



UNIVERSITE DE LILLE  
Faculté de Pharmacie de Lille  
Centre Lille Neuroscience & Cognition INSERM UMR-S1172

**THESE DE DOCTORAT EN CHIMIE**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR EN CHIMIE**

*Spécialité : Biomolécules, pharmacologie, thérapeutique*

*Présentée et soutenue publiquement le 04 décembre 2024*

*Par*

**Amélie LAVERVIN**

---

**Conception, synthèse et évaluation pharmacologique  
d'antagonistes des récepteurs A<sub>2A</sub> et de ligands duaux  
ciblant les récepteurs A<sub>2A</sub> et mGlu<sub>5</sub>**

---

*Membres du Jury*

Président : **Pr. Sylvain Routier**, Professeur – Université d'Orléans

Rapportrices : **Dr. Candice Botuha**, Maîtresse de conférences – Sorbonne Université  
**Dr. Sandrine Delarue-Cochin**, Maîtresse de conférences – Université Paris-Saclay

Examineurs : **Pr. Marc Le Borgne**, Professeur – Université de Lyon  
**Pr. Nicolas Lebègue**, Professeur – Université de Lille

Directrice de thèse : **Pr. Patricia Melnyk**, Professeure – Université de Lille

# Remerciements

Je tiens tout d'abord à adresser mes plus sincères remerciements au **Pr. Patricia Melnyk**, ma directrice de thèse, et au **Pr. Nicolas Lebègue**, mon co-encadrant. Merci d'avoir accepté de prendre la relève en tant qu'encadrants en plein milieu de ma thèse, de m'avoir permis de faire progresser mon projet, et pour la confiance que vous m'avez témoignée. Votre expertise, vos connaissances et vos conseils ont joué un rôle clé dans la réussite de ma thèse ainsi que dans mon développement professionnel.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont accordé à ce travail. Je remercie tout particulièrement le **Pr. Sylvain Routier** de l'Institut de Chimie Organique et Analytique de l'Université d'Orléans et le **Pr. Marc Le Borgne** du Centre de Recherche sur le Cancer de l'Université de Lyon pour leur accompagnement tout au long de ces trois années de thèse et pour avoir accepté d'examiner ces travaux. Je tiens à remercier sincèrement le **Dr. Candice Botuha** de l'Institut Parisien de Chimie Moléculaire de l'Université de Paris Sorbonne et le **Dr. Sandrine Delarue-Cochin** de l'Université Paris-Sud pour avoir accepté de jouer le rôle de rapportrices et d'avoir consacré leur temps précieux à l'évaluation de ce manuscrit.

Un grand merci aux membres du labo de chimie thérapeutique, notamment les plus anciens, **Séverine, Stéphanie, Maxime, Jamal, Jérôme, Fabrice** et **Philippe** pour l'aide qu'ils ont pu m'apporter et leurs nombreux conseils. Merci aussi aux plus jeunes, **Emeline, Juliette, Leïla, Maureen, Benjamin, Arthur** et **Martin** pour votre bonne humeur et votre soutien. Je remercie particulièrement le **Dr. Robin Dufosse** de m'avoir aidé sur mon projet lors de cette troisième année. Pour une fois, je n'étais plus la seule à me casser la tête à cause de ces foutues quinazolines !

Je tiens également à remercier le **Dr. Sergio Hernandez-Tapia** pour son aide précieuse durant les nombreuses semaines consacrées à la mise en place du test de polarisation de fluorescence. Ce fut un grand défi, mais nous y sommes finalement parvenus ! Un grand merci aussi à **Mathilde Coevoet** pour m'avoir formée au test de fonctionnalité. C'était sympa de faire des manip à Biserte pour changer !

Je remercie également **Djamila** pour sa bonne humeur et sa joie de vivre constante. Merci pour les fous rires qu'on a eu dans le bureau, cela mettait un peu de gaieté dans nos journées. Merci également pour tes conseils de maman.

Évidemment, je ne peux pas t'oublier, **Polo** ! Je ne te remercierai jamais assez pour ton aide précieuse à chaque fois que j'ai eu des galères au labo (et on sait qu'il y en a eu beaucoup !). Grâce à tes talents de bricoleur, on a toujours trouvé une solution, même si je n'étais parfois pas convaincue face à tes « bidouillages », comme avec l'agitateur à eppendorf. En tout cas, on a bien rigolé pendant ces trois ans, surtout quand tu faisais encore partie de la team du premier étage !

Je remercie également une collègue devenue une véritable amie, **Justine Peters**. Merci d'être devenue ma sœur de doctorat, avec qui j'ai eu le plaisir de partager cette aventure dès le stage de M2, puis lors du concours de l'école doctorale, et tout au long de ces trois années. Nous avons pu nous soutenir mutuellement aussi bien dans les mauvais que dans les bons moments. Je n'oublierais jamais nos fous rires ainsi que nos nombreuses sorties et nos voyages un peu partout qui m'ont permis de me vider la tête !

Je tiens à remercier mes compagnons de bureau les « **rouges glouglous** ». Merci à **Alexandre Gobert** (aka Gobiche) de nous avoir supportées dans le bureau, même si on papotait beaucoup avec Marie. Même si tu prends souvent la grosse tête on s'est bien marré et surtout envoyé beaucoup de tacles ! Mais au fond, on s'apprécie quand même ! Fin j'espère ahah. Merci aussi de nous avoir fait craquer à chaque fois pour aller manger dehors ou manger un p'tit muffin en dessert !

Je remercie forcément le troisième membre des « rouges glouglous », **Marie Stoup**. Je ne sais pas comment j'aurais traversé ces deux ans et demi sans ma « work bestie », qui est aussi devenue ma meilleure amie en dehors du labo. Je te suis extrêmement reconnaissante de m'avoir soutenue et épaulée pendant les moments difficiles. Merci pour toutes les pauses café et goûter que nous avons partagées pour nous remonter le moral (on a un peu déconné de ce côté-là ahah). Merci d'être la personne à qui je peux tout dire sans filtre et pour tous ces fous rires jusqu'aux larmes, cela va énormément me manquer !

Je remercie également mes plus proches amis **Tess, Amandine, Kelly, Sophie** et le **Solfé Gang**. Merci pour votre sincère amitié et pour tous ces merveilleux moments passés ensemble.

Je tiens évidemment à remercier mon copain, **Tarak**, que j'ai eu la chance de rencontrer au laboratoire. Merci de m'avoir soutenue et épaulée, même dans les moments les plus difficiles. Je sais que je ne suis

## *Remerciements*

pas toujours facile à vivre, surtout en période de stress (ce qui arrive souvent et je m'en excuse), mais tu as toujours su trouver les mots justes pour me réconforter et me redonner le sourire. Merci de me faire rire avec tes blagues pourries chaque jour.

Pour finir, un immense merci à ma sœur et à mes parents. Merci **Cloco** de m'avoir supportée et d'avoir préparé des bons petits plats à l'appart pendant ces trois années. Et à mes chers parents, **Bettina** et **David**, merci pour votre soutien inconditionnel et votre aide précieuse tout au long de mon parcours, quels que soient mes choix.

# **Publications, communications et enseignements**

Les travaux effectués dans le cadre de cette thèse ont, à ce jour, abouti aux publications et communications suivantes :

- Publications

Ettaoussi M., Laversin A., Vreulz B., Rami M., Lebègue N., Delagrance P., Caignard D.-H., Melnyk P., Liberelle M., Yous S.

*Synthesis and SAR studies of isoquinoline and tetrahydroisoquinoline derivatives as melatonin receptor ligands.*

*ChemMedChem* **2021**, 16, 1-17

Bolteau R., Duroux R., Laversin A., Vreulz B., Shiriaeva A., Stauch B., Won Han G., Cherezov V., Renault N., Barczyk A., Ravez S., Coevoet M., Melnyk P., Liberelle M., Yous S.

