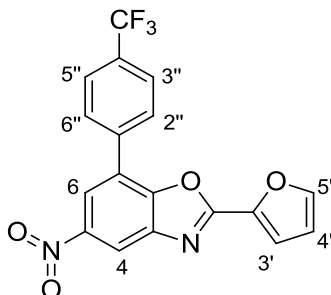
Molecular formula: C₁₉H₁₄N₂O₆

Molecular weight: 366.32 g/mol

Melting point: 176 °C

Aspect: yellow solid

2-(Furan-2-yl)-5-nitro-7-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1,3-benzoxazole (61f)



Procedure:

Same procedure as described for compound **61a** was used starting from **54** (1 eq., 250 mg, 0.945 mmol) with 4-(trifluoromethyl)phenylboronic acid (1.7 eq., 305 mg, 1.61 mmol), K₃PO₄ (2 eq., 401 mg, 1.89 mmol), palladium diacetate (2%, 4.24 mg, 0.0189 mmol) and triphenylphosphine (4%, 9.91 mg,

0.038 mmol) in dioxane (5 mL). Final solid was suspended with cold diethyl ether and filtered to afford **61f** (135 mg, 38%).

¹H NMR (DMSO-d₆, δ ppm, J Hz): 8.64 (m, 1H, H₄), 8.53 (m, 1H, H₆), 8.22 (d, 2H, J = 7.6 Hz, H_{5''} and H_{3''}), 8.16 (m, 1H, H_{5'}), 7.97 (d, 2H, J = 7.8 Hz, H_{6''} and H_{2''}), 7.63 (m, 1H, H_{3'}), 6.86 (m, 1H, H_{4'}).

¹³C NMR (DMSO, δ ppm): 157.9 (C), 151.3 (C), 148.7 (CH), 146.1 (C), 143.1 (C), 141.1 (C), 137.3 (C), 130.1 (C), 129.7 (2 CH), 126.6 (CH), 126.5 (CH), 123.5 (C), 122.7 (C), 120.3 (CH), 117.8 (CH), 115.6 (CH), 113.7 (CH).

LC-MS (ESI) m/z found: 375 [M+H]⁺.

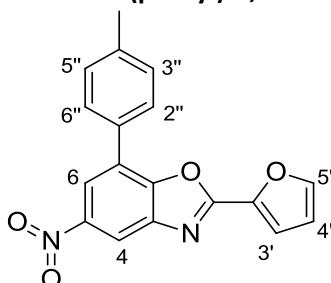
Molecular formula: C₁₈H₉F₃N₂O₄

Molecular weight: 374.27 g/mol

Melting point: 218 °C

Aspect: white solid

2-(Furan-2-yl)-5-nitro-7-(p-tolyl)-1,3-benzoxazole (61h)



Procedure:

Same procedure as described for compound **61a** was used starting from **54** (1 eq., 350 mg, 1.32 mmol) with K₃PO₄ (2 eq., 2 M, 1.32 mL, 2.65 mmol), 4-tolylboronic acid (1.3 eq., 233 mg, 1.72 mmol), palladium diacetate (2%, 5.94 mg, 0.026 mmol) and triphenylphosphine (4%, 13.9 mg, 0.053 mmol) in dioxane (7 mL). Final solid was recrystallized in EtOAc and filtered to afford compound **61h** (125 mg, 41%).

¹H NMR (DMSO-d₆, δ ppm, J Hz): 8.55 (d, 1H, J = 2.2 Hz, H₄), 8.41 (d, 1H, J = 2.2 Hz, H₆), 8.16 (m, 1H, H_{5'}), 7.88 (d, 2H, J = 8.1 Hz, H_{6''} and H_{2''}), 7.60 (d, 1H, J = 3.1 Hz, H_{3'}), 7.43 (d, 2H, J = 8.1 Hz, H_{5''} and H_{3''}), 6.86 (dd, 1H, J = 1.7 Hz and J = 3.5 Hz, H_{4'}), 2.41 (s, 3H, Me).

¹³C NMR (DMSO, δ ppm): 157.8 (C), 151.1 (C), 148.6 (CH), 146.1 (C), 142.9 (C), 141.2 (C), 139.6 (C), 130.4 (C), 130.3 (2 CH), 128.6 (2 CH), 125.2 (C), 119.5 (CH), 117.5 (CH), 114.4 (CH), 113.6 (CH), 21.3 (CH₃).

LC-MS (ESI) m/z found: 321 [M+H]⁺.

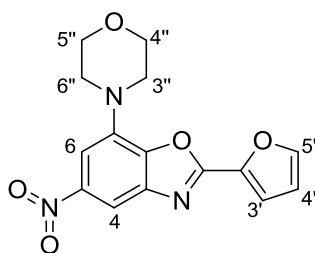
Molecular formula: C₁₈H₁₂N₂O₄

Molecular weight: 320.3 g/mol

Melting point: 178 °C

Aspect: white solid

2-(Furan-2-yl)-7-morpholino-5-nitro-1,3-benzoxazole (61i)



Procedure:

A solution of **54** (1 eq., 400 mg, 1.51 mmol) with palladium diacetate (0.03 eq., 10.2 mg, 0.045 mmol), binap (0.04 eq., 37.6 mg, 0.061 mmol), cesium carbonate (2 eq., 985 mg, 3.02 mmol) and morpholine (1.5 eq., 0.2 mL, 2.27 mmol) in toluene (7 mL) was degassed and heated at reflux in a sealed tube for 3h, cooled to room temperature, hydrolyzed with water and EtOAc was added. Precipitated product was filtered, then diluted in DCM and Pd residue was filtered off. Organic layer was washed with water, dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. Solid was suspended in EtOAc and filtered to afford **61i** (253 mg, 53%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8.19 (d, 1H, J = 2.1 Hz, H₆), 7.73 (m, 1H, H_{5'}), 7.70 (d, 1H, J = 2.1 Hz, H₄), 7.36 (d, 1H, J = 3.5 Hz, H_{3'}), 7.67 (dd, 1H, J = 1.7 Hz and J = 3.5 Hz, H_{4'}), 3.99 (t, 4H, J = 4.7 Hz, H_{3''} and H_{6''}), 3.49 (t, 4H, J = 4.7 Hz, H_{4''} and H_{5''}).

¹³C NMR (CDCl₃, δ ppm): 156.6 (C), 146.6 (CH), 146.4 (C), 144.2 (C), 143.0 (C), 141.5 (C), 136.6 (C), 115.7 (CH), 112.6 (CH), 108.2 (CH), 106.7 (CH), 66.6 (2 CH₂), 49.2 (2 CH₂).

LC-MS (ESI) m/z found: 316 [M+H]⁺.

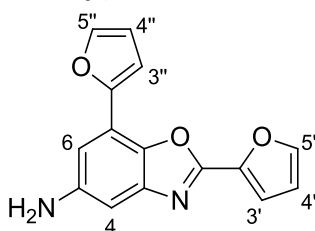
Molecular formula: C₁₅H₁₃N₃O₅

Molecular weight: 315.3 g/mol

Melting point: 214 °C

Aspect: yellow solid

2,7-Di(furan-2-yl)benzoxazol-5-amine (IXa)



Procedure:

To a solution of **61a** (1 eq., 300 mg, 1.01 mmol) in EtOAc (20 mL) was added Raney nickel and hydrazine monohydrate (1.5 eq., 0.07 mL, 1.52 mmol) was stirred for 30 min at room temperature. Catalyst was filtered off and the mixture was hydrolyzed with water and extracted three times with EtOAc. Combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. Solid was recrystallized from diethyl ether to afford **IXa** (200 mg, 74%).

¹H NMR (DMSO-d₆, δ ppm, J Hz): 8.05 (m, 1H, H_{5'} or H_{5''}), 7.86 (m, 1H, H_{5'} or H_{5''}), 7.51 (d, 1H, J = 3.3 Hz, H_{3'} or H_{3''}), 7.13 (d, 1H, J = 3.3 Hz, H_{3'} or H_{3''}), 7.04 (d, 1H, J = 2.0 Hz, H₆), 6.82-6.79 (m, 2H, H_{4'} or H_{4''} and H₄), 6.71 (dd, 1H, J = 1.7 Hz and J = 3.5 Hz, H_{4'} or H_{4''}), 5.28 (br s, 2H, NH₂).

¹³C NMR (DMSO, δ ppm): 155.2 (C), 148.5 (C), 147.5 (C), 147.2 (CH), 143.7 (CH), 143.3 (C), 142.3 (C), 137.7 (C), 115.1 (CH), 114.7 (C), 113.2 (CH), 112.8 (CH), 110.1 (CH), 107.6 (CH), 102.4 (CH).

LC-MS (ESI) m/z found: 267 [M+H]⁺.

HPLC: C4 column: t_R = 13.6 min, purity >99%; C18 column: t_R = 21.8 min, purity >99%.

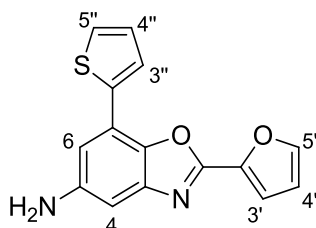
Molecular formula: C₁₅H₁₀N₂O₃

Molecular weight: 266.07 g/mol

Melting point: 160 °C

Aspect: pale green solid

2-(Furan-2-yl)-7-(thiophen-2-yl)-1,3-benzoxazol-5-amine (IXb)



Procedure:

Same procedure as described for compound IXa was used starting from **61b** (1 eq., 95 mg, 0.304 mmol) in 20 mL of MeOH (2 mL) with Raney nickel and hydrazine hydrate (1.5 eq., 0.02 mL, 0.456 mmol). Final solid suspended in cold diethyl ether and filtered to afford **IXb** (15 mg, 17%).

¹H NMR (DMSO-d₆, δ ppm, J Hz): 8.07 (m, 1H, H_{5'}), 7.77 (dd, 1H, J = 1.0 Hz and J = 3.6 Hz, H_{3'}), 7.68 (dd, 1H, J = 0.9 Hz and J = 5.1 Hz, H_{5''}), 7.46 (d, 1H, J = 3.5 Hz, H_{3''}), 7.26 (dd, 1H, J = 3.6 Hz and J = 5.0 Hz, H_{4''}), 6.97 (d, 1H, J = 2.0 Hz, H₄), 6.91 (m, 2H, H_{4'} and H₆), 5.27 (br s, 2H, NH₂).

¹H NMR (DMSO-d₆, δ ppm, J Hz): 155.2 (C), 147.6 (C), 147.2 (CH), 143.5 (C), 142.4 (C), 138.6 (C), 138.0 (C), 128.9 (CH), 126.8 (2 CH), 118.0 (C), 115.0 (CH), 113.2 (CH), 110.0 (CH), 102.5 (CH).

LC-MS (ESI) m/z found: 283 [M+H]⁺.

HPLC: C4 column: t_R = 14.1 min, purity >99%; C18 column: t_R = 22.7 min, purity 95%.

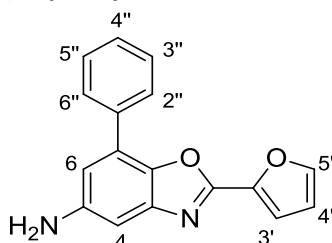
Molecular formula: C₁₅H₁₀N₂O₂S

Molecular weight: 282.35 g/mol

Melting point: 158 °C

Aspect: pale green solid

2-(Furan-2-yl)-7-phenyl-1,3-benzoxazol-5-amine (IXc)



Procedure:

Same procedure as described for compound IXa was used starting from **61c** (1 eq., 250 mg, 0.82 mmol) in EtOAc (13 mL) some Raney nickel was added follow by hydrazine hydrate (1.5 eq., 0.06 mL, 1.22 mmol) in EtOAc (20 mL). Final solid was recrystallized from EtOAc to afford **IXc** (185 mg, 82%).

¹H NMR (DMSO-d₆, δ ppm, J Hz): 8.03 (m, 1H, H_{5'}), 7.85-7.82 (m, 2H, H_{6''} and H_{2''}), 7.58-7.53 (m, 2H, H_{5''} and H_{3''}), 7.44 (m, 1H, H_{4''}), 7.38 (dd, 1H, H_{3'}, J = 0.7 Hz and J = 3.5 Hz), 6.89-6.78 (m, 3H, H₄, H₆ and H_{4'}), 5.24 (br s, 2H, NH₂).

¹³C NMR (DMSO, δ ppm): 155.1 (C), 147.6 (C), 147.0 (CH), 143.5 (C), 142.4 (C), 140.0 (C), 135.8 (C), 129.4 (2 CH), 128.5 (CH), 128.1 (2 CH), 124.4 (C), 114.7 (CH), 113.1 (CH), 112.1 (CH), 102.6 (CH).

LC-MS (ESI) m/z found: 277 [M+H]⁺.

HPLC: C4 column: t_R = 14.1 min, purity > 99%; C18 column: t_R = 22.9 min, purity >99%.

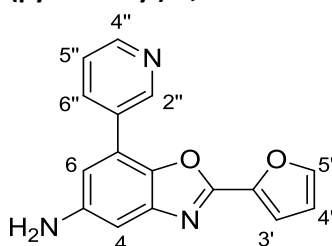
Molecular formula: C₁₇H₁₂N₂O₂

Molecular weight: 276.29 g/mol

Melting point: 182 °C

Aspect: white solid

2-(Furan-2-yl)-7-(pyridin-3-yl)-1,3-benzoxazol-5-amine (IXd)



Procedure:

Same procedure as described for compound **IXa** was used starting from **61d** (1 eq., 190 mg, 0.618 mmol) in EtOAc (20 mL) with Raney nickel and hydrazine hydrate (2 eq., 0.06 mL, 1.24 mmol). Final solid was recrystallized from EtOAc to afford **IXd** (120 mg, 70%).

¹H NMR (DMSO-d₆, δ ppm, J Hz): 9.03 (d, 1H, J = 1.8 Hz, H_{2''}), 8.63 (dd, 1H, J = 1.4 Hz and J = 4.7 Hz, H_{4''}), 8.22-8.18 (m, 1H, H_{6''}), 8.03 (m, 1H, H_{5'}), 7.60-7.56 (m, 1H, H_{5''}), 7.39 (d, 1H, J = 3.5 Hz, H_{3'}), 6.95 (d, 1H, J = 2.0 Hz, H₄), 6.90 (d, 1H, J = 2.0 Hz, H₆), 6.79 (dd, 1H, J = 1.7 Hz and J = 3.5 Hz, H_{4'}), 5.28 (br s, 2H, NH₂).

¹³C NMR (DMSO, δ ppm): 155.3 (C), 149.5 (C), 148.8 (CH), 147.8 (CH), 147.2 (CH), 143.6 (C), 142.3 (C), 140.0 (C), 135.5 (CH), 131.6 (C), 124.5 (CH), 121.1 (C), 115.0 (CH), 113.2 (CH), 111.9 (CH), 103.3 (CH).

LC-MS (ESI) m/z found: 278 [M+H]⁺.

HPLC: C4 column: t_R = 14.9 min, purity >99%; C18 column: t_R = 17.1 min, purity >99%.

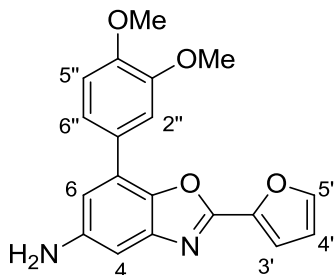
Molecular formula: C₁₆H₁₁N₃O₂

Molecular weight: 277.28 g/mol

Melting point: 176 °C

Aspect: white solid

7-(3,4-Dimethoxyphenyl)-2-(furan-2-yl)-1,3-benzoxazol-5-amine (IXe)



Procedure:

Same procedure as described for compound IXa was used starting from 61e (1 eq., 150 mg, 0.41 mmol) in EtOAc (5 mL) and THF (2 mL) with hydrazine hydrate (1.5 eq., 0.03 mL, 0.614 mmol) and Raney nickel. Final solid was suspended from diethyl ether and filtered to afford IXe (48 mg, 35%).

¹H NMR (DMSO-d₆, δ ppm, J Hz): 8.02 (m, 1H, H_{5'}), 7.40-7.34 (m, 3H, H₄, H_{6''} and H_{3'}), 7.14-7.11 (m, 1H, H_{2''}), 6.91 (m, 1H, H₄), 6.80 (m, 2H, H_{5''} and H_{4'}), 5.17 (br s, 2H, NH₂), 3.86 (s, 3H, OMe), 3.83 (s, 3H, OMe).

¹³C NMR (DMSO, δ ppm): 155.0 (C), 149.3 (C), 149.2 (C), 147.5 (C), 147.0 (CH), 143.4 (C), 142.5 (C), 139.9 (C), 128.2 (C), 124.3 (C), 120.6 (CH), 114.6 (CH), 113.1 (CH), 112.6 (CH), 111.7 (2 CH), 102.0 (CH), 56.1 (CH₃), 56.0 (CH₃).

LC-MS (ESI) m/z found: 337 [M+H]⁺.

HPLC: C4 column: t_R = 14.2 min, purity >99%; C18 column: t_R = 22.1 min, purity 95%.

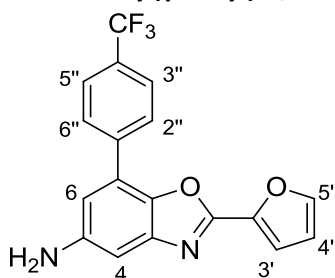
Molecular formula: C₁₉H₁₆N₂O₄

Molecular weight: 336.34 g/mol

Melting point: 172 °C

Aspect: white solid

2-(Furan-2-yl)-7-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1,3-benzoxazol-5-amine (IXf)



Procedure:

Same procedure as described for compound IXa was used starting from 61f (1 eq., 100 mg, 0.267 mmol) in MeOH (4 mL) and THF (2 mL) with hydrazine hydrate (1.5 eq., 0.02 mL, 0.40 mmol) and Raney nickel. Final solid was recrystallized from diethyl ether and filtered to afford IXf (30 mg, 33%).

¹H NMR (DMSO-d₆, δ ppm, J Hz): 8.05 (m, 3H, H_{5'}, H_{5''} and H_{3''}), 7.91 (d, 2H, J = 8.2 Hz, H_{6''} and H_{2''}), 7.41 (d, 1H, J = 3.3 Hz, H_{3'}), 6.98 (d, 1H, J = 1.9 Hz, H₄), 6.92 (d, 1H, J = 1.9 Hz, H₆), 6.79 (dd, 1H, J = 1.7 Hz and J = 3.5 Hz, H_{4'}), 5.30 (br s, 2H, NH₂).

¹³C NMR (DMSO, δ ppm): 155.3 (C), 147.8 (CH), 147.2 (CH), 143.6 (C), 142.3 (C), 140.0 (C), 139.8 (C), 128.9 (2 CH), 128.6 (C), 126.5 (C), 126.4 (CH), 126.3 (CH), 122.9 (C), 122.7 (C), 115.0 (CH), 113.2 (CH), 112.1 (CH), 103.6 (CH).

LC-MS (ESI) m/z found: 345 [M+H]⁺.

HPLC: C4 column: t_R = 16.1 min, purity 98%; C18 column: t_R = 26.0 min, purity >99%.

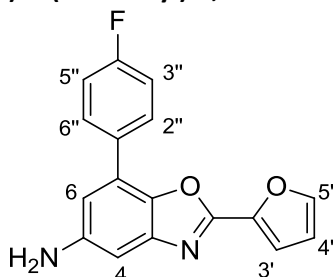
Molecular formula: C₁₈H₁₁F₃N₂O₂

Molecular weight: 344.29 g/mol

Melting point: 206 °C

Aspect: beige solid

7-(4-Fluorophenyl)-2-(furan-2-yl)-1,3-benzoxazol-5-amine (IXg)



Procedure:

Same procedure as described for compound **61a** was used starting from **54** (1 eq., 400 mg, 1.51 mmol), K₃PO₄ (2 eq., 641 mg, 1.51 mL, 3.02 mmol), 4-fluorobenzeneboronic acid (1.5 eq., 317 mg, 2.27 mmol), palladium diacetate (2%, 6.79 mg, 0.0302 mmol) and triphenylphosphine (4%, 15.9 mg, 0.061 mmol) in dioxane (7 mL). Final solid was suspended with cold diethyl ether and filtered to give a beige solid which was directly engaged to next step.

Solid was suspended in EtOAc (17 mL) and Raney nickel was added followed by hydrazine hydrate (1.5 eq., 0.07 mL, 1.5 mmol). The mixture was stirred for 2h at room temperature and then catalyst was filtered off. The reaction mixture was hydrolysed with water and then extracted three times with ethyl acetate. Combined organic layers were dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo* to afford **IXg** (70 mg, 24%) after recrystallization from diethyl ether and petroleum ether (1/5).

¹H NMR (DMSO-d₆, δ ppm, J Hz): 8.04 (m, 1H, H_{5'}), 7.85 (d, 2H, J = 8.7 Hz, H_{5''} and H_{3''}), 7.42-7.36 (m, 3H, H_{3'}, H_{6''} and H_{2''}), 6.89 (d, 1H, J = 1.8 Hz, H₄), 6.84 (d, 1H, J = 1.8 Hz, H₆), 6.79 (dd, 1H, J = 1.7 Hz and J = 3.5 Hz, H_{4'}), 5.23 (br s, 2H, NH₂).

¹³C NMR (DMSO, δ ppm): 164.0 (C), 160.7 (C), 155.14 (C), 147.7 (CH), 147.1 (C), 143.4 (C), 142.4 (C), 139.9 (C), 132.2 (CH), 123.3 (C), 130.1 (CH), 116.5 (CH), 116.2 (CH), 114.8 (CH), 113.1 (CH), 112.0 (CH), 102.6 (CH).

LC-MS (ESI) m/z found: 295 [M+H]⁺.

HPLC: C4 column: t_R = 14.3 min, purity >99%; C18 column: t_R = 23.5 min, purity >99%.

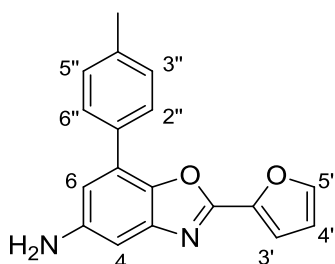
Molecular formula: C₁₇H₁₁FN₂O₂

Molecular weight: 294.28 g/mol

Melting point: 173°C

Aspect: beige solid

2-(Furan-2-yl)-7-(p-tolyl)-1,3-benzoxazol-5-amine (IXh)



Procedure:

Same procedure as described for compound IXa was used starting from **61h** (1 eq., 135 mg, 0.42 mmol) with Raney nickel and hydrazine hydrate (1 eq., 0.021 mL, 0.42 mmol) in EtOAc (6 mL). Final solid was recrystallized from diethyl ether to afford **IXh** (80 mg, 65%).

¹H NMR (DMSO-d₆, δ ppm, J Hz): 8.03 (m, 1H, H_{5'}), 7.71 (m, 2H, H_{5''} and H_{3''}), 7.36 (m, 3H, H_{3'}, H_{6''} and H_{2''}), 6.89-6.78 (m, 3H, H₄, H₆ and H_{4'}), 5.20 (br s, 2H, NH₂).

¹³C NMR (DMSO, δ ppm): 155.1 (C), 147.6 (C), 147.0 (CH), 143.4 (C), 142.5 (C), 140.0 (C), 137.9 (C), 132.8 (C), 130.0 (2 CH), 129.8 (2 CH), 124.3 (C), 114.7 (CH), 113.1 (CH), 111.8 (CH), 102.3 (CH), 21.3 (CH₃).

LC-MS (ESI) m/z found: 291 [M+H]⁺.

HPLC: C4 column: t_R = 14.9 min, purity 98%; C18 column: t_R = 24.2 min, purity >99%.

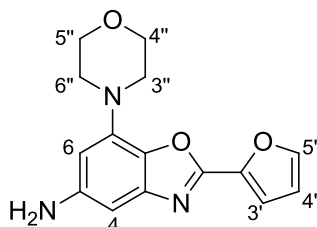
Molecular formula: C₁₈H₁₄N₂O₂

Molecular weight: 290.3 g/mol

Melting point: 182 °C

Aspect: white solid

2-(furan-2-yl)-7-morpholino-1,3-benzoxazol-5-amine (IXi)



Procedure:

Same procedure as described for compound IXa was used starting from **61i** (1 eq., 215 mg, 0.68 mmol) in EtOAc (22 mL) with Raney nickel and hydrazine hydrate (2 eq., 0.07 mL, 1.36 mmol). Final solid was recrystallized from EtOAc/PE (9/1) mixture to afford **IXi** (52 mg, 27%).

¹H NMR (DMSO-d₆, δ ppm, J Hz): 8.00 (m, 1H, H_{5'}), 7.34 (d, 1H, J = 3.1 Hz, H_{3'}), 6.75 (dd, 1H, J = 1.7 Hz and J = 3.5 Hz, H_{4'}), 6.39 (d, 1H, J = 1.8 Hz, H₄), 6.17 (d, 1H, J = 1.8 Hz, H₆), 5.01 (br s, 2H, NH₂), 3.80 (t, 4H, J = 4.4 Hz, H_{morpholine}), 3.80 (t, 4H, J = 4.4 Hz, H_{morpholine}).

¹³C NMR (DMSO, δ ppm): 154.0 (C), 147.7 (C), 146.8 (C), 143.8 (CH), 142.5 (C), 137.0 (C), 133.7 (C), 114.3 (CH), 113.0 (CH), 100.5 (CH), 95.4 (CH), 66.5 (CH₂), 49.6 (CH₂).

LC-MS (ESI) m/z found: 286 [M+H]⁺.

HPLC: C4 column: t_R = 7.9 min, purity 98%; C18 column: t_R = 19.4 min, purity >99%.

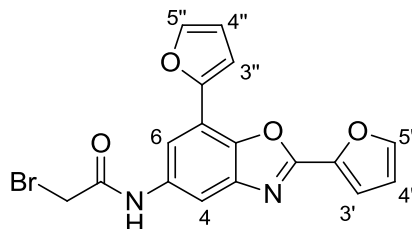
Molecular formula: C₁₅H₁₅N₃O₃

Molecular weight: 285.3 g/mol

Melting point: 158 °C

Aspect: pale yellow solid

2-Bromo-N-(2,7-di(furan-2-yl)-1,3-benzoxazol-5-yl)acetamide (62a)



Procedure:

To a solution of **IXa** (1 eq., 180 mg, 0.676 mmol) in EtOAc (10 mL) and H₂O (3 mL) with K₂CO₃ (3 eq., 280 mg, 2.03 mmol) at 0 °C was added dropwise bromoacetyl bromide (1.3 eq., 0.08 mL, 0.88 mmol) diluted in EtOAc (3 mL). After 1h stirring at room temperature, water was added and mixture was extracted three times with EtOAc. Combined organic layers were washed with 0.5 M HCl solution, brine, dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. Solid was suspended in diethyl ether and filtered to afford **62a** (165 mg, 63%).

¹H NMR (DMSO-d₆, δ ppm, J Hz): 10.67 (br s, 1H, NH), 8.11 (m, 1H, H_{5'} or H_{5''}), 7.97-7.94 (m, 3H, H_{5'} or H_{5''}, H₄ and H₆), 7.64 (d, 1H, *J* = 3.0 Hz, H₃ or H_{3''}), 7.26 (d, 1H, *J* = 3.0 Hz, H₃ or H_{3''}), 6.85 (m, 1H, H_{4'} or H_{4''}), 6.77 (dd, 1H, *J* = 1.7 Hz and *J* = 3.5 Hz, H_{4'} or H_{4''}), 4.09 (s, 2H, CH₂).

¹³C NMR (DMSO, δ ppm): 165.5 (C), 156.2 (C), 155.9 (C), 147.4 (CH), 144.5 (CH), 142.6 (C), 141.7 (C), 141.6 (C), 136.3 (C), 116.4 (CH), 114.9 (C), 113.4 (CH), 113.1 (CH), 112.2 (CH), 111.3 (CH), 109.5 (CH), 62.4 (CH₂).

LC-MS (ESI) m/z found: 387, 389 [M+H]⁺.

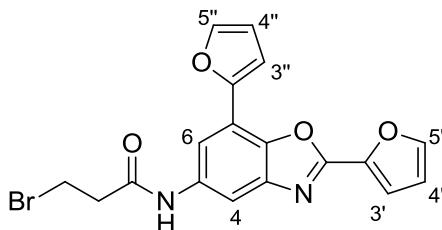
Molecular formula: C₁₇H₁₁BrN₂O₄

Molecular weight: 385.99 g/mol

Melting point: 244 °C

Aspect: white solid

3-Bromo-N-(2,7-di(furan-2-yl)-1,3-benzoxazol-5-yl)propanamide (62b)



Procedure:

Same procedure as described for **62a** starting from **IXa** (1 eq., 628 mg, 2.37 mmol) with K₂CO₃ (3 eq., 979 mg, 7.09 mmol) and 3-bromopropionyl chloride (2 eq., 0.48 mL, 4.73 mmol) diluted in EtOAc (20 mL) and H₂O (6 mL) was used to afford **62b** (370 mg, 39%).

¹H NMR (DMSO-d₆, δ ppm, J Hz): 10.35 (br s, 1H, NH), 8.11 (m, 1H, H_{5'} or H_{5''}), 8.0-7.98 (m, 2H, H_{5'} or H_{5''} and H₆), 7.93 (m, 1H, H₄), 7.64 (dd, 1H, *J* = 0.6 Hz and *J* = 3.6 Hz, H₃ or H_{3''}), 7.25 (dd, 1H, *J* = 0.6 Hz

and $J = 3.6$ Hz, H_3 or $H_{3''}$), 6.85 (dd, 1H, $J = 1.7$ Hz and $J = 3.5$ Hz, $H_{4'}$ or $H_{4''}$) 6.76 (dd, 1H, $J = 1.7$ Hz and $J = 3.5$ Hz, $H_{4'}$ or $H_{4''}$), 3.77 (t, 2H, $J = 6.3$ Hz, CH_2CH_2), 3.00 (t, 2H, $J = 6.4$ Hz, CH_2CH_2).

^{13}C NMR (DMSO, δ ppm): 168.8 (C), 156.0 (C), 147.8 (CH), 147.6 (C), 144.3 (CH), 142.6 (C), 141.8 (C), 141.1 (C), 137.2 (C), 116.1 (CH), 114.7 (C), 113.3 (CH), 113.0 (CH), 111.9 (CH), 111.0 (CH), 109.0 (CH), 41.3 (CH_2), 29.6 (CH_2).

LC-MS (ESI) m/z found: 401, 403 $[M+H]^+$.

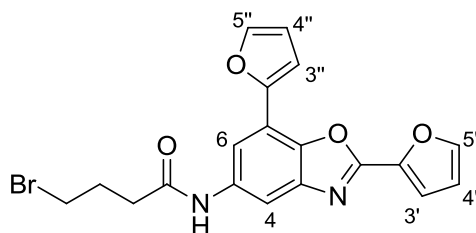
Molecular formula: $C_{18}H_{13}BrN_2O_4$

Molecular weight: 401.21 g/mol

Melting point: 250 °C

Aspect: white solid

4-Bromo-*N*-(2,7-di(furan-2-yl)-1,3-benzoxazol-5-yl)butanamide (62c)



Procedure:

Same procedure as described for **62a** (1 eq., 600 mg, 2.25 mmol) starting from **IXa** with K_2CO_3 (3 eq., 979 mg, 7.09 mmol) and 4-bromobutyryl chloride (2 eq., 0.55 mL, 4.73 mmol) in EtOAc (40 mL) and water was used to afford **62c** (350 mg, 37%).

1H NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J Hz): 10.26 (br s, 1H, NH), 8.11 (m, 1H, $H_{5'}$ or $H_{5''}$), 8.00-7.98 (m, 2H, $H_{5'}$ or $H_{5''}$ and H_6), 7.93 (m, 1H, H_4), 7.64 (dd, 1H, $J = 3.0$ Hz, H_3 or $H_{3''}$), 7.25 (dd, 1H, $J = 3.0$ Hz, H_3 or $H_{3''}$), 6.85 (dd, 1H, $J = 1.7$ Hz and $J = 3.5$ Hz, $H_{4'}$ or $H_{4''}$) 6.76 (dd, 1H, $J = 1.7$ Hz and $J = 3.5$ Hz, $H_{4'}$ or $H_{4''}$), 3.62 (t, 2H, $J = 6.6$ Hz, $CH_2CH_2CH_2$), 2.55 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz, $CH_2CH_2CH_2$), 2.20-2.13 (m, 2H, $CH_2CH_2CH_2$).

LC-MS (ESI) m/z found: 415, 417 $[M+H]^+$.

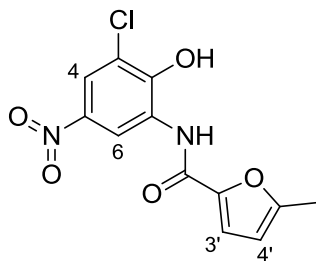
Molecular formula: $C_{19}H_{15}BrN_2O_4$

Molecular weight: 415.24 g/mol

Melting point: 275 °C

Aspect: purple solid

***N*-(3-chloro-2-hydroxy-5-nitrophenyl)-5-methylfuran-2-carboxamide (63)**



Procedure:

Same procedure as described for compound **53**, starting from 5-methylfuran-2-carboxylic acid (1.5 eq., 2.5 g, 19.8 mmol) and 2-amino-6-chloro-4-nitrophenol (1 eq., 2.49 g, 13.2 mmol) have been used to afford **63** (2.63 g, 67%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J* Hz): 9.62 (br s, 1H, OH), 8.61 (d, 1H, *J* = 2.8 Hz, H₄), 8.12 (d, 1H, *J* = 2.8 Hz, H₆), 7.28 (d, 1H, H_{3'}, *J* = 3.4 Hz), 6.38 (m, 1H, H_{4'}), 3.6 (br m, 1H NH), 2.40 (s, 3H, Me).

¹³C NMR (DMSO, δ ppm): 156.9 (C), 156.4 (C), 152.2 (C), 145.6 (C), 139.2 (C), 127.6 (C), 121.9 (CH), 121.3 (C), 117.8 (CH), 117.5 (CH), 109.6 (CH), 14.0 (CH₃)

LC-MS (ESI) m/z found: 297, 299 [M+H]⁺.

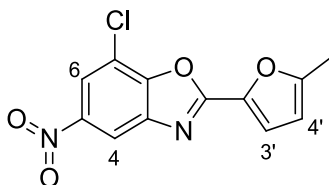
Molecular formula: C₁₂H₉ClN₂O₅

Molecular weight: 296.66 g/mol

Melting point: 270 °C

Aspect: brown solid

7-chloro-2-(5-methylfuran-2-yl)-5-nitro-1,3-benzoxazole (64)



Procedure:

Same procedure as described for **54** have been used starting from compound **63** (1 eq., 2.63 g, 8.87 mmol) with PTSA (3 eq., 4.58 g, 26.6 mmol) in toluene (147 mL). Final solid was recrystallized from EtOH/H₂O (10/1) to afford **64** (1.78 g, 72%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J* Hz): 8.56 (d, 1H, *J* = 2.8 Hz, H₄), 8.40 (d, 1H, *J* = 2.8 Hz, H₆), 6.54 (dd, 1H, *J* = 0.3 Hz and *J* = 3.5 Hz, H_{3'}), 6.51 (dd, 1H, *J* = 0.9 Hz and *J* = 3.5 Hz, H_{4'}), 2.46 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (DMSO, δ ppm): 158.9 (C), 157.8 (C), 150.5 (C), 145.9 (C), 143.2 (C), 139.1 (C), 121.4 (CH), 119.6 (CH), 115.7 (C), 114.8 (CH), 110.4 (CH), 14.1 (CH₃)

LC-MS (ESI) m/z found: 279, 281 [M+H]⁺.

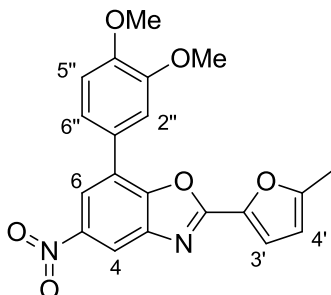
Molecular formula: C₁₂H₇ClN₂O₄

Molecular weight: 278.65 g/mol

Melting point: 173 °C

Aspect: brown solid

7-(3,4-Dimethoxyphenyl)-2-(5-methylfuran-2-yl)-5-nitro-1,3-benzoxazole (65)



Procedure:

Same procedure as described for compound **61e** was used starting from **64** (1 eq., 724 mg, 2.6 mmol) with 3,4-dimethoxyphenylboronic acid (1.5 eq., 710 mg, 3.9 mmol), K_3PO_4 (2 eq., 1104 mg, 2.6 mmol, 5.2 mmol), palladium diacetate (2%, 11.7 mg, 0.052 mmol) and triphenylphosphine (4%, 27.3 mg, 0.104 mmol) in dioxane (14 mL). Final solid was obtained after purification by flash chromatographic (PE/EtOAc: 8/2) to afford compound **65** (290 mg, 29%).

1H NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J Hz): 8.45 (m, 1H, H_6), 8.41 (m, 1H, H_4), 7.55 (m, 2H, $H_{6''}$ and $H_{2''}$), 7.45 (m, 1H, H_3), 7.17-7.15 (m, 1H, $H_{5''}$), 6.49 (m, 1H, H_4'), 3.90 (s, 3H, OMe), 3.85 (s, 3H, OMe), 2.45 (s, 3H, Me).

^{13}C NMR (DMSO, δ ppm): 158.3 (C), 157.8 (C), 150.9 (C), 150.2 (C), 149.5 (C), 146.0 (C), 143.0 (C), 139.6 (C), 125.6 (C), 125.1 (C), 121.4 (CH), 119.1 (CH), 118.8 (CH), 113.6 (CH), 112.6 (CH), 112.0 (CH), 110.2 (CH), 56.1 (2 CH_3), 14.0 (CH_3).

LC-MS (ESI) m/z found: 381 $[M+H]^+$.

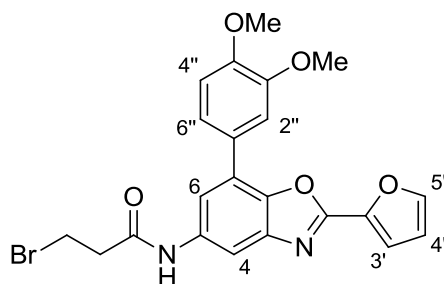
Molecular formula: $C_{20}H_{16}N_2O_6$

Molecular weight: 380.15 g/mol

Melting point: 161°C

Aspect: pale brown solid

3-Bromo-*N*-(7-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-(furan-2-yl)-1,3-benzoxazol-5-yl)propanamide (66)



Procedure:

Same procedure as described for compound **62b** was used starting from **61e** (1 eq., 485 mg, 1.44 mmol) with 3-bromopropionyl chloride (2 eq., 0.29 mL, 2.89 mmol) and K_2CO_3 (3 eq., 598 mg, 4.33 mmol) in EtOAc (24 mL) and water (14 mL) to afford **66** (284 mg, 42%).

1H NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J Hz): 10.30 (br s, NH), 8.08 (m, 2H), 7.73 (d, 1H, $J = 1.9$ Hz), 7.45-7.42 (m, 3H), 7.16 (m, 1H), 6.82 (dd, 1H, $J = 1.7$ Hz and $J = 3.5$ Hz, H_4), 3.88 (s, 3H, OMe), 3.84 (s, 3H, OMe), 3.75 (m, 2H, CH_2CH_2), 3.00 (m, 2H, CH_2CH_2).

¹³C NMR (DMSO, δ ppm): 168.8 (C), 155.9 (C), 149.6 (CH), 149.4 (C), 147.6 (CH), 143.5 (C), 142.6 (C), 142.0 (C), 137.2 (C), 127.3 (C), 124.5 (CH), 120.8 (C), 115.8 (CH), 115.6 (CH), 113.3 (CH), 112.7 (CH), 111.7 (CH), 108.8 (CH), 56.1 (CH₃), 56.0 (CH₃), 55.7 (CH₂), 29.6 (CH₂).

LC-MS (ESI) m/z found: 471, 473 [M+H]⁺.

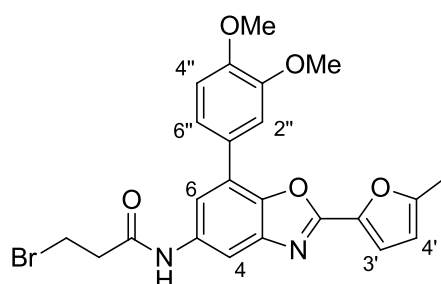
Molecular formula: C₁₉H₁₉BrN₂O₅

Molecular weight: 471.30 g/mol

Melting point: 173°C

Aspect: white solid

3-Bromo-N-(7-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-(5-methylfuran-2-yl)-1,3-benzoxazol-5-yl)propanamide (67)



Procedure:

To a solution of **65** (1 eq., 290 mg, 0.762 mmol) in EtOAc (12.9 mL) with Raney nickel was added hydrazine hydrate (1.5 eq., 0.06 mL, 1.14 mmol). Mixture was stirred for 2h and catalyst was filtered off. K₂CO₃ (3 eq., 316 mg, 2.29 mmol) was added with water (7 mL) and 3-bromopropionyl chloride (2 eq., 0.15 mL, 1.52 mmol) diluted in EtOAc (13 mL) was added dropwise to the mixture at 0°C.

After 1h stirring at room temperature, organic layer was extracted three times with EtOAc. Combined organic layer were dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. Solid was suspended in diethyl ether and filtered to afford **67** (170 mg, 46%).

¹H NMR (DMSO-d₆, δ ppm, J Hz): 10.28 (br s, 1H, NH), 8.08 (d, 1H, *J* = 1.7 Hz, H₄), 7.70 (d, 1H, *J* = 1.7 Hz, H₆), 7.45 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz, H_{2''}), 7.41 (dd, 1H, *J* = 2.0 Hz and *J* = 8.3 Hz, H_{6''}), 7.33 (d, 1H, *J* = 3.5 Hz, H_{3'}), 7.16 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz, H_{4''}), 6.45 (m, 1H, H_{4'}), 3.88 (s, 3H, OMe), 3.84 (s, 3H, OMe), 3.77 (t, 2H, *J* = 6.4 Hz, CH₂CH₂), 3.00 (d, 2H, *J* = 6.4 Hz, CH₂CH₂), 2.49 (s, 3H, Me).

¹³C NMR (DMSO, δ ppm): 168.8 (C), 157.1 (C), 155.9 (C), 149.6 (C), 149.4 (C), 143.4 (C), 142.8 (C), 140.5 (C), 137.1 (C), 127.4 (C), 124.3 (CH), 120.7 (C), 116.9 (CH), 115.5 (CH), 112.7 (CH), 111.7 (CH), 109.8 (CH), 108.7 (CH), 56.1 (2 CH₃), 55.2 (CH₂), 29.6 (CH₂), 14.0 (CH₃).

LC-MS (ESI) m/z found: 485, 487 [M+H]⁺.

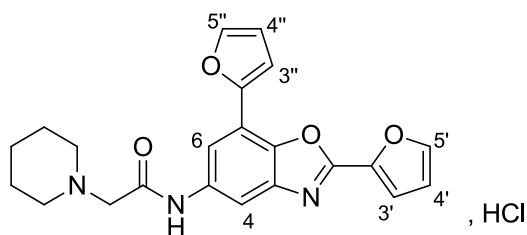
Molecular formula: C₂₃H₂₁BrN₂O₅

Molecular weight: 485.33 g/mol

Melting point: 187 °C

Aspect: white solid

***N*-(2,7-Di(furan-2-yl)-1,3-benzoxazol-5-yl)-2-(piperidin-1-yl)acetamide hydrochloride (Xa)**



Procedure:

To a solution of **62a** (1 eq., 150 mg, 0.387 mmol) in acetonitrile (20 mL) was added piperidine (3 eq., 0.11 mL, 1.16 mmol). The mixture was heated for 1h at reflux, cooled to room temperature and concentrated *in vacuo*. Solid was suspended in water and extracted three times with EtOAc. Combined organic layer were dried over MgSO₄, concentrated *in vacuo*. Solid was then solubilized in EtOAc and HCl gas was added, concentrated *in vacuo* and recrystallized from EtOH to afford **Xa** (130 mg, 78%).

¹H NMR (DMSO-d₆, δ ppm, J Hz): 11.39 (br s, 1H, NH⁺), 10.03 (br s, 1H, NH), 8.12 (m, 1H, H_{5'} or H_{5''}), 8.05 (m, 1H, H₄ or H₆), 8.03 (m, 1H, H₄ or H₆), 7.94 (d, 1H, H_{5'} or H_{5''}), 7.64 (d, 1H, *J* = 3.4 Hz, H_{3'} or H_{3''}), 7.27 (d, 1H, *J* = 3.4 Hz, H_{3'} or H_{3''}), 6.85 (dd, H, *J* = 1.7 Hz and *J* = 3.5 Hz, H_{4'} or H_{4''} and H₄), 6.77 (dd, 1H, *J* = 1.7 Hz and *J* = 3.5 Hz, H_{4'} or H_{4''}), 4.21 (s, 2H, CH₂), 3.50 (m, 2H, H_{piperidine}), 3.12 (m, 2H, H_{piperidine}), 1.18 (m, 4H, H_{piperidine}), 1.68 (m, 1H, H_{piperidine}), 1.42 (m, 1H, H_{piperidine}).

¹³C NMR (DMSO, δ ppm): 163.6 (C), 156.2 (C), 148.0 (C), 147.4 (CH), 144.5 (CH), 142.6 (C), 141.7 (C), 141.6 (C), 136.3 (C), 116.4 (CH), 114.9 (C), 113.4 (CH), 113.1 (CH), 112.2 (CH), 111.3 (CH), 109.5 (CH), 57.6 (CH₂), 53.5 (2 CH₂), 22.7 (2 CH₂), 21.6 (CH₂).

LC-MS (ESI) m/z found: 392 [M+H]⁺.

HPLC: C4 column: t_R = 15.9 min, purity > 99%; C18 column: t_R = 24.5 min, purity > 99%.

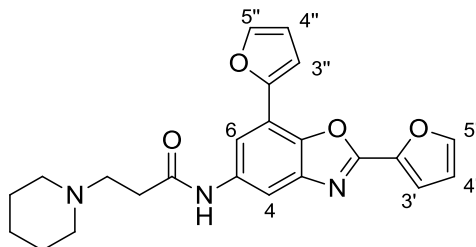
Molecular formula: C₂₂H₂₂ClN₃O₄

Molecular weight: 427.88 g/mol

Melting point: > 300 °C

Aspect: White solid

***N*-(2,7-Di(furan-2-yl)-1,3-benzoxazol-5-yl)-3-(piperidin-1-yl)propanamide (Xb)**



Procedure:

Same procedure as described for compound **Xa** was used starting from **62b** (1 eq., 170 mg, 0.424 mmol) with piperidine (3 eq., 0.13 mL, 1.27 mmol) in CH₃CN (15 mL) to afford **Xb** (115 mg, 61%) after recrystallization from EtOAc.

For biological studies, solid was solubilized in EtOAc and HCl gas was added, concentrated *in vacuo* and recrystallized from EtOH.

¹H NMR (DMSO-d₆, δ ppm, J Hz): 10.40 (br s, 1H, NH), 8.11 (m, 1H, H_{5'}), 7.98 (d, H, H₆, J = 1.8 Hz), 7.95 (d, 1H, H₄, J = 1.8 Hz), 7.93 (d, 1H, J = 1.2 Hz, H_{5''}), 7.62 (d, 1H, J = 3.0 Hz, H₃ or H_{3''}), 7.24 (d, 1H, J = 3.0 Hz, H₃ or H_{3''}), 6.84 (dd, 1H, J = 1.7 Hz and J = 3.5 Hz, H_{4'} or H_{4''}), 6.76 (dd, 1H, J = 1.7 Hz and J = 3.5 Hz, H_{4'} or H_{4''}), 2.63 (t, 2H, J = 6.3 Hz, CH₂CH₂), 2.50 (m, 2H, J = 6.4 Hz, CH₂CH₂), 2.40 (m, 4H, H_{piperidine}), 1.50 (m, 4H, H_{piperidine}), 1.39 (m, 2H, H_{piperidine}).

¹³C NMR (DMSO, δ ppm): 171.0 (C), 156.0 (C), 147.8 (CH), 147.6 (C), 144.3 (CH), 142.5 (C), 141.8 (C), 141.0 (C), 137.5 (C), 116.2 (CH), 114.7 (C), 113.3 (CH), 113.0 (CH), 111.8 (CH), 111.0 (CH), 109.9 (CH), 54.8 (CH₂), 54.1 (2 CH₂), 34.6 (CH₂), 26.0 (2 CH₂), 24.4 (CH₂).

LC-MS (ESI) m/z found: 406 [M+H]⁺.

HPLC: C4 column: t_R = 16.47 min, purity > 99%; C18 column: t_R = 24.75 min, purity > 99%.

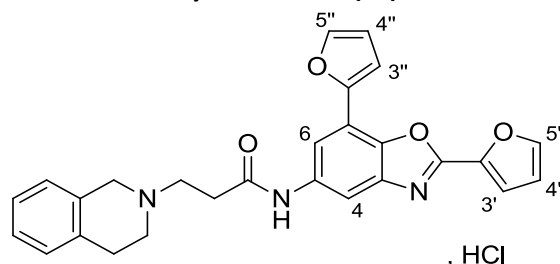
Molecular formula: C₂₃H₂₃N₃O₄

Molecular weight: 405.17 g/mol

Melting point: 268 °C

Aspect: white solid

***N*-(2,7-Di(furan-2-yl)-1,3-benzoxazol-5-yl)-3-(3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)propanamide hydrochloride (Xc)**



Procedure:

Same procedure as described for compound **Xa** was used starting from **62b** (1 eq., 190 mg, 0.474 mmol) in CH₃CN (17 mL) with 1,2,3,4-Tetra-hydroisoquinoline (3 eq., 0.18 mL, 1.42 mmol) to afford **Xc** (30 mg, 13%) after recrystallization from EtOH.

¹H NMR (DMSO-d₆, δ ppm, J Hz): 10.85 (br s, 1H, NH), 10.72 (br s, 1H, NH), 8.11 (m, 1H, H_{5'}), 8.04 (m, H, H₆), 8.02 (m, 1H, H₄), 7.94 (d, 1H, H_{5''}), 7.64 (m, 1H, J = 3.4 Hz, H₃ or H_{3''}), 7.28-7.23 (m, 5H, H_{tetrahydroisoquinoline} and H₃ or H_{3''}), 6.85 (dd, 1H, J = 1.7 Hz and J = 3.5 Hz, H_{4'} or H_{4''}), 6.77 (dd, 1H, J = 1.7 Hz and J = 3.5 Hz, H_{4'} or H_{4''}), 4.59-4.40 (m, 2H), 3.74-3.66 (m, 4H), 3.24-3.08 (m, 4H).

¹³C NMR (DMSO, δ ppm): 170.8 (C), 155.9 (C), 147.8 (CH), 147.7 (C), 144.3 (CH), 142.5 (C), 141.9 (C), 141.0 (C), 137.6 (C), 135.2 (C), 134.5 (C), 128.9 (C), 126.8 (CH), 126.4 (CH), 125.9 (CH), 116.1 (CH), 114.7 (CH), 113.3 (CH), 113.0 (CH), 111.8 (CH), 110.9 (CH), 108.9 (CH), 55.7 (CH₂), 54.1 (CH₂), 50.7 (CH₂), 35.0 (CH₂), 29.2 (CH₂)

LC-MS (ESI) m/z found: 454 [M+H]⁺.

HPLC: C4 column: t_R = 16.86 min, purity > 99%; C18 column: t_R = 26.16 min, purity > 99%.

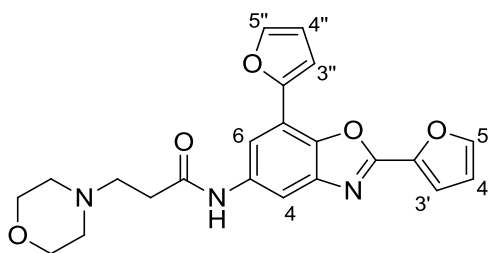
Molecular formula: C₂₇H₂₄ClN₃O₄

Molecular weight: 453.49 g/mol

Melting point: 256 °C

Aspect: white solid

***N*-(2,7-di(furan-2-yl)-1,3-benzoxazol-5-yl)-3-morpholinopropanamide (Xd)**



Procedure:

Same procedure as described for compound **Xb** was used starting from **62b** (1 eq., 150 mg, 0.374 mmol) in CH₃CN (10 mL) with morpholine (3 eq., 0.10 mL, 1.12 mmol) to afford **Xd** (120 mg, 72%) after recrystallization from EtOAc.

For biologic studies, solid was solubilized in AN and HCl gas was added to afford a solid which was filtered.

¹H NMR (DMSO-d₆, δ ppm, J Hz): 10.28 (br s, 1H, NH), 8.11 (m, 1H, H_{5'}), 7.98 (d, 1H, *J* = 1.9 Hz, H₆), 7.95 (d, 1H, *J* = 1.9 Hz, H₄), 7.93 (m, 1H, H_{5''}), 7.62 (d, 1H, *J* = 3.4 Hz, H₃ or H_{3''}), 7.24 (d, 1H, *J* = 3.4 Hz, H₃ or H_{3''}), 6.84 (dd, 1H, *J* = 1.7 Hz and *J* = 3.5 Hz, H_{4'} or H_{4''}), 6.76 (dd, 1H, *J* = 1.7 Hz and *J* = 3.5 Hz, H_{4'} or H_{4''}), 3.57 (t, 4H, *J* = 4.5 Hz, H_{morpholine}), 2.65 (t, 2H, *J* = 7.0 Hz, CH₂CH₂), 2.50 (t, 2H, *J* = 6.7 Hz, CH₂CH₂), 2.40 (m, 4H, H_{morpholine}).

¹³C NMR (DMSO, δ ppm): 170.8 (C), 156.0 (C), 147.8 (CH), 147.7 (C), 144.3 (CH), 142.5 (C), 141.9 (C), 141.0 (C), 137.5 (C), 116.1 (CH), 114.7 (C), 113.3 (CH), 113.0 (CH), 111.8 (CH), 111.0 (CH), 109.0 (CH), 66.7 (2 CH₂), 54.0 (CH₂), 53.5 (2 CH₂), 34.5 (CH₂).

LC-MS (ESI) m/z found: 408 [M-H]⁺.

HPLC: C4 column: t_R = 14.22 min, purity 99%; C18 column: t_R = 23.86 min, purity > 99%.

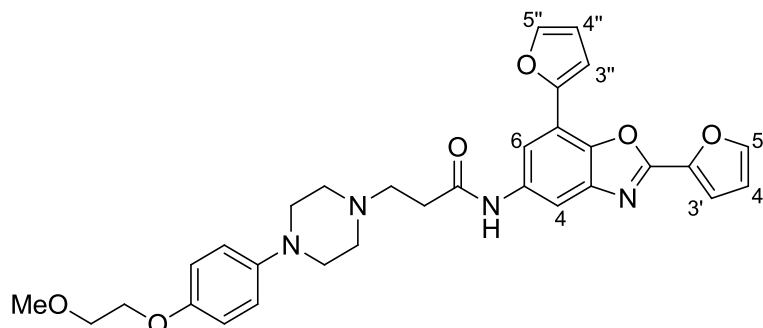
Molecular formula: C₂₂H₂₁N₃O₅

Molecular weight: 407.42 g/mol

Melting point: 130 °C

Aspect: white solid

***N*-(2,7-Di(furan-2-yl)-1,3-benzoxazol-5-yl)-3-(4-(4-(2-methoxyethoxy)phenyl)piperazin-1-yl)propanamide (Xe)**



Procedure:

Same procedure as described for compound **Xb** was used starting from **62b** (1 eq., 300 mg, 0.75 mmol) with Et₃N (1.2 eq., 0.13 mL, 0.89 mmol) and **17** (1.2 eq., 212 mg, 0.89 mmol) in CH₃CN (20 mL) to afford **Xe** (93 mg, 22%) after recrystallization from EtOAc.

¹H NMR (DMSO-d₆, δ ppm, J Hz): 10.34 (br s, 1H, NH), 8.11 (m, 1H, H_{5'}), 8.0 (d, 1H, J = 1.6 Hz, H₆), 7.97 (d, 1H, J = 1.6 Hz, H₄), 7.92 (d, 1H, J = 1.1 Hz, H_{5''}), 7.63 (d, 1H, J = 3.3 Hz, H₃ or H_{3''}), 7.24 (d, 1H, J = 3.3 Hz, H₃ or H_{3''}), 6.88-6.78 (m, 5H, H_{phenyl} and H_{4'} or H_{4''}) 6.76 (dd, 1H, J = 1.7 Hz and J = 3.5 Hz, H_{4'} or H_{4''}), 3.98 (t, 2H, J = 1.7 Hz, CH₂O), 3.60 (t, 2H, J = 1.7 Hz, OCH₂), 3.28 (s, 3H, OMe), 3.02 (m, 4H, H_{piperazine}), 2.71 (m, 2H, CH₂CH₂), 2.63-2.52 (m, 6H, CH₂CH₂ and H_{piperazine}).

¹³C NMR (DMSO, δ ppm): 170.8 (C), 156.0 (C), 152.5 (C), 147.8 (CH), 147.7 (C), 145.9 (C), 144.3 (CH), 142.5 (C), 141.9 (C), 141.0 (C), 137.5 (C), 117.7 (2 CH), 116.1 (CH), 115.4 (2 CH), 114.7 (C), 113.3 (CH), 113.0 (CH), 111.8 (CH), 110.9 (CH), 108.9 (CH), 71.0 (CH₂), 67.5 (CH₂), 58.6 (CH₃), 54.3 (2 CH₂), 53.0 (CH₂), 50.0 (2 CH₂), 34.8 (CH₂).

LC-MS (ESI) m/z found: 557 [M+H]⁺.

HPLC: C4 column: t_R = 16.65 min, purity > 99%; C18 column: t_R = 26.14 min, purity > 99%.

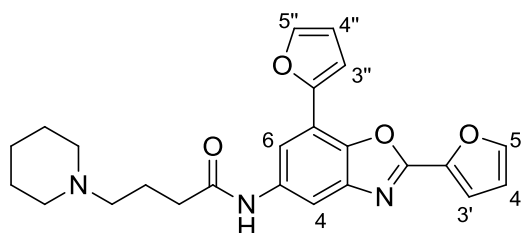
Molecular formula: C₃₁H₃₂N₄O₆

Molecular weight: 556.6 g/mol

Melting point: 185 °C

Aspect: white solid

***N*-(2,7-di(furan-2-yl)-1,3-benzoxazol-5-yl)-4-(piperidin-1-yl)butanamide (Xf)**



Procedure:

Same procedure as described for compound **Xb** was used starting from **62c** (1 eq., 150 mg, 0.36 mmol) in CH₃CN (5 mL) with piperidine (3 eq., 0.11 mL, 1.08 mmol) to afford **Xf** (65 mg, 43%) after recrystallization from AN.

For biologic studies, solid was solubilized in diethyl ether and HCl gas was added, stirred for a night and filtered.

¹H NMR (DMSO-d₆, δ ppm, J Hz): 10.14 (br s, 1H, NH), 8.11 (m, 1H, H_{5'}), 8.00 (m, 1H, H₆), 7.95 (m, 1H, H₄), 7.92 (m, 1H, H_{5''}), 7.62 (d, 1H, J = 3.0 Hz, H₃ or H_{3''}), 7.24 (d, 1H, J = 3.0 Hz, H₃ or H_{3''}), 6.84 (dd, 1H, J = 1.7 Hz and J = 3.5 Hz, H_{4'} or H_{4''}) 6.76 (dd, 1H, J = 1.7 Hz and J = 3.5 Hz, H_{4'} or H_{4''}), 2.35-2.25 (m, 8H, CH₂CH₂CH₂, CH₂CH₂CH₂ and H_{piperidine}), 1.78-1.73 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂), 1.46 (m, 4H, H_{piperidine}), 1.36 (m, 2H, H_{piperidine}).

¹³C NMR (DMSO, δ ppm): 171.9 (C), 155.9 (C), 147.8 (CH), 147.7 (CH), 144.3 (C), 142.5 (C), 141.9 (C), 140.9 (C), 137.7 (C), 116.1 (CH), 114.6 (C), 113.3 (CH), 112.9 (CH), 111.9 (CH), 110.9 (CH), 108.9 (CH), 58.5 (CH₂), 54.5 (2 CH₂), 35.0 (CH₂), 26.0 (2 CH₂), 24.6 (CH₂), 22.7 (CH₂).

LC-MS (ESI) m/z found: 420 [M+H]⁺.

HPLC: C4 column: t_R = 17.06 min, purity 98%; C18 column: t_R = 25.22 min, purity 98%.

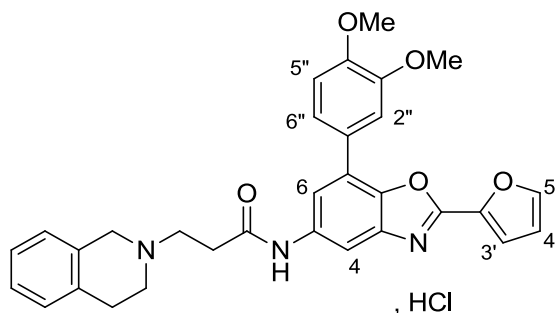
Molecular formula: C₂₄H₂₅N₃O₄

Molecular weight: 419.47 g/mol

Melting point: 156 °C

Aspect: white solid

3-(3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)-N-(7-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-(furan-2-yl)-1,3-benzoxazol-5-yl)propanamide (Xg)



Procedure:

Same procedure as described for compound **Xb** was used starting from **66** (1 eq., 200 mg, 0.424 mmol) with 1,2,3,4-Tetra-hydroisoquinoline (3 eq., 0.17 mL, 1.27 mmol) to afford **Xg** (50 mg, 22%) after recrystallization from EtOH.

¹H NMR (acetone-d₆, δ ppm, J Hz): 10.94 (br s, 1H, NH⁺), 10.70 (br s, 1H, NH), 8.11 (m, 2H, H_{5'} and H₆), 7.83 (m, 1H, H_{2''}), 7.46-7.44 (m, 3H, H₄, H_{6''} and H_{3'}), 7.28-7.18 (m, 5H, H_{5''} and H_{phenyl}), 6.84 (m, 1H, H_{4'}), 4.55-4.41 (m, 2H), 3.89 (s, 3H, OMe), 3.87 (s, 3H, OMe), 3.77 (m, 1H), 3.57 (m, 2H), 3.24-3.11 (m, 5H).

¹³C NMR (acetone, δ ppm): 168.4 (C), 155.9 (C), 149.7 (CH), 149.4 (CH), 147.7 (C), 143.5 (C), 142.6 (C), 142.0 (C), 137.2 (C), 131.8 (C), 129.0 (2 CH), 128.2 (C), 127.3 (C), 127.1 (2 CH), 124.4 (C), 120.8 (CH), 116.0 (C), 115.7 (CH), 113.4 (CH), 112.7 (CH), 111.7 (CH), 109.0 (CH), 56.1 (2 CH₃), 52.6 (CH₂), 51.6 (CH₂), 49.3 (CH₂), 31.2 (CH₂), 25.6 (CH₂).

LC-MS (ESI) m/z found: 522 [M-H]⁺.

HPLC: C4 column: t_R = 16.91 min, purity >99%; C18 column: t_R = 26.53 min, purity >99%.

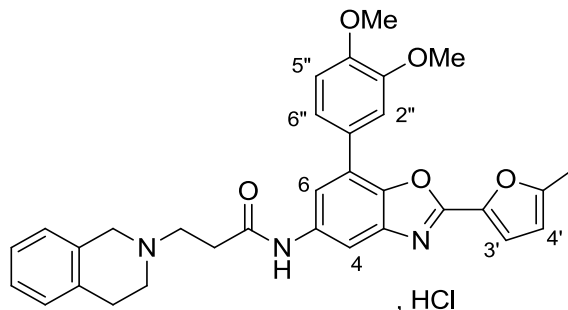
Molecular formula: C₃₁H₃₀ClN₃O₅

Molecular weight: 559.19 g/mol

Melting point: 249 °C

Aspect: beige solid

3-(3,4-Dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)-N-(7-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-(5-methylfuran-2-yl)-1,3-benzoxazol-5-yl)propanamide (Xh)



Procedure:

Same procedure as described for **Xb** was used starting from **67** (1 eq., 160 mg, 0.33 mmol) with 1,2,3,4-Tetra-hydroisoquinoline (3 eq., 0.12 mL, 0.99 mmol) in CH₃CN (12 mL) to afford **Xh** (45 mg, 25%) after recrystallization from EtOAc.

¹H NMR (acetone-d₆, δ ppm, J Hz): 10.62 (br s, 1H, NH), 8.06 (d, 1H, J = 2.0 Hz, H₆), 7.49 (d, 1H, J = 2.0 Hz, H₄ or H_{2''}), 7.48 (d, 1H, J = 2.0 Hz, H₄ or H_{2''}), 7.28 (dd, 1H, J = 2.1 Hz and J = 8.4 Hz, H_{6''}), 7.25 (d, 1H, J = 3.5 Hz, H_{3'}), 7.16-7.11 (m, 4H, H_{phenyl}), 7.07 (d, 1H, J = 3.5 Hz, H_{5''}), 6.36 (m, 1H, H_{4'}), 3.90 (s, 3H, OMe), 3.89 (s, 3H, OMe), 3.80 (m, 2H, H_{piperidine}), 2.99-2.92 (m, 6H, H_{piperidine} and CH₂CH₂), 2.67 (t, 2H, J = 6.7 Hz, CH₂CH₂), 2.44 (s, 3H, Me).

¹³C NMR (acetone, δ ppm): 170.1 (C), 156.6 (C), 155.8 (C), 149.7 (C), 149.6 (C), 143.2 (C), 143.1 (C), 141.0 (C), 137.3 (C), 134.6 (C), 134.1 (C), 128.6 (CH), 127.6 (C), 126.5 (CH), 126.2 (CH), 125.7 (CH), 124.2 (C), 120.3 (CH), 115.8 (CH), 114.8 (CH), 112.1 (CH), 111.7 (CH), 108.8 (CH), 108.4 (CH), 55.3 (2 CH₂), 55.3 (CH₃), 55.2 (CH₃), 53.6 (CH₂), 50.2 (CH₂), 33.8 (CH₂), 12.8 (CH₃).

LC-MS (ESI) m/z found: 538 [M+H]⁺.

HPLC: C4 column: t_R = 17.32 min, purity >99%; C18 column: t_R = 26.66 min, purity >99%.