*High ligand efficiency quinazoline compounds as novel A<sub>2A</sub> adenosine receptor antagonists.*

*Eur. J. Med. Chem.*, **2022**, Vol. 241, 114620

Laversin A., Dufossez R., Bolteau R., Duroux R., Ravez S., Hernandez-Tapia S., Fossart M., Coevoet M., Liberelle M., Yous S., Lebègue N., Melnyk P.

*Novel quinazolines derivatives as highly effective A<sub>2A</sub> adenosine receptor antagonists.*

*Molecules* **2024**, 29, 3847.

- Communications par affiche

Laversin A., Ravez S., Liberelle M., Furman C., Melnyk P., Yous S.

*Design, synthesis and pharmacological evaluation of dual ligands targeting A<sub>2A</sub> and mGlu<sub>5</sub> receptors for the treatment of neurodegenerative diseases.*

**Lil'N Doc Day 2022**, Lille, 2022, February 25<sup>th</sup>

Laversin A., Ravez S., Liberelle M., Furman C., Melnyk P., Yous S.

*Design, synthesis and pharmacological evaluation of dual ligands targeting A<sub>2A</sub> and mGlu<sub>5</sub> receptors for the treatment of neurodegenerative diseases.*

**Drug discovery Day 2022**, Lille, 2022, December 16<sup>th</sup>

Laversin A., Ravez S., Liberelle M., Furman C., Melnyk P., Yous S.

*Design, synthesis and pharmacological evaluation of dual ligands targeting A<sub>2A</sub> and mGlu<sub>5</sub> receptors for the treatment of neurodegenerative diseases.*

**30th Young Researcher Fellows Meeting**, Paris, 2023, February 1<sup>st</sup>-3<sup>rd</sup>

Laversin A., Ravez S., Liberelle M., Furman C., Melnyk P., Yous S.

*Design, synthesis and pharmacological evaluation of dual ligands targeting A<sub>2A</sub> and mGlu<sub>5</sub> receptors for the treatment of neurodegenerative diseases.*

**RICT 2023**, Lille, 2023, July 5<sup>th</sup>-7<sup>th</sup>

- **Communications orales**

Laversin A., Ravez S., Liberelle M., Furman C., Melnyk P., Yous S.

*Design, synthesis and pharmacological evaluation of dual ligands targeting A<sub>2A</sub> and mGlu<sub>5</sub> receptors for the treatment of neurodegenerative diseases.*

**30th Young Researcher Fellows Meeting**, Paris, 2023, February 1<sup>st</sup>-3<sup>rd</sup>

Laversin A., Ravez S., Liberelle M., Furman C., Melnyk P., Yous S.

*Design, synthesis and pharmacological evaluation of dual ligands targeting A<sub>2A</sub> and mGlu<sub>5</sub> receptors for the treatment of neurodegenerative diseases.*

**Lil'N Doc Day 2023**, Lille, 2023, March 24<sup>th</sup>

Laversin A., Dufosse R., Ravez S., Hernandez-Tapia S., Liberelle M., Lebègue N., Melnyk P.

*Design, synthesis and pharmacological evaluation of dual ligands targeting A<sub>2A</sub> and mGlu<sub>5</sub> receptors for therapeutic issues.*

**Lil'N Doc Day 2024**, Lille, 2024, May 13<sup>th</sup>

- Enseignements

- Encadrement d'un étudiant (1 semaine en décembre) participant à une UE « Initiation à la recherche », Faculté de Pharmacie, Lille, 2021.

- Encadrement de travaux pratiques (9h) « Dosage d'ions par complexométrie » avec le Dr. Maxime Liberelle, 2<sup>ème</sup> année de Licence Sciences du médicament et des produits de santé, Lille, 2022.

- Encadrement d'une étudiante (1 semaine en décembre) participant à une UE « Initiation à la recherche », Faculté de Pharmacie, Lille, 2022.

- Encadrement de travaux pratiques (16h) « Chimie des solutions » avec le Dr. Marie Lecoeur et le Dr. Cécile Danel, 1<sup>ère</sup> année du DEUST Santé Environnement, Lille, 2023.

- Encadrement de travaux pratiques (9h) « Chimie organique » avec le Dr. Maxime Liberelle, 2<sup>ème</sup> année de Licence Sciences du médicament et des produits de santé, Lille, 2023.

- Formations de l'École Doctorale Biologie Santé suivies

- Veille et stratégie de recherche documentaire, 2022, January 14<sup>th</sup>

- Gérer efficacement sa documentation avec Zotero, 2022, March 16<sup>th</sup>

- Practice makes perfect, 2022, March 7<sup>th</sup> to May 16<sup>th</sup>

- Partage des savoirs avec Wikipédia, 2023, January 19<sup>th</sup>

- Current concepts in Precision Health - Novel Mode of actions for personalized drugs, 2023, November 27<sup>th</sup> and 28<sup>th</sup>

- Validation de MOOC – Ethique de la recherche, 2024, January-February

# Abréviations

5'-AMP : 5'-adénosine monophosphate  
A<sub>1</sub>R : Récepteur à l'adénosine A<sub>1</sub>  
A<sub>2A</sub>R : Récepteur à l'adénosine A<sub>2A</sub>  
A<sub>2B</sub>R : Récepteur à l'adénosine A<sub>2B</sub>  
A<sub>3</sub>R : Récepteur à l'adénosine A<sub>3</sub>  
ADA : Adénosine déaminase  
ADME : Absorption, Distribution, Métabolisme, Elimination  
ADP : Adénosine diphosphate  
AK : Adénosine kinase  
AMPA :  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionate  
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique  
AT1R : Récepteur à l'angiotensine 1  
ATP : Adénosine triphosphate  
BHE : Barrière hémato-encéphalique  
BRET : Transfert d'énergie par résonance de bioluminescence  
CCR2 : Récepteur à la chimiokine de type 2  
CHO : Chinese hamster ovary  
CREB : C-AMP Response Element-binding protein  
CTLA-4 : Antigène 4 associé aux lymphocytes T cytotoxiques  
D<sub>2</sub>R : Récepteur dopaminergique D<sub>2</sub>  
DAG : Diacyl-glycérol  
DCM : Dichlorométhane  
DIPEA : *N,N*-diisopropyléthylamine  
DMF : Diméthylformamide  
ECL : Extracellular loop  
EDCI : 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide  
ERK : Extracellular signal-regulated kinases  
FDA : Food and Drug Administration  
FINE : Finlande, Italie, Pays-Bas  
FP : Polarisation de fluorescence  
GABA : Acide gamma-aminobutyrique  
GDP : Guanosine diphosphate

G<sub>i</sub> : Protéine G inhibitrice  
G<sub>s</sub> : Protéine G stimulatrice  
GTP : Guanosine triphosphate  
HEK : Human embryonic kidney  
ICL : Intracellular loop  
IP<sub>3</sub> : Inositol 1,4,5-triphosphate  
K<sub>D</sub> : Constante de dissociation  
K<sub>i</sub> : Constante d'inhibition  
K<sub>off</sub> : Constante de vitesse de dissociation  
K<sub>on</sub> : Constante de vitesse d'association  
MA : Maladie d'Alzheimer  
MAPK : Mitogen-activated protein kinases  
mGluR<sub>1</sub> : Récepteur au glutamate mGlu<sub>1</sub>  
mGluR<sub>2</sub> : Récepteur au glutamate mGlu<sub>2</sub>  
mGluR<sub>3</sub> : Récepteur au glutamate mGlu<sub>3</sub>  
mGluR<sub>4</sub> : Récepteur au glutamate mGlu<sub>4</sub>  
mGluR<sub>5</sub> : Récepteur au glutamate mGlu<sub>5</sub>  
mGluR<sub>6</sub> : Récepteur au glutamate mGlu<sub>6</sub>  
mGluR<sub>7</sub> : Récepteur au glutamate mGlu<sub>7</sub>  
mGluR<sub>8</sub> : Récepteur au glutamate mGlu<sub>8</sub>  
MH : Maladie d'Huntington  
MND : Maladies neurodégénératives  
MP : Maladie de Parkinson  
MPEP : 2-méthyl-6-(phényléthynyl)pyridine  
MsOH : Acide méthane sulfonique  
MTEP : 3-((2-méthyl-4-thiazolyl)éthynyl)pyridine  
NAM : Modulateur allostérique négatif  
NMDA : N-méthyl-D-aspartate  
PD-L1 : Ligand de mort cellulaire programmée 1  
PDB : Protein Data Bank  
PKA : Protéine kinase A  
PKC : Protéine kinase C