Molecular formula: C₃₂H₃₁ClN₃O₅

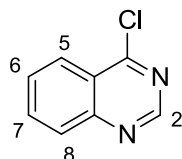
Molecular weight: 574.07 g/mol

Melting point: 251°C

Aspect: beige solid

3- Synthesis of quinazolines (Chap.3)

2-Chloro-3,4-dihydroquinazolin-4-ol (68)



Procedure:

To a solution of 4(1H)-quinazolinone (1 eq., 2 g, 13.7 mmol) with lutidine (0.07 eq., 0.11 mL, 0.96 mmol) in toluene (40 mL) at 0°C was added dropwise POCl₃ (3 eq., 3.83 mL, 41.1 mmol). Reaction mixture was refluxed for 40 min, cooled to room temperature, hydrolyzed with ice and extracted three times with EtOAc. Combined organic layers were dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. Solid was recrystallized from PE to afford **68** (1.2 g, 60%).

¹H NMR (DMSO-d₆, δ ppm, J Hz): 8.98 (s, 1H, H₂), 8.17 (dd, 1H, J = 1.2 Hz and J = 8.0 Hz, H_{quina}), 7.98-7.93 (m, 1H, H_{quina}), 7.87 (m, 1H, H_{quina}), 7.69-7.64 (m, 1H, H_{quina}).

LC-MS (ESI) m/z found: 165, 166 [M+H]⁺.

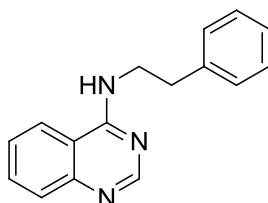
Molecular formula: C₈H₅ClN₂

Molecular weight: 164.59 g/mol

Melting point: 192 °C

Aspect: Pink solid

2-Chloro-N-phenethylquinazolin-4-amine (XIb)



Procedure:

To a solution of **68** (1 eq., 248 mg, 1.51 mmol) in THF (3 mL) was added phenethylamine (1.1 eq., 0.21 mL, 1.66 mmol) and Et₃N (1.3 eq., 0.27 mL, 1.96 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 2h, hydrolyzed with water and extracted three times with EtOAc. Combined organic layers were dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo* to afford a solid which was recrystallized from AN to afford **XIb** (225 mg, 32%).

¹H NMR (DMSO-d₆, δ ppm, J Hz): 8.49 (s, 1H, H₂), 8.41 (br t, 1H, J = 5.0 Hz, NH), 8.22 (d, 1H, J = 8.0 Hz, H_{quina}), 7.75 (m, 1H, H_{quina}), 7.67 (m, 1H, H_{quina}), 7.50 (m, 1H, H_{quina}), 7.32-7.19 (m, 5H, H_{phenyl}), 3.75 (m, 2H, CH₂CH₂), 2.97 (t, 2H, CH₂CH₂, J = 7.8 Hz).

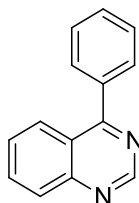
¹³C NMR (DMSO, δ ppm): 159.8 (C), 155.6 (CH), 149.5 (C), 140.0 (C), 132.9 (CH), 129.2 (2 CH), 128.8 (2 CH), 128.0 (CH), 126.6 (CH), 126.0 (CH), 123.1 (CH), 115.5 (C), 42.6 (CH₂), 35.0 (CH₂).

LC-MS (ESI) m/z found: 250 [M+H]⁺.

HPLC: C4 column: t_R = 13.5 min, purity 99%; C18 column: t_R = 21.5 min, purity 97%.

Molecular formula: C₁₆H₁₅N₃
Molecular weight: 249.31 g/mol
Melting point: 178 °C
Aspect: White crystal

4-Phenylquinazoline (Xlc)



Procedure:

A mixture of **68** (1 eq., 350 mg, 2.13 mmol), K₃PO₄ (2 eq., 902 mg, 4.25 mmol), phenylboronic acid (1.5 eq., 388 mg, 3.19 mmol), PPh₃ (4%, 22.3 mg, 0.085 mmol) and palladium diacetate (2%, 9.55 mg, 0.042 mmol) were placed into a mixture of dioxane (9 mL) and H₂O (1 mL) in a sealed tube, degassed and then heated at 110 °C for 2 hours. After cooling to room temperature, mixture was hydrolyzed with water and extracted three times with EtOAc. Combined organic layers were dried over MgSO₄, concentrated *in vacuo*, purified by flash chromatographie (EP/EtOAc: 10/0 to 9/1) and recrystallized from AN to afford **Xlc** (107 mg, 24%).

¹H NMR (DMSO-d₆, δ ppm, J Hz): 9.39 (s, 1H, H₂), 8.16-8.12 (m, 2H, H_{quina}), 7.93 (m, 1H, H_{quina}), 7.81-7.78 (m, 2H, H_{quina} and H_{ar}), 7.65-7.58 (m, 4H, H_{ar}).

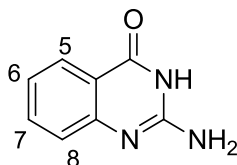
¹³C NMR (DMSO, δ ppm): 168.4 (C), 154.7 (CH), 151.1 (C), 137.1 (C), 133.7 (CH), 130.1 (CH), 130.0 (2 CH), 128.9 (CH), 128.7 (2 CH), 127.7 (CH), 127.1 (CH), 123.2 (C).

LC-MS (ESI) m/z found: 207 [M+H]⁺.

HPLC: C4 column: t_R = 29.9 min, purity >99%; C18 column: t_R = 25.8 min, purity 98%.

Molecular formula: C₁₄H₁₀N₂
Molecular weight: 206.24 g/mol
Melting point: 100°C
Aspect: White crystal

2-Aminoquinazolin-4(3H)-one (69)



Procedure:

2-bromobenzoic acid (1 eq., 1 g, 4.97 mmol), guanidine hydrochloride (2 eq., 950 mg, 9.95 mmol), CuI (0.1 eq., 947 mg, 0.497 mmol) and K₂CO₃ (4 eq., 2.75 g, 19.9 mmol) were dissolved in 20 mL of anhydrous DMF and stirred at 110 °C for 24h. The solvent was distilled off *in vacuo* and the residue filtered through a short pad of celite using DCM/MeOH (8/2) as eluant. Filtrate was concentrated *in vacuo*, suspended in water, put in the fridge for 1h and filtered to afford **69** (640 mg, 80%).

¹H NMR (DMSO-d₆, δ ppm, J Hz): 11.14 (br m, 1H, NH), 7.87 (dd, 1H, *J* = 1.5 Hz and *J* = 7.9 Hz, H_{quina}), 7.54 (ddd, 1H, *J* = 8.5 Hz, *J* = 1.6 Hz and *J* = 7.1 Hz, H_{quina}), 7.18 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz, H_{quina}), 7.13-7.03 (m, 1H, H_{quina}), 6.47 (br s, 2H, NH₂).

¹³C NMR (DMSO, δ ppm): 163.5 (C), 152.8 (C), 151.1 (C), 134.4 (CH), 126.4 (CH), 123.8 (C), 121.9 (CH), 117.6 (CH)

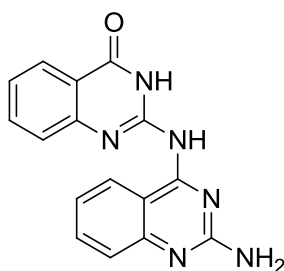
Molecular formula: C₈H₇N₃O

Molecular weight: 161.16 g/mol

Melting point: > 300 °C

Aspect: White solid

2-((2-Aminoquinazolin-4-yl)amino)quinazolin-4(3H)-one (70)



Procedure:

A suspension of **69** (1 eq., 600 mg, 3.72 mmol) in POCl₃ (20 mL) with lutidine (0.7 eq., 0.3 mL, 2.61 mmol) was heated at reflux for 3h, cooled to room temperature and concentrated *in vacuo*. Crude was suspended in water and the formed solid was filtered to afford **70** (432 mg, 38%).

¹H NMR (DMSO-d₆, δ ppm, J Hz): 7.85 (dd, 2H, *J* = 1.5 Hz and *J* = 7.9 Hz, H_{quina}), 7.51 (ddd, 2H, *J* = 1.6 Hz, *J* = 2.1 Hz and *J* = 8.5 Hz, H_{quina}), 7.15 (m, 2H, H_{quina}), 7.08-7.02 (m, 6H, H_{quina}, NH, NH and NH₂).

LC-MS (ESI) m/z found: 305 [M+H]⁺.

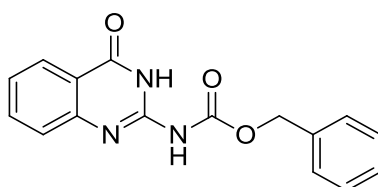
Molecular formula: C₁₆H₁₂N₆O

Molecular weight: 304.31 g/mol

Melting point:

Aspect: White solid

Benzyl (4-oxo-3,4-dihydroquinazolin-2-yl)carbamate (71)



Procedure:

To a solution of **69** (1 eq., 1.47 g, 9.12 mmol) in DMF (20 mL) with Et₃N (2 eq., 2.54 mL, 18.2 mmol) at 0°C was added dropwise benzyl chloroformate (1.5 eq., 1.95 mL, 13.7 mmol). After one night stirring at room temperature, benzyl chloroformate (1.5 eq., 1.95 mL, 13.7 mmol) and Et₃N (2 eq., 1.85 g, 2.54 mL, 18.2 mmol) were added again and stirred for 3h at 80 °C. The reaction mixture was then acidified with HCl 1 N solution and extracted 3 times with EtOAc. Combined organic layers were dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. Solid was suspended in diethyl ether to afford **71** (500 mg, 19%).

¹H NMR (DMSO-d₆, δ ppm, J Hz): 11.5 (br m, 1H, NH), 8.02 (dd, 1H, *J* = 7.9 Hz and *J* = 1.5 Hz, H_{Quina}), 7.74 (m, 1H, H_{Quina}), 7.46 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz, H_{Quina}), 7.42-7.30 (m, 7H, H_{Quina} and H_{Ar}), 5.23 (s, 2H, CH₂).

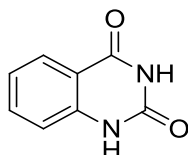
Molecular formula: C₁₆H₁₃N₃O₃

Molecular weight: 295.29g/mol

Melting point: > 300 °C

Aspect: White solid

Quinazoline-2,4(1H,3H)-dione (72)



Procedure:

To a suspension of anthranilic acid (1 eq., 15 g, 109 mmol) in H₂O (690 mL) and AcOH (7 mL) heated at 35 °C, was added dropwise a solution of potassium cyanate (1.3 eq., 11.5 g, 141 mmol) diluted in 50 mL of H₂O. After 2h stirring, the reaction mixture was cooled at 0 °C, NaOH (32.9 eq., 144 g, 3600 mmol) was added by fraction and the mixture was stirred for a night at room temperature. Solid formed was then filtered, suspended in water (400 mL) and acidified with 6 N HCl solution up to acid pH and filtered again. Solid was dried in the oven to afford **72** (13.7 g, 77%).

¹H NMR (DMSO-d₆, δ ppm, J Hz): 11.27 (br s, 1H, NH), 11.13 (br s, 1H, NH), 7.88 (dd, 1H, *J* = 1.4 Hz and *J* = 8.1 Hz, H_{Quina}), 7.62 (ddd, 1H, *J* = 1.4 Hz, *J* = 8.1 Hz and *J* = 7.1 Hz, H_{Quina}), 7.17 (m, 2H, H_{Quina}).

¹³C NMR (DMSO, δ ppm): 163.6 (C), 153.1 (C), 141.7 (CH), 135.8 (CH), 127.8 (C), 123.2 (CH), 116.1 (C), 115.2 (C).

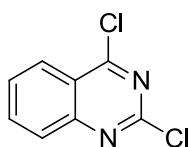
Molecular formula: C₈H₆N₂O₂

Molecular weight: 162.15 g/mol

Melting point: > 300 °C

Aspect: White solid

2,4-Dichloroquinazoline (73)



Procedure:

To a suspension of **72** (1 eq., 1 g, 6.17 mmol) in POCl₃ (7 eq., 4 mL, 42.9 mmol) was added lutidine (0.7 eq., 0.51 mL, 4.36 mmol) and the mixture was refluxed for 5h, cooled to room temperature and then concentrated *in vacuo*. Ice was added carefully and solid formed was filtered, washed with 1 N NaOH solution and dried in the oven to afford **73** (950 mg, 77%).

¹H NMR (DMSO-d₆, δ ppm, J Hz): 8.30 (ddd, 1H, *J* = 8.4 Hz, *J* = 1.4 Hz and *J* = 0.6 Hz, H_{Quina}), 8.17 (ddd, 1H, *J* = 1.4 Hz, *J* = 7.0 Hz and *J* = 8.4 Hz, H_{Quina}), 8.04 (ddd, 1H, *J* = 0.7 Hz, *J* = 1.1 Hz and *J* = 8.5 Hz, H_{Quina}), 8.17 (ddd, 1H, *J* = 1.2 Hz, *J* = 7.0 Hz and *J* = 8.3 Hz, H_{Quina}).

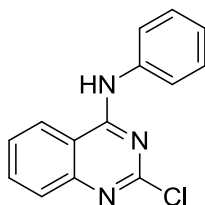
Molecular formula: C₈H₄Cl₂N₂

Molecular weight: 199.04 g/mol

Melting point: 119 °C

Aspect: Pink solid

***N*-benzyl-2-chloroquinazolin-4-amine (74a)**



Procedure:

To a solution of **73** (1 eq., 470 mg, 2.36 mmol) in THF (25 mL) was added aniline (1 eq., 0.21 mL, 2.36 mmol) and Et₃N (1.1 eq., 0.36 mL, 2.6 mmol). Mixture was stirred overnight at room temperature, hydrolyzed with water and extracted three times with EtOAc. Combined organic layer were dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash chromatographie (PE/EtOAc : 100/0 to 50/50) to afford **74a** (290 mg, 48%).

¹H NMR (DMSO-d₆, δ ppm, J Hz): 10.20 (br s, 1H, NH), 8.58 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, H_{quina}), 7.90 (m, 1H, H_{quina}), 7.79 (m, 2H), 7.73 (m, 1H), 7.66 (m, 1H), 7.45 (m, 2H), 7.22 (m, 1H).

LC-MS (ESI) m/z found: 256, 258 [M+H]⁺.

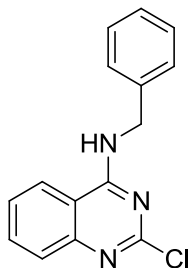
Molecular formula: C₁₄H₁₀ClN₃

Molecular weight: 255.70 g/mol

Melting point: 195 °C

Aspect: White solid

***N*-benzyl-2-chloroquinazolin-4-amine (74b)**



Procedure:

To a solution of **73** (1 eq., 542 mg, 2.72 mmol) in THF (5 mL) was added benzylamine (1.1 eq., 0.33 mL, 3 mmol) and Et₃N (1.5 eq., 0.57 mL, 4.08 mmol). The mixture was stirred at 30 °C for 25min, cooled to room temperature, hydrolyzed with water and extracted three times with EtOAc. Combined organic layers were washed with 0.5 N HCl solution, brine, dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. Solid was suspended in EtOAc and filtered to afford compound **74b** (550 mg, 75%).

¹H NMR (DMSO-d₆, δ ppm, J Hz): 9.31 (br t, 1H, *J* = 5.6 Hz, NH), 8.32 (dd, 1H, *J* = 8.3 Hz and *J* = 0.8 Hz, H_{quina}), 7.84-7.78 (m, 1H, H_{quina}), 7.64 (dd, 1H, *J* = 8.3 Hz, *J* = 0.8 Hz, H_{quina}), 7.58-7.53 (m, 1H, H_{quina}), 7.40-7.26 (m, 5H, H_{phenyl}), 4.75 (d, 2H, *J* = 5.7 Hz, CH₂)

¹³C NMR (DMSO, δ ppm): 161.6 (C), 157.4 (C), 150.8 (C), 139.0 (C), 134.2 (CH), 128.9 (2 CH), 127.9 (2 CH), 127.5 (CH), 127.1 (CH), 126.7 (CH), 123.6 (CH), 114.0 (C), 44.3 (CH₂).

LC-MS (ESI) m/z found: 270, 272 [M+H]⁺.

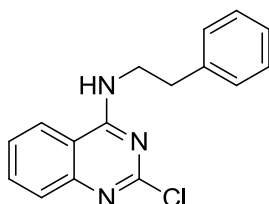
Molecular formula: C₁₅H₁₂ClN₃

Molecular weight: 269.73 g/mol

Melting point: 186 °C

Aspect: Beige solid

2-Chloro-N-phenethylquinazolin-4-amine (74c)



Procedure:

To a solution of **73** (1 eq., 500 mg, 2.51 mmol) in THF (5 mL) was added Et₃N (1.5 eq., 0.52 mL, 3.77 mmol) and phenethylamine (1 eq., 0.32 mL, 2.51 mmol) and the mixture was stirred at room temperature for 25 min, cooled to room temperature and concentrated *in vacuo*. Oil was suspended in water and extracted three times with EtOAc, dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. Solid was recrystallized from AN to afford **74c** (225 mg, 32%).

¹H NMR (DMSO-d₆, δ ppm, J Hz): 9.39 (br m, 1H, NH), 8.36 (m, 1H, H_{quina}), 7.83 (m, 1H, H_{quina}), 7.66 (m, 1H, H_{quina}), 7.56 (m, 1H, H_{quina}), 7.37-7.17 (m, 5H, H_{phenyl}), 3.76 (m, 2H, CH₂CH₂), 2.98 (t, 2H, J = 7.4 Hz, CH₂CH₂).

¹³C NMR (DMSO, δ ppm): 161.5 (C), 157.5 (C), 150.8 (C), 139.7 (C), 134.0 (CH), 129.2 (2 CH), 128.8 (2 CH), 127.1 (CH), 126.7 (CH), 126.5 (CH), 123.5 (CH), 114.0 (C), 42.9 (CH₂), 34.6 (CH₂).

LC-MS (ESI) m/z found: 284, 286 [M+H]⁺.

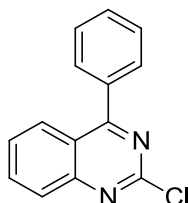
Molecular formula: C₁₆H₁₄ClN₃

Molecular weight: 283.76 g/mol

Melting point: 108 °C

Aspect: beige solid

2-Chloro-4-phenylquinazoline (75a)



Procedure:

A mixture of **73** (1 eq., 1 g, 5.02 mmol), K₃PO₄ (2 eq., 2.14 g, 10.04 mmol), phenylboronic acid (0.8 eq., 490 mg, 4.02 mmol), triphenylphosphine (0.04 eq., 52.7 mg, 0.2 mmol) and palladium diacetate (2%, 22.6 mg, 0.1 mmol) in dioxane (20 mL) and water (5 mL) was degassed for 2 min. Mixture was then heated at 40 °C in a sealed tube for 2h, cooled to room temperature, hydrolyzed with water and extracted three times with EtOAc. Combined organic layers were dried over MgSO₄ and concentrated

in vacuo to give an oil which was purified by flash chromatographie (PE/EtOAc : 10/0 to 97/3) to afford **75a** (187mg, 23%).

¹H NMR (DMSO-d₆, δ ppm, J Hz): 8.16 (dd, 1H, *J* = 0.7 Hz and *J* = 8.4 Hz, H_{quina}), 8.10-8.04 (m, 1H, H_{quina}), 7.96 (ddd, 1H, *J* = 1.4 Hz, *J* = 6.9 Hz and *J* = 8.4 Hz, H_{quina}), 7.86-7.76 (m, 2H, H_{quina} and H_{ar}), 7.69-7.55 (m, 4H, H_{ar}).

¹³C NMR (DMSO, δ ppm): 171.2 (C), 157.0 (C), 153.0 (C), 135.9 (C), 134.9 (CH), 130.7 (CH), 130.1 (2 CH), 128.8 (2 CH), 128.1 (CH), 128.0 (CH), 127.9 (CH), 121.6 (C).

LC-MS (ESI) m/z found: 241, 243 [M+H]⁺.

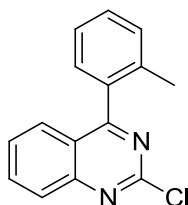
Molecular formula: C₁₄H₉ClN₂

Molecular weight: 240.69 g/mol

Melting point: 112 °C

Aspect: Beige solid

2-Chloro-4-(*o*-tolyl)quinazoline (75b)



Procedure:

Same procedure as described for compound **75a** have been used starting from **73** (1 eq., 750 mg, 3.77 mmol) with K₃PO₄ (2 eq., 1.6 g, 7.54 mmol), 2-tolylboronic acid (1.1 eq., 563 mg, 4.14 mmol), PPh₃ (4%, 39.5 mg, 0.15 mmol) and palladium diacetate (2%, 16.9 mg, 0.0754 mmol) in dioxane (16 mL) and water (3.8 mL). Crude was purified using flash chromatography (PE/EtOAc : 10/0 to 9/1) to afford **75b** (230 mg, 24%).

¹H NMR (DMSO-d₆, δ ppm, J Hz): 8.08-8.06 (m, 1H), 7.98-7.92 (m, 1H), 7.72-7.69 (m, 1H), 7.60-7.55 (m, 1H), 7.49-7.43 (m, 1H), 7.39-7.33 (m, 3H), 2.59 (s, 3H, CH₃)

¹³C NMR (DMSO, δ ppm): 173.3 (C), 157.0 (C), 152.5 (C), 136.2 (C), 135.3 (C), 135.1 (CH), 130.8 (CH), 129.8 (CH), 129.3 (CH), 128.1 (CH), 128.0 (CH), 127.5 (CH), 125.8 (CH), 122.6 (C), 19.9 (CH₃)

LC-MS (ESI) m/z found: 255, 257 [M+H]⁺.

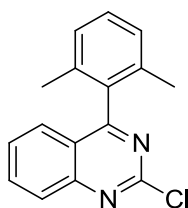
Molecular formula: C₁₅H₁₁ClN₂

Molecular weight: 254.71 g/mol

Melting point: 86 °C

Aspect: Beige solid

2-Chloro-4-(2,6-dimethylphenyl)quinazoline (75c)



Procedure:

Same procedure as described for compound **75a** have been used starting from **73** (1 eq., 500 mg, 2.51 mmol), K_3PO_4 (2 eq., 1066 mg, 5.02 mmol), 2,6-dimethylphenylboronic acid (1.1 eq., 414 mg, 2.76 mmol), PPh_3 (4%, 26.36 mg, 0.10 mmol) and palladium diacetate (2%, 11.3 mg, 0.0502 mmol) in dioxane (11 mL) and water (3 mL). Crude product was purified using flash chromatography (PE/EtOAc : 10/0 to 9/1) to afford **75c** (140 mg, 21%).

1H NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J Hz): 8.10-8.07 (m, 1H, H_{quina}), 7.99-7.94 (m, 1H, H_{quina}), 7.58-7.55 (m, 2H, H_{quina}), 7.37-7.32 (m, 1H, H_{ar}), 7.21-7.18 (d, 2H, $J = 7.8$ Hz, H_{ar}), 1.97 (s, 6H, 2 CH_3).

^{13}C NMR (DMSO, δ ppm): 174.0 (C), 157.5 (C), 152.3 (C), 135.6 (2 C), 135.3 (CH), 135.0 (C), 129.3 (CH), 128.3 (CH), 128.1 (CH), 127.8 (2 CH), 126.7 (CH), 122.8 (C), 19.9 (2 CH_3).

LC-MS (ESI) m/z found: 269, 271 $[M+H]^+$.

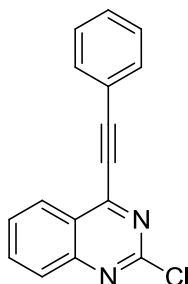
Molecular formula: $C_{16}H_{13}ClN_2$

Molecular weight: 268.74 g/mol

Melting point: 112 °C

Aspect: Beige solid

2-Chloro-4-(phenylethynyl)quinazoline (76)



Procedure:

A mixture of **73** (1 eq., 500 mg, 2.51 mmol) in THF (10 mL) with bis(triphenylphosphine)palladium(II) chloride (2%, 35.3 mg, 0.050 mmol), PPh_3 (1%, 6.59 mg, 0.025 mmol) and Et_3N (6 eq., 2.1 mL, 15.1 mmol) was degassed for 15 min and then CuI (2%, 9.6 mg, 0.050 mmol) and phenylacetylene (1 eq., 0.276 mL, 2.51 mmol) were added. Mixture was heated at 65 °C for 1h30 in a sealed tube, cooled to room temperature and pour in water. Mixture was extracted twice with DCM, dried over $MgSO_4$ and concentrated *in vacuo*. Product was purified by flash chromatographie (PE/EtOAc : 10/0 to 95/5) to afford **76** (340 mg, 51%).

1H NMR ($CDCl_3$, δ ppm, J Hz): 8.42-8.39 (m, 1H, H_{quina}), 8.03-7.94 (m, 2H), 7.77-7.71 (m, 3H), 7.52-7.43 (m, 3H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$, δ ppm): 157.1 (C), 155.1 (C), 152.0 (C), 135.5 (CH), 132.8 (2 CH), 130.8 (CH), 128.8 (2 CH), 128.6 (CH), 127.9 (CH), 126.8 (CH), 123.8 (C), 120.6 (C), 100.8 (C), 84.6 (C).

LC-MS (ESI) m/z found: 265, 267 [M+H]⁺.

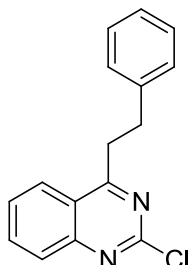
Molecular formula: C₁₆H₉ClN₂

Molecular weight: 264.71 g/mol

Melting point: 146 °C

Aspect: Yellow solid

2-Chloro-4-phenethylquinazoline (77)



Procedure:

A solution of **76** (1 eq., 250 mg, 0.944 mmol) in a mixture of MeOH/THF (5 mL/5 mL) with Raney nickel was stirred for 8h under H₂ atmosphere at room temperature. Catalyst was then filtered off and the mixture concentrated, suspended in PE and filtered to afford **77** (210 mg, 83%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8.37 (m, 1H, H_{quina}), 8.06-8.00 (m, 1H, H_{quina}), 7.94 (m, 1H, H_{quina}), 7.77-7.71 (ddd, 1H, J = 1.4 Hz, J = 6.9 Hz and J = 8.4 Hz, H_{quina}), 7.33-7.15 (m, 5H, H_{Ar}), 3.62 (t, 2H, J = 8.3 Hz, CH₂CH₂), 3.13 (t, 2H, J = 8.3 Hz, CH₂CH₂).

¹³C NMR (CDCl₃, δ ppm): 159.1 (C), 155.3 (C), 152.8 (C), 135.2 (CH), 133.8 (2 CH), 131.3 (CH), 128.8 (2 CH), 128.6 (CH), 127.3 (CH), 126.1 (CH), 122.6 (C), 120.6 (C) 34.9 (CH₂), 34.4 (CH₂).

LC-MS (ESI) m/z found: 269, 271 [M+H]⁺.

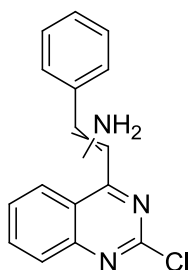
Molecular formula: C₁₆H₁₃ClN₂

Molecular weight: 268.74 g/mol

Melting point: 234 °C

Aspect: Beige solid

1-(2-Chloroquinazolin-4-yl)-2-phenylethanamine (78)



Procedure:

A solution of **76** (1 eq., 65 mg, 0.246 mmol) in a mixture of NH₄OH (2.0 mL) and EtOH (2 mL) was heated at 90 °C for 1h in a sealed tube. The mixture was cooled to room temperature, hydrolyzed with water and extracted three times with EtOAc. Combined organic layers were dried on MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. Solid was suspended in diethyl ether to afford **78** (35 mg, 51%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 10.14 (br m, 1H, NH), 8.53 (br m, 1H, NH), 8.43 (m, 1H, H_{quina}), 7.86-7.80 (m, 3H), 7.67 (d, 1H, J = 8.2 Hz), 7.57-7.53 (m, 4H), 6.33 (s, 1H).

¹³C NMR (CDCl₃, δ ppm): 166.9 (C), 160.2 (C), 156.1 (C), 151.0 (C), 138.6 (C), 133.3 (CH), 130.6 (2 CH), 129.1 (CH), 127.8 (CH), 126.5 (2 CH), 126.4 (CH), 123.9 (CH), 120.5 (C), 88.0 (CH).

LC-MS (ESI) m/z found: 282, 284 [M+H]⁺.

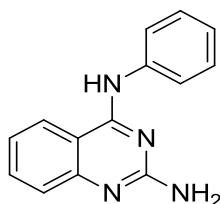
Molecular formula: C₁₆H₁₂ClN₃

Molecular weight: 281.74 g/mol

Melting point: 187 °C

Aspect: Yellow solid

N⁴-Benzylquinazoline-2,4-diamine (XIIa)



Procedure:

To a solution of **74a** (1 eq., 250 mg, 0.978 mmol) in a mixture of EtOH (6 mL) and glacial acetic acid (1.7 mL) was added NaN₃ (2 eq., 127 mg, 1.96 mmol) and the mixture was stirred at 90-95 °C for 2 h. After cooling to room temperature, Pd/C (15 mg) was added followed by addition of hydrazine hydrate (1.5 eq., 0.07 mL, 1.47 mmol). The mixture was stirred again at 90-95 °C for an additional two hours. Once complete, catalyst was filtered off and mixture concentrated *in vacuo*. Crude was suspended in water and extracted three times with EtOAc. Combined organic layers were dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. Crude product was purified by flash chromatographie using EP/EtOAc (10/0 : 7/3) as eluant to afford **XIIa** (42 mg, 18%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 7.74-7.72 (m, 3H), 7.61 (m, 1H), 7.51 (m, 1H), 7.43-7.38 (m, 3H), 7.277.16 (m, 2H), 4.99 (br m, 2H).

¹³C NMR (CDCl₃, δ ppm): 159.7 (C), 158.5 (C), 152.3 (C), 138.4 (C), 133.2 (CH), 129.0 (2 CH), 126.0 (CH), 124.2 (CH), 122.2 (CH), 121.6 (2 CH), 120.5 (CH), 111.1 (C).

LC-MS (ESI) m/z found: 237 [M+H]⁺.

HPLC: C4 column: t_R = 13.4 min, purity 97%; C18 column: t_R = 21.6 min, purity 96%.

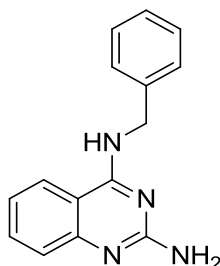
Molecular formula: C₁₄H₁₂N₄

Molecular weight: 236.27 g/mol

Melting point: 201 °C

Aspect: White solid

N⁴-Benzylquinazoline-2,4-diamine (XIIb)



Procedure:

To a solution of **74b** (1 eq., 210 mg, 0.779 mmol) in a mixture of EtOH (6 mL) and glacial acetic acid (1.7 mL) was added NaN₃ (1.1 eq., 55.7 mg, 0.856 mmol) and the reaction mixture was heated at 60 °C for 1h, cooled to room temperature and hydrolyzed with water. White solid was filtered and directly diluted in THF (15 mL) and MeOH (15 mL). PPh₃ (1.1 eq., 104 mg, 0.398 mmol) was then added and the mixture was stirred at 60 °C for night. 0.5N HCl solution (15 mL) was then added and the mixture was stirred 72h at 60 °C. After cooling to room temperature, the mixture was concentrated *in vacuo* and aqueous layer was extracted with EtOAc three times. Combined organic layers were dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. Solid was suspended in PE/diethyl ether (10/1) mixture and filtered to afford **XIIb** (35 mg, 20%)

¹H NMR (DMSO-d₆, δ ppm, J Hz): 8.36 (br t, 1H, J = 5.8 Hz, NH), 8.01 (m, 1H, H_{quina}), 7.50-7.44 (m, 1H, H_{quina}), 7.37-7.28 (m, 4H), 7.24-7.19 (m, 2H), 7.04-7.00 (m, 1H), 6.05 (br s, 2H, NH₂), 4.73 (d, 2H, J = 5.3 Hz, CH₂).

¹³C NMR (DMSO, δ ppm): 160.9 (C), 160.8 (C), 152.7 (C), 140.4 (C), 132.6 (CH), 128.7 (2 CH), 127.8 (2 CH), 127.1 (CH), 124.8 (CH), 123.1 (CH), 120.4 (CH), 111.2 (C), 43.6 (CH₂).

LC-MS (ESI) m/z found: 251 [M+H]⁺.

HPLC: C4 column: t_R = 13.2 min, purity 99%; C18 column: t_R = 21.4 min, purity >99%.

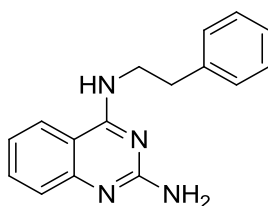
Molecular formula: C₁₅H₁₄N₄

Molecular weight: 250.30 g/mol

Melting point: 196 °C

Aspect: Beige solid

N⁴-phenethylquinazoline-2,4-diamine (XIIc)



Procedure:

To a mixture of **74c** (1 eq., 200 mg, 0.705 mmol) in EtOH (5 mL) and glacial acetic acid (1.5 mL) was added NaN₃ (1.1 eq., 50.4 mg, 0.775 mmol) and the mixture was stirred at 90-95 °C for 2 h. After cooling to room temperature, Pd/C (15 mg) was added followed by addition of hydrazine hydrate (1.5 eq., 0.05 mL, 1.06 mmol). The mixture was stirred again at 90-95 °C for an additional two hours. Once complete, catalyst was filtered off, mixture concentrated *in vacuo*. Crude was suspended in water and extracted three times with EtOAc. Combined organic layers were dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. Solid was recrystallized from EtOAc to afford **XIIc** (92 mg, 49%).

¹H NMR (DMSO-d₆, δ ppm, J Hz): 12.72 (br s, 2H, NH₂), 9.65 (br m, 1H, NH), 8.30 (m, 1H, H_{quina}), 7.79-7.74 (m, 1H, H_{quina}), 7.45 (m, 1H, H_{quina}), 7.42-7.37 (m, 1H, H_{quina}), 7.31-7.18 (m, 5H, H_{Ar}), 7.82-7.75 (m, 2H, CH₂CH₂), 2.99 (m, 2H, CH₂CH₂).

¹³C NMR (DMSO, δ ppm): 160.6 (C), 155.0 (C), 139.4 (C), 139.2 (C), 135.4 (CH), 129.2 (2 CH), 128.9 (2 CH), 126.8 (CH), 124.7 (CH), 124.5 (CH), 117.4 (CH), 110.3 (C), 43.1 (CH₂), 34.5 (CH₂).

LC-MS (ESI) m/z found: 265 [M+H]⁺.

HPLC: C4 column: t_R = 25.1 min, purity 98%; C18 column: t_R = 25.1 min, purity >99%.

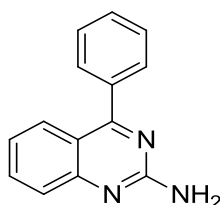
Molecular formula: C₁₆H₁₆N₄

Molecular weight: 264.33 g/mol

Melting point: 131 °C

Aspect: White solid

4-Phenylquinazolin-2-amine (XIId)



Procedure:

Same procedure as described for compound **XIId** have been used starting from **75a** (1 eq., 150 mg, 0.623 mmol) with NaN₃ (1.1 eq., 44.6 mg, 0.686 mmol) in 4:1 EtOH (4.4 mL) and glacial acetic acid (1.3 mL) mixture followed by Pd/C (20 mg) with hydrazine hydrate (1.5 eq., 0.05 mL, 0.935 mmol). Crude product was purified by flash chromatography using EP/EtOAc (10/0 : 7/3) as eluant, and then recrystallized from DCM to afford **XIId** (60 mg, 44%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 7.87-7.84 (m, 1H, H_{quina}), 7.74-7.64 (m, 4H), 7.57-7.55 (m, 3H), 7.26-7.21 (m, 1H), 5.41 (br s, 2H, NH₂).

¹³C NMR (DMSO, δ ppm): 169.9 (C), 160.7 (C), 153.7 (C), 137.5 (C), 134.2 (CH), 130.1 (CH), 129.8 (2 CH), 128.8 (2 CH), 127.4 (CH), 125.8 (CH), 122.5 (CH), 117.8 (C).

LC-MS (ESI) m/z found: 222 [M+H]⁺.

HPLC: C4 column: t_R = 23.1 min, purity >99%; C18 column: t_R = 20.9 min, purity >99%.

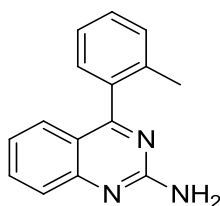
Molecular formula: C₁₄H₁₁N₃

Molecular weight: 221.26 g/mol

Melting point: 172 °C

Aspect: Beige solid

4-Phenylquinazolin-2-amine (XIIe)



Procedure:

Same procedure as described for compound **XIIc** have been used starting from **75b** (1 eq., 200 mg, 0.785 mmol) and NaN_3 (1.1 eq., 56.1 mg, 0.864 mmol) in a 4:1 EtOH (5.5 mL) and glacial acetic acid (1.6 mL) mixture followed by Pd/C (20 mg) with hydrazine hydrate (1.5 eq., 0.057 mL, 1.18 mmol). Crude product was purified by flash chromatographie using EP/EtOAc (10:0-8:2) as eluant to afford **XIIe** (30 mg, 15%).

$^1\text{H NMR}$ (acetone- d_6 , δ ppm, J Hz): 7.70-7.65 (m, 1H, H_{Quina}), 7.56 (m, 1H, H_{Quina}), 7.45-7.30 (m, 5H, H_{ar} and H_{Quina}), 7.17-7.12 (m, 1H, H_{Quina}), 6.30 (br s, 2H, NH_2), 2.12 (s, 3H, CH_3).

$^{13}\text{C NMR}$ (DMSO, δ ppm): 171.1 (C), 160.5 (C), 153.1 (C), 137.2 (C), 135.7 (C), 133.6 (CH), 130.2 (CH), 128.9 (CH), 128.8 (CH), 126.9 (CH), 125.8 (CH), 125.5 (CH), 122.2 (CH), 118.9 (C), 18.9 (CH_3).

LC-MS (ESI) m/z found: 236 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

HPLC: C4 column: t_R = 24.1 min, purity 98%; C18 column: t_R = 22.1 min, purity >99%.

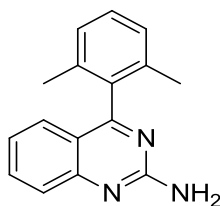
Molecular formula: $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_3$

Molecular weight: 235.28 g/mol

Melting point: 130 °C

Aspect: Beige solid

4-(2,6-Dimethylphenyl)quinazolin-2-amine (XII f)



Procedure:

Same procedure as described for compound **XIIc** have been used starting from **75c** (1 eq., 120 mg, 0.45 mmol) with NaN_3 (1.1 eq., 31.9 mg, 0.49 mmol) in a 4:1 EtOH (3.2 mL) and glacial acetic acid (0.9 mL) mixture followed by Pd/C (12 mg) with hydrazine hydrate (1.5 eq., 0.03 mL, 0.67 mmol). Crude product was purified by flash chromatographie using EP/EtOAc (10/0 to 7/3) to afford **XII f** (30 mg, 27%).

$^1\text{H NMR}$ (acetone- d_6 , δ ppm, J Hz): 7.70-7.65 (m, 1H, H_{Quina}), 7.51 (m, 1H, H_{Quina}), 7.34-7.29 (m, 1H, H_{Quina}), 7.20 (d, 2H, J = 7.5 Hz, H_{ar}), 7.14-7.07 (m, 2H, H_{ar} and H_{Quina}), 6.92 (br s, 2H, NH_2), 1.91 (s, 6H, CH_3).

$^{13}\text{C NMR}$ (DMSO, δ ppm): 171.2 (C), 161.1 (C), 153.0 (C), 136.7 (C), 135.2 (CH), 134.5 (2 C), 128.9 (CH), 127.8 (2 CH), 126.2 (CH), 125.8 (CH), 122.7 (CH), 118.6 (C), 19.73 (2 CH_3).

LC-MS (ESI) m/z found: 250 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

HPLC: C4 column: $t_R = 13.6$ min, purity >99%; C18 column: $t_R = 23.1$ min, purity >99%.

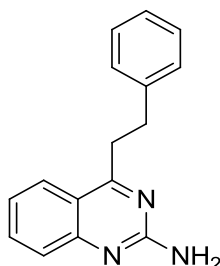
Molecular formula: $C_{16}H_{15}N_3$

Molecular weight: 249.31 g/mol

Melting point: 154 °C

Aspect: Beige solid

4-Phenethylquinazolin-2-amine (XIIg)



Procedure:

Same procedure as described for compound **XIIc** have been used starting from **77** (1 eq., 150 mg, 0.558 mmol) with NaN_3 (1.1 eq., 39.9 mg, 0.614 mmol) in a 4:1 EtOH (3.9 mL) and glacial acetic acid (1.2 mL) mixture followed by Pd/C (25 mg) which hydrazine hydrate (1.5 eq., 0.04 mL, 0.837 mmol) Crude was purified by flash chromatographie using EP/EtOAc (10/0 to 7/3) to afford **XIIg** (30 mg, 22%).

1H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8.00 (m, 1H, H_{quina}), 7.65-7.60 (m, 1H, H_{quina}), 7.40 (m, 1H, H_{quina}), 7.32-7.25 (m, 1H, H_{ar}), 7.20-7.15 (m, 5H, H_{ar} and H_{quina}), 6.72 (br s, 2H, NH_2), 3.39-3.32 (m, 2H, CH_2CH_2), 3.06 (t, 2H, $J = 7.4$ Hz, CH_2CH_2).

^{13}C NMR (CDCl₃, δ ppm): 171.8 (C), 160.5 (C), 152.6 (C), 141.8 (C), 133.9 (CH), 128.9 (2 CH), 128.8 (2 CH), 126.4 (CH), 125.7 (2 CH), 122.1 (CH), 118.6 (C), 35.6 (CH_2), 34.1 (CH_2).

LC-MS (ESI) m/z found: 250 $[M+H]^+$.

HPLC: C18 column: $t_R = 22.9$ min, purity >99%.

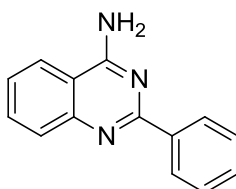
Molecular formula: $C_{16}H_{15}N_3$

Molecular weight: 249.31 g/mol

Melting point: 131 °C

Aspect: Beige solid

2-Phenylquinazolin-4-amine (XIIh)



Procedure:

2-fluorobenzonitrile (1 eq., 0.135 mL, 1.24 mmol), benzenecarboximidamide hydrochloride (1.5 eq., 290 mg, 1.86 mmol) and potassium *tert*-butoxide (3 eq., 416 mg, 3.72 mmol) in DMAc (2.4 mL) was heated in a sealed tube for a night at 110 °C. After cooling to room temperature, mixture was

hydrolyzed with water and extracted three times with EtOAc. Combined organic layers were dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. Crude product was purified by flash chromatographie using PE/EtOAc (10/0 to 8/2) to afford **XIIh** (178 mg, 65%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8.47 (m, 2H, H_{quina}), 7.94 (m, 1H, H_{quina}), 7.73 (m, 1H, H_{quina}), 7.68 (m, 1H, H_{quina}), 7.49-7.43 (m, 3H, H_{quina}), 7.38 (m, 1H, H_{quina}), 6.05 (m, 2H).

¹³C NMR (CDCl₃, δ ppm): 162.6 (C), 160.2 (C), 150.8 (C), 139.0 (C), 133.4 (CH), 130.4 (CH), 128.6 (2 CH), 128.3 (2 CH), 128.1 (CH), 125.6 (CH), 124.1 (CH), 113.7 (C).

LC-MS (ESI) m/z found: 241 [M+H]⁺.

HPLC: C4 column: t_R = 22.2 min, purity 99%; C18 column: t_R = 19.4 min, purity 96%.

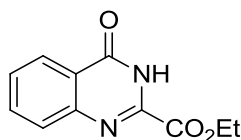
Molecular formula: C₁₄H₉ClN₂

Molecular weight: 240.69 g/mol

Melting point: °C

Aspect: Beige solid

Ethyl 4-oxo-3,4-dihydroquinazoline-2-carboxylate (**79**)



Procedure:

To a solution of anthranilamide (1 eq., 2.5 g, 18.4 mmol) in EtOH (45 mL) was added diethyl oxalate (3 eq., 7.5 mL, 55.1 mmol) and EtONa freshly prepared (2 eq., 2.5 g, 36.7 mmol). The reaction mixture was heated at 80 °C using a microwave (200 W) for 1h30, then crude was diluted in EtOH and 0.5 N HCl solution was added up to acid pH. Solide was then filtered to afford **79** (2.0 g, 51%).

¹H NMR (DMSO-d₆, δ ppm, J Hz): 12.62 (br s, 1H, NH), 8.17 (dd, 1H, J = 1.3 Hz and J = 7.9 Hz, H_{quina}), 7.93-7.86 (m, 1H, H_{quina}), 7.84-7.81 (m, 1H, H_{quina}), 7.67-7.61 (m, 1H, H_{quina}), 4.38 (q, 2H, J = 7.1 Hz, CH₂), 1.35 (t, 3H, J = 7.1 Hz, CH₃)

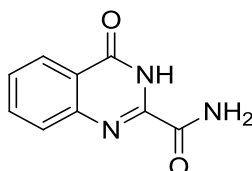
Molecular formula: C₁₁H₁₀N₂O₃

Molecular weight: 218.21 g/mol

Melting point: 194 °C

Aspect: White solid

4-Oxo-3,4-dihydroquinazoline-2-carboxamide (**80**)



Procedure:

A mixture of **79** (1 eq., 500 mg, 2.29 mmol) in 10 mL of NH₄OH 25% solution was heated at 70 °C for 3h, cooled to room temperature and acidified with AcOH up to neutral pH. Solid was filtered, washed with water and cold EtOH to afford **80** (274mg, 66%).

¹H NMR (DMSO-d₆, δ ppm, J Hz): 12.01 (br s, 1H, NH), 8.35 (br m, 1H, NH (NH₂)), 8.17-8.15 (m, 1H, H_{quina}), 8.07 (br m, 1H, NH(NH₂)), 7.90-7.85 (m, 1H, H_{quina}), 7.78-7.75 (m, 1H, H_{quina}), 7.61-7.58 (m, 1H, H_{quina})

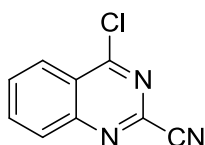
Molecular formula: C₉H₇N₃O₂

Molecular weight: 189.17 g/mol

Melting point: 231 °C

Aspect: White solid

4-Chloroquinazoline-2-carbonitrile (**81**)



Procedure:

To a solution of **80** (1 eq., 243 mg, 1.28 mmol) in CH₃CN (4.5 mL) was added POCl₃ (13 eq., 1.6 mL, 16.7 mmol) and lutidine (0.7 eq., 0.10 mL, 0.90 mmol). Reaction mixture was heated for a night at 90 °C, cooled to room temperature, and hydrolyzed carefully with ice and then filtered. Brown solid was diluted in hot EtOAc with charcoal, insoluble filtered off and then concentrated *in vacuo* to afford **81** (207 mg, 85%).

¹H NMR (DMSO-d₆, δ ppm, J Hz): 8.43-8.40 (m, 1H, H_{quina}), 8.33-8.23 (m, 2H, H_{quina}), 8.12-8.07 (m, 1H, H_{quina})

¹³C NMR (DMSO, δ ppm): 137.8 (2 CH), 135.6 (C), 133.2 (CH), 129.9 (C), 129.3 (CH), 128.5 (C), 126.6 (C), 126.5 (CH).

LC-MS (ESI) m/z found: 190, 192 [M+H]⁺.

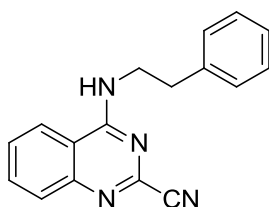
Molecular formula: C₉H₄ClN₃

Molecular weight: 189.60 g/mol

Melting point: 142 °C

Aspect: White solid

4-(Phenethylamino)quinazoline-2-carbonitrile (**82a**)



Procedure:

To a solution of **81** (1 eq., 400 mg, 2.11 mmol) in THF (7 mL) was added phenylethylamine (1.2 eq., 0.32 mL, 2.53 mmol) and Et₃N (1.5 eq., 0.44 mL, 3.16 mmol). The mixture was stirred for 1h at room temperature, hydrolyzed with water and extracted three times with EtOAc. Combined organic layers were dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. Green oil was suspended in PE with some drops of diethyl ether to get solid which was filtered to afford **82a** (300 mg, 52%).

¹H NMR (DMSO-d₆, δ ppm, J Hz): 9.39 (br t, 1H, J = 5.2 Hz, NH), 8.28 (m, 1H, H_{quina}), 7.87-7.85 (m, 1H, H_{quina}), 7.78-7.75 (m, 1H, H_{quina}), 7.70-7.65 (m, 1H, H_{quina}), 7.29-7.19 (m, 5H, H_{phenyl}), 3.79-3.72 (m, 2H, CH₂CH₂), 2.97 (t, 2H, J = 7.7 Hz, CH₂CH₂).

¹³C NMR (CDCl₃, δ ppm): 160.2 (C), 148.6 (C), 141.1 (C), 139.6 (C), 134.3 (CH), 129.2 (2 CH), 128.9 (CH), 128.8 (2 CH), 128.3 (CH), 126.7 (CH), 123.4 (CH), 117.7 (C), 115.7 (C), 42.9 (CH₂), 34.6 (CH₂).

LC-MS (ESI) m/z found: 275 [M+H]⁺.

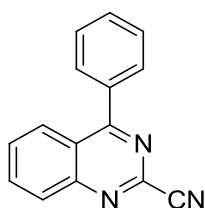
Molecular formula: C₁₇H₁₄N₄

Molecular weight: 274.32 g/mol

Melting point: 110 °C

Aspect: White solid

4-Phenylquinazoline-2-carbonitrile (**82b**)



Procedure:

Same procedure as described for compound **75a** have been used starting from **81** (1 eq., 400 mg, 2.11 mmol) with phenyl boronic acid (1.5 eq., 385 mg, 3.16 mmol), K₃PO₄ (2 eq., 2 M, 2.11 mL, 4.22 mmol), PPh₃ (4%, 22.1 mg, 0.084 mmol) and palladium diacetate (2%, 9.47 mg, 0.042 mmol) in dioxane (8 mL). Crude product was suspended in a mixture of PE/diethyl ether (9/1) to afford **82b** (340 mg, 70%).

¹H NMR (DMSO-d₆, δ ppm, J Hz): 8.24-8.20 (m, 3H), 7.98-7.93 (m, 1H), 7.85-7.82 (m, 2H), 7.69-7.66 (m, 3H).

¹³C NMR (DMSO, δ ppm): 170.0 (C), 150.7 (C), 140.1 (C), 136.4 (CH), 135.7 (C), 131.9 (CH), 131.4 (CH), 130.7 (2 CH), 129.3 (2 CH), 129.1 (CH), 127.9 (CH), 123.4 (C), 117.1 (C).

LC-MS (ESI) m/z found: 232 [M+H]⁺.

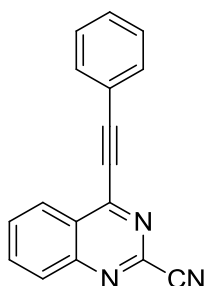
Molecular formula: C₁₅H₉N₃

Molecular weight: 231.25 g/mol

Melting point: 130 °C

Aspect: Pale brown solid

4-(phenylethynyl)quinazoline-2-carbonitrile (**82c**)



Procedure:

Same procedure as described for compound **76** have been used starting from **81** (1 eq., 500 mg, 2.64 mmol) with phenylacetylene (1.2 eq., 0.348 mL, 3.16 mmol), Et₃N (6 eq., 2.2 mL, 15.8 mmol), PPh₃ (1%, 6.92 mg, 0.026 mmol) and bis(triphenylphosphine)palladium(II) chloride (2%, 37 mg, 0.053 mmol) in THF (8 mL). Product was purified by flash chromatographie using PE/EtOAc (10/0 to 9/1) to afford **82c** (140 mg, 21%).

¹H NMR (DMSO-d₆, δ ppm, J Hz): 8.58 (m, 1H, H_{Quina}), 8.27-8.18 (m, 2H, H_{Quina}), 8.08-8.03 (m, 1H, H_{Quina}), 7.92-7.89 (m, 2H, H_{Ar}), 7.65-7.54 (m, 3H, H_{Ar}).

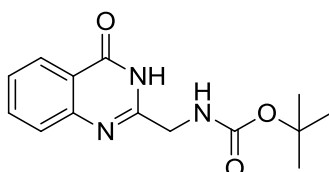
Molecular formula: C₁₇H₉N₃

Molecular weight: 255.27 g/mol

Melting point: 178 °C

Aspect: Pale brown solid

tert-Butyl ((4-oxo-3,4-dihydroquinazolin-2-yl)methyl)carbamate (**83**)



Procedure:

Isobutyl chloroformate (1.1 eq., 5.75 mL, 44.1 mmol) was added to solution of *N*-bocglycine (1 eq., 7.02 g, 40.1 mmol) with *N*-methylmorpholine (1.1 eq., 4.85 mL, 44.1 mmol) in THF (112 mL) at -15 °C. After 1h stirring, anthranilamide (1.1 eq., 6 g, 44.1 mmol) was added and heating at reflux overnight. After cooling to room temperature, a solution of NaOMe (1.96 eq., 2 M, 39.3 mL, 78.6 mmol) was added and the resulting mixture was heated at reflux one more night, cooled to room temperature, hydrolyzed with 1 M HCl solution up to acidic pH. Precipitate formed was filtered and washed with EtOH to afford **83** (8.9 g, 81%).

¹H NMR (DMSO-d₆, δ ppm, J Hz): 11.21 (br s, 1H, NH), 8.09 (dd, 1H, J = 1.2 Hz and J = 7.9 Hz, H_{Quina}), 8.82-7.76 (m, 1H, H_{Quina}), 7.61-7.59 (m, 1H, H_{Quina}), 7.51-7.46 (m, 1H, H_{Quina}), 7.17 (t, 1H, J = 5.8 Hz, NHBoc), 4.09 (d, 2H, J = 5.4 Hz, CH₂), 1.40 (s, 9H, 3 CH₃).

¹³C NMR (DMSO, δ ppm): 166.7 (C), 161.0 (C), 159.8 (C), 153.7 (C), 139.7 (CH), 132.1 (CH), 131.5 (CH), 131.0 (CH), 126.4 (C), 83.5 (C), 47.9 (CH₂), 33.4 (3 CH₃).

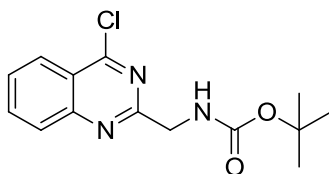
Molecular formula: C₁₄H₁₇N₃O₃

Molecular weight: 275.30 g/mol

Melting point: 228 °C

Aspect: White solid

***tert*-Butyl ((4-chloroquinazolin-2-yl)methyl)carbamate (**84**)**



Procedure:

To a solution of **83** (1 eq., 2 g, 7.26 mmol) in toluene (20 mL) was added dimethylaniline (3 eq., 2.78 mL, 21.8 mmol) and then POCl₃ (4 eq., 2.71 mL, 29.1 mmol) at 0°C. After 40 min stirring at 80 °C, mixture was cooled to room temperature and hydrolyzed slowly with ice. Organic layer was extracted twice with EtOAc, dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. Solid was suspended in PE and filtered to afford **84** (1.4 g, 65%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8.26-8.24 (m, 1H, H_{quina}), 8.04-7.93 (m, 2H, H_{quina}), 7.73-7.68 (m, 1H, H_{quina}), 5.82 (br m, 1H, NH), 4.71 (d, 2H, J = 4.4 Hz, CH₂), 1.51 (s, 9H, 3 CH₃).

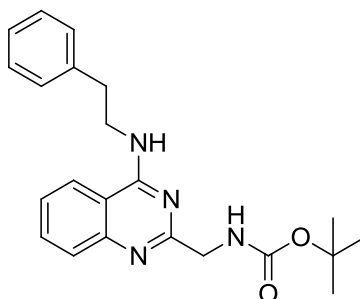
Molecular formula: C₁₄H₁₆ClN₃O₂

Molecular weight: 293.75 g/mol

Melting point: 140 °C

Aspect: White solid

***tert*-Butyl ((4-(phenethylamino)quinazolin-2-yl)methyl)carbamate (**85a**)**



Procedure:

To a solution of **84** (1 eq., 500 mg, 1.7 mmol) in THF (7 mL) was added phenylethylamine (1.2 eq., 0.257 mL, 2.04 mmol) and DIPEA (1.5 eq., 0.42 mL, 2.55 mmol). Reaction mixture was stirred at room temperature for a night, hydrolyzed with water and extracted three times with EtOAc. Combined organic layer were dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. Solid was suspended in PE and filtered to afford **85a** (350 mg, 54%).

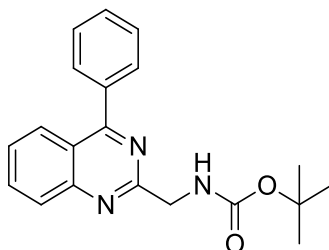
¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 7.80-7.78 (m, 1H, H_{quina}), 7.72-7.67 (m, 1H, H_{quina}), 7.58-7.55 (m, 1H, H_{quina}), 7.41-7.36 (m, 1H, H_{quina}), 7.34-7.32 (m, 2H, H_{Ar}), 7.28-7.26 (m, 3H, H_{Ar}), 5.99 (br m, 2H, NH), 4.50 (d, 2H, J = 4.4 Hz, CH₂), 3.96-3.90 (m, 2H, CH₂CH₂), 3.03 (t, 2H, J = 7.0 Hz, CH₂CH₂) 1.51 (s, 9H, 3 CH₃).

¹³C NMR (CDCl₃, δ ppm): 162.3 (C), 159.5 (C), 156.0 (C), 149.4 (C), 138.9 (C), 132.7 (CH), 128.9 (2 CH), 128.8 (2 CH), 128.1 (CH), 126.7 (CH), 125.6 (CH), 120.4 (CH), 113.7 (C), 79.2 (C), 46.6 (CH₂), 42.4 (CH₂), 35.3 (CH₂), 28.5 (3 CH₃).

LC-MS (ESI) m/z found: 377 [M-H]⁺.

Molecular formula: C₂₂H₂₆N₄O₂
Molecular weight: 378.47 g/mol
Melting point: 162 °C
Aspect: White solid

***tert*-Butyl ((4-chloroquinazolin-2-yl)methyl)carbamate (85b)**



Procedure:

Same procedure as described for compound **75a** have been used starting from **84** (1 eq., 500 mg, 1.7 mmol) with K₃PO₄ (2 eq., 2 M, 1.7 mL, 3.4 mmol), phenylboronic acid (1.5 eq., 311 mg, 2.55 mmol), palladium diacetate (2%, 7.64 mg, 0.034 mmol) and triphenylphosphine (4%, 17.9 mg, 0.068 mmol) in dioxane (9 mL). Crude was suspended in diethyl ether and filtered to afford **85b** (220 mg, 39%).

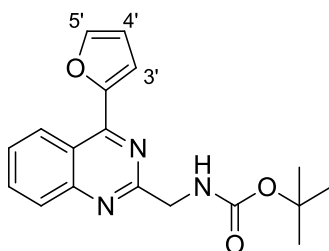
¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8.12-8.07 (m, 2H), 7.94-7.88 (m, 1H), 7.79-7.76 (m, 2H), 7.61-7.56 (m, 4H), 6.02 (br m, 1H, NH), 4.80 (d, 2H, J = 4.6 Hz, CH₂), 1.52 (s, 9H, 3 CH₃).

¹³C NMR (CDCl₃, δ ppm): 164.2 (C), 157.0 (C), 151.3 (C), 146.2 (C), 132.2 (C), 129.2 (CH), 125.4 (CH), 125.2 (2 CH), 123.9 (2 CH), 123.6 (CH), 122.6 (CH), 122.5 (C), 117.1 (C), 74.7 (C), 42.0 (CH₂), 23.7 (3 CH₃).

LC-MS (ESI) m/z found: 336 [M+H]⁺.

Molecular formula: C₂₀H₂₁N₃O₂
Molecular weight: 335.40 g/mol
Melting point: 132 °C
Aspect: White solid

***tert*-Butyl ((4-furanquinazolin-2-yl)methyl)carbamate (85c)**



Procedure:

Same procedure as described for compound **75a** have been used starting from **84** (1 eq., 500 mg, 1.7 mmol) with K₃PO₄ (2 eq., 2 M, 1.7 mL, 3.4 mmol), 2-furanboronic acid (1.5 eq., 285 mg, 2.55 mmol), palladium diacetate (2%, 7.64 mg, 0.034 mmol) and triphenylphosphine (4%, 17.9 mg, 0.07 mmol) in dioxane (9 mL). Crude product was suspended in PE and filtered to afford **85c** (232 mg, 32%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8.89 (m, 1H, H_{quina}), 8.02 (m, 1H, H_{quina}), 7.92-7.87 (m, 1H, H_{quina}), 7.81 (m, 1H, H_{5'}), 7.68-7.63 (m, 1H, H_{quina}), 7.60 (d, 1H, J = 3.5 Hz, H_{3'}), 6.70 (dd, 1H, J = 1.7 Hz and J = 3.5 Hz, H_{4'}), 5.98 (br m, 1H, NH), 4.75 (d, 2H, J = 4.7 Hz, CH₂), 1.53 (s, 9H, 3 CH₃).

¹³C NMR (CDCl₃, δ ppm): 161.5 (C), 156.0 (C), 155.6 (C), 151.7 (C), 146.1 (CH), 133.8 (CH), 128.4 (CH), 127.6 (CH), 126.8 (CH), 126.7 (CH), 119.7 (C), 116.7 (CH), 112.5 (CH), 79.4 (C), 46.6 (CH₂), 28.5 (3 CH₃).

LC-MS (ESI) m/z found: 326 [M+H]⁺.

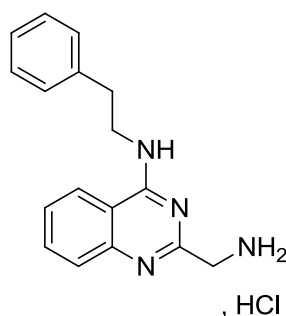
Molecular formula: C₁₈H₁₉N₃O₃

Molecular weight: 325.36 g/mol

Melting point: 76 °C

Aspect: White solid

2-(Aminomethyl)-N-phenethylquinazolin-4-amine hydrochloride (XIIIa)



Procedure:

To a solution of **85a** (350 mg, 0.925 mmol) in DCM (30 mL) was added with HCl gas. The mixture was heated at 50°C for 10 min and then concentrated *in vacuo*, suspended in EtOAc and filtered to afford **XIIIa** (288 mg, 99%).

¹H NMR (DMSO-d₆, δ ppm, J Hz): 10.71 (br s, 1H, NH), 8.87 (br s, 3H, NH₃), 8.65 (d, 1H, H_{quina}), 8.04-7.99 (m, 1H, H_{quina}), 7.91 (d, 1H, H_{quina}), 7.75-7.71 (m, 1H, H_{quina}), 7.37-7.21 (m, 5H, H_{ar}), 4.40 (m, 2H, CH₂), 4.04-4.01 (m, 2H, CH₂CH₂), 3.06 (t, 2H, J = 7.9 Hz, CH₂CH₂).

¹³C NMR (DMSO-d₆, δ ppm): 159.9 (CH), 157.5 (CH), 139.2 (CH), 136.5 (C), 129.4 (3 CH), 128.8 (2 CH), 128.6 (C), 126.8 (CH), 125.0 (C), 120.0 (C), 112.6 (C), 43.5 (CH₂), 40.8 (CH₂), 34.5 (CH₂).

LC-MS (ESI) m/z found: 280 [M+H]⁺.

HPLC: C4 column: t_R = 22.3 min, purity 94%; C18 column: t_R = 17.9 min, purity >99%.

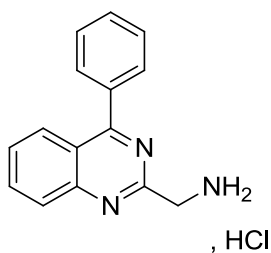
Molecular formula: C₁₇H₁₉ClN₄

Molecular weight: 314.81 g/mol

Melting point: 200 °C

Aspect: White solid

(4-Phenylquinazolin-2-yl)methanamine hydrochloride (XIIIb)



Procedure:

To a solution of **85b** (1 eq., 180 mg, 0.537 mmol) in DCM (30 mL) was added HCl gas. Reaction mixture was heated at 50°C for 10 min and then concentrated *in vacuo*, suspended in EtOAc and filtered to afford **XIIIb** (90 mg, 62%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8.75 (br s, 3H, NH₃), 8.14 (m, 1H), 8.10 (m, 2H), 7.88-7.85 (m, 2H), 7.80-7.75 (m, 1H), 7.66-7.64 (m, 3H), 4.47-4.46 (m, 2H, CH₂).

¹³C NMR (CDCl₃, δ ppm): 168.8 (C), 159.1 (C), 150.8 (C), 136.6 (C), 135.5 (CH), 130.9 (CH), 130.6 (2 CH), 129.2 (2 CH), 129.0 (CH), 128.4 (CH), 127.6 (CH), 121.6 (C), 43.8 (CH₂).

LC-MS (ESI) m/z found: 236 [M+H]⁺.

HPLC: C4 column: t_R = 20.8 min, purity 99%; C18 column: t_R = 20.5 min, purity >99%.

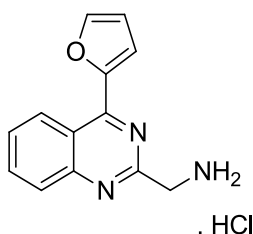
Molecular formula: C₁₅H₁₄ClN₃

Molecular weight: 271.74 g/mol

Melting point: > 300 °C

Aspect: White solid

4-(Furan-2-yl)quinazolin-2-yl-ethanamine hydrochloride (XIIIc)



Procedure:

To a solution of **85c** (1 eq., 110 mg, 0.338 mmol) in DCM (30 mL) was added HCl gas. Reaction mixture was heated at 50 °C for 10 min and then concentrated *in vacuo*, suspended in EtOAc and filtered to afford **XIIIc** (73 mg, 83%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8.93 (d, 1H, J = 8.7 Hz, H_{quina}), 8.73 (br s, 3H, NH₃), 8.24 (m, 1H, H_{5'}), 8.10-8.01 (m, 2H, H_{quina} and H_{quina}), 7.90 (d, 1H, J = 3.5 Hz, H_{3'}), 7.86-7.81 (m, 1H, H_{quina}), 6.90 (dd, 1H, J = 1.7 Hz and J = 3.5 Hz, H_{4'}), 4.40 (m, 2H, CH₂).