PLC : Phospholipase C

PP2A : Protéine phosphatase 2

PTP : Pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidine

RCPG : Récepteur couplé aux protéines G

RSA : Relation structure-activité

SAH : S-adénosyl homocystéine

SNC : Système nerveux central

TA : Température ambiante

Tau : Tubulin associated unit

TBAB : Tetra-n-butylammonium bromide

TBAF : Tetra-n-butylammonium fluoride

TEP : Tomographie par émission de positons

TFA : Trifluoroacetic acid

THF : Tétrahydrofurane

TM : Transmembranaire

UDP : Uridine diphosphate

UTP : Uridine triphosphate

XAC : 8-phényl-1,3-dipropylxanthine

## Table des matières

|  |    |
|--|----|
| Introduction.....  | 1  |
| I. Les récepteurs couplés aux protéines G.....   | 2  |
| II. Les récepteurs à l'adénosine.....  | 7  |
| 1. L'adénosine.....  | 7  |
| 2. Classification des récepteurs à l'adénosine.....  | 9  |
| 3. Intérêt thérapeutique des récepteurs à l'adénosine.....                                 | 11 |
| III. Les récepteurs à l'adénosine $A_{2A}$ .....   | 12 |
| 1. Voie biochimique.....   | 12 |
| 2. Importance de l'homodimérisation vs l'hétérodimérisation du récepteur $A_{2A}$ .....    | 13 |
| 3. Intérêt thérapeutique des antagonistes $A_{2A}R$ .....                                  | 14 |
| IV. Les antagonistes du récepteur $A_{2A}$ .....   | 21 |
| 1. Les dérivés « xanthines-like ».....   | 21 |
| 2. Les dérivés « non xanthines-like ».....   | 22 |
| V. Les récepteurs au glutamate.....  | 31 |
| 1. Le glutamate.....   | 31 |
| 2. Classification des récepteurs métabotropiques du glutamate.....                         | 32 |
| 3. Intérêt thérapeutique des récepteurs métabotropiques du glutamate.....                  | 33 |
| VI. Les récepteurs du glutamate $mGlu_5$ .....   | 34 |
| 1. Voie biochimique.....   | 34 |
| 2. Intérêt thérapeutique des modulateurs allostériques négatifs $mGluR_5$ .....            | 36 |
| VII. Les modulateurs allostériques négatifs du récepteur $mGlu_5$ .....                    | 39 |
| 1. Dérivés alcynes.....  | 39 |
| 2. Dérivés non alcynes.....  | 41 |
| Travaux préliminaires et objectifs.....  | 46 |
| Chapitre 1 : Développement de tests par polarisation de fluorescence.....                  | 59 |
| I. Mesure de l'affinité par polarisation de fluorescence.....                              | 60 |
| 1. Principe de la polarisation de fluorescence.....  | 62 |
| 2. Mise en place du test de polarisation de fluorescence sur les récepteurs $A_{2A}$ ..... | 64 |
| 3. Mise en place du test de polarisation de fluorescence sur les récepteurs $mGlu_5$ ..... | 72 |
| II. Etude fonctionnelle de ligands $A_{2A}R$ .....   | 77 |
| 1. Production de l'AMPC intracellulaire.....   | 78 |

|  |     |
|--|-----|
| 2. Tests de dosage de l'AMPC intracellulaire.....  | 78  |
| Chapitre 2 : La famille des benzofuranes .....   | 81  |
| I. Conception de nouveaux composés benzofuraniques .....   | 82  |
| 1. Modulations en position C5 .....  | 82  |
| 2. Modulations en position C2 .....  | 82  |
| II. Synthèse des composés benzofuraniques .....  | 83  |
| 1. Synthèse de la série I.....   | 83  |
| 2. Synthèse de la série II.....  | 88  |
| III. Evaluation pharmacologique des benzofuranes .....   | 91  |
| Chapitre 3 : La famille des quinazolines .....   | 92  |
| I. Développement de nouveaux antagonistes A <sub>2A</sub> R quinazoliniques .....                          | 93  |
| 1. Modulations en positions C4, C6 et C7 du composé « hit ».....   | 93  |
| 2. Amélioration de la solubilité des composés quinazoliniques .....  | 103 |
| II. Conception et synthèse de sondes fluorescentes A <sub>2A</sub> R.....                                  | 114 |
| 1. Conception de sondes fluorescentes pour A <sub>2A</sub> R.....  | 114 |
| 2. Synthèse des sondes 4-phénylquinazolines.....   | 117 |
| 3. Synthèse des sondes 4-furan-2-yl-quinazolines.....  | 120 |
| Chapitre 4 : Ligands duaux A <sub>2A</sub> R/mGluR <sub>5</sub> .....                                      | 124 |
| I. Conception de nouveaux ligands duaux A <sub>2A</sub> R/mGluR <sub>5</sub> .....                         | 125 |
| 1. Composés 2-aminopyrimidines .....   | 126 |
| 2. Composés quinazoliniques .....  | 129 |
| II. Affinités et relations structure-activité des ligands duaux A <sub>2A</sub> R/mGluR <sub>5</sub> ..... | 132 |
| 1. Composés 2-aminopyrimidines .....   | 132 |
| 2. Composés quinazoliniques .....  | 134 |
| Conclusion et perspectives.....  | 136 |
| Partie expérimentale.....  | 143 |
| I. Chemistry.....  | 144 |
| 1. Synthesis of mGluR <sub>5</sub> probe.....  | 145 |
| 2. Synthesis of benzofuranes.....  | 152 |
| 3. Synthesis of quinazolines .....   | 169 |
| 4. Synthesis of 2-aminopyrimidines A <sub>2A</sub> R/mGluR <sub>5</sub> .....                              | 224 |
| 5. Synthesis of quinazolines A <sub>2A</sub> R/mGluR <sub>5</sub> .....                                    | 245 |
| II. Biology .....  | 253 |

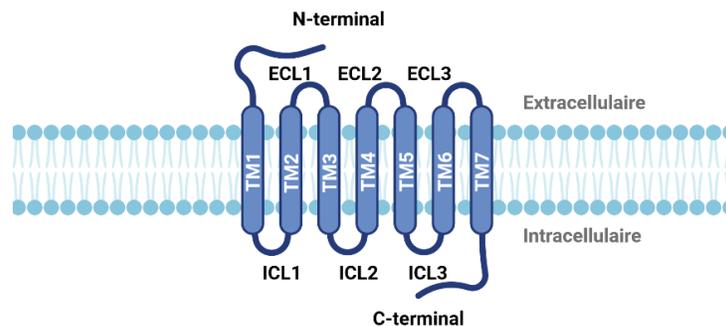
|   |     |
|---|-----|
| 1. Materials.....                             | 253 |
| 2. Cell culture and membrane preparation..... | 253 |
| 3. FP binding assay .....                     | 254 |
| 4. cAMP assay.....                            | 254 |
| III. Molecular docking.....                   | 255 |
| IV. Solubility assay .....                    | 255 |
| Bibliographie.....                            | 256 |

# Introduction

## I. Les récepteurs couplés aux protéines G

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), aussi connus sous le nom de récepteurs à sept domaines transmembranaires, forment l'une des familles de récepteurs de surface cellulaire les plus vastes et les plus diversifiées (plus de 800 membres).<sup>1</sup> Il y a plusieurs décennies, les RCPG ont été regroupés afin de former une superfamille de récepteurs.<sup>2</sup> Différentes superfamilles ont été répertoriées, chacune caractérisée par des propriétés structurales et fonctionnelles distinctes. Les autres familles de récepteurs cellulaires les plus connues, telles que les récepteurs ionotropiques<sup>3</sup>, les récepteurs nucléaires<sup>4</sup> ou encore les récepteurs cytokiniques<sup>5</sup>, sont également classées comme superfamilles de récepteurs.