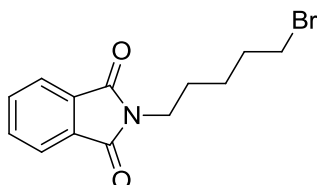
¹³C NMR (CDCl₃, δ ppm): 159.0 (C), 155.0 (C), 152.9 (C), 151.5 (C), 148.7 (CH), 135.3 (CH), 129.1 (CH), 128.2 (CH), 127.3 (C), 119.3 (CH), 118.6 (CH), 113.4 (CH), 44.0 (CH₂).

LC-MS (ESI) m/z found: 226 [M+H]⁺.

HPLC: C4 column: t_R = 16.6 min, purity 96%; C18 column: t_R = 19.6 min, purity >99%.

Molecular formula: C₁₃H₁₂ClN₃O
Molecular weight: 261.71 g/mol
Melting point: 266 °C
Aspect: White solid

2-(5-Bromopentyl)isoindoline-1,3-dione (86d)



Procedure:

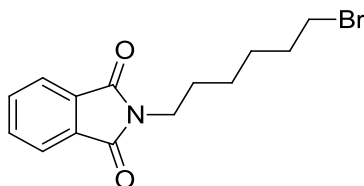
To a suspension of 1,5-dibromopentane (5.13 eq., 41 mL, 304 mmol) in DMF (50 mL) with tetra-*n*-butylammonium bromide (1%, 0.19 g, 0.594 mmol) was added slowly potassium phthalimide (1 eq., 11 g, 59.4 mmol). The reaction mixture was stirred at 100°C overnight, concentrated *in vacuo*, hydrolyzed with water and extracted three times with diethyl ether. Combined organic layers were washed with K₂CO₃ 0.5 M solution, dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. Product was precipitated in petroleum ether at 0°C to afford after filtration **86d** (9 g, 51%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 7.89-7.85 (m, 2H, H_{Ar}), 7.74-7.68 (m, 2H, H_{Ar}), 3.69 (t, 2H, J = 7.0 Hz, NCH₂), 3.38 (t, 2H, J = 7.2 Hz, BrCH₂), 1.74 (m, 4H), 1.45-1.35 (m, 2H).

LC-MS (ESI) m/z found: 297 [M+H]⁺.

Molecular formula: C₁₃H₁₄BrNO₂
Molecular weight: 296.16 g/mol
Melting point: 60-62 °C
Aspect: White solid

2-(6-Bromohexyl)isoindoline-1,3-dione (86e)



Procedure:

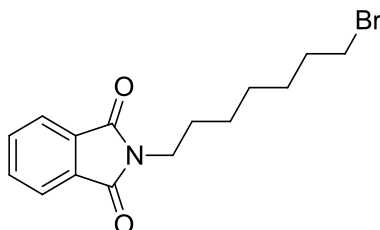
Same procedure as described for compound **86d** was used starting from 1,6-dibromohexane (5 éq., 33.8 g, 138.5 mmol) and potassium phthalimide (1 eq., 5 g, 27 mmol) to afford **86e** (3.9 g, 47%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 7.87-7.82 (m, 2H, H_{Ar}), 7.75-7.69 (m, 2H, H_{Ar}), 3.69 (t, 2H, J = 7.2 Hz, NCH₂), 3.40 (t, 2H, J = 6.9 Hz, BrCH₂), 1.86 (m, 2H), 1.70 (m, 2H), 1.54-1.45 (m, 2H), 1.42-1.32 (m, 2H).

LC-MS (ESI) m/z found: 311 [M+H]⁺.

Molecular formula: C₁₄H₁₆BrNO₂
Molecular weight: 310.19 g/mol
Melting point: 55-57 °C
Aspect: White solid

2-(7-Bromoheptyl)isoindoline-1,3-dione (86f)



Procedure:

Same procedure as described for compound **86d** was used starting from 1,7-dibromoheptane (2.5 eq., 2.45 g, 9.49 mmol) and potassium phthalimide (1 eq., 0.703 g, 3.8 mmol) to afford **86f** (708 mg, 58%).

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , δ ppm, J Hz): 7.87-7.80 (m, 2H, H_{Ar}), 7.74-7.67 (m, 2H, H_{Ar}), 3.67 (t, 2H, $J = 7.0$ Hz, NCH_2), 3.39 (t, 2H, $J = 6.8$ Hz, BrCH_2), 1.84 (m, 2H), 1.70-1.65 (m, 2H), 1.44-1.33 (m, 6H).

LC-MS (ESI) m/z found: 326 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

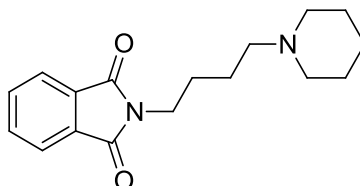
Molecular formula: $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{BrNO}_2$

Molecular weight: 324.21 g/mol

Melting point: 52-54 °C

Aspect: White solid

2-(4-(Piperidin-1-yl)butyl)isoindoline-1,3-dione (87c)



Procedure:

To a solution of 2-(4-bromobutyl)isoindoline-1,3-dione (1 eq., 1.7 g, 5.74 mmol) in acetonitrile (32 mL) was added piperidine (1.2 eq., 0.68 mL, 6.89 mmol) and Et_3N (1.2 eq., 0.96 mL, 6.89 mmol). The reaction mixture was stirred at reflux overnight, cooled to room temperature, hydrolyzed with water and acidified with HCl 1 N solution and extracted with EtOAc. Aqueous layer was alkalized with NaOH 0.5 M solution and then extracted three times with EtOAc. Combined organic layers were dried over MgSO_4 and concentrated *in vacuo*. Oil was suspended in PE to get solid which was filtered to afford **87c** (1.6 g, 97%).

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , δ ppm, J Hz): 7.82-7.80 (m, 2H, H_{Ar}), 7.70-7.67 (m, 2H, H_{Ar}), 3.68 (t, 2H, $J = 6.9$ Hz, NCH_2), 2.32-2.26 (m, 6H), 1.66 (m, 2H), 1.56-1.46 (m, 6H), 1.39 (m, 2H).

LC-MS (ESI) m/z found: 287 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

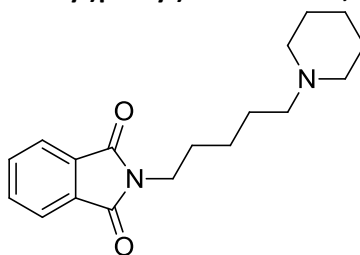
Molecular formula: $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2$

Molecular weight: 286.37 g/mol

Melting point: 82-84 °C

Aspect: White solid

2-(5-(Piperidin-1-yl)pentyl)isoindoline-1,3-dione (87d)



Procedure:

Same procedure as described for compound **87c** was used starting from **86e** (1 eq., 1.7 g, 5.74 mmol) in acetonitrile (32 mL) with piperidine (1.2 eq., 0.68 mL, 6.89 mmol) and Et₃N (1.2 eq., 0.96 mL, 6.89 mmol) to afford **87d** (1.3 g, 79%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 7.85-7.82 (m, 2H, H_{Ar}), 7.73-7.69 (m, 2H, H_{Ar}), 3.68 (t, 2H, J = 6.9 Hz, NCH₂), 2.38-2.27 (m, 6H), 1.69 (m, 2H), 1.64-1.51 (m, 4H), 1.44-1.31 (m, 6H).

LC-MS (ESI) m/z found: 301 [M+H]⁺.

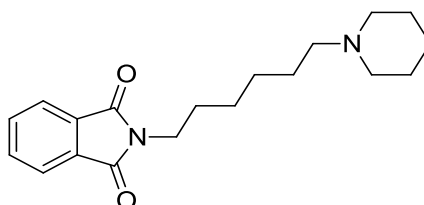
Molecular formula: C₁₈H₂₄N₂O₂

Molecular weight: 300.40 g/mol

Melting point: 72-76 °C

Aspect: White solid

2-(6-(Piperidin-1-yl)hexyl)isoindoline-1,3-dione (87e)



Procedure:

Same procedure as described for compound **87c** was used starting from **86e** (1 eq., 1.55 g, 5 mmol) in acetonitrile (40 mL) with Et₃N (1.2 eq., 0.83 mL, 6 mmol) and piperidine (1.2 eq., 0.59 mL, 6 mmol) to afford **87e** (1.26 g, 41%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 7.87-7.81 (m, 2H, H_{Ar}), 7.74-7.68 (m, 2H, H_{Ar}), 3.68 (t, 2H, J = 7.0 Hz, NCH₂), 2.10 (m, 2H), 2.35 (m, 4H), 2.29-2.24 (m, 2H), 1.73-1.63 (m, 2H), 1.61-1.54 (m, 4H), 1.51-1.32 (m, 6H).

LC-MS (ESI) m/z found: 316 [M+H]⁺.

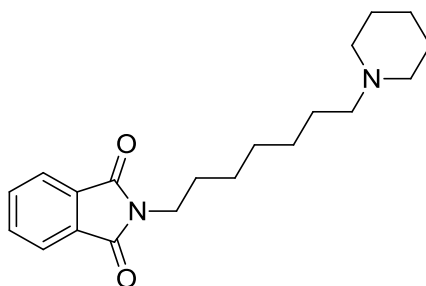
Molecular formula: C₁₉H₂₆N₂O₂

Molecular weight: 314.42 g/mol

Melting point: 59-61 °C

Aspect: White solid

2-(7-(Piperidin-1-yl)heptyl)isoindoline-1,3-dione (**87f**)



Procedure:

Same procedure as described for compound **87c** was used starting from **86f** (1 eq., 1.2 g, 3.7 mmol) in acetonitrile (55 mL) with Et₃N (1.2 eq., 0.62 mL, 4.44 mmol) and piperidine (1.2 eq., 0.44 mL, 4.44 mmol) to afford **87f** (687 mg, 57%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 7.86-7.81 (m, 2H, H_{Ar}), 7.74-7.69 (m, 2H, H_{Ar}), 3.67 (t, 2H, J = 7.2 Hz, NCH₂), 2.35 (m, 4H), 2.28-2.23 (m, 2H), 1.69-1.19 (m, 16H).

LC-MS (ESI) m/z found: 330 [M+H]⁺.

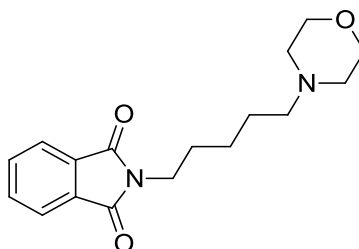
Molecular formula: C₂₀H₂₈N₂O₂

Molecular weight: 328.45 g/mol

Melting point: 56-58 °C

Aspect: White solid

2-(5-Morpholinopentyl)isoindoline-1,3-dione (**87g**)



Procedure:

Same procedure as described for compound **87c** was used starting from **86d** (1 eq., 3 g, 10.1 mmol) in acetonitrile (60 mL) with morpholine (1.2 eq., 1.07 mL, 12.2 mmol) and Et₃N (1.2 eq., 1.69 mL, 12.2 mmol) to afford **87g** (1.7 g, 56%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 7.86-7.83 (m, 2H, H_{Ar}), 7.73-7.70 (m, 2H, H_{Ar}), 3.72-3.67 (m, 6H), 2.44-2.41 (m, 4H), 2.32 (t, 2H, J = 7.8 Hz), 1.71 (m, 2H), 1.54 (m, 2H), 1.37 (m, 2H).

LC-MS (ESI) m/z found: 303 [M+H]⁺.

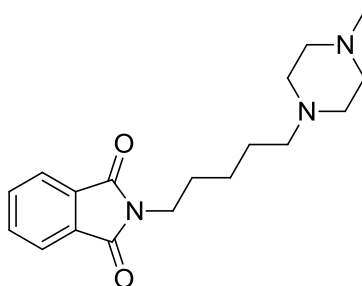
Molecular formula: C₁₇H₂₂N₂O₃

Molecular weight: 302.37 g/mol

Melting point: 66-68 °C

Aspect: White solid

2-(5-(4-Methylpiperazin-1-yl)pentyl)isoindoline-1,3-dione (90h)



Procedure:

Same procedure as described for compound **87c** was used starting from **86d** (1.2 eq., 1.98 g, 6.69 mmol) in acetonitrile (45 mL) with Et₃N (1 eq., 0.77 mL, 5.57 mmol) and methylpiperazine (1 eq., 0.618 mL, 5.57 mmol) to afford **87h** (800 mg, 38%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 7.86-7.83 (m, 2H, H_{Ar}), 7.74-7.70 (m, 2H, H_{Ar}), 3.68 (t, 2H, J = 7.2 Hz, NCH₂), 3.01 (t, 2H, J = 7.1 Hz), 2.26 (m, 8H), 2.10 (s, 3H, CH₃), 1.71-1.64 (m, 2H), 1.62-1.51 (m, 2H), 1.43-1.33 (m, 2H).

LC-MS (ESI) m/z found: 317 [M+H]⁺.

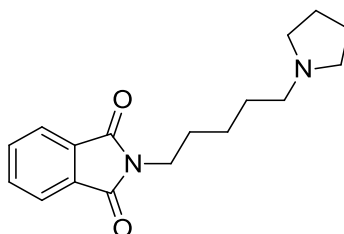
Molecular formula: C₁₈H₂₅N₃O₂

Molecular weight: 315.41 g/mol

Melting point: / °C

Aspect: Yellow oil

2-(5-(Pyrrolidin-1-yl)pentyl)isoindoline-1,3-dione (87i)



Procedure:

Same procedure as described for compound **87c** was used starting from **86d** (1 eq., 1.2 g, 4.05 mmol) in acetonitrile (23 mL) with Et₃N (1.5 eq., 0.84 mL, 6.08 mmol) and pyrrolidine (1.2 eq., 0.40 mL, 4.86 mmol) and to afford **87i** (630 mg, 54%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 7.86-7.83 (m, 2H, H_{Ar}), 7.72-7.70 (m, 2H, H_{Ar}), 3.69 (t, 2H, J = 7.2 Hz, NCH₂), 2.50-2.46 (m, 4H), 2.45-2.40 (m, 2H), 1.82-1.74 (m, 4H), 1.73-1.66 (m, 2H), 1.62-1.51 (m, 2H), 1.43-1.33 (m, 2H).

LC-MS (ESI) m/z found: 287 [M+H]⁺.

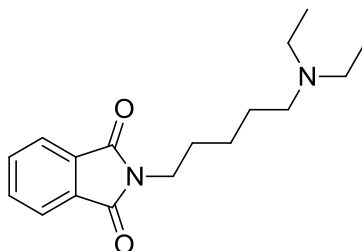
Molecular formula: C₁₇H₂₂N₂O₂

Molecular weight: 286.37 g/mol

Melting point: 58-60 °C

Aspect: White solid

2-(5-(Diethylamino)pentyl)isoindoline-1,3-dione (87j)



Procedure:

Same procedure as described for compound **87c** was used starting from **86d** (1 eq., 1.15 g, 3.87 mmol) in acetonitrile (30 mL) with Et₃N (1.5 eq., 0.81 mL, 5.82 mmol) and diethylamine (1.2 eq., 0.48 mL, 4.66 mmol) to afford **87j** (670 mg, 60%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 7.86-7.83 (m, 2H, H_{Ar}), 7.73-7.70 (m, 2H, H_{Ar}), 3.69 (t, 2H, J = 7.2 Hz, NCH₂), 2.51 (q, 4H, J = 7.3 Hz, 2 CH₂), 2.40 (t, 2H, J = 7.3 Hz), 1.70 (m, 2H), 1.55-1.45 (m, 2H), 1.39-1.29 (m, 2H), 1.15 (t, 6H, J = 7.8 Hz, 2 CH₃).

LC-MS (ESI) m/z found: 289 [M+H]⁺.

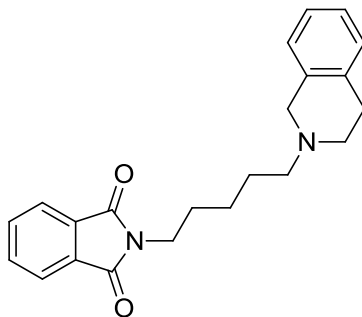
Molecular formula: C₁₇H₂₄N₂O₂

Molecular weight: 288.38 g/mol

Melting point: /

Aspect: Yellow oil

2-(5-(3,4-Dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)pentyl)isoindoline-1,3-dione (87k)



Procedure:

Same procedure as described for compound **87c** was used starting from **86d** (1 eq., 3 g, 10.1 mmol) in acetonitrile (60 mL) with Et₃N (1.2 eq., 1.69 mL, 12.2 mmol) and tetrahydroisoquinoline (1.2 eq., 1.53 mL, 12.2 mmol) to afford **87k** (1.2 g, 34%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 7.86-7.83 (m, 2H, H_{Ar}), 7.73-7.70 (m, 2H, H_{Ar}), 7.13-7.00 (m, 4H), 3.71 (t, 2H, J = 7.3 Hz, NCH₂), 3.61 (s, 2H, CH₂ tetrahydro), 2.89 (t, 2H, J = 5.9 Hz, CH₂ tetrahydro), 2.71 (t, 2H, J = 6.0 Hz, CH₂ tetrahydro), 2.50 (t, 2H, J = 7.7 Hz, CH₂N), 1.79-1.61 (m, 4H), 1.47-1.37 (m, 2H).

LC-MS (ESI) m/z found: 349 [M+H]⁺.

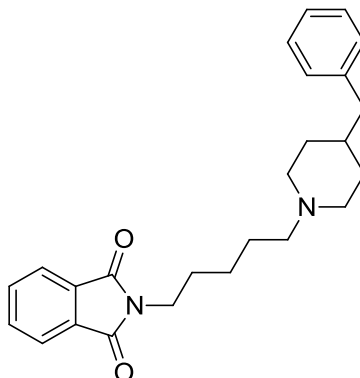
Molecular formula: C₂₂H₂₄N₂O₂

Molecular weight: 348.44 g/mol

Melting point: 74-76 °C

Aspect: White solid

2-(5-(4-Benzylpiperidin-1-yl)pentyl)isoindoline-1,3-dione (87l)



Procedure:

Same procedure as described for compound **87c** was used starting from **86d** (1 eq., 1 g, 3.38 mmol) in acetonitrile (19.1 mL) with Et₃N (1.5 eq., 0.70 mL, 5.06 mmol) and 4-benzylpiperidine (1.2 eq., 0.72 mL, 4.05 mmol) to afford **87l** (410 mg, 31%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 7.86-7.84 (m, 2H, H_{Ar}), 7.73-7.70 (m, 2H, H_{Ar}), 6.94-6.92 (m, 5H, H_{benzyl}), 3.72 (t, 2H, J = 7.3 Hz, NCH₂), 3.07 (m, 3H), 2.63-2.50 (m, 8H), 2.29 (m, 2H), 1.35-1.10 (m, 6H).

LC-MS (ESI) m/z found: 392 [M+H]⁺.

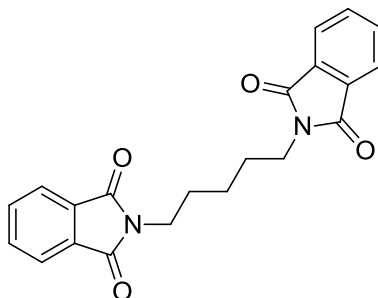
Molecular formula: C₂₅H₃₀N₂O₂

Molecular weight: 390.52 g/mol

Melting point: 60-62 °C

Aspect: White solid

2,2'-(Pentane-1,5-diyl)bis(isoindoline-1,3-dione) (87m)



Procedure:

To a suspension of 1,5-dibromopentane (1 eq., 3.1 g, 13.5 mmol) in 50 mL of DMF with tetra-n-butylammonium bromide (1%, 0.043 g, 0.135 mmol) was added slowly potassium phthalimide (4 eq., 10 g, 54 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature overnight and concentrated *in vacuo*. Mixture was then hydrolyzed with water and extracted with DCM three times. Combined organic layers were washed with NaOH 1 M solution, dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo* to give an oil which was precipitated in petroleum ether at 0 °C and filtered to afford **87m** (6.8 g, 35%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 7.86-7.81 (m, 4H, H_{Ar}), 7.72-7.68 (m, 4H, H_{Ar}), 3.68 (t, J = 7.0 Hz, 4H, 2 NCH₂), 1.72 (m, 4H), 1.32 (m, 2H).

LC-MS (ESI) m/z found: 363 [M+H]⁺.

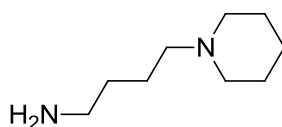
Molecular formula: C₂₁H₁₈N₂O₄

Molecular weight: 362.38 g/mol

Melting point: 189-190 °C

Aspect: White solid

4-(Piperidin-1-yl)butan-1-amine (88c)



Procedure:

A mixture of **87c** (1 eq., 2.8 g, 9.78 mmol) in EtOH (85 mL) with hydrazine hydrate (2.5 eq., 1.19 mL, 24.4 mmol) was heated at reflux for 3h, cooled to room temperature and then phthalhydrazide was filtered off. Filtrate was concentrated *in vacuo*, suspended in chloroform and phthalhydrazide was filtered again. Filtrate was then washed with water, dried over MgSO₄ and evaporated *in vacuo* to afford **88c** (1.38 g, 90%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 2.71 (t, 2H, J = 6.9 Hz, NCH₂), 2.44 (br m, 2H, NH₂), 2.28 (t, 2H, J = 7.1 Hz, NCH₂), 1.61-1.38 (m, 14H).

LC-MS (ESI) m/z found: 157 [M+H]⁺.

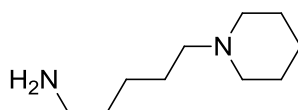
Molecular formula: C₉H₂₀N₂

Molecular weight: 156.27 g/mol

Melting point: /

Aspect: Yellow oil

5-(Piperidin-1-yl)pentane-1-amine (88d)



Procedure:

Same procedure as described for compound **88c** was used starting from **87d** (1 eq., 2.8 g, 9.78 mmol) in EtOH (85 mL) with hydrazine hydrate (2.5 eq., 1.19 mL, 24.4 mmol) to afford **88d** (1.38 g, 90%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 2.66 (t, 2H, J = 6.9 Hz, NCH₂), 2.34 (m, 4H, NCH₂ piperidine), 2.25 (t, 2H, J = 7.1 Hz, NCH₂), 1.59-1.48 (m, 6H), 1.45-1.39 (m, 6H), 1.33-1.26 (m, 2H).

LC-MS (ESI) m/z found: 171 [M+H]⁺.

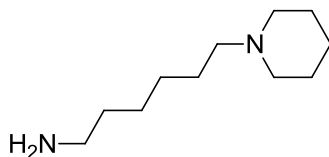
Molecular formula: C₁₀H₂₂N₂

Molecular weight: 170.30 g/mol

Melting point: /

Aspect: Yellow oil

6-(Piperidin-1-yl)hexan-1-amine (88e)



Procedure:

Same procedure as described for compound **88c** was used starting from **87e** (1 eq., 1.26 g, 4 mmol) in EtOH (35 mL) with hydrazine hydrate (2.5 eq., 0.43 mL, 10 mmol) to afford **88e** (476 mg, 65%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 2.62 (t, 2H, *J* = 6.9 Hz, NCH₂), 2.36 (m, 4H), 2.30-2.25 (br m, 2H, NH₂), 1.59 (m, 4H), 1.52-1.42 (m, 6H), 1.36-1.25 (m, 6H).

LC-MS (ESI) m/z found: 185 [M+H]⁺.

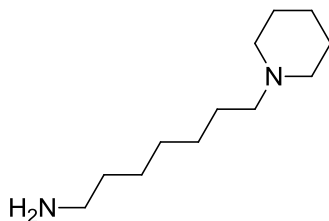
Molecular formula: C₁₁H₂₄N₂

Molecular weight: 184.32 g/mol

Melting point: /

Aspect: Yellow oil

7-(Piperidin-1-yl)heptan-1-amine (88f)



Procedure:

Same procedure as described for compound **88c** was used starting from **87f** (1 eq., 635 mg, 1.93 mmol) in EtOH (18 mL) with hydrazine (2.5 eq., 0.24 mL, 4.83 mmol) to afford **88f** (300 mg, 78%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 2.64 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, NCH₂), 2.34 (m, 4H), 2.26-2.21 (m, 2H), 1.59-1.17 (m, 18H).

LC-MS (ESI) m/z found: 199 [M+H]⁺.

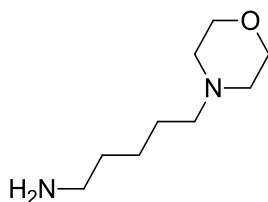
Molecular formula: C₁₂H₂₆N₂

Molecular weight: 198.35 g/mol

Melting point: /

Aspect: Yellow oil

5-Morpholinopentan-1-amine (88g)



Procedure:

Same procedure as described for compound **88c** was used starting from **87g** (1 eq., 1.72 g, 5.69 mmol) in EtOH (49 mL) with hydrazine hydrate (2.5 eq., 0.69 mL, 14.2 mmol) to afford **88g** (808 mg, 83%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 3.72 (t, 4H, J = 4.5 Hz, OCH₂ morpholine), 2.72-2.68 (m, 2H), 2.45-2.42 (m, 4H), 2.34 (t, 2H, J = 7.8 Hz, NCH₂), 1.56-1.42 (m, 4H), 1.39-1.29 (m, 4H).

LC-MS (ESI) m/z found: 173 [M+H]⁺.

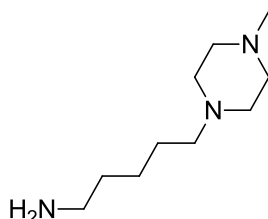
Molecular formula: C₉H₂₀N₂O

Molecular weight: 172.27 g/mol

Melting point: /

Aspect: Yellow oil

5-(4-Methylpiperazin-1-yl)pentan-1-amine (88h)



Procedure:

Same procedure as described for compound **88c** was used starting from **87h** (1 eq., 800 mg, 2.54 mmol) in EtOH (22 mL) with hydrazine hydrate (2.5 eq., 0.31 mL, 6.34 mmol) to afford **88h** (390 mg, 83%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 2.60-2.56 (m, 2H), 2.35 (m, 6H), 2.25-2.20 (m, 3H), 2.18 (s, 3H), 1.45-1.31 (m, 5H), 1.27-1.17 (m, 4H).

LC-MS (ESI) m/z found: 186 [M+H]⁺.

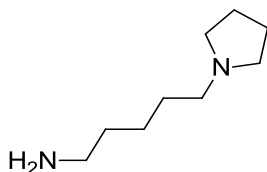
Molecular formula: C₁₀H₂₃N₃

Molecular weight: 185.31 g/mol

Melting point: /

Aspect: Yellow oil

5-(Pyrrolidin-1-yl)pentan-1-amine (88i)



Procedure:

Same procedure as described for compound **88c** was used starting from **87i** (1 eq., 600 mg, 2.1 mmol) in EtOH (18 mL) with hydrazine hydrate (2.5 eq., 0.26 mL, 5.24 mmol) to afford **88i** (265 mg, 81%).

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , δ ppm, J Hz): 2.69 (t, 2H, $J = 6.8$ Hz, NCH_2), 2.53-2.50 (m, 4H), 2.46 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz, NCH_2), 2.19 (br m, 2H, NH_2), 1.85-1.76 (m, 4H), 1.59-1.29 (m, 6H).

LC-MS (ESI) m/z found: 157 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

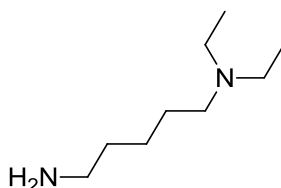
Molecular formula: $\text{C}_9\text{H}_{20}\text{N}_2$

Molecular weight: 156.27 g/mol

Melting point: /

Aspect: Yellow oil

N^1,N^1 -Diethylpentane-1,5-diamine (88j)



Procedure:

Same procedure as described for compound **88c** was used starting from **87j** (1 eq., 550 mg, 1.91 mmol) in EtOH (17 mL) with hydrazine hydrate (2.5 eq., 0.23 mL, 4.77 mmol) to afford **88j** (272 mg, 90%).

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , δ ppm, J Hz): 3.60 (m, 2H), 2.75 (m, 2H), 2.52 (t, 4H, $J = 7.3$ Hz, 2 CH_2), 2.40 (t, 2H, $J = 7.3$ Hz), 1.54-1.39 (m, 4H), 1.33-1.25 (m, 2H), 1.05 (t, 6H, $J = 7.5$ Hz, 2 CH_3).

LC-MS (ESI) m/z found: 159 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

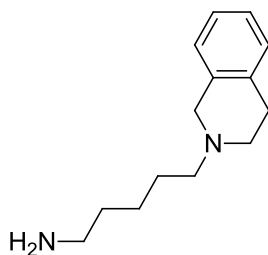
Molecular formula: $\text{C}_9\text{H}_{22}\text{N}_2$

Molecular weight: 158.28 g/mol

Melting point: /

Aspect: Yellow oil

5-(3,4-Dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)pentan-1-amine (88k)



Procedure:

Same procedure as described for compound **88c** was used starting from **87k** (1 eq., 0.3 g, 0.861 mmol) in EtOH (8 mL) with hydrazine hydrate (2.5 eq., 0.11 mL, 2.15 mmol) to afford **88k** (131.6 mg, 70%).

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , δ ppm, J Hz): 7.14-7.06 (m, 4H), 3.61 (m, 2H), 2.88 (t, 2H, $J = 5.9$ Hz, NCH_2), 2.71 (t, 2H $J = 6.0$ Hz, NCH_2), 2.50 (t, 2H, $J = 7.7$ Hz), 2.46 (t, 2H, $J = 7.1$ Hz), 1.79-1.61 (m, 4H), 1.47-1.37 (m, 4H).

LC-MS (ESI) m/z found: 219 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

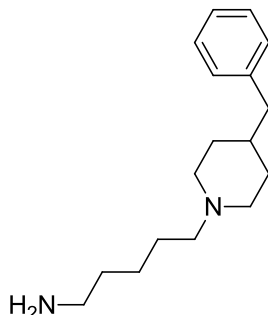
Molecular formula: $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{N}_2$

Molecular weight: 218.34 g/mol

Melting point: /

Aspect: Yellow oil

5-(4-Benzylpiperidin-1-yl)pentan-1-amine (88l)



Procedure:

Same procedure as described for compound **88c** was used starting from **87l** (1 eq., 400 mg, 1.02 mmol) in EtOH (9 mL) with hydrazine (2.5 eq., 0.13 mL, 2.56 mmol) to afford **88l** (260 g, 97%).

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , δ ppm, J Hz): 7.16 (m, 5H), 6.84-6.75 (m, 2H), 3.10 (m, 3H), 2.60-2.50 (m, 8H), 2.29 (m, 2H), 1.39-1.10 (m, 6H), 0.80 (m, 2H).

LC-MS (ESI) m/z found: 261 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

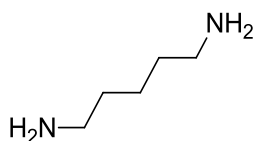
Molecular formula: $\text{C}_{17}\text{H}_{28}\text{N}_2$

Molecular weight: 260.42 g/mol

Melting point: /

Aspect: Limpid oil

Pentane-1,5-diamine (88m)



Procedure:

Same procedure as described for compound **88c** was used starting from **87m** (1 eq., 6 g, 16.5 mmol) in EtOH (140 mL) with hydrazine (10 eq., 8 mL, 164 mmol) to afford **88m** (1.48 g, 86%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 2.69 (t, 4H, J = 6.8 Hz, 2 NCH₂), 1.53 (m, 8H), 1.30 (m, 2H).

LC-MS (ESI) m/z found: 103 [M+H]⁺.

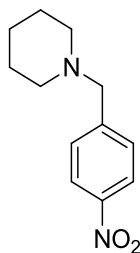
Molecular formula: C₅H₁₄N₂

Molecular weight: 102.18 g/mol

Melting point: /

Aspect: Yellow oil

1-(4-Nitrobenzyl)piperidine (89)



Procedure:

To a solution of 1-(chloromethyl)-4-nitrobenzene (1 eq., 2 g, 11.7 mmol) in 92 mL of acetone was added Et₃N (1.2 eq., 1.94 mL, 14 mmol) and piperidine (1.2 eq., 1.38 mL, 14 mmol). The reaction mixture was stirred at reflux overnight, cooled to room temperature and concentrated *in vacuo*. Mixture was suspended in water and acidified with HCl 1 M solution and extracted with diethyl ether. Aqueous layer was alkalinized using a NaOH 1 M solution up to basic pH and then extracted three times with diethyl ether. Combined organic layers were dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo* to afford **89** (2.05 g, 80%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8.18-8.15 (m, 2H, H_{Ar}), 7.52-7.49 (m, 2H, H_{Ar}), 3.55 (s, 2H, CH₂), 2.40-2.36 (m, 4H, H_{piperidine}), 1.59 (m, 4H, J = 11.2 Hz, H_{piperidine}), 1.49-1.45 (m, 2H, H_{piperidine}).

LC-MS (ESI) m/z found: 222 [M+H]⁺.