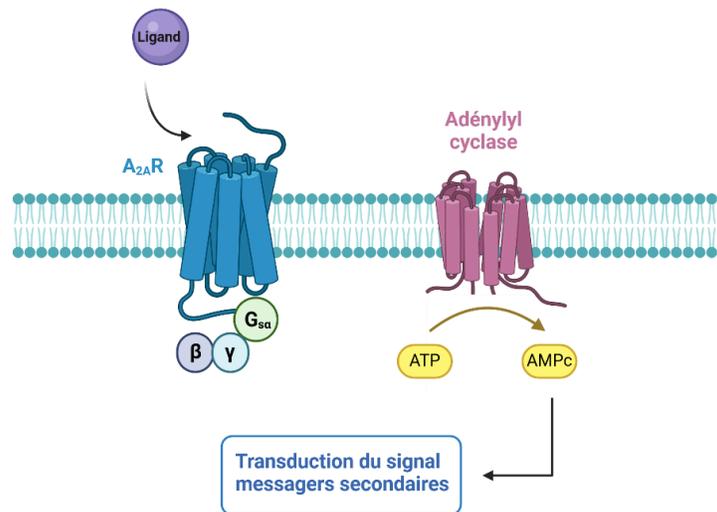
Les RCPG se caractérisent par leur structure commune composée de sept hélices alpha transmembranaires (TM) traversant la membrane cellulaire (**Figure 1**).<sup>6,7</sup> La partie centrale est constituée de sept domaines transmembranaires connectés par une alternance de trois boucles intracellulaires (ICL1, ICL2 et ICL3) et trois boucles extracellulaires (ECL1, ECL2 et ECL3). L'extrémité N-terminale se trouve toujours du côté extracellulaire, tandis que l'extrémité C-terminale est située du côté intracellulaire.



**Figure 1. Structure générale d'un récepteur couplé aux protéines G (Biorender).<sup>7</sup>**

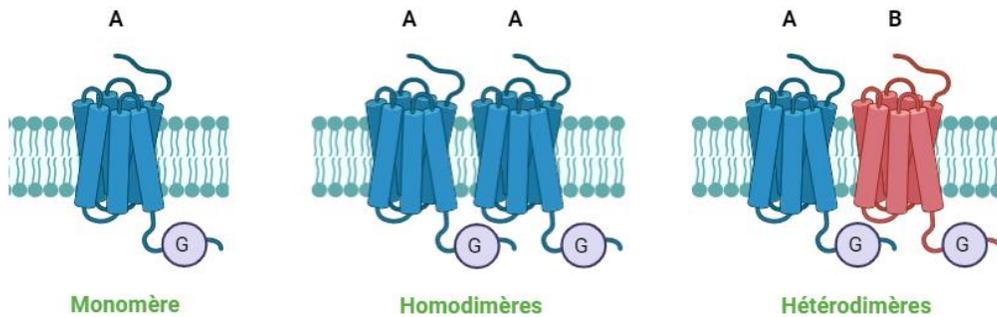
Cette configuration leur permet de capter des signaux extracellulaires et de déclencher une série de réactions intracellulaires en activant les protéines G associées. L'activation des RCPG déclenche une série d'événements biologiques suite à la liaison d'un ligand. Lorsqu'un ligand (comme une hormone ou un neurotransmetteur) se lie à un RCPG, cela provoque un changement de conformation du récepteur. Ce changement permet l'activation de la protéine G liée, qui est composée de trois sous-unités : alpha, bêta et gamma.<sup>8</sup> L'activation de la protéine G induit la dissociation de la sous-unité alpha, qui peut alors moduler l'activité d'autres protéines intracellulaires, telles que les enzymes ou les canaux ioniques, initiant ainsi une réponse cellulaire spécifique.

Certains RCPG, comme par exemple le récepteur à l'adénosine  $A_{2A}$  ( $A_{2A}R$ ), peuvent contrôler la production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) intracellulaire en activant des protéines G spécifiques : soit des protéines stimulatrices ( $G_s$ ) qui stimulent la production d'AMPc, soit des protéines inhibitrices ( $G_i$ ) qui l'inhibent (**Figure 2**). La synthèse de l'AMPc est déclenchée par l'adénylyl cyclase (aussi appelée adénylate cyclase) membranaire, qui catalyse la conversion de l'adénosine triphosphate (ATP) en AMPc et en pyrophosphate. La régulation intracellulaire de l'AMPc est déterminée par l'équilibre entre sa production à partir d'ATP et sa dégradation rapide en 5'-adénosine monophosphate (5'-AMP) par une phosphodiesterase.<sup>9</sup>



**Figure 2. Récepteur  $A_{2A}$  couplé à une protéine  $G_s$  et synthèse de l'AMPc (BioRender).**

Les études portées sur les interactions récepteur-récepteur ont également démontré que les RCPG fonctionnent non seulement comme des monomères, mais aussi comme des dimères (**Figure 3**).<sup>10,11</sup> Ces récepteurs dimères peuvent se trouver sous la forme d'homodimères ou d'hétérodimères. L'homodimérisation fait référence à l'association de deux récepteurs identiques pour former un complexe fonctionnel. A contrario, l'hétérodimérisation implique l'association de deux récepteurs distincts, ce qui peut moduler leur fonction.



**Figure 3. Mono et dimérisation des récepteurs couplés aux protéines G (BioRender).**

Le phénomène d'hétérodimérisation permet de diversifier les réponses cellulaires, influençant la signalisation, la sélectivité des ligands, et la régulation des voies intracellulaires. Elle peut également altérer les propriétés pharmacologiques des récepteurs, en modifiant l'affinité des ligands ou l'efficacité des réponses biologiques.

Les hétérodimères des RCPG ont ouvert un nouveau champ dans la pharmacologie. En ciblant les hétérodimères les mieux caractérisés, de nouvelles stratégies thérapeutiques ont été proposées dans le traitement de diverses maladies. Par exemple, des composés antagonistes bloquant l'activité des hétérodimères des récepteurs à l'angiotensine 1 (AT1R) et des récepteurs à la chimiokine de type 2 (CCR2) pour le traitement des maladies rénales chroniques sont en cours de développement.<sup>12</sup> Les hétérodimères des récepteurs à l'adénosine  $A_{2A}$  et des récepteurs dopaminergiques  $D_2$  ( $D_2R$ ) sont tous deux présents dans le striatum et sont considérés comme importants dans l'utilisation prévue des antagonistes des récepteurs à l'adénosine  $A_{2A}$  pour le traitement de la maladie de Parkinson (MP).<sup>13</sup>

Les RCPG présentent donc un intérêt thérapeutique depuis des décennies. En effet, les RCPG sont impliqués dans une multitude de processus physiologiques, incluant la vision, l'odorat, la régulation du rythme cardiaque, et bien d'autres fonctions vitales.<sup>14,15</sup> En raison de leur rôle central dans la signalisation cellulaire, les RCPG sont également des cibles majeures pour de nombreux médicaments. Environ sept cents médicaments sur le marché, soit environ un tiers des médicaments, agissent en modulant l'activité des RCPG, ce qui souligne leur importance en pharmacologie.<sup>16</sup> Ainsi de nouvelles molécules chimiques ont été développées le plus souvent dans le but de cibler la poche de liaison du ligand endogène. Ces molécules peuvent être des agonistes ou des antagonistes et agissent donc sur le site orthostérique des RCPG. Cependant, de plus récentes découvertes sur les mécanismes d'activation des RCPG ont permis de développer de nouveaux composés pharmacologiques agissant comme des modulateurs allostériques.<sup>17</sup>