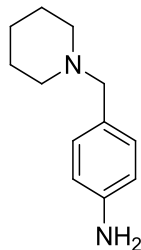
Molecular formula: C₁₂H₁₆N₂O₂

Molecular weight: 220.27 g/mol

Melting point: /

Aspect: Brown oil

4-(Piperidin-1-ylmethyl)aniline (90)



Procedure:

To a solution of compound **89** (2.3 g, 10.44 mmol) in EtOH (115 mL) with Raney nickel was added hydrazine hydrate (1.5 eq., 0.76 mL, 15.7 mmol) dropwise. The reaction mixture was stirred for 30 min at room temperature and catalyst was then filtered off. Reaction mixture was then concentrated *in vacuo*, suspended in water and extracted three times with diethyl ether. Combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. Solid was suspended in PE and filtered to afford **90** (1.259 g, 63%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 7.11-7.08 (m, 2H, H_{Ar}), 6.66-6.63 (m, 2H, H_{Ar}), 3.61 (br m, 2H, NH₂), 3.38 (s, 2H, CH₂), 2.36 (m, 4H, H_{piperidine}), 1.61-1.53 (m, 4H, H_{piperidine}), 1.46-1.38 (m, 2H, H_{piperidine}).

LC-MS (ESI) m/z found: 191 [M+H]⁺.

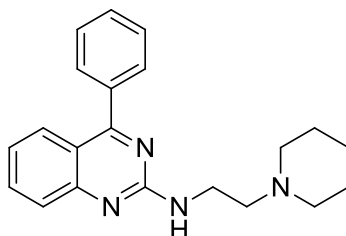
Molecular formula: C₁₂H₁₈N₂

Molecular weight: 190.28 g/mol

Melting point: 94-96°C

Aspect: Orange solid

4-Phenyl-N-(2-(piperidin-1-yl)ethyl)quinazolin-2-amine (XIVa)



Procedure:

A mixture of **75a** (1 eq., 250 mg, 1.04 mmol) with 1-piperidin-ethanamine (3 eq., 0.45 mL, 3.12 mmol) was stirred at 75 °C for 30 min in a sealed tube. After cooling to room temperature, mixture was hydrolyzed with water and extracted three times with EtOAc. Combined organic layer were dried over MgSO₄ and evaporated *in vacuo*. Oil was purified by flash chromatographie using DCM/MeOH as solvent (10/0-90/1) to afford **XIVa** (80 mg, 21%).

For biological evaluation, oil was diluted in diethyl ether with HCl gas, concentrated *in vacuo* and recrystallized from acetonitrile.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 7.79-7.77 (m, 1H, H_{Quina}), 7.72-7.69 (m, 2H, H_{Quina}), 7.67-7.65 (m, 2H, H_{Ar} and H_{Quina}), 7.56-7.53 (m, 3H, H_{Ar}), 7.17-7.12 (m, 1H, H_{Ar}), 5.93 (br m, 1H, NH), 3.67 (m, 2H, J = 5.7 Hz, CH₂CH₂), 2.60 (t, 2H, J = 6.12 Hz, CH₂CH₂), 2.45 (m, 4H, H_{piperidine}), 1.63-1.56 (m, 4H, H_{piperidine}), 1.48-1.45 (m, 2H, H_{piperidine}).

¹³C NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 170.0 (C), 159.0 (C), 153.5 (C), 137.6 (C), 133.6 (CH), 129.6 (CH), 129.5 (2 CH), 128.5 (2 CH), 127.5 (CH), 126.0 (CH), 122.1 (CH), 118.4 (C), 57.6 (CH₂), 54.4 (2 CH₂), 38.4 (CH₂), 25.9 (2 CH₂), 24.5 (CH₂).

LC-MS (ESI) m/z found: 333 [M+H]⁺.

HPLC: C4 column: t_R = 28.6 min, purity >99%; C18 column: t_R = 20.6 min, purity >99%.

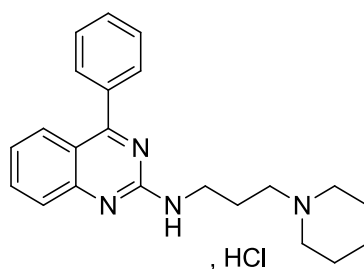
Molecular formula: C₂₁H₂₄N₄

Molecular weight: 332.44 g/mol

Melting point: /

Aspect: Yellow oil

4-Phenyl-N-(3-(piperidin-1-yl)propyl)quinazolin-2-amine hydrochloride (XIVb)



Procedure:

Same procedure as described for **XIVa** was used starting from **75a** (1 eq., 180 mg, 0.748 mmol) and 3-(piperidin-1-yl)propan-1-amine (1.5 eq., 0.18 mL, 1.12 mmol) to afford **XIVb** (60 mg, 21%).

¹H NMR (DMSO-d₆, δ ppm, J Hz): 10.26 (br s, NH⁺), 7.7-7.68 (m, 4H, H_{quina}), 7.59-7.54 (m, 5H, H_{ar}), 7.20 (br t, 1H, J = 8.0 Hz, NH), 3.51-3.33 (m, 4H), 3.1 (m, 2H), 2.84 (m, 2H), 2.06 (m, 2H), 1.77-1.66 (m, 5H), 1.37 (m, 1H).

¹³C NMR (DMSO, δ ppm): 169.7 (C), 159.3 (C), 153.3 (C), 137.4 (C), 134.3 (CH), 130.2 (CH), 129.8 (2 CH), 128.9 (2 CH), 127.5 (CH), 126.1 (CH), 122.7 (CH), 118.0 (C), 54.5 (CH₂), 52.4 (2 CH₂), 38.7 (CH₂), 23.7 (CH₂), 22.8 (2 CH₂), 21.9 (CH₂).

LC-MS (ESI) m/z found: 347 [M+H]⁺.

HPLC: C4 column: t_R = 16.1 min, purity >99%; C18 column: t_R = 20.7 min, purity >99%.

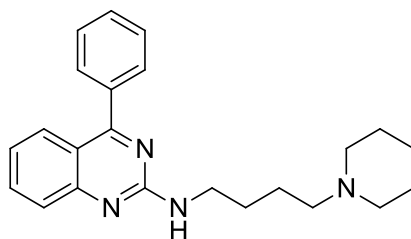
Molecular formula: C₂₂H₂₇ClN₄

Molecular weight: 382.93 g/mol

Melting point: 202 °C

Aspect: Beige solid

4-Phenyl-N-(4-(piperidin-1-yl)butyl)quinazolin-2-amine (XIVc)



Procedure:

Same procedure as described for **XIVa** was used starting from **75a** (1 eq., 200 mg, 0.831 mmol) with **89c** (3.08 eq., 400 mg, 2.56 mmol) to afford **XIVc** (163 mg, 54%) into base form.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 7.82 (m, 1H), 7.70-7.67 (m, 3H) 7.56 (m, 3H), 7.19 (m, 2H), 5.55 (br m, 1H, NH), 3.66 (m, 2H, NCH₂), 3.01 (m, 2H, NCH₂), 2.02-1.26 (m, 14H).

¹³C NMR (CDCl₃, δ ppm): 170.4 (C), 158.9 (C), 153.4 (C), 137.4 (C), 133.9 (CH), 129.8(CH), 129.6 (2 CH), 128.5 (2 CH), 127.6 (CH), 125.9 (CH), 122.5 (CH), 118.5 (C), 57.2 (CH₂), 53.1 (2 CH₂), 40.3 (CH₂), 27.3 (CH₂), 22.7 (2 CH₂), 22.3 (2 CH₂), 20.9 (CH₂).

LC-MS (ESI) m/z found: 361 [M+H]⁺.

HPLC: C4 column: t_R = 16.4 min, purity >99%; C18 column: t_R = 21.2 min, purity >99%.

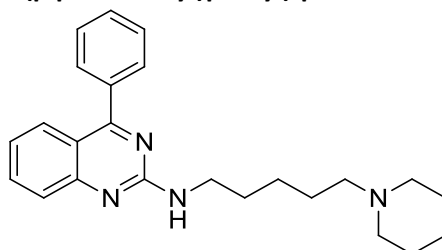
Molecular formula: C₂₃H₂₈N₄

Molecular weight: 360.5 g/mol

Melting point: /

Aspect: Yellow oil

4-Phenyl-N-(5-(piperidin-1-yl)pentyl)quinazolin-2-amine (XIVd)



Procedure:

Same procedure as described for **XIVa** was used starting from **75a** (1 eq., 150 mg, 0.623 mmol) with **88d** (3 eq., 300 mg, 1.92 mmol) to afford **XIVd** (170 mg, 56%) into base form.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 7.78 (m, 1H, H_{quina}), 7.77-7.68 (m, 2H) 7.67-7.65 (m, 2H), 7.55-7.53 (m, 3H), 7.18-7.12 (m, 1H), 5.55 (br t, 1H, J = 5.60 Hz, NH), 3.60 (m, 2H, NCH₂), 2.39 (m, 3H), 2.32 (t, 2H, J = 7.40 Hz, NCH₂), 1.73-1.66 (m, 2H), 1.64-1.54 (m, 5H), 1.49-1.26 (m, 6H).

¹³C NMR (CDCl₃, δ ppm): 169.9 (C), 159.1 (C), 153.4 (C), 137.5 (C), 133.7 (CH), 129.6 (CH), 129.5 (2 CH), 128.4 (2 CH), 127.5 (CH), 126.1 (CH), 122.2 (CH), 118.4 (C), 59.3 (CH₂), 54.6 (2 CH₂), 41.4 (CH₂), 29.6 (CH₂), 26.5 (CH₂), 25.8 (2 CH₂), 25.1 (2 CH₂), 24.4 (CH₂).

LC-MS (ESI) m/z found: 375 [M+H]⁺.

HPLC: C4 column: t_R = 16.4 min, purity > 99%; C18 column: t_R = 21.2 min, purity > 99%.

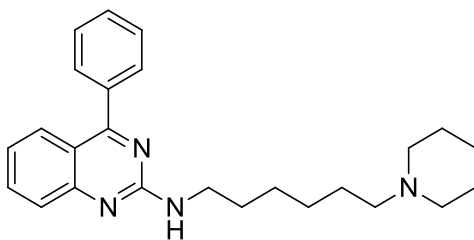
Molecular formula: C₂₄H₃₀N₄

Molecular weight: 374.52 g/mol

Melting point: /

Aspect: Yellow oil

4-Phenyl-N-(6-(piperidin-1-yl)hexyl)quinazolin-2-amine (XIVe)



Procedure:

Same procedure as described for **XIVa** was used starting from **75a** (1 eq., 150 mg, 0.623 mmol) with **88e** (3 eq., 300 mg, 1.92 mmol) to afford **XIVe** (163 mg, 54%) into base form.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 7.80-7.77 (m, 1H), 7.71-7.64 (m, 4H), 7.54-7.52 (m, 3H), 7.17-7.11 (m, 1H), 5.37 (m, 1H), 3.57 (m, 2H), 2.37 (m, 4H), 2.31-2.26 (m, 2H), 1.72-1.63 (m, 2H), 1.63-1.55 (m, 4H), 1.52-1.32 (m, 8H).

¹³C NMR (CDCl₃, δ ppm): 169.9 (C), 159.1 (C), 153.5 (C), 137.5 (C), 133.6 (CH), 129.6 (CH), 129.5 (2 CH), 128.5 (2 CH), 127.5 (CH), 126.1 (CH), 122.1 (CH), 118.4 (C), 59.5 (CH₂), 54.6 (2 CH₂), 41.5 (CH₂), 29.6 (CH₂), 27.5 (CH₂), 26.9 (CH₂), 26.8 (CH₂), 25.9 (2 CH₂), 24.5 (CH₂).

LC-MS (ESI) m/z found: 390 [M+H]⁺.

HPLC: C4 column: t_R = 17.1 min, purity > 99%; C18 column: t_R = 21.9 min, purity > 99%.

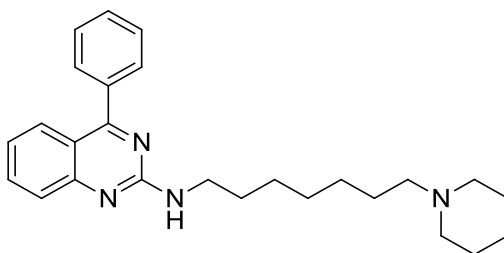
Molecular formula: C₂₅H₃₂N₄

Molecular weight: 388.55 g/mol

Melting point: /

Aspect: Yellow oil

4-Phenyl-N-(7-(piperidin-1-yl)heptyl)quinazolin-2-amine (XIVf)



Procedure:

Same procedure as described for **XIVa** was used starting from **75a** (1 eq., 207 mg, 0.861 mmol) with **88f** (3 eq., 476 mg, 2.58 mmol) to afford **XIVf** (150 mg, 75%) into base form.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 7.81-7.78 (m, 1H), 7.72-7.65 (m, 4H), 7.56-7.52 (m, 3H), 7.18-7.12 (m, 1H), 5.31 (m, 1H), 3.58 (m, 2H), 2.39 (m, 4H), 2.33-2.28 (m, 2H), 1.70-1.65 (m, 2H), 1.63-1.57 (m, 4H), 1.55-1.49 (m, 2H), 1.47-1.39 (m, 4H), 1.36-1.26 (m, 4H).

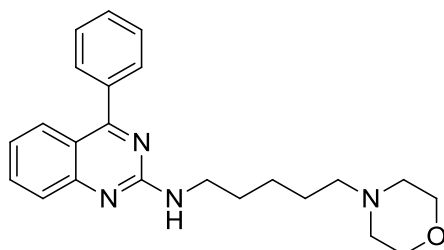
¹³C NMR (CDCl₃, δ ppm): 169.9 (C), 159.0 (C), 153.4 (C), 137.5 (C), 133.7 (CH), 129.6 (CH), 129.5 (2 CH), 128.5 (2 CH), 127.5 (CH), 126.1 (CH), 122.2 (CH), 118.4 (C), 59.4 (CH₂), 54.5 (2 CH₂), 41.5 (CH₂), 29.6 (CH₂), 29.3 (CH₂), 27.6 (CH₂), 26.9 (CH₂), 26.5 (CH₂), 25.6 (2 CH₂), 24.2 (CH₂).

LC-MS (ESI) m/z found: 403 [M+H]⁺.

HPLC: C4 column: t_R = 14.8 min, purity 96%; C18 column: t_R = 6.9 min, purity 93%.

Molecular formula: C₂₆H₃₄N₄
Molecular weight: 402.57 g/mol
Melting point: /
Aspect: Yellow oil

***N*-(5-Morpholinopentyl)-4-phenylquinazolin-2-amine (XIVg)**



Procedure:

Same procedure as described for **XIVa** was used starting from **75a** (1 eq., 77.1 mg, 0.32 mmol) with **88g** (3.08 eq., 170 mg, 0.987 mmol) to afford **XIVg** (163 mg, 54%) into base form.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 7.81-7.78 (m, 1H, H_{Quina}), 7.73-7.65 (m, 4H), 7.57-7.52 (m, 3H), 7.16 (m, 1H), 5.36-5.32 (m, 1H), 3.72 (t, 4H J = 4.6 Hz, OCH₂_{morpholine}), 3.60 (m, 2H), 2.45-2.42 (m, 4H), 2.38-2.33 (m, 2H), 1.71 (m, 2H), 1.63-1.42 (m, 4H).

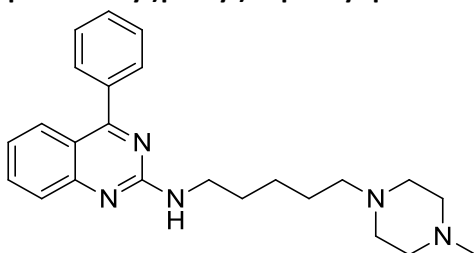
¹³C NMR (CDCl₃, δ ppm): 170.0 (C), 159.1 (C), 153.4 (C), 137.5 (C), 133.7 (CH), 129.6 (C), 129.5 (2 CH), 128.5 (2 CH), 127.5 (C), 126.1 (C), 122.3 (C), 118.4 (C), 66.9 (2 CH₂), 59.0 (CH₂), 53.7 (2 CH₂), 41.4 (CH₂), 29.5 (CH₂), 26.2 (CH₂), 24.8 (CH₂).

LC-MS (ESI) m/z found: 377 [M+H]⁺.

HPLC: C4 column: t_R = 15.2 min, purity > 98%; C18 column: t_R = 21.2 min, purity > 96%.

Molecular formula: C₂₃H₂₈N₄O
Molecular weight: 376.49 g/mol
Melting point: /
Aspect: Yellow oil

***N*-(5-(4-Methylpiperazin-1-yl)pentyl)-4-phenylquinazolin-2-amine (XIVh)**



Procedure:

Same procedure as described for **XIVa** was used starting from **75a** (1 eq., 383 mg, 1.59 mmol) with **88h** (3 eq., 885 mg, 4.78 mmol) to afford **XIVh** (386 mg, 55%) into base form.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 7.80-7.77 (m, 1H, H_{Quina}), 7.71-7.65 (m, 4H), 7.54-7.51 (m, 3H), 7.17-7.12 (m, 1H), 5.35 (m, 1H), 3.58 (m, 2H, NCH₂), 2.46 (m, 7H), 2.38-2.33 (m, 3H), 2.28 (s, 3H, CH₃), 1.75-1.65 (m, 2H), 1.62-1.52 (m, 2H), 1.50-1.40 (m, 2H).

¹³C NMR (CDCl₃, δ ppm): 169.93 (C), 159.1 (C), 153.4 (C), 137.5 (C), 133.7 (CH), 129.6 (CH), 129.5 (2 CH), 128.5 (2 CH), 127.5 (CH), 126.1 (CH), 122.2 (CH), 118.4 (C), 58.6 (CH₂), 55.1 (2 CH₂), 53.2 (2 CH₂), 46.0 (CH₃), 41.4 (CH₂), 29.5 (CH₂), 26.6 (CH₂), 24.9 (CH₂).

LC-MS (ESI) m/z found: 390 [M+H]⁺.

HPLC: C4 column: t_R = 13.4 min, purity > 99%; C18 column: t_R = 3.8 min, purity > 99%.

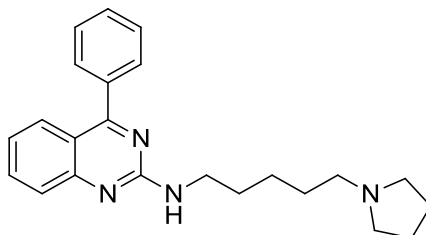
Molecular formula: C₂₄H₃₁N₅

Molecular weight: 389.54 g/mol

Melting point: /

Aspect: Yellow oil

4-Phenyl-N-(5-(pyrrolidin-1-yl)pentyl)quinazolin-2-amine (XIVi)



Procedure:

Same procedure as described for **XIVa** was used starting from **75a** (1 eq., 145 mg, 0.61 mmol) with **88i** (3 eq., 284 mg, 1.82 mmol) to afford **XIVi** (107 mg, 49%) into base form.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 7.80-7.78 (m, 1H, H_{quina}), 7.71-7.65 (m, 4H), 7.55-7.52 (m, 3H), 7.17-7.12 (m, 1H), 5.36 (m, 1H), 3.59 (m, 2H, NCH₂), 2.55-2.53 (m, 4H), 2.52-2.46 (m, 2H), 1.82-1.78 (m, 4H), 1.73-1.69 (m, 2H), 1.66-1.58 (m, 2H), 1.52-1.45 (m, 2H).

¹³C NMR (CDCl₃, δ ppm): 169.9 (C), 159.0 (C), 153.4 (C), 137.2 (C), 134.1 (CH), 129.9 (CH), 129.6 (2 CH), 128.5 (2 CH), 127.7 (CH), 126.1 (CH), 122.6 (CH), 119.2 (CH), 55.5 (CH₂), 53.5 (2 CH₂), 40.9 (CH₂), 28.9 (CH₂), 25.3 (CH₂), 24.1 (CH₂), 23.4 (2 CH₂).

LC-MS (ESI) m/z found: 361 [M+H]⁺.

HPLC: C4 column: t_R = 16.0 min, purity > 99%; C18 column: t_R = 22.9 min, purity > 99%.

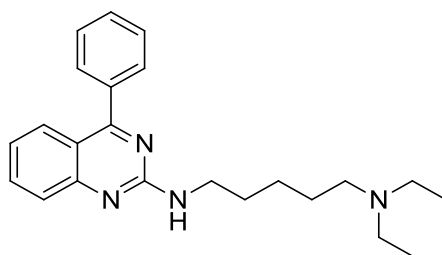
Molecular formula: C₂₃H₂₈N₄

Molecular weight: 360.50 g/mol

Melting point: /

Aspect: Yellow oil

***N*¹,*N*¹-Diethyl-*N*⁵-(4-phenylquinazolin-2-yl)pentane-1,5-diamine (XIVj)**



Procedure:

Same procedure as described for **XIVa** was used starting from **75a** (1 eq., 152 mg, 0.632 mmol) with **88j** (4 eq., 400 mg, 2.53 mmol) to afford **XIVj** (103 mg, 45%) into base form.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 7.81-7.78 (m, 1H, H_{quina}), 7.71-7.65 (m, 4H), 7.56-7.52 (m, 3H), 7.18-7.12 (m, 1H), 5.35 (m, 1H), 3.59 (m, 2H), 2.55 (q, 4H, J = 7.34 Hz, 2 CH₂), 2.48-2.43 (m, 2H), 1.71 (m, 2H), 1.59-1.40 (m, 4H), 1.03 (t, 6H, J = 7.40 Hz, 2 CH₃).

¹³C NMR (CDCl₃, δ ppm): 169.9 (C), 159.1 (C), 153.5 (C), 137.5 (C), 133.7 (CH), 129.6 (CH), 129.5 (2 CH), 128.4 (2 CH), 127.5 (CH), 126.1 (CH), 122.2 (CH), 118.4 (C), 52.7 (CH₂), 46.8 (2 CH₃), 41.5 (CH₂), 29.6 (CH₂), 26.6 (CH₂), 25.1 (CH₂), 11.5 (2 CH₂).

LC-MS (ESI) m/z found: 363 [M+H]⁺.

HPLC: C4 column: t_R = 4.3 min, purity > 99%; C18 column: t_R = 3.7 min, purity > 99%.

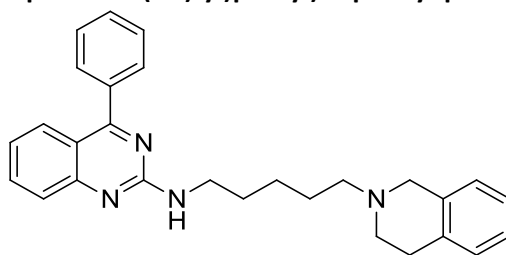
Molecular formula: C₂₃H₃₀N₄

Molecular weight: 362.51 g/mol

Melting point: /

Aspect: Yellow oil

***N*-(5-(3,4-Dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)pentyl)-4-phenylquinazolin-2-amine (XIVk)**



Procedure:

Same procedure as described for **XIVa** was used starting from **75a** (1 eq., 77 mg, 0.32 mmol) with **88k** (3 eq., 170 mg, 0.987 mmol) to afford **XIVk** (44 mg, 36%) into base form.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 7.82-7.79 (m, 1H, H_{quina}), 7.72-7.66 (m, 4H), 7.56-7.53 (m, 3H), 7.19-7.09 (m, 4H), 7.03-7.00 (m, 1H), 5.35-5.32 (m, 1H), 3.65-3.59 (m, 4H), 2.91 (t, 2H J = 5.6 Hz), 2.73 (t, 2H J = 5.7 Hz), 2.56-2.52 (m, 2H), 1.78-1.65 (m, 4H), 1.57-1.27 (m, 2H).

¹³C NMR (CDCl₃, δ ppm): 170.03 (C), 158.9 (C), 153.4 (C), 137.4 (C), 133.8 (C), 130.0 (C), 129.6 (CH), 129.6 (2 CH), 128.6 (CH), 128.5 (2 CH), 128.3 (CH), 128.2 (CH), 128.1 (CH), 127.9 (CH), 127.8 (CH), 127.7 (CH), 122.7 (CH), 118.2 (C), 56.8 (CH₂), 54.4 (CH₂), 50.0 (CH₂), 41.2 (CH₂), 29.4 (CH₂), 26.9 (CH₂), 25.6 (CH₂), 24.6 (CH₂).

LC-MS (ESI) m/z found: 424 [M+H]⁺.

HPLC: C4 column: $t_R = 4.3$ min, purity > 99%; C18 column: $t_R = 3.9$ min, purity > 99%.

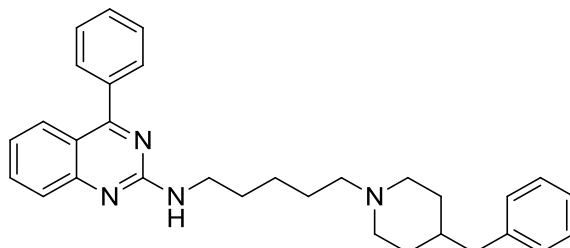
Molecular formula: $C_{28}H_{30}N_4$

Molecular weight: 422.56 g/mol

Melting point: /

Aspect: Yellow oil

***N*-(5-(4-Benzylpiperidin-1-yl)pentyl)-4-phenylquinazolin-2-amine (XIVl)**



Procedure:

Same procedure as described for **XIVa** was used starting from **75a** (1 eq., 87 mg, 0.36 mmol) with **88l** (3 eq., 281 mg, 1.08 mmol) to afford **XIVl** (80 mg, 50%) into base form.

1H NMR (CDCl₃, δ ppm, *J* Hz): 7.81-7.78 (m, 1H), 7.72-7.65 (m, 4H), 7.55-7.53 (m, 3H), 7.30-7.12 (m, 6H), 5.38 (m, 1H), 3.58 (m, 2H), 2.94-2.90 (m, 2H), 2.53 (d, 2H, *J* = 6.93 Hz), 2.35-2.30 (m, 2H), 1.90-1.81 (m, 2H), 1.72-1.65 (m, 2H), 1.61-1.51 (m, 4H), 1.49-1.39 (m, 3H), 1.36-1.27 (m, 2H).

^{13}C NMR (CDCl₃, δ ppm): 169.9 (C), 159.1 (C), 153.5 (C), 140.7 (C), 137.5 (C), 133.7 (CH), 129.6 (CH), 129.5 (2 CH), 129.1 (2 CH), 128.5 (2 CH), 128.1 (2 CH), 127.5 (CH), 126.1 (CH), 125.8 (CH), 122.2 (CH), 118.4 (C), 59.0 (CH₂), 54.0 (2 CH₂), 43.2 (CH₂), 41.4 (2 CH₂), 38.0 (CH₂), 32.1 (CH₂), 29.6 (CH₂), 26.7 (CH), 25.1 (CH₂).

LC-MS (ESI) *m/z* found: 465 [M+H]⁺.

HPLC: C4 column: $t_R = 4.3$ min, purity 93%; C18 column: $t_R = 25.6$ min, purity > 99%.

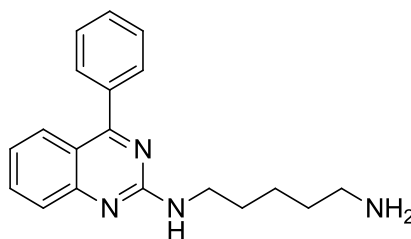
Molecular formula: $C_{31}H_{36}N_4$

Molecular weight: 464.64 g/mol

Melting point: /

Aspect: Yellow oil

***N*¹-(4-phenylquinazolin-2-yl)pentane-1,5-diamine (XIVm)**



Procedure:

Same procedure as described for **XIVa** was used starting from **75a** (1 eq., 100 mg, 0.415 mmol) with **88m** (3 eq., 0.15 mL, 1.25 mmol) to afford **XIVm** (50 mg, 39%) into base form.

1H NMR (CDCl₃, δ ppm, *J* Hz): 7.79-7.76 (m, 1H), 7.71-7.65 (m, 4H), 7.56-7.53 (m, 3H), 7.18-7.12 (m, 1H), 5.53 (m, 1H), 3.60 (m, 2H), 2.69-2.65 (m, 2H), 2.46 (m, 2H), 1.74-1.70 (m, 2H), 1.54-1.53 (m, 4H).

¹³C NMR (CDCl₃, δ ppm): 170.0 (C), 159.0 (C), 153.4 (C), 137.5 (C), 133.8 (CH), 129.7 (CH), 129.5 (2 CH), 128.5 (2 CH), 127.5 (CH), 126.0 (CH), 122.2 (CH), 118.4 (C), 41.7 (CH₂), 41.1 (CH₂), 32.5 (CH₂), 29.2 (CH₂), 24.0 (CH₂).

LC-MS (ESI) m/z found: 307 [M+H]⁺.

HPLC: C4 column: t_R = 4.5 min, purity > 99%; C18 column: t_R = 3.9 min, purity > 99%.

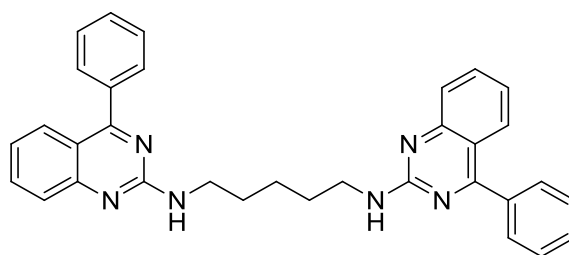
Molecular formula: C₁₉H₂₂N₄

Molecular weight: 306.40 g/mol

Melting point: /

Aspect: Yellow oil

N¹,N⁵-Bis(4-phenylquinazolin-2-yl)pentane-1,5-diamine (XIVn)



Procedure:

Same procedure as described for **XIVa** was used starting from **75a** (1 eq., 100 mg, 0.415 mmol) with **88m** (3 eq., 0.15 mL, 1.25 mmol) to afford **XIVm** (50 mg, 30%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 7.70 (m, 2H), 7.69-7.66 (m, 8H), 7.56-7.53 (m, 6H), 7.18-7.12 (m, 2H), 5.47 (br m, 2H, 2 NH), 3.63 (m, 4H), 1.83-1.74 (m, 4H), 1.66-1.58 (m, 2H).

¹³C NMR (CDCl₃, δ ppm): 169.5 (2 C), 159.4 (C), 153.4 (C), 137.5 (C), 134.1 (CH), 130.1 (CH), 129.8 (2 CH), 128.8 (2 CH), 127.5 (CH), 126.0 (CH), 122.3 (CH), 117.8 (C), 42.8 (CH₂), 41.2 (CH₂), 29.2 (CH₂), 29.0 (CH₂), 24.6 (CH₂).

LC-MS (ESI) m/z found: 511 [M+H]⁺.

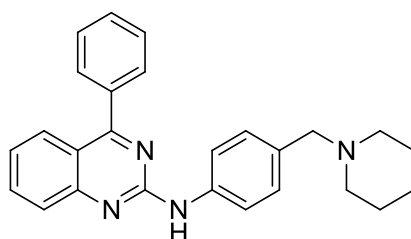
Molecular formula: C₃₃H₃₀N₆

Molecular weight: 510.63 g/mol

Melting point: > 300 °C

Aspect: Yellow solid

4-Phenyl-N-(4-(piperidin-1-ylmethyl)phenyl)quinazolin-2-amine (XIVo)



Procedure:

In a sealed tube was added **75a** (1 eq., 126 mg, 0.526 mmol), BINAP (0.1 eq., 32.7 mg, 0.053 mmol), **90** (1 eq., 100 mg, 0.526 mmol), Cs₂CO₃ (3 eq., 513 mg, 1.58 mmol) and palladium diacetate (5%, 5.9 mg, 0.026 mmol) in 4 mL of anhydrous dioxane. The mixture reaction was degassed and then heated

overnight at 130 °C. The mixture was then hydrolyzed with water and extracted three times with EtOAc. Combined organic layer were dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. Crude was purified using a flash chromatography (DCM/MeOH : 100-0 to 90-10) to afford **XIVo** (150 mg, 71%).

¹H NMR (DMSO-d₆): 7.91-7.89 (m, 1H), 7.85-7.72 (m, 6H), 7.59-7.57 (m, 3H), 7.43 (m, 1H), 7.36-7.26 (m, 3H), 3.53 (s, 2H, CH₂), 2.45 (m, 4H), 1.64-1.59 (m, 4H), 1.47-1.45 (m, 2H).

¹³C NMR (DMSO-d₆): 170.1 (C), 156.1 (C), 152.8 (C), 138.9 (C), 137.2 (C), 133.9 (CH), 130.1 (CH), 129.9 (CH), 129.8 (CH), 129.6 (2 CH), 128.6 (2 CH), 127.4 (CH), 126.9 (CH), 123.6 (CH), 122.6 (C), 119.1 (C), 118.49 (2 CH), 63.2 (CH₂), 54.2 (2 CH₂), 25.7 (2 CH₂), 24.3 (CH₂).

LC-MS (ESI) m/z found: 395 [M+H]⁺.

HPLC: C4 column: t_R = 15.9 min, purity > 99%; C18 column: t_R = 25.4 min, purity > 99%.

Molecular formula: C₂₆H₂₆N₄

Molecular weight: 394.51 g/mol

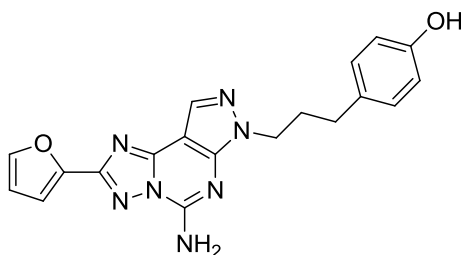
Melting point: /

Aspect: Yellow oil

4- Synthesis of antagonists probes (Chap.4)

Chemical Synthesis. Materials and Instrumentation. SCH-442416 (Tocris Bioscience, Ellisville, MO), Alexa Fluor® 647 NHS Ester (ThermoFisher Scientific, Ref. A20006), BODIPY® 630/650-X NHS Ester (ThermoFisher Scientific, Ref. D10000) and Alexa Fluor® 488 Carboxylic Acid, 2,3,5,6-Tetrafluorophenyl Ester, 5-isomer (ThermoFisher Scientific, Ref. A30005) were obtained from the commercial sources specified in the parenthesis next to its name. All other reagents and solvents were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). NMR spectra were recorded on a Bruker 400 MHz spectrometer. Chemical shifts are given in ppm (δ), calibrated to the residual solvent signals or TMS. TLC analysis was carried out on glass sheets precoated with silica gel F 254 (0.2 mm) from Aldrich and spots were examined under ultraviolet light at 254 nm. Purification of final fluorescent compounds was performed by preparative HPLC with CH₃CN/H₂O as mobile phase (column A: Luna 5 μ m C18(2) 100 Å, LC column 250 mm \times 21.2 mm, flow rate of 5 mL/min ; column B: Eclipse XDB-C18, 5 μ m, 4.6 mm \times 250 mm, flow rate of 5 mL/min). Column chromatography was performed on silica gel (40–63 μ m, 60 Å). High resolution mass (HRMS) measurements were performed on a proteomics optimized Q-TOF-2 (Micromass-Waters). The purity of final derivatives was checked using a Hewlett-Packard 1100 HPLC equipped with a Zorbax SB-Aq 5 μ m analytical column (50 \times 4.6 mm; Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA). The mobile phase was as follows: linear gradient solvent system, 5 mM TBAP (tetrabutylammonium dihydrogen phosphate) – CH₃CN from 100:0 to 0:100 in 15 min; the flow rate was 0.5 mL/min. All derivatives tested for biological activity showed >95% purity by HPLC analysis with detection at 254 nm for molecules without fluorescent moieties and at 488 nm, 640 nm or 647 nm depending on the fluorescent ligands.

4-(3-(5-Amino-2-(furan-2-yl)-7H-pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidin-7-yl)propyl)phenol (91)



Procedure:

To a solution of 2-(furan-2-yl)-7-(3-(4-methoxyphenyl)propyl)-7H-pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidin-5-amine (1 eq., 90 mg, 0.231 mmol) in DCM (12 mL) was added dropwise BBr₃ (5 eq., 1 M in CH₂Cl₂, 1.2 mL, 1.18 mmol). The mixture was stirred for 4h at room temperature, hydrolyzed carefully with MeOH and evaporated *in vacuo* to afford **91** (75 mg, 86%).

¹H NMR (MeOD-*d*4, δ ppm, *J* Hz) : 8.12 (s, 1H), 7.78 (d, 1H, *J* = 1.1 Hz), 7.25 (d, 1H, *J* = 3.1 Hz), 6.92-7.10 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz), 6.66 (d, 1H, *J* = 1.9 Hz), 6.61-6.65 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz), 4.37 (t, 2H, *J* = 7.0 Hz), 2.52 (t, 2H, *J* = 7.0 Hz), 2.16-2.25 (m, 2H).

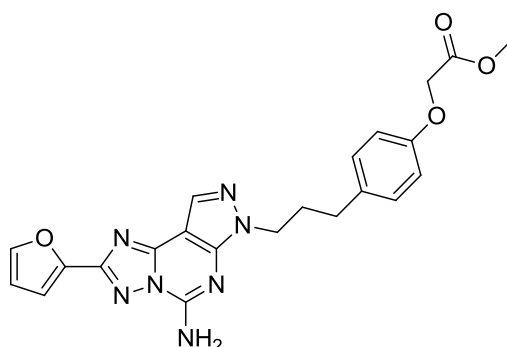
ESI-HRMS calculated for C₁₉H₁₈N₇O₂ [M + H]⁺, 376.1532; Calcd. 376.1522.

Molecular formula: C₁₉H₁₇N₇O₂

Molecular weight: 375.38 g/mol

Aspect: Beige solid

Methyl-2-(4-(3-(5-amino-2-(furan-2-yl)-7H-pyrazolo[4,3-*e*][1,2,4]triazolo[1,5-*c*]pyrimidin-7-yl)propyl)phenoxy)acetate (92)



Procedure:

To a suspension of **91** (1 eq., 18 mg, 0.048 mmol) in MeOH (3 mL) was added cesium carbonate (5 eq., 78.1 mg, 0.24 mmol). The mixture was stirred for 1 h at 40 °C and then methyl bromoacetate (12 eq., 0.06 mL, 0.58 mmol) was added. The mixture was stirred overnight at 40 °C and then concentrated *in vacuo*. The crude product was suspended in water, extracted three times with EtOAc, and the combined organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. The resulting crude residue was purified by silica gel column chromatography (DCM/MeOH : 99/1) to afford **92** (12 mg, 90%).

¹H NMR (MeOD-*d*4, δ ppm, *J* Hz) : 8.21 (s, 1H), 7.65 (d, 1H, *J* = 1.8 Hz), 7.29-7.26 (m, 1H), 7.14-7.10 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 6.85-6.80 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 6.63 (dd, 1H, *J* = 1.6 Hz and *J* = 3.2 Hz), 5.97 (s, 2H), 4.62 (s, 3H), 4.37 (t, 2H, *J* = 7.0 Hz), 2.62 (t, 2H, *J* = 7.0 Hz), 2.30-2.19 (m, 2H).

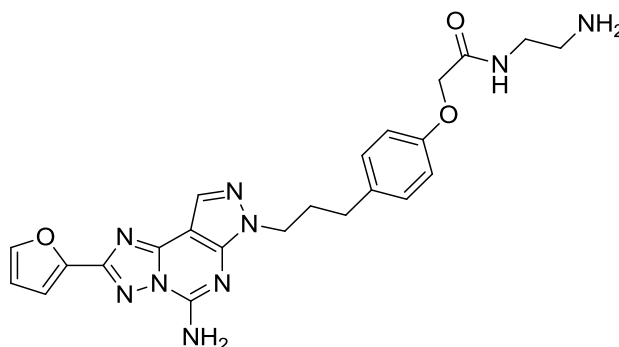
ESI-HRMS calculated for C₂₂H₂₂N₇O₄ [M + H]⁺, 448.1727; Calcd. 448.1733.

Molecular formula: C₂₂H₂₁N₇O₄

Molecular weight: 447.45 g/mol

Aspect: White solid

2-(4-(3-(5-Amino-2-(furan-2-yl)-7H-pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidin-7-yl)propyl)phenoxy)-N-(2-aminoethyl)acetamide (93a)



Procedure:

Compound **92** (1 eq., 12 mg, 0.0268 mmol) was dissolved in a mixture of ethylenediamine and MeOH (2 mL, 1:9, v/v). After stirring at room temperature overnight, the reaction mixture was concentrated to dryness, and the resulting residue was purified by silica gel column chromatography (20:78:2 MeOH:CH₂Cl₂:aq. NH₃, v/v/v) to afford **93a** (8 mg, 63%).

¹H NMR (MeOD-*d*₄, δ ppm, *J* Hz) : 8.10 (s, 1H), 7.77 (d, 1H, *J* = 0.7 Hz and *J* = 1.7 Hz), 7.26 (d, 1H, *J* = 0.7 Hz and *J* = 3.4 Hz), 7.10 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz), 6.84 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz), 6.68 (dd, 1H, *J* = 1.6 Hz and *J* = 3.2 Hz), 4.44 (s, 2H), 4.38 (t, 2H, *J* = 6.7 Hz), 3.33 (t, 2H, *J* = 6.2 Hz), 2.77 (t, 2H, *J* = 6.2 Hz), 2.62 (t, 2H, *J* = 6.2 Hz), 2.26-2.23 (m, 2H).

ESI-HRMS calculated for C₂₃H₂₆N₉O₃ [M + H]⁺, 476.2160; Calcd. 476.2159.

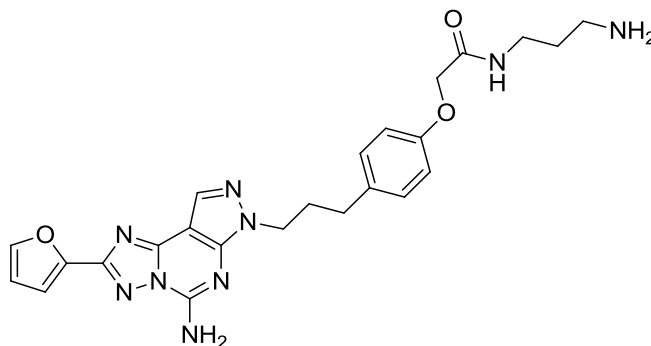
HPLC: C18 column: t_R = 6.9 min, purity 98%.

Molecular formula: C₂₃H₂₅N₉O₃

Molecular weight: 475.50 g/mol

Aspect: White solid

2-(4-(3-(5-Amino-2-(furan-2-yl)-7H-pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidin-7-yl)propyl)phenoxy)-N-(3-aminopropyl)acetamide (93b)



Procedure:

Compound **92** (1 eq., 7 mg, 0.0157 mmol) was dissolved in a mixture of 1,3-diaminopropane and MeOH (2 mL, 1:9, v/v). After stirring at room temperature overnight, the reaction mixture was

concentrated to dryness, and the resulting residue was purified by silica gel column chromatography (20:78:2 MeOH:CH₂Cl₂:aq. NH₃, v/v/v) to afford **93b** (4.5 mg, 59%).

¹H NMR (MeOD-*d*4, δ ppm, *J* Hz) : 8.10 (s, 1H), 7.77 (d, 1H, *J* = 1.7 Hz), 7.26 (d, 1H, *J* = 3.2 Hz), 7.10 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz), 6.84 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz), 6.68 (dd, 1H, *J* = 1.6 Hz and *J* = 3.2 Hz), 4.43 (s, 2H), 4.38 (t, 2H, *J* = 6.7 Hz), 3.33 (t, 2H, *J* = 6.2 Hz), 2.68 (t, 2H, *J* = 6.2 Hz), 2.62 (t, 2H, *J* = 6.2 Hz), 2.26-2.23 (m, 2H), 1.74-1.67 (m, 2H).

ESI-HRMS calculated for C₂₄H₂₈N₉O₃ [M + H]⁺, 490.2321; Calcd. 490.2315.

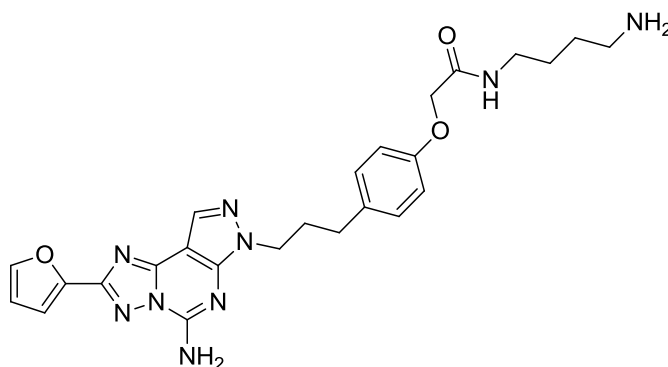
HPLC: C18 column: t_R = 6.9 min, purity 99%.

Molecular formula: C₂₄H₂₇N₉O₃

Molecular weight: 489.53 g/mol

Aspect: White solid

2-(4-(3-(5-Amino-2-(furan-2-yl)-7H-pyrazolo[4,3-*e*][1,2,4]triazolo[1,5-*c*]pyrimidin-7-yl)propyl)phenoxy)-*N*-(4-aminobutyl)acetamide (93c)



Procedure:

Compound **92** (1 eq., 21 mg, 0.047 mmol) was dissolved in a mixture of putrescine and MeOH (7 mL, 1:9, v/v) and stirred overnight at room temperature before concentrated to dryness. The resulting residue was purified by silica gel column chromatography (20:78:2 MeOH:CH₂Cl₂:aq. NH₃, v/v/v) to afford **93c** (18 mg, 76%).

¹H NMR (MeOD-*d*4, δ ppm, *J* Hz) : 8.10 (s, 1H), 7.78 (d, 1H, *J* = 1.7 Hz), 7.26 (d, 1H, *J* = 0.7 Hz and *J* = 3.4 Hz), 7.10 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz), 6.84 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz), 6.68 (dd, 1H, *J* = 1.6 Hz and *J* = 3.2 Hz), 4.42 (s, 2H), 4.38 (t, 2H, *J* = 6.7 Hz), 3.33 (t, 2H, *J* = 6.2 Hz), 2.90 (t, 2H, *J* = 6.2 Hz), 2.62 (t, 2H, *J* = 6.2 Hz), 2.26-2.23 (m, 2H), 1.62-1.61 (m, 4H).

ESI-HRMS calculated for C₂₅H₃₀N₉O₃ [M + H]⁺, 504.2476; Calcd. 504.2472.

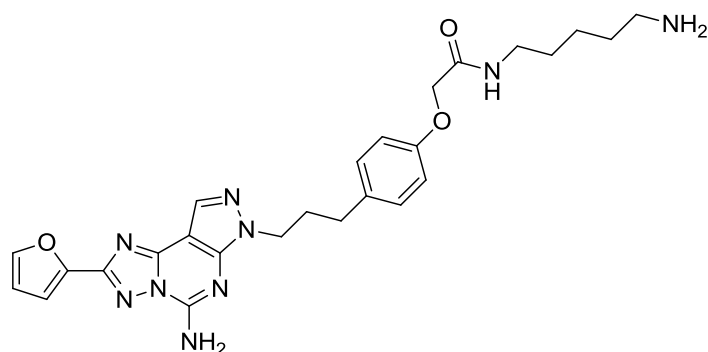
HPLC: C18 column: t_R = 7.4 min, purity 97%.

Molecular formula: C₂₅H₂₉N₉O₃

Molecular weight: 503.56 g/mol

Aspect: White solid

2-(4-(3-(5-Amino-2-(furan-2-yl)-7H-pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidin-7-yl)propyl)phenoxy)-N-(5-aminopentyl)acetamide (93d)



Procedure:

Compound **92** (1 eq., 10 mg, 0.0224 mmol) was dissolved in a mixture of cadaverine and MeOH (5 mL, 1:9, v/v) and stirred overnight at room temperature before concentrated to dryness. The resulting residue was purified by silica gel column chromatography (20:78:2 MeOH:CH₂Cl₂:aq. NH₃, v/v/v) to afford **93d** (7.5 mg, 65%).

¹H NMR (MeOD-*d*₄, δ ppm, *J* Hz) : 8.10 (s, 1H), 7.78 (d, 1H, *J* = 0.7 Hz and *J* = 1.7 Hz), 7.26 (d, 1H, *J* = 0.7 Hz and *J* = 3.4 Hz), 7.10 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz), 6.83 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz), 6.68 (dd, 1H, *J* = 1.6 Hz and *J* = 3.2 Hz), 4.42 (s, 2H), 4.38 (t, 2H, *J* = 6.8 Hz), 3.27 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz), 2.74-2.67 (m, 4H), 2.62 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz), 2.26-2.23 (m, 2H), 1.61-1.51 (m, 4H).

ESI-HRMS calculated for C₂₆H₃₂N₉O₃ [M + H]⁺, 518.2631; Calcd. 518.2628.

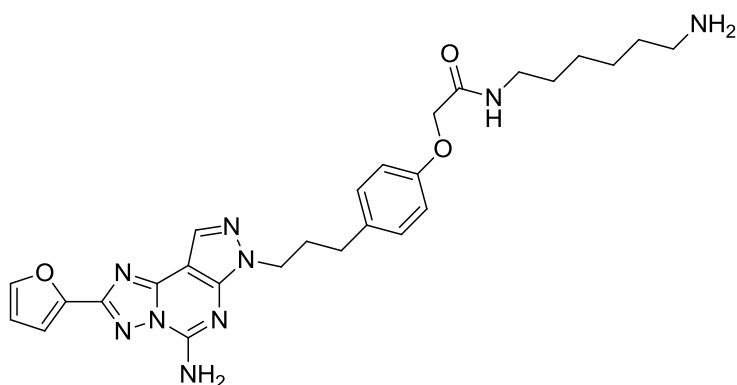
HPLC: C18 column: t_R = 7.8 min, purity 96%.

Molecular formula: C₂₆H₃₁N₉O₃

Molecular weight: 517.58 g/mol

Aspect: White solid

2-(4-(3-(5-Amino-2-(furan-2-yl)-7H-pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidin-7-yl)propyl)phenoxy)-N-(6-aminohexyl)acetamide (93e)



Procedure:

Compound **92** (1 eq., 7 mg, 0.0157 mmol) was dissolved in a mixture of 1,6-hexanediamine and MeOH (2 mL, 1:9, v/v) and stirred overnight at room temperature before concentrated to dryness.

The resulting residue was purified by silica gel column chromatography (20:78:2 MeOH:CH₂Cl₂:aq. NH₃, v/v/v) and to afford **93e** (1.5 mg, 20%).

¹H NMR (MeOD-*d*₄, δ ppm, *J* Hz) : 8.10 (s, 1H), 7.78 (d, 1H, *J* = 0.7 Hz and *J* = 1.7 Hz), 7.26 (d, 1H, *J* = 0.7 Hz and *J* = 3.4 Hz), 7.10 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz), 6.84 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz), 6.68 (dd, 1H, *J* = 1.6 Hz and *J* = 3.2 Hz), 4.42 (s, 2H), 4.38 (t, 2H, *J* = 6.8 Hz), 3.27 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz), 2.91 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz), 2.62 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz), 2.26-2.23 (m, 2H), 1.68-1.66 (m, 2H), 1.64-1.62 (m, 2H), 1.61-1.58 (m, 4H).

ESI-HRMS calculated for C₂₇H₃₄N₉O₃ [M + H]⁺, 532.2776; Calcd. 532.2785.

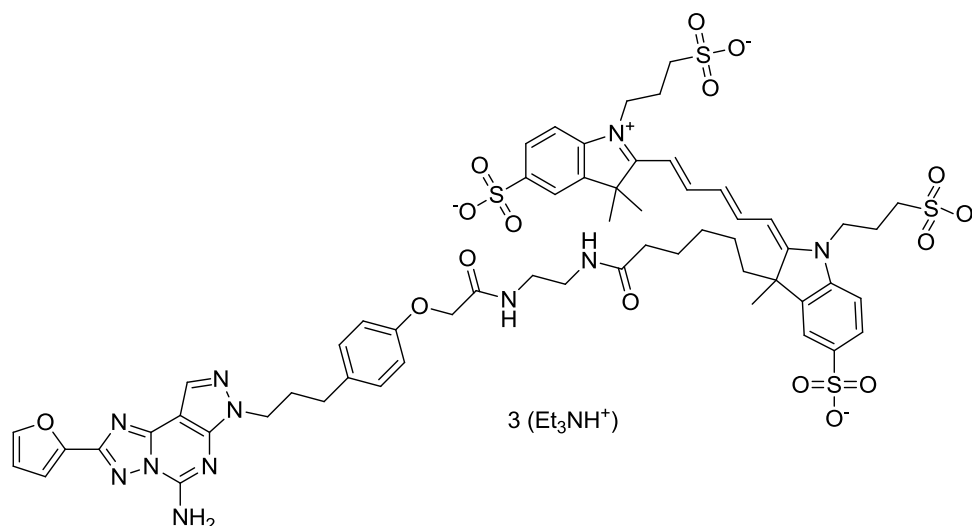
HPLC: C18 column: t_R = 7.5 min, purity 96%.

Molecular formula: C₂₇H₃₃N₉O₃

Molecular weight: 531.61 g/mol

Aspect: White solid

2-((1E,3E)-5-((E)-3-(6-((2-(2-(4-(3-(5-amino-2-(furan-2-yl)-7H-pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidin-7-yl)propyl)phenoxy)acetamido)ethyl)amino)-6-oxohexyl)-3-methyl-5-sulfonato-1-(3-sulfonatopropyl)indolin-2-ylidene)penta-1,3-dien-1-yl)-3,3-dimethyl-1-(3-sulfonatopropyl)-3H-indol-1-ium-5-sulfonate (XVa)



Procedure:

To a solution of **93a** (1 eq., 0.7 mg, 0.0015 mmol) in DMF (0.3 mL) was added Et₃N (1.1 eq., 0.0002 mL, 0.0016 mmol) and Alexa Fluor® 647 NHS Ester (0.54 eq., 1.0 mg, 0.0008 mmol). The flask was protected from light, and the mixture was stirred overnight. The crude product was then directly purified by HPLC (column A, H₂O/AN : from 100/0 to 70/30, 40 min, t_R = 27.8 min) to afford after lyophilization **XVa** (1.2 mg, 62%).

¹H NMR (D₂O-*d*₄, δ ppm, *J* Hz) : 7.87-7.84 (m, 1H), 7.79-7.76 (m, 1H), 7.75-7.71 (m, 2H), 7.59-7.57 (m, 2H), 7.50-7.48 (m, 1H), 7.28 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 7.06 (d, 1H, *J* = 3.3 Hz), 6.92 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 6.64 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz), 6.53 (dd, 1H, *J* = 1.6 Hz and *J* = 3.2 Hz), 6.29-6.19 (m, 4H), 5.87 (d, 1H, *J* = 13.7 Hz), 5.37 (s, 1H), 4.21-4.19 (m, 2H), 4.16-4.13 (m, 2H), 4.08-4.02 (q, NCH₂, *J* = 7.2 Hz), 3.96 (d, 1H, *J* = 14.6 Hz), 3.86-3.82 (m, 2H), 3.76 (d, 1H, *J* = 14.6 Hz), 3.66-3.52 (m, 1H), 3.57-3.54 (m, 1H), 3.11-3.00 (m, 2H), 2.94-2.91 (m, 2H), 2.84 (t, 2H, *J* = 7.25 Hz), 2.55 (m, 2H), 2.22-2.11 (m, 2H), 2.08 (t, 2H, *J* = 7.25 Hz), 1.99-1.94 (m, 3H), 1.82 (s, 1H), 1.54 (s, 3H), 1.49 (s, 3H), 1.41 (s, 3H), 1.34-1.26 (m, 2H), 1.23-1.18 (m, 5H), 1.16 (t, NCH₃, *J* = 7.2 Hz), 1.09-1.01 (m, 1H).

ESI-HRMS calculated for $C_{59}H_{68}N_{11}O_{16}S_4$ $[M + H]^+$, 1314.3739; Calcd. 1314.3728.

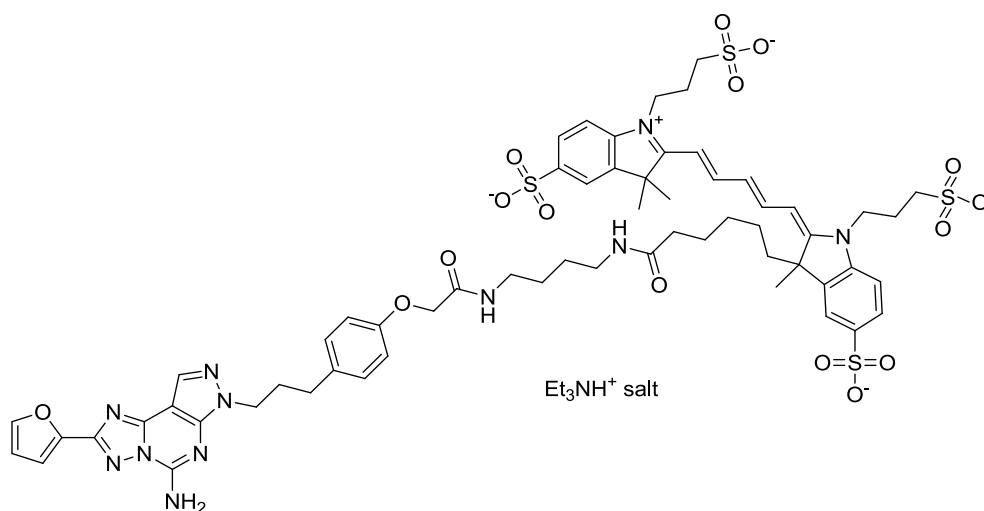
HPLC: C18 column: t_R = 14 min, purity 99%.

Molecular formula: $C_{59}H_{66}K_3N_{11}O_{16}S_4$

Molecular weight: 1430.77 g/mol

Aspect: Blue solid

2-((1E,3E)-5-((E)-3-(6-((4-(2-(4-(3-(5-amino-2-(furan-2-yl)-7H-pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidin-7-yl)propyl)phenoxy)acetamido)butyl)amino)-6-oxohexyl)-3-methyl-5-sulfonato-1-(3-sulfonatopropyl)indolin-2-ylidene)penta-1,3-dien-1-yl)-3,3-dimethyl-1-(3-sulfonatopropyl)-3H-indol-1-ium-5-sulfonate (XVb)



Procedure:

To a solution of **93c** (1 eq., 0.741 mg, 0.0015 mmol) in DMF (0.3 mL) was added AlexaFluor® 647 NHS Ester (0.5 eq., 1 mg, 0.0008 mmol) and Et_3N (1.1 eq., 0.0002 mL, 0.0016 mmol). The flask was protected from light, and the mixture was stirred overnight. The crude product was then directly purified by HPLC (column A, H_2O/AN : from 100/0 to 70/30, 40 min, t_R = 29.06 min) to afford after lyophilization **XVb** (1.5 mg, 76%).

1H NMR (MeOD- d_4 , δ ppm, J Hz): 7.83-7.65 (m, 5H), 7.56 (m, 2H), 7.48 (d, 1H, J = 8.4 Hz), 7.24 (d, 1H, J = 7.6 Hz), 6.98 (m, 1H), 6.91 (d, 1H, J = 7.6 Hz), 6.62 (d, 2H, J = 6.3 Hz), 6.51 (m, 1H), 6.23 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 6.18-6.13 (m, 1H), 5.79 (d, 1H, J = 13.2 Hz), 4.10 (m, 4H), 3.94 (d, 1H, J = 14.4 Hz), 3.83-3.82 (m, 2H), 3.71 (d, 1H, J = 10.8 Hz), 3.10 (q, NCH_2 , J = 7.2 Hz), 3.01 (m, 2H), 2.95-2.80 (m, 8H), 2.49 (m, 2H), 2.14-2.11 (m, 6H), 1.99-1.92 (m, 4H), 1.49 (s, 3H), 1.41 (s, 3H), 1.37 (s, 3H), 1.23-1.20 (m, 6H), 1.17 (t, NCH_3 , J = 7.2 Hz), 1.06 (m, 2H).

ESI-HRMS calculated for $C_{61}H_{72}N_{11}O_{16}S_4$ $[M + H]^+$, 1342.4052; Calcd. 1342.4041.

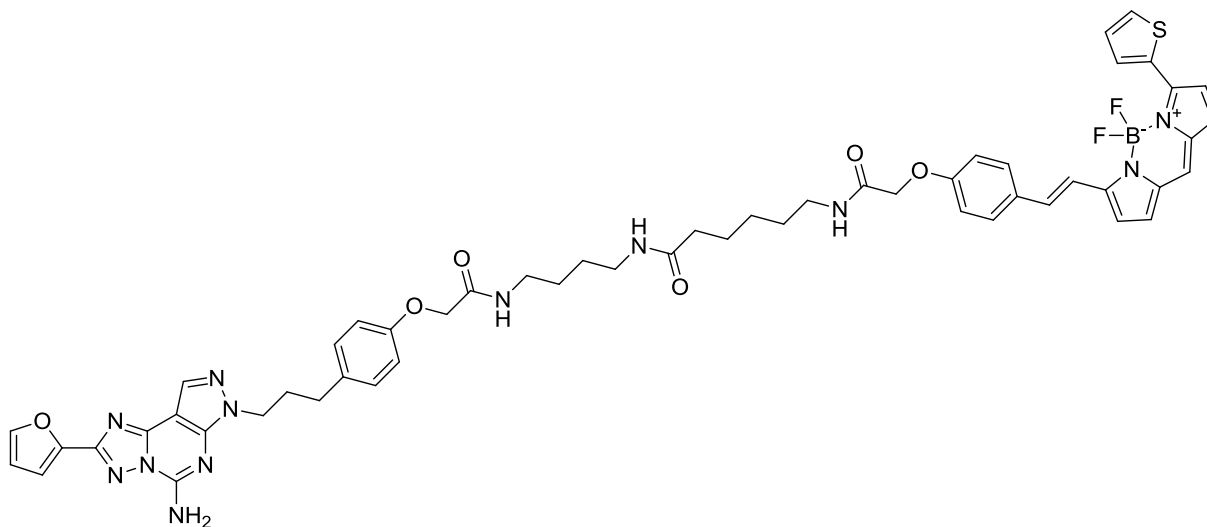
HPLC: C18 column: t_R = 10.1 min, purity 99%.

Molecular formula: $C_{61}H_{70}K_3N_{11}O_{16}S_4$

Molecular weight: 1458.83 g/mol

Aspect: Blue solid

***N*-(4-(2-(4-(3-(5-Amino-2-(furan-2-yl)-7H-pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidin-7-yl)propyl)phenoxy)acetamido)butyl)-6-(2-(4-(2-(5,5-difluoro-7-(thiophen-2-yl)-5H-4l4,5l4-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-3-yl)vinyl)phenoxy)acetamido)hexanamide (XVc)**



Procedure:

To a solution of **93c** (1 eq., 1.5 mg, 0.0029 mmol) in DMF (0.3 mL) was added Et₃N (1.1 eq., 0.0004 mL, 0.0033 mmol) and BODIPY® 630/650-X NHS Ester (0.8 eq., 1.57 mg, 0.0024 mmol). The flask was protected from light, and the mixture was stirred overnight. The crude product was then directly purified by HPLC (column A, H₂O/AN : 50/50 to 0/100, 40 min, t_R = 29.9 min) to afford after lyophilization **XVc** (1.9 mg, 61%).

¹H NMR (MeOD-*d*4/D₂O, δ ppm, *J* Hz): 8.05 (m, 2H), 7.74 (m, 1H), 7.60 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz), 7.56 (d, 2H, *J* = 7.6 Hz), 7.46 (d, 1H, *J* = 3.9 Hz), 7.31 (s, 1H), 7.23 (d, 1H, *J* = 3.2 Hz), 7.18 (m, 2H), 7.00 (d, 1H, *J* = 4.4 Hz), 7.07-7.03 (m, 4H), 6.99 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 6.65 (m, 1H), 4.36 (m, 2H), 4.29 (t, 2H, *J* = 6.8 Hz), 3.22 (t, 2H, *J* = 6.4 Hz), 3.12-3.10 (m, 2H), 2.56 (t, 2H, *J* = 6.4 Hz), 2.19-2.13 (m, 4H), 1.59-1.43 (m, 8H), 1.28-1.26 (m, 2H), 1.21-1.19 (m, 2H).

ESI-HRMS calculated for C₅₄H₅₆BF₂N₁₂O₆S [M + H]⁺, 1049.4224; Calcd. 1049.4228.

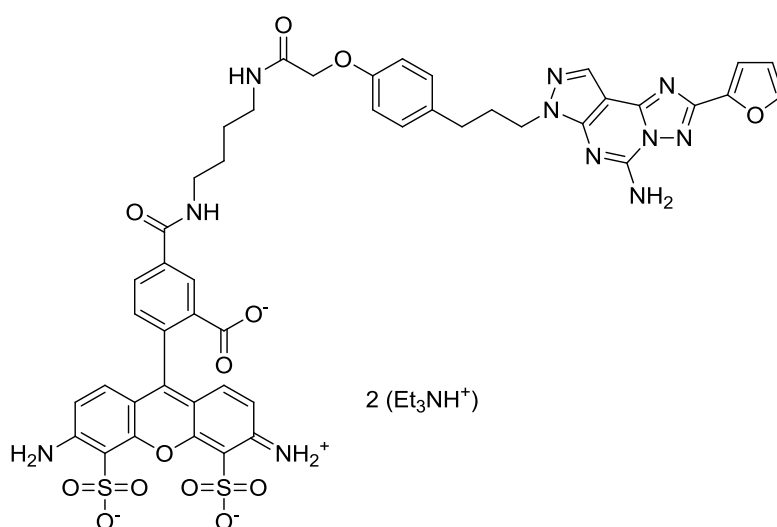
HPLC: C18 column: t_R = 13.6 min, purity 96%.

Molecular formula: C₅₄H₅₅BF₂N₁₂O₆S

Molecular weight: 1048.96 g/mol

Aspect: Blue solid

5-((4-(2-(4-(3-(5-Amino-2-(furan-2-yl)-7H-pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidin-7-yl)propyl)phenoxy)acetamido)butyl)carbamoyl)-2-(6-amino-3-iminio-4,5-disulfonato-3H-xanthen-9-yl)benzoate (XVd)



Procedure:

To a solution of **93c** (1 eq., 0.71 mg, 0.00141 mmol) in DMF (0.14 mL) was added Et₃N (1.1 eq., 0.0002 mL, 0.0016 mmol) and Alexa Fluor® 488 Carboxylic Acid, 2,3,5,6-Tetrafluorophenyl Ester, 5-isomer (0.8 eq., 1 mg, 0.0011 mmol). The flask was protected from light, and the mixture was stirred overnight. The crude product was then directly purified by HPLC (column B, H₂O/AN : 100/0 to 70/30, 20 min, t_R = 10.7 min) to afford after lyophilization **XVd** (0.47 mg, 33%).