Les RCPG sont des protéines membranaires essentielles à la transmission des signaux cellulaires. Leur structure varie en fonction de leur interaction avec des molécules telles que les agonistes ou les antagonistes, ce qui modifie leur aptitude à activer ou inhiber les protéines G associées. Voici les principales différences de conformation observées lors de la liaison d'un RCPG à un agoniste par rapport à un antagoniste :

#### Liaison avec un agoniste :

- **Conformation active** : Lorsqu'un agoniste se lie au RCPG, il induit un changement de conformation qui stabilise la forme active du récepteur (**Figure 4**). Cela permet au récepteur de s'associer avec une protéine G (soit de la famille  $G_s$ ,  $G_i$ ,  $G_q$ , etc.), déclenchant ainsi une cascade de signalisation intracellulaire.
- **Changement au niveau de l'hélice transmembranaire** : L'agoniste favorise un écartement entre certaines hélices transmembranaires (notamment TM3 et TM6), ce qui expose les sites de liaison pour la protéine G. Cela facilite l'échange de la guanosine diphosphate (GDP) pour la guanosine triphosphate (GTP) sur la sous-unité  $\alpha$  de la protéine G, activant ainsi cette dernière.
- **Conséquence fonctionnelle** : L'activation de la protéine G entraîne différents processus intracellulaires, comme la production d'AMPc (avec la protéine  $G_s$ ) ou l'inhibition de la production d'AMPc (avec la protéine  $G_i$ ).

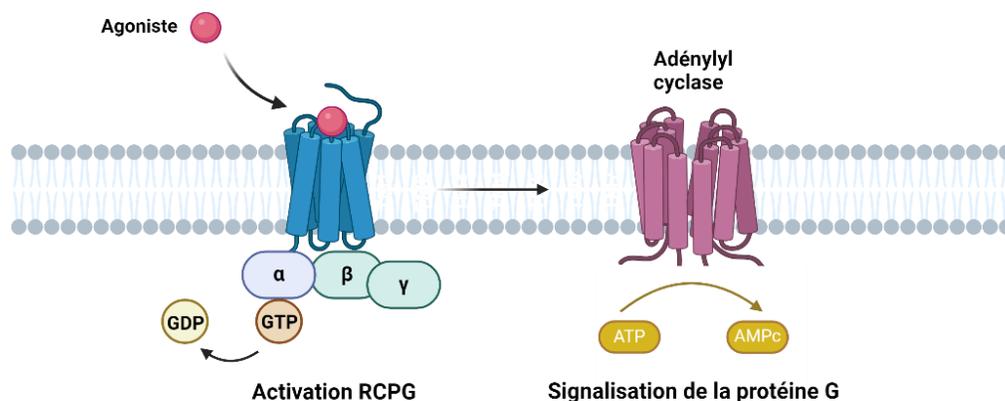


Figure 4. Conformation d'un RCPG lors de la liaison d'un agoniste.

## Liaison avec un antagoniste :

- **Conformation inactive** : Lorsqu'un antagoniste se lie au RCPG, il stabilise la conformation inactive du récepteur (**Figure 5**). Dans cette conformation, les hélices transmembranaires ne subissent pas le changement nécessaire pour lier la protéine G. La liaison avec l'antagoniste bloque ainsi l'activation du récepteur, empêchant toute signalisation intracellulaire.
- **Blocage de l'activité** : L'antagoniste n'induit pas les changements structuraux requis pour activer la protéine G. En fait, il empêche la liaison des agonistes et bloque donc l'activité du récepteur.
- **Absence de signalisation** : Comme le récepteur ne subit pas de changement de conformation vers l'état actif, il n'y a ni activation de la protéine G, ni transmission du signal.

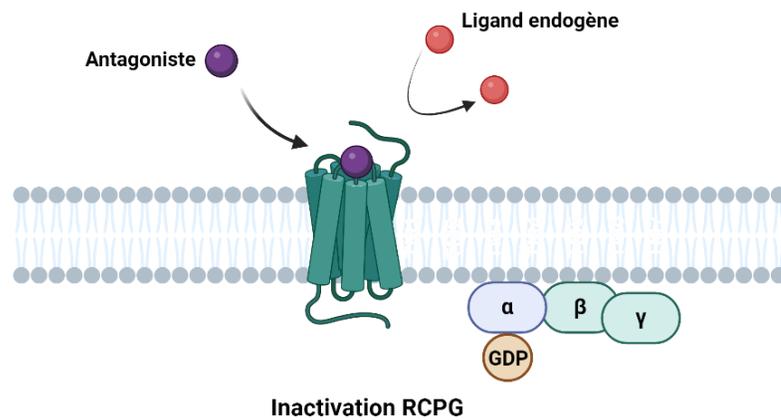


Figure 5. Conformation d'un RCPG lors de la liaison d'un antagoniste.

## Autres cas :

- **Agonistes partiels** : Ceux-ci induisent une conformation intermédiaire du récepteur, permettant une activation partielle des protéines G. Ils n'activent donc pas pleinement le récepteur comme le ferait un agoniste complet.
- **Agonistes inverses** : Ces molécules stabilisent une conformation du récepteur qui favorise son inactivation, même dans le cas où le récepteur aurait une activité constitutive (activité de base sans ligand).

## En résumé :

- **Agoniste** : induit un changement de conformation vers un état actif, permettant l'interaction avec les protéines G et la transmission du signal.
- **Antagoniste** : stabilise le récepteur dans sa conformation inactive, empêchant toute signalisation.

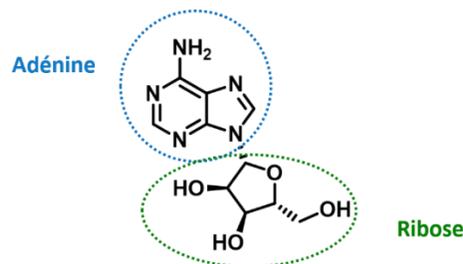
Ces changements conformationnels sont essentiels pour comprendre comment les RCPG régulent diverses voies de signalisation dans les cellules et comment les médicaments peuvent moduler ces voies.

## II. Les récepteurs à l'adénosine

Les récepteurs à l'adénosine font partie de la famille des RCPG, et leur ligand endogène est l'adénosine.

### 1. L'adénosine

L'adénosine est un nucléoside que l'on retrouve dans toutes les cellules de notre corps.<sup>18</sup> Elle est constituée d'une base azotée, l'adénine, à laquelle est lié un sucre appelé ribose (**Figure 6**).



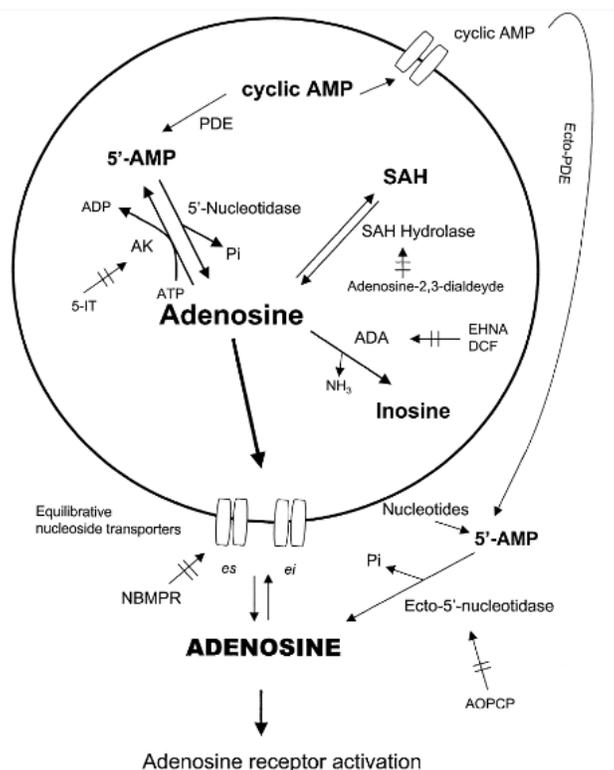
**Figure 6. Structure de l'adénosine.**

L'adénosine est un neuromodulateur essentiel du système nerveux central (SNC), qui influence l'excitabilité neuronale en régulant la libération de neurotransmetteurs comme le glutamate, l'acétylcholine et la dopamine.<sup>19,20</sup> Elle joue également un rôle clé, tant dans les processus physiologiques normaux que dans des conditions pathologiques. L'adénosine exerce ses effets en interagissant avec des récepteurs membranaires appartenant à la famille des récepteurs couplés aux protéines G qui sont présents dans différentes cellules telles que les cellules endothéliales, immunitaires, les vaisseaux sanguins, les astrocytes, les microglies, le striatum et la moelle épinière du SNC.