¹H NMR (D₂O, δ ppm, J Hz): 8.07 (s, 1H), 7.82 (s, 1H), 7.70 (m, 1H), 7.58 (s, 1H), 7.02 (d, 1H, J = 3.6 Hz), 6.85 (d, 2H, J = 9.6 Hz), 6.69-6.66 (m, 5H), 6.53 (m, 1H), 6.39 (d, 2H, J = 8.4 Hz), 4.09 (m, 4H), 3.24 (s, 2H), 3.10 (q, NCH₂, J = 7.2 Hz), 3.07-3.05 (m, 2H), 2.27-2.25 (m, 2H), 2.03 (m, 2H), 1.39 (m, 4H), 1.17 (t, NCH₃, J = 7.2 Hz).

ESI-HRMS calculated for C₄₆H₄₀N₁₁O₁₃S₂ [M + H]⁺, 1020.2411; Calcd. 1020.2405.

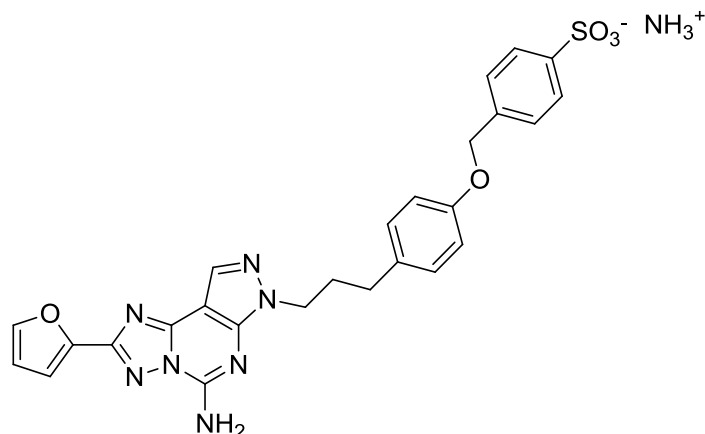
HPLC: C18 column: t_R = 10.1 min, purity 99%.

Molecular formula: C₄₆H₃₉N₁₁O₁₃S₂

Molecular weight: 1018.00 g/mol

Aspect: Orange solid

4-((4-(3-(5-Amino-2-(furan-2-yl)-7H-pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidin-7-yl)propyl)phenoxy)methyl)benzenesulfonate ammonium salt (XVe)



Procedure:

To a solution of **91** (1 eq., 10 mg, 0.027 mmol) in DMF (4.3 mL) under N₂ was added NaH (1 eq., 0.64 mg, 0.027 mmol) and the mixture was stirred for 15 min at room temperature before adding sodium 4-(bromomethyl)benzenesulfonate (1.1 eq., 8 mg, 0.029 mmol). After 1 h stirring at room temperature, sodium 4-(bromomethyl)benzenesulfonate (1.1 eq., 8 mg, 0.029 mmol) was added again, and the mixture was stirred for 45 min. The mixture was then treated with MeOH, concentrated *in vacuo* and purified by silica gel column chromatography (DCM/MeOH/NH₃: 85/15/1) to afford **XVe** (6.3 mg, 42%).

¹H NMR (MeOD-*d*₄, δ ppm, *J* Hz) : 8.12 (s, 1H), 7.77-7.76 (m, 3H), 7.76 (m, 1H), 7.49 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 7.45 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz), 7.24 (dd, 1H, *J* = 0.4 Hz and *J* = 3.2 Hz), 7.04 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 6.80 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 6.67 (dd, 1H, *J* = 1.6 Hz and *J* = 3.2 Hz), 4.99 (s, 2H), 4.69 (br s, 1H), 4.38 (t, 2H, *J* = 7.0 Hz), 2.62 (t, 2H, *J* = 7.0 Hz), 2.27-2.24 (m, 2H).

ESI HRMS calculated for C₂₆H₂₂N₇O₅S [M-H]⁻, 544.1401; Calcd. 544.1403.

HPLC: C18 column: t_R = 10.8 min, purity 96%.

Molecular formula: C₂₆H₂₅N₈O₅S

Molecular weight: 561.59 g/mol

Aspect: White solid

II- Molecular Docking

Molecular docking was performed using Gold suite v5.2²⁰³ within the Hermes v1.6 GUI (CCDC[®]). Thus after adding hydrogens, water molecules were deleted and docking was performed in a 10 Å around co-crystallized ligands then ligands deleted. Early termination of 3 docking solutions within 1.5 Å was set up in order to highlight ligands converging towards a few binding modes.

III- In vitro testing

1- Displacement binding assays

Compounds of interest are selected by a competition-binding assay at 10⁻⁵ M giving a displacement of the reference compound ([³H]-ZM24135) more than 50%.

Stock solutions of the compounds were prepared in DMSO and further diluted with the binding buffer to the desired concentration. Final DMSO concentrations in the assay were less than 0.1%. Briefly [³H]-ZM24135 (2 nM final) as radioligand for the *hA2a* receptor, was added to 4,5 µg of membranes (PerkinElmer) resuspended in 300 µL (final volume) binding buffer (50 mM Tris, 10 mM MgCl₂, 0.2 UI/mL of adenosine deaminase, pH 7.4).²⁰⁴ After 1 h at room temperature, the incubation was stopped and the solutions were rapidly filtered over Unifilter-96 GF/B glass fiber pre-soaked in binding buffer on a Filtermate Unifilter 96-Harvester (PerkinElmer) and washed 10x times with of ice-cold binding buffer. The radioactivity on the filters was measured using TopCount NXT™ Microplate Scintillation Counter (PerkinElmer) using 30 µL of MicroScint™ 40 (PerkinElmer) after 30 min resting. The nonspecific binding was determined in the presence of 5 mM ZM-24135. Affinity towards A₁R (human recombinant CHO cells, [³H]-DPCPX (1 nM), Cerep catalogue (reference 0002) was determined by CEREP laboratories as described by Townsend-Nicholson²⁰⁵.

2- [³⁵S]-GTPS binding assay

The [³⁵S]GTPγS binding assay was carried out as described previously²⁰⁶ with minor modifications. HEK293-A2aR membranes were pre-incubated in triplicate, in 96-well plates, at 25°C in 250 µL final volume of 50 mM Tris–HCl buffer (pH 7.4) containing 0.2 nM [³⁵S]GTPγS, 10 µM GDP, 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 100 mM NaCl, 0,5% bovine serum albumin and 0.2 UI/ml adenosine deaminase with various concentrations of CGS241680 (Emax determination) or with the designed A_{2a}R antagonists (10 min pre-incubation) and 1 µM of CGS241680 (IC₅₀ determination, inhibition versus response). The incubation was stopped by a rapid filtration over Unifilter-96 GF/B glass fiber

²⁰³ Jones G. et al., *J. Mol. Biol.*, **1995**, *245*, 43-53

²⁰⁴ Lopes L.V. et al., *J. Neurophysiol.*, **1999**, *82*, 3196-3203

²⁰⁵ Townsend-Nicholson A. et al., *J. Biol. Chem.*, **1994**, *269*, 2373-2376

²⁰⁶ Welihinda A.A. et al., *J. Inflamm.*, **2014**, *11*, 37

and washed 10x times with an ice-cold binding buffer. The nonspecific binding was measured in the presence of 100 μ M Gpp(NH)p. Radioactivity was quantified using a TopCount scintillation counter.

Data Analysis.

K_i and IC₅₀ values were determined by nonlinear regression analysis performed using the GraphPad prism 5.0 program (GraphPad Software, San Diego).

3- Cell culture and cytotoxicity assay

The human neuroblastoma cell line (SY5Y) was cultured in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Gibco) supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 mg/ml streptomycin, 100 IU/mL penicillin, 1 mM non-essential amino acids and 10% (v/v) heatinactivated fetal bovine serum (Sigma Aldrich), and grown at 37 °C in a humidified incubator with 5% CO₂. Cells were seeded at 2000 cells per well onto 96-well plates in DMEM medium. Cells were starved for 24 h to obtain synchronous cultures, and were then incubated in culture medium that contained various concentrations of test compounds, each dissolved in less than 0.1% DMSO. After 72 h of incubation, cell growth was estimated by the colorimetric MTT (thiazolyl blue tetrazolium bromide) assay.

4-ADME assessment

Aqueous solubility (in phosphate-buffered saline, PBS, pH 7.4; incubation room temperature for 24h as described by Lipinski²⁰⁷ Eurofins Cerep SA catalogue reference G235), partition coefficient (log D, n-octanol/PBS, pH 7.4, room temperature for 60 min as described by Sangster²⁰⁸; Eurofins Cerep SA catalogue reference 0417), human plasma protein binding evaluated at 10 μ M concentration for 4h at 37 °C as described by Banker²⁰⁹ (Eurofins Cerep SA catalogue reference 2194), A-B and B-A permeability coefficient evaluated at 10 μ M for 40 min as described by Hidalgo²¹⁰ (Papp, Caco-2 cells, pH 6.5/7.4; Eurofins Cerep SA catalogue reference G228), metabolic stability in human liver microsomes evaluated at 0.1 μ M concentration for 0, 15, 30, 45, 60 min at 37 °C as described by Obach²¹¹ (Eurofins Cerep SA catalogue reference 0607) were determined in standard assays by Eurofins Cerep SA, France.

²⁰⁷ Lipinski C.A. et al., *Adv. Drug Del. Rev.*, **1997**, *46*, 3-26

²⁰⁸ Sangster J., *Wiley Series in Solution Chemistry Volume 2*, John Wiley and Sons, **1997**, 170 pp

²⁰⁹ Banker M.J. et al., *J. Pharm. Sci.*, **2003**, *92*, 967-974

²¹⁰ Hidalgo I.J. et al., *Gastroenterology*, **1989**, *96*, 736-749

²¹¹ Obach R.S. et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1997**, *283*, 46-58

5- Blood Brain Barrier crossing

Same procedure as described by Cecchelli et al.²¹² have been used.

To a preheat Ringer HEPES in a 37°C water bath, 1.5 ml of Ringer HEPES was added in wells of 12-well plates. A 40 mM solution of our compound in DMSO was diluted in a solution of Ringer HEPES to get 1, 10 and 100 µM final concentration. At time zero, filters are transferred in a 12-well plate containing Ringer HEPES. Then solution containing the compound is put in the luminal side of the filter. The volume is 0.5 ml for TRANSWELL. At time t-20 min, filter is transferred in another well containing fresh Ringer HEPES and repeat at time t-40 and t-60 min. Time incubations are performed on a rocking platform at 37°C.

For each compound, the rate of solute diffusion does not have to be restricted by the permeability of the filter only coated with matrigel. Different kind of filters can be tested to evaluate this diffusion. Triplicate filters per compound are coated with matrigel and put in complete medium at least for 48 hours. Then, a transport experiment is performed to be sure of the non-restriction of the solute across the filter without cells. Lucifer yellow(LY) is used as a paracellular marker to control the toxicity of products. This small hydrophilic molecule presents a low cerebral penetration and its endothelial permeability coefficient reveals the endothelial cell monolayer integrity. The transport experiment is performed on filter in triplicate with the drug to test in co-incubation with 50µM of LY per filter (Sigma).

²¹² Cecchelli R. et al., *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2007**, 6, 650-661

Bibliographie

- 1 **Fargo K. al.**, *Alzheimer's Association / Alzheimer's & Dementia*, **2014**, *10*, 47-92
2 Alzheimer - Comprendre la maladie. [http://www.francealzheimer.org/comprendre-la-](http://www.francealzheimer.org/comprendre-la-maladie)
3 **LAUMET G.**, Rôle des ADAM dans le processus physiopathologique de la maladie
4 d'Alzheimer. Thèse en Neurosciences. Université de Lille II, **2010**, 220p
5 **Fratiglioni L. et al.**, *Ann Neurol*, **1993**, *33*, 258–66
6 [http://www.inserm.fr/thematiques/neurosciences-sciences-cognitives-neurologie-](http://www.inserm.fr/thematiques/neurosciences-sciences-cognitives-neurologie-sychiatrie/dossiers-d-information/alzheimer)
7 **Querfurth H. W. et al.**, *New England Journal of Medicine*, **2010**, *362*, 329-34
8 **Gatchel J.R. et al.**, *Am. J. Geriatr. Psychiatry*, **2017**, *7*, 683-693
9 **Rowe C.C. et al.**, *Neurobiology of Aging*, **2010**, *31*, 1275-1283
10 **Mattson M. et al.**, *Nature*, **2004**, *430*, 631-639
11 **Villemagne V.L. et al.**, *Lancet Neurol.*, **2013**, *12*, 357–367
12 **Manly J.J. et al.**, *Ann. Neurol.*, **2008**, *63*, 494–506
13 **Folch J. et al.**, *Neural. Plast.*, **2016**, *2016*, 8501693
14 **Huang W.J. et al.**, *Biomed. Rep.*, **2016**, *5*, 519-522
15 **Olazaran J. et al.**, *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.*, **2010**, *30*, 161–178
16 **Gueroux M.**, *Thèse en Biochimie/Chimie-Physique*. Université de Limoges, **2013**, 148p
17 **Deutsch J.A.**, *Science*, **1974**, *174*, 788-794
18 **Ferreira-Vieira T.H. et al.**, *Curr. Neuropharmacol.*, **2016**, *14*, 101-115
19 **Unzeta M. et al.**, *Front. Neurosci.*, **2016**, *10*, 205
20 **Orta-Salazr E. et al.**, *Life Sci.*, **2014**, *116*, 83-89
21 **Allian H. et al.**, *Clin. Pharmacol.*, **2003**, *17*, 419–428
22 **Cumings J.L.**, *New Engl. J. Med.*, **2004**, *351*, 56-67
23 **Takai H. et al.**, *Exp. Mol. Pathol.*, **2003**, *1*, 89-94
24 **Zhang Y. et al.**, *Neurol. Sci.*, **2016**, *7*, 1039-1047
25 **Silvestelli G. et al.**, *Mechanisms of Ageing and Development*, **2006**, *127*, 148–157
26 **Dinamaca M. et al.**, *Front Physiol.*, **2012**, *3*, 464
27 **Revett, T.J. et al.**, *J. Psychiatry. Neurosci.*, **2013**, *38*, 6-23
28 **Wang X. et al.**, *PLoS One*, **2015**, *12*, e0145441
29 **Barage S.H. et al.**, *Neuropeptides*, **2015**, *52*, 1–18
30 **Kojro E. et al.**, *Subcell. Biochem.*, **2005**, *38*, 105–127
31 **Walsh D.M. et al.**, *J. Neurochem.*, **2007**, *101*, 1172–1184
32 **Chen G. et al.**, *Nature*, **2000**, *408*, 975–979
33 **Hardy J.A. et al.**, *Science*, **1992**, *256*, 184–185
34 **Eikelenboom P. et al.**, *Glia*, **2002**, *40*, 232-239
35 **Bertram L. et al.**, *Neuron*, **2010**, *68*, 270–281
36 **Shen J. et al.**, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2007**, *104*, 403–409.
37 **Castano E.N. et al.**, *J. E. Biochem.*, **1995**, *306*, 599–604
38 **Ghosh A.K. et al.**, *J. Neurochem.*, **2012**, *120*, 71-83
39 **Weggen S. et al.**, *J. Biol. Chem.*, **2003**, *278*, 31831–31837
40 **Abramowski D. et al.**, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2008**, *327*, 411–424
41 **Bursavich M.G. et al.**, *J. Med. Chem.*, **2016**, *59*, 7389–7409
42 **Smith A. et al.**, *Int. J. Pharm.*, **2010**, *389*, 207-212
43 **DaSilva K.A. et al.**, *Exp. Neurol.*, **2010**, *223*, 311-321
44 **Saumier D. et al.**, *J. Nutr. Health Aging*, **2009**, *13*, 808-812
45 **Marr R.A. et al.**, *J. Mol. Neurosci.*, **2004**, *22*, 5-11

46 Vekrellis K. et al., *J. Neurosci.*, **2000**, *20*, 1657-1665
47 Pasquier F. et al., *J Alz. Dis.*, **2016**, *51*, 1131–1143
48 Pedersen J.T. et al., *Trends in Molecular Medicine*, **2015**, *6*, 394-402
49 Vossel K.A. et al., *Science*, **2010**, *330*, 198
50 Handoko M., et al., *Neurologie*, **2013**, *70*, 594–599
51 Rhein V. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2009**, *106*, 20057-20062
52 Buee L. et al., *Brain Res. Rev.*, **2000**, *33*, 95-130
53 Goedert M., *EMBO J.*, **1989**, *8*, 393-399
54 Mazanetz M.P. et al., *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2007**, *6*, 464–479
55 Medina M. et al., *Bio. Pharma.*, **2014**, *88*, 540–547
56 Bourdenx M. et al., *Progress in Neurobiology*, **2015**, *15*, 77-85
57 Kuret J. et al., *Microsc. Res. Tech.*, **2005**, *67*, 141–155
58 Folch J. et al., *Neural. Plast.*, **2016**, *2016*, 8501693
59 Medina M. et al., *Front. Mol. Neuro.*, **2011**, *4*, 24
60 Golde T.E. et al., *Exp. Neurol.*, **2010**, *223*, 252–266
61 Takashima A. et al., *Curr. Alz. Res.*, **2010**, *7*, 665–669
62 Lee J. et al., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2009**, *61*, 1316-1323
63 Farina N. et al., *Cochrane Database Syst. Rev.*, **2012**, *11*
64 Seth S. et al., *Int. J. Mol. Sci.*, **2014**, *15*, 2024-2052
65 Sattin A. et al., *Mol. Pharmacol.*, **1970**, *6*, 13-23
66 Sashdeva S. et al., *Saudi Pharm. J.*, **2013**, *21*, 245-253
67 Matsumoto T. et al., *Pharmacol. Res.*, **2012**, *65*, 81-90
68 Linden J. et al., *Mol. Pharmacol.*, **2005**, *67*, 1385-1387
69 Boison D. et al., *Neuropharmacology*, **2012**, *62*, 1527-1543
70 Zhou Y. et al., *Pharmacol. Ther.*, **2009**, *123*, 105-116
71 Mark A. et al., *Bioorg. Med. Chem.*, **2007**, *15*, 1586-1605
72 Ralevic V. et al., *Circ. Res.*, **1991**, *69*, 1583-1590
73 Jacobson K.A. et al., *Neuropharmacology*, **2016**, *104*, 31-49
74 Livingston M. et al., *Inflamm. Res.*, **2004**, *53*, 171-178
75 Yuzlenko O. et al., *Curr. Med. Chem.*, **2006**, *13*, 3609-3625
76 Cristalli G. et al., *Curr. Pharm. design*, **2008**, *14*, 1525-1552
77 Boison D. et al., *Neuropharm.*, **2012**, *62*, 1527-1543
78 Jacobson K.A., *Trends Pharmacol. Sci.*, **1998**, *19*, 184-191
79 Chen J.F. et al., *Nat. Rev. Drug Disc.*, **2013**, *12*, 265-286
80 Fredholm B.B. et al., *Pharmacol. Rev.*, **2001**, *53*, 527-552
81 Muller C.E. et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **2011**, *1808*, 1290-1308
82 Hutchinson S.A. et al., *Front. Med. Chem.*, **2006**, *3*, 125-156
83 F. Ochoa-Cortes et al., *Inflamm. Bowel Dis.*, **2014**, *20*, 1259-1287
84 Palmer T.M. et al., *J. Pharmacol.*, **2008**, *153*, 527-534
85 Guzman J. et al., *Inflamm. Bowel Dis.*, **2006**, *12*, 766-789
86 Fredholm B.B. et al., *Pharmacol. Rev.*, **1999**, *51*, 83-133
87 Dhalla A.K. et al., *Curr. Top. Med. Chem.*, **2003**, *3*, 369–385
88 Che J. et al., *Mol. Pharmacol.*, **2007**, *72*, 1626-1636
89 Fredholm B.B. et al., *Curr. Top. Med. Chem.*, **2002**, *3*, 1349-1364
90 Peterfreund R.A. et al., *J. Neuro.*, **1996**, *66*, 362-368
91 Fredholm B.B. et al., *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **2000**, *362*, 364–374
92 Marala R.B. et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1993**, *266*, 294-300
93 Fredholm B.B. et al., *Progr. Neuro.*, **2007**, *83*, 263-276

94 Ciruela F. et al., *Trends Biotechnol.*, **2010**, 28, 407-415

95 Cristovao-Ferreira S. et al., *Purinergic Signal*, **2013**, 9, 433-449

96 Ferre S. et al., *Trends Neurosci.*, **1997**, 20, 482-487

97 Bonaventura J. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2015**, 112, 3609-3618

98 Schiffmann S.N. et al., *Prog. Neurobiol.*, **2007**, 83, 277-292

99 Tozzi A. et al., *J. Neurosci.*, **2011**, 31, 1850-1852

100 Ferré S. et al., *J. Neurochem.*, **2016**, 136, 897-899

101 Cerri S. et al., *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **2014**, 73, 414-424

102 Ciruela F. et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **2011**, 1808, 1245-1255

103 Fredholm B.B. et al., *Biochem. Pharmacol.*, **2001**, 61, 241-248

104 Hettinger B.D. et al., *J. Comp. Neurol.*, **2011**, 431, 331-346

105 Ossowaska K. et al., *Neuropharmacol.*, **2001**, 41, 413-420

106 Beggiano S. et al., *J. Neurochem.*, **2016**, 138, 254-264

107 Kumar A. et al., *Front. Neurosci.*, **2015**, 9, article 215

108 Kalda A. et al., *J. Neurol. Sci.*, **2006**, 248, 9-15

109 Kreutzberg G.W. et al., *Trends Neurosci.*, **1996**, 19, 312-318

110 Madeira M.H. et al., *Mediators of Inflammation*, **2017**, 2017, 12 pages

111 Braak H. et al., *Neurobiol. Aging*, **2003**, 24, 197-211

112 Dauer W. et al., *Neuron*, **2003**, 39, 889-909

113 Gomes C.V. et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **2011**, 1808, 1380-1399

114 Ascherio A. et al., *Ann. Neurol.*, **2001**, 50, 56-63

115 Salvemini D. et al., *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **2013**, 304, 473-487

116 Shook B.C. et al., *ACS Chem. Neurosci.*, **2011**, 2, 555-567

117 M. Morelli, et al., *Handb. Exp. Pharmacol.*, **2009**, 193, 589-615

118 Petzer J.P. et al., *Neurotherapeutics*, **2009**, 6, 141-151

119 Flaten V. et al., *Biochem. Soc. Trans.*, **2015**, 42, 587-592

120 Eskelinen M.H. et al., *J. Alz. Dis.*, **2009**, 16, 85-91

121 Gelber R.P. et al., *J. Alz. Dis.*, **2011**, 23, 607-615

122 Diogenes M.J. et al., *Neuropsychopharmacology*, **2011**, 36, 1823-1836

123 Kolahdouzan M. et al., *CNS Neurosci. Ther.*, **2017**, 23, 272-290

124 Arendash G.W. et al., *Neuroscience*, **2006**, 142, 941-952

125 Arendash G.W. et al., *J. Alz. Dis.*, **2009**, 17, 661-680

126 Arendash G.W. et al., *J. Alz. Dis.*, **2010**, 20, 117-126

127 Viana da Silva S. et al., *Nature com.*, **2016**, 7, 11915

128 Almeida C.G. et al., *Neurosci. Lett.*, **2003**, 339, 127-130

129 Canas P.M. et al., *J. Neurosci.*, **2009**, 29, 14741-14751

130 Rodrigues R.J. et al., *Neurobiol. Aging*, **2008**, 29, 1597-1601

131 Laurent C. et al., *Molecular Psychiatry*, **2016**, 21, 97-101

132 Zhao Z.A. et al., *Transl. Psychiatry*, **2017**, 7, e1123

133 Ng Y.P. et al., *Neurochem. Int.*, **2015**, 89, 260-270

134 Muller C.E. et al., *Recent Patents on CNS Drug Discovery*, **2007**, 2, 1-21

135 Ng Y.P. et al., *ACS Chem. Neurosci.*, **2011**, 2, 555-567

136 Ruiz M. de L. et al., *J. Med. Chem.*, **2014**, 57, 3623-3650

137 Preti D. et al., *Med. Res. Review*, **2015**, 35, 1-59

138 Shook B.C. et al., *J. Med. Chem.*, **2010**, 53, 8104-8115

139 Mihara T. et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2007**, 323, 708-719

140 Falsini M. et al., *J. Med. Chem.*, **2017**, X, XXX

141 Topiol S. et al., *Biochem. Pharmacol.*, **2009**, 78, 11-20

- 142 Jaakola V.L. et al., *Science*, **2008**, *21*, 1211-1217
- 143 Segela E. et al., *J. Med. Chem.*, **2016**, *59*, 6470–6479
- 144 Congreve M. et al., *J. Med. Chem.*, **2012**, *55*, 1898–1903
- 145 Jaakola V.P. et al., *Cur. Op. Stru. Bio.*, **2010**, *20*, 401–414
- 146 Keranen H. et al., *PLOS One*, **2014**, *10*, e108492
- 147 Slee D.H. et al., *J. Med. Chem.*, **2008**, *51*, 1719–1729
- 148 Gutschow M. et al., *J. Med. Chem.*, **2012**, *55*, 3331–3341
- 149 Yoshida S. et al., *J. Med. Chem.*, **2005**, *48*, 7075–7079
- 150 Grobler J.A. et al., *J. Biol. Chem.*, **2007**, *282*, 8005–8010
- 151 Easmon J. et al., *J. Med. Chem.*, **2006**, *49*, 6343–6350.
- 152 Viirre R.D. et al., *J. Org. Chem.*, **2008**, *73*, 3452-3459
- 153 Wisastra R. et al., *Bioorg. Med. Chem.*, **2012**, *20*, 5027–5032
- 154 Ueda S. et al., *J. Org. Chem.*, **2009**, *74*, 4272 -4277
- 155 Liu N. et al., *J. Org. Chem.*, **2011**, *76*, 10031-10038
- 156 Huang J. et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 3674-3675
- 157 Guru M.M. et al., *J. Org. Chem.*, **2011**, *76*, 5295-5308
- 158 Klose J. et al., *Chem. Commun.*, **1999**, *18*, 1847-1848
- 159 Hoechst, WO 99/37620
- 160 Augustine J.K. et al., *Synlett*, *20*, **2009**, 3378-3382
- 161 Xiaolan W. et al., *Tet. Lett.*, **2012**, *53*, 2440-2443
- 162 Cho Y.H. et al., *Tetrahedron*, **2013**, *69*, 6565-6573
- 163 Chen W. et al., *J. Org. Chem.*, **2016**, *81*, 1085–1086
- 164 Meddour A. et al., *Tet. Assy.*, **2000**, *11*, 3635–3644
- 165 Perretta I. et al., *J. Med. Chem.*, **2005**, *48*, 5705 – 5720
- 166 Nakazato A. et al., *J. Med. Chem.*, **1999**, *42*, 1076–1087
- 167 Silverman L.S. et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2007**, *17*, 1659–1662
- 168 Shook B.C. et al., *J. Med. Chem.*, **2012**, *55*, 1402–1417
- 169 Tran V.H. et al., *Eur. J. Org. Chem.*, **2006**, *13*, 2970-2976
- 170 Obermeyer A.C. et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, *136*, 9572-9579
- 171 Frechette S. et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2008**, *18*, 1502–1506
- 172 Evaluation and Licensing Division, Pharmaceutical and Food Safety Bureau Ministry of Health, Labour and Welfare, <https://www.pmda.go.jp/files/000153870.pdf/>, 2013
- 173 Müller C.E., *Chemistry & Biodiversity*, **2009**, *6*, 2071-208
- 174 Slee D.H. et al., *J. Med. Chem.*, **2008**, *51*, 400-406
- 175 Diogenes M.J. et al., *Neuropsychopharmacology*, **2011**, *36*, 1823-1836
- 176 Wolfe J.P. et al., *Tet. Lett.*, **1997**, *38*, 6367-6370
- 177 Faldu V.J. et al., *Tet. Lett.*, **2014**, *55*, 1456-1460
- 178 Kobayashi T et al., *Drug Metab. Dispos.*, **1987**, *15*, 877-881
- 179 Glukhova A. et al., *Cell*, **2017**, *168*, 867–877
- 180 Ramirez C.Z. et al., *Futur Neurol.*, **2013**, *6*, 639-648
- 181 Gosselet F. et al., *medecine/sciences*, **2017**, *33*, 423-431
- 182 Cecchelli R. et al., *PLoS One*, **2014**, *9*, e99733.
- 183 Jones G. et al., *J. Mol. Biol.*, **1997**, *267*, 727–748.
- 184 Willett P., *Drug Discov. Today*, **2006**, *11*, 1046-1053
- 185 Theivendren P.S. et al., *Research in Pharmacy*, **2011**, *1*, 1-21
- 186 Huang X. et al., *Synthesis*, **2009**, *16*, 2679– 2688
- 187 Van Horn K.S. et al., *J. Med. Chem.*, **2014**, *57*, 5141–5156
- 188 Lin F.L. et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 2686-2695

- 189 **Mohamed T. et al.**, *Tet. Lett.*, **2015**, 56, 6882–6885
- 190 **Hrdina R. et al.**, *Adv. Synth. Catal.*, **2007**, 6, 822-826
- 191 **Feng J.B. et al.**, *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, 13, 10656–10662
- 192 **Patrick G.L.**, *Oxford*, **2017**, 6, chap.13, pp. 247-249
- 193 **Ciruela F. et al.**, *Neuropharmacology*, **2015**, 98, 58-67
- 194 **Kozma E. et al.**, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2013**, 23, 26-36
- 195 **Kecskés M. et al.**, *Biochem. Pharmacol.*, **2010**, 80, 506-511
- 196 **Paoletta S. et al.**, *J. Med. Chem.*, **2013**, 56, 5949–5963
- 197 **Duroux R. et al.**, *J. Enz. Inhib. Med. Chem.*, **2017**, 32, 850-864
- 198 **Duroux R. et al.**, *Eur. J. Med. Chem.*, soumis
- 199 **Kuszczyk M. et al.**, *Neurochem. Int.*, **2009**, 55, 174-180
- 200 **Zhang D. et al.**, *Neuropharmacology*, **2017**, 121, 231-246
- 201 **Christopher J.A. et al.**, *J. Med. Chem.*, **2015**, 58, 6653-6664
- 202 **Duroux R. et al.**, *Med. Chem. Commun.*, **2017**, 8, 1659-1667
- 203 **Jones G. et al.**, *J. Mol. Biol.*, **1995**, 245, 43-53
- 204 **Lopes L.V. et al.**, *J. Neurophysiol.*, **1999**, 82, 3196-3203
- 205 **Townsend-Nicholson A. et al.**, *J. Biol. Chem.*, **1994**, 269, 2373-2376
- 206 **Welihinda A.A. et al.**, *J. Inflam.*, **2014**, 11, 37
- 207 **Lipinski C.A. et al.**, *Adv. Drug Del. Rev.*, **1997**, 46, 3-26
- 208 **Sangster J.**, Wiley Series in Solution Chemistry Volume 2, John Wiley and Sons, **1997**, 170 pp
- 209 **Banker M.J. et al.**, *J. Pharm. Sci.*, **2003**, 92, 967-974
- 210 **Hidalgo I.J. et al.**, *Gastroenterology*, **1989**, 96, 736-749
- 211 **Obach R.S. et al.**, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1997**, 283, 46-58
- 212 **Cecchelli R. et al.**, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2007**, 6, 650-661

CONCEPTION, SYNTHÈSE ET ÉVALUATION D'ANTAGONISTES DES RECEPTEURS A_{2A}

La maladie d'Alzheimer (MA) est la maladie neurodégénérative touchant le plus de personnes dans le monde. Jusqu'à présent, aucun traitement curatif n'existe pour soigner cette maladie, d'où la nécessité d'identifier et d'étudier de nouvelles cibles thérapeutiques.

La découverte des effets bénéfiques de la caféine, antagoniste du récepteur à adénosine A_{2A} (A_{2A}R), conjuguée à une surexpression de ce dernier chez les patients atteints de la MA, font de ce récepteur une cible d'intérêt. En effet, des antagonistes des A_{2A}Rs ont montré leur capacité à améliorer les performances cognitives de par une diminution de la charge amyloïde associée à une diminution la phosphorylation de la protéine Tau.

Bien que plusieurs antagonistes aient été développés pour le traitement de maladies neurodégénératives, ceux-ci présentent un manque d'efficacité corrélée à de faibles propriétés pharmacocinétiques. Ainsi, à partir d'études de modélisation moléculaire, deux nouvelles familles d'antagonistes présentant un noyau central benzoxazole ou quinazoline ont été conçus, synthétisés et évalués pharmacologiquement. Trois composés ont été sélectionnés et font actuellement l'objet d'études pharmacologiques complémentaires sur modèles animaux.

DESIGN, SYNTHESIS AND EVALUATION OF A_{2A} RECEPTOR ANTAGONISTS

Alzheimer's disease (AD) is the most prevalent form of dementia in the aged population. So far, there is no way to halt or slow-down AD. Therefore, there is a constant need of developing novel therapeutic strategies.

In recent years, adenosine A_{2A} receptor (A_{2A}R) has attracted a growing interest since it has been proved that this receptor is over-expressed during AD. Also, epidemiological studies showed that people consuming regularly caffeine-based beverages over a lifetime are substantially less likely to develop this disease. Indeed, A_{2A}R antagonists improve memory performance as it reduces β -amyloid deposits and Tau-phosphorylation.

Though several antagonists have been developed for the treatment of neurodegenerative diseases, current research efforts are focus on developing new antagonists with relevant ADME properties and a better efficacy. Based on a molecular modeling-guided design, we synthesised new A_{2A}R antagonists with benzoxazole and quinazoline as central scaffold. Three molecules were selected and will be subject to evaluation on animal's model.