L'adénosine est principalement générée par le métabolisme de l'ATP et remplit des fonctions diverses dans l'ensemble de l'organisme. Dans le SNC, elle joue un rôle crucial dans la régulation de la libération des neurotransmetteurs, la plasticité synaptique, ainsi que la neuroprotection en réponse à l'ischémie, l'hypoxie et le stress oxydatif.<sup>21-23</sup> Par ailleurs, l'adénosine exerce des effets variés dans de nombreux

tissus. Par exemple, dans le système cardiovasculaire, elle peut provoquer soit une vasoconstriction, soit une vasodilatation des veines et des artères.<sup>24</sup> Elle régule également la prolifération des cellules T et la production de cytokines, tout en inhibant la lipolyse et en stimulant la bronchoconstriction.

L'adénosine est produite à la fois de manière intracellulaire et extracellulaire (**Figure 7**). À l'intérieur des cellules, elle est formée à partir de son précurseur, la 5'-AMP, par l'action de l'enzyme 5'-nucléotidase. L'adénosine peut être produite par l'hydrolyse de la S-adénosyl homocystéine (SAH) *via* la SAH hydrolase. Elle peut ensuite suivre plusieurs voies métaboliques : être transformée en inosine et hypoxanthine par l'adénosine désaminase (ADA) ou inverser la réaction de la SAH hydrolase pour reformer de la SAH. De plus, l'adénosine peut être transportée à l'extérieur de la cellule par des transporteurs spécifiques des nucléosides, permettant ainsi l'activation des récepteurs à l'adénosine extracellulaires. Elle peut également être reconvertie en 5'-AMP par l'adénosine kinase (AK), puis en adénosine diphosphate (ADP) et adénosine triphosphate (ATP). Extracellulairement, l'AMP cyclique est transformé en 5'-AMP par l'ecto-phosphodiesterase, puis en adénosine par l'ecto-5'-nucléotidase.<sup>25,26</sup>



**Figure 7. Voies de production de l'adénosine (Latini S. et Pedata F., 2001)<sup>25</sup>**

L'adénosine agit aussi principalement comme ligand endogène sur quatre récepteurs couplés aux protéines G : les récepteurs A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> et A<sub>3</sub>. L'adénosine présente une affinité moyennement élevée pour

les récepteurs  $A_1$  ( $K_i(hA_1R) = 100$  nM),  $A_{2A}$  ( $K_i(hA_{2A}R) = 310$  nM) et  $A_3$  ( $K_i(hA_3R) = 290$  nM). Son affinité envers les récepteurs  $A_{2B}$ , quant à elle, est beaucoup plus faible ( $K_i(hA_{2B}R) = 15$   $\mu$ M).<sup>27</sup>

## 2. Classification des récepteurs à l'adénosine

Les récepteurs purinergiques ont initialement été classés en deux sous-types : P1 et P2.<sup>28</sup> Les récepteurs P1 reconnaissent principalement l'adénosine comme ligand, tandis que les récepteurs P2 (incluant les sous-types P2X et P2Y) interagissent avec des molécules telles que l'ADP, l'ATP, l'uridine diphosphate (UDP), l'uridine triphosphate (UTP) et d'autres dinucléotides.<sup>29</sup> Ces récepteurs sont ensuite subdivisés en fonction de leurs propriétés biochimiques, moléculaires et des données pharmacologiques disponibles. Quatre récepteurs à l'adénosine variant par leur affinité, leur localisation et leurs fonctions ont été identifiés et clonés :  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  et  $A_3$  (**Tableau 1**).<sup>30</sup>

|  | $A_1R$                                    | $A_{2A}R$  | $A_{2B}R$   | $A_3R$   |
|--|---|--|---|--|
| <b>Expression</b>                      | Cerveau > cœur, poumons reins             | Cerveau<br>Thymus > cœur, poumons > rate, leucocytes | Muscle lisse bronchique, jéjunum, iléon, côlon, poumons | Foie, poumons, placenta, glandes surrénales > rate, intestin grêle |
| <b><math>K_i</math> adénosine (nM)</b> | 100                                       | 310  | 15000   | 290  |
| <b>Protéine G</b>                      | $G_{i/o}$                                 | $G_s, G_{olf}$                                       | $G_s, G_q$  | $G_i, G_q$   |
| <b>Effets</b>                          | ↓ AMPc<br>↓ PKA<br>↑ $K^+$<br>↓ $Ca^{2+}$ | ↑ AMPc<br>↑ PKA                                      | ↑ AMPc<br>↑ PKA   | ↓ AMPc<br>↓ PKA  |

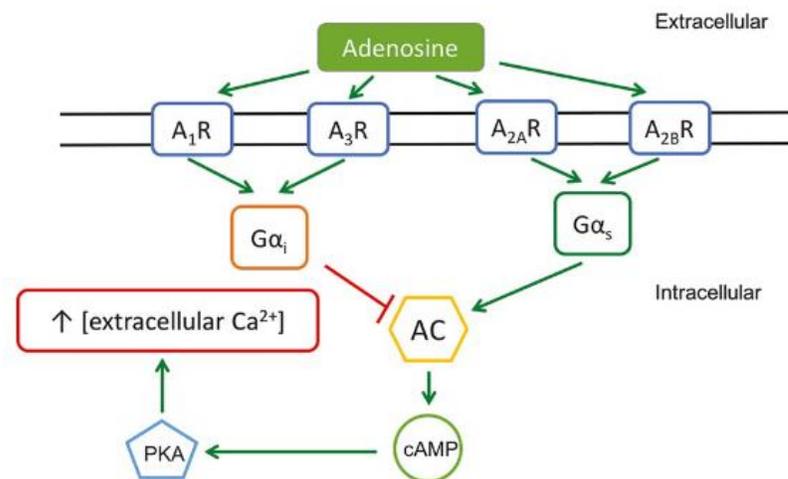
**Tableau 1. Expression, affinité et effets des récepteurs à l'adénosine.**<sup>27,28,31</sup>

Chaque récepteur a été classé après son clonage en fonction de son profil d'activité agoniste ou antagoniste, de son couplage aux protéines G et de son système effecteur. L'adénosine et ses récepteurs peuvent réguler l'activité de l'adénylate cyclase, une enzyme responsable de la production d'AMP cyclique. Selon le type de récepteur, cette enzyme peut être activée ou inhibée.

- Le récepteur  $A_1$  est le récepteur à l'adénosine le plus affiné pour l'adénosine ( $K_i(hA_1R) = 100$  nM). Il est fortement exprimé au sein du SNC, plus particulièrement au niveau du cortex cérébral et de l'hippocampe.<sup>31</sup> Ce récepteur est également retrouvé dans d'autres organes tels le cœur, les poumons ou encore les reins. L'activation de ce récepteur par l'adénosine *via* une protéine G inhibitrice ( $G_i$ ) provoque une inhibition de l'adénylyl cyclase (**Figure 8**). Par conséquent, la

production d'AMPc intracellulaire et l'activation de la protéine kinase A (PKA) sont également inhibées. L'activation de ce récepteur va également favoriser l'ouverture des canaux potassiques, ce qui entraîne indirectement une diminution de la production intracellulaire de calcium. L'activation du récepteur  $A_1$  a un effet neuroprotecteur en diminuant la libération de neurotransmetteurs excitateurs.

- Le récepteur  $A_3$  est très peu abondant dans le SNC, mais est principalement exprimé dans les tissus et organes liés aux processus inflammatoires, immunitaires et cardiovasculaires.<sup>32</sup> Tout comme le récepteur  $A_1$ , son activation entraîne une inhibition de l'adénylyl cyclase et donc par conséquent une inhibition de la production intracellulaire d'AMPc.



**Figure 8. Interaction de l'adénosine avec ses récepteurs (Kolahdouzan M. et Hamadeh M. J., 2017).<sup>33</sup>**

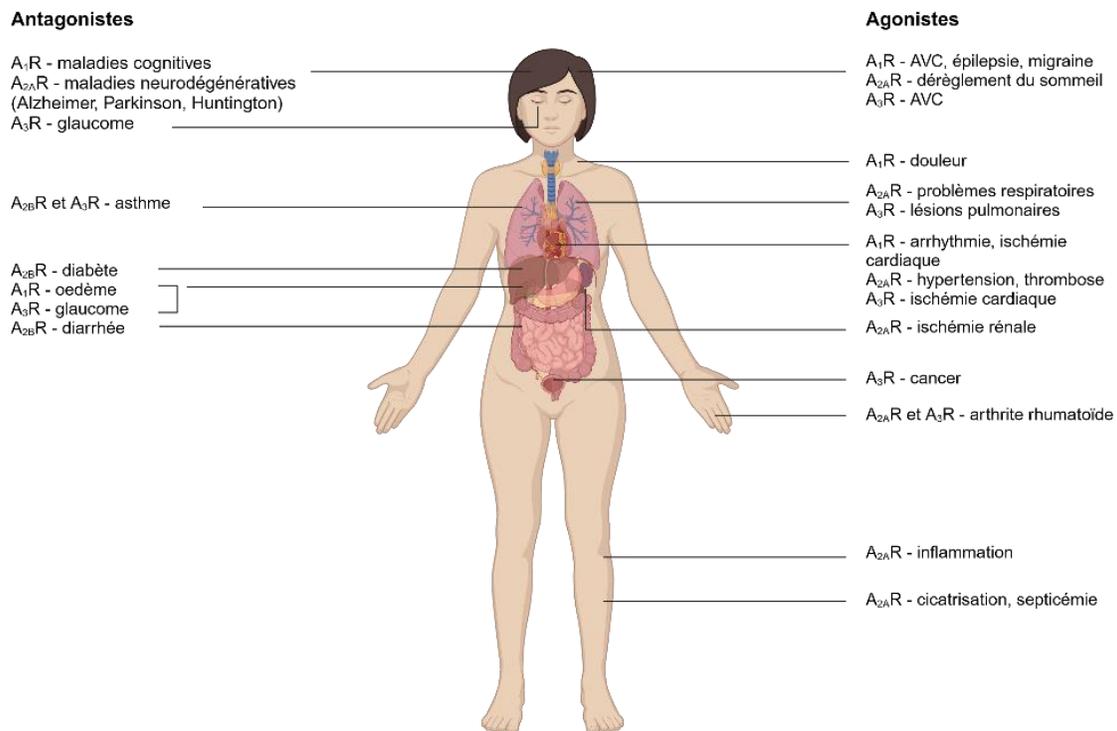
Les récepteurs  $A_2$ , quant à eux, se divisent en deux sous-types,  $A_{2A}$  et  $A_{2B}$ , selon leur affinité distincte pour l'adénosine.

- Le récepteur  $A_{2A}$  est également très affin pour l'adénosine ( $K_i(hA_{2A}R) = 310$  nM). A l'instar du récepteur  $A_1$ , le récepteur  $A_{2A}$  est fortement exprimé dans le système nerveux central, notamment dans le striatum, où il se trouve aussi bien dans les neurones que dans les cellules gliales.<sup>31</sup> Ce récepteur est également retrouvé dans d'autres organes tels le cœur, les poumons ou encore la rate. L'activation du récepteur  $A_{2A}$  par l'adénosine *via* une protéine G stimulatrice ( $G_s$ ) induit l'activation de l'adénylyl cyclase. Par conséquent, la production d'AMPc intracellulaire et de la PKA sont également activées.
- Enfin, le récepteur  $A_{2B}$  est le récepteur le moins affin pour l'adénosine ( $K_i(hA_{2B}R) = 15000$  nM) et son expression est plus faible que celle des autres récepteurs de l'adénosine. Il est très faiblement

présent au sein du SNC mais fortement exprimé dans le tractus gastro-intestinal et les poumons.<sup>34</sup> Tout comme le récepteur  $A_{2A}$ , son activation entraîne une activation de l'adénylyl cyclase et donc par conséquent une activation de la production intracellulaire d'AMPc.

### 3. Intérêt thérapeutique des récepteurs à l'adénosine

L'adénosine joue un rôle clé dans diverses maladies, notamment la maladie de Parkinson, l'ischémie et l'inflammation.<sup>35</sup> L'activation des récepteurs à l'adénosine induit une protection cellulaire dans plusieurs organes et tissus. En conditions de stress hypoxique, le niveau extracellulaire d'adénosine augmente, ce qui permet aux récepteurs à l'adénosine de s'adapter et de répondre en conséquence. Cette réponse favorise l'augmentation des besoins énergétiques, le pré-conditionnement ischémique, l'inhibition de la libération de neurotransmetteurs toxiques, ainsi que la réduction de la réponse inflammatoire. Ces dernières années, de nombreux travaux ont été réalisés sur les quatre récepteurs à l'adénosine. Le développement de nombreux ligands, agonistes et antagonistes, a permis d'étudier et de prouver l'intérêt thérapeutique de ces récepteurs dans le traitement de diverses pathologies. Ces récepteurs jouent un rôle dans de nombreuses pathologies, comme les maladies neurodégénératives, les maladies cardiovasculaires, le cancer ou encore l'inflammation (**Figure 9**).



**Figure 9. Cibles pathologiques pour les ligands sélectifs des récepteurs à l'adénosine (Biorender).**

Figure adaptée de Jacobson K. A. and Gao Z-G.<sup>36</sup>

Comme reporté sur la **Figure 9**, les agonistes du récepteur  $A_{2A}$  présentent des effets anti-inflammatoires et un effet immunosuppresseur, tandis que les agonistes du récepteur  $A_3$  sont proposés pour le traitement de l'inflammation auto-immune ou encore pour l'ischémie cardiaque.<sup>36</sup> L'activation du récepteur  $A_1$  est impliquée dans les mécanismes de la douleur et a montré son utilité dans le traitement de l'épilepsie et de la migraine.

Les antagonistes du récepteur  $A_{2A}$ , quant à eux, se sont révélés être des composés d'intérêt notamment dans le contexte des maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer<sup>33</sup> (MA), la maladie de Parkinson<sup>37</sup> et la maladie d'Huntington<sup>38</sup> (MH). Les antagonistes du récepteur  $A_1$  ont démontré une efficacité dans le traitement de l'insuffisance cardiaque et rénale.<sup>39</sup> Les antagonistes des récepteurs  $A_{2B}$  suscitent de l'intérêt pour le traitement de l'asthme, tandis que le blocage des récepteurs  $A_3$  pourrait avoir une activité sur le développement du glaucome.<sup>40</sup> Plus récemment, les antagonistes  $A_{2A}R$  ont également montré un intérêt thérapeutique dans le domaine de la cancérologie.<sup>41</sup>

En raison de l'implication du récepteur à l'adénosine  $A_{2A}$  dans diverses pathologies, notamment les MND, nous avons porté notre attention sur ce récepteur ainsi que sur ses antagonistes.

### III. Les récepteurs à l'adénosine $A_{2A}$

#### 1. Voie biochimique

Le récepteur  $A_{2A}$  est principalement exprimé dans le SNC, en particulier au niveau du striatum, où il régule la libération de neurotransmetteurs comme le glutamate, l'acétylcholine ou l'acide gamma-aminobutyrique (GABA). Le rôle de ce récepteur a également été démontré dans le développement neuronal et la neuroprotection.<sup>42,43</sup>

L'activation du récepteur  $A_{2A}$  entraîne un échange entre la GDP et la GTP, cette dernière se liant à la sous-unité  $\alpha$ , qui se dissocie de l'hétérodimère  $\beta\gamma$ . En raison du couplage du récepteur avec une protéine G activatrice, l'adénylate cyclase est stimulée, favorisant la production d'AMPc, lequel active ensuite la protéine kinase A.<sup>33</sup> Une fois phosphorylée, la PKA active divers effecteurs tels que des canaux ioniques, des phosphodiesterases ou la protéine CREB. L'activation de CREB met en évidence l'effet anti-inflammatoire du récepteur  $A_{2A}$ , grâce à sa capacité à inhiber le facteur nucléaire  $\kappa B$  (NF- $\kappa B$ ) et l'activation de la voie MAP kinase (MAPK) et à réduire l'expression des cytokines.<sup>44</sup> De plus, l'activation des récepteurs  $A_{2A}$  stimule la phospholipase C (PLC), ce qui module la production d'inositol phosphate, augmente les niveaux de calcium intracellulaire et active les protéines kinases C (PKC).

## 2. Importance de l'homodimérisation vs l'hétérodimérisation du récepteur A<sub>2A</sub>

Comme mentionné précédemment, de nombreux RCPG peuvent former des dimères, soit avec des récepteurs de leur propre famille, soit avec des récepteurs d'autres familles. Des études de transfert d'énergie par résonance de bioluminescence (BRET), technique permettant de mesurer une interaction entre deux protéines par transfert d'énergie d'un donneur bioluminescent à un accepteur fluorescent, ont révélé l'existence d'une interaction A<sub>2A</sub>R-A<sub>2A</sub>R, formant une structure fonctionnelle à la surface de la membrane plasmique.<sup>45</sup> De plus, le récepteur A<sub>2A</sub> forme également des hétérodimères avec d'autres récepteurs à l'adénosine, notamment A<sub>1</sub>R, ainsi qu'avec les récepteurs dopaminergiques D<sub>2</sub> et les récepteurs au glutamate mGlu<sub>5</sub>.<sup>46-48</sup>

Les récepteurs A<sub>1</sub> et A<sub>2A</sub> peuvent interagir, de sorte que l'activation des récepteurs A<sub>2A</sub> peut inhiber les réponses médiées par les récepteurs A<sub>1</sub>.<sup>46</sup> Grâce à la technique du BRET, des hétérodimères A<sub>1</sub>R-A<sub>2A</sub>R ont été identifiés dans des cellules immortalisées et transfectées. De plus, à l'aide d'expériences de co-immunoprécipitation, il a été montré que ces hétérodimères sont présents dans les membranes présynaptiques et qu'ils régulent la libération de glutamate par les terminaisons nerveuses présynaptiques. Ces données suggèrent fortement un rôle potentiel des hétérodimères A<sub>1</sub>R-A<sub>2A</sub>R dans les neurones.

Le récepteur A<sub>2A</sub>, principalement exprimé dans le striatum, joue également un rôle important dans la transmission dopaminergique de par sa co-localisation avec le récepteur D<sub>2</sub>.<sup>47</sup> Ces deux récepteurs se trouvent principalement dans les neurones striatopallidaux contenant du GABA, où ils sont les plus concentrés dans le cerveau. Ces neurones jouent un rôle clé dans la MP, et sont impliqués dans les effets de récompense liés à la consommation de drogues, ainsi que dans les effets antipsychotiques des neuroleptiques.<sup>49</sup> Les relations entre les récepteurs A<sub>2A</sub> et D<sub>2</sub> ont été prouvées au niveau biochimique, fonctionnel et comportemental. Des études montrent que les agonistes A<sub>2A</sub> réduisent l'affinité du récepteur D<sub>2</sub> pour la dopamine chez les animaux. Inversement, les antagonistes A<sub>2A</sub> augmentent les effets du récepteur D<sub>2</sub> sur l'activité motrice en facilitant la libération de neurotransmetteurs. Ainsi, l'utilisation d'un antagoniste A<sub>2A</sub>R présente un intérêt thérapeutique pour le traitement de la maladie de Parkinson.

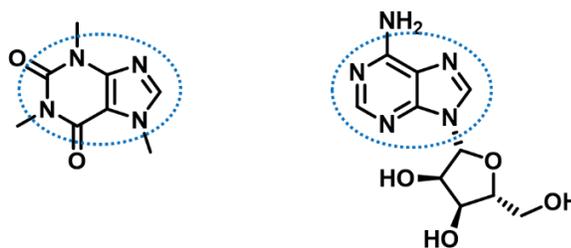
L'hétérodimérisation du récepteur A<sub>2A</sub> avec le récepteur mGlu<sub>5</sub> a également été étudiée. Ces deux récepteurs sont co-localisés dans le striatum et semblent interagir de façon synergique : activer le récepteur mGlu<sub>5</sub> augmente l'activation du récepteur A<sub>2A</sub>.<sup>50</sup> Cette synergie a été observée pour la première fois par Ferré *et al.*, lors d'une co-transfection des récepteurs A<sub>2A</sub> et mGlu<sub>5</sub> dans des cellules HEK. Le traitement de ces cellules avec un agoniste A<sub>2A</sub> ou un agoniste mGlu<sub>5</sub> a permis d'amplifier l'activation de

la voie MAPK de deux à trois fois par rapport aux cellules non traitées. Le traitement simultané avec un agoniste  $A_{2A}R$  et un agoniste  $mGluR_5$  provoque une activation encore plus marquée, augmentant l'activation de la voie MAPK jusqu'à dix fois par rapport aux cellules non traitées, montrant ainsi une synergie entre ces deux récepteurs. Ce phénomène a également été observé chez le rat, montrant ainsi leur implication dans la plasticité neuronale dans le striatum. A l'inverse, le blocage du récepteur  $mGlu_5$  bloque l'activation du récepteur  $A_{2A}$ . Cibler les hétérodimères  $A_{2A}R$ - $mGluR_5$  semble offrir un potentiel thérapeutique prometteur, notamment pour le traitement des MND, où ces deux récepteurs jouent un rôle important.

### 3. Intérêt thérapeutique des antagonistes $A_{2A}R$

#### 1.1. Le point de départ : la caféine

Il y a plusieurs années, une étude épidémiologique a démontré un effet bénéfique de la caféine (**Figure 10**), vis-à-vis du risque de développer certaines maladies neurodégénératives telles que la MA et la MP.<sup>33,51</sup> La caféine est une substance psychoactive contenue dans le café, le thé, les boissons gazeuses et le chocolat. Ses propriétés psychoactives sont dues à sa capacité à interagir avec la neurotransmission dans différentes régions du cerveau, favorisant ainsi les fonctions comportementales, telles que la vigilance, l'attention, l'humeur et l'éveil, ainsi que l'amélioration de la cognition. Il a été montré que la caféine se lie aux récepteurs à l'adénosine et agit comme antagoniste non sélectif des récepteurs  $A_{2A}$ . L'affinité de la caféine pour ces récepteurs s'explique par sa structure, qui comporte un noyau purine similaire à celui de l'adénosine, le ligand endogène des récepteurs à l'adénosine.



**Figure 10. Structure de la caféine (à gauche) et de l'adénosine (à droite).**

Des effets bénéfiques de la caféine sur les fonctions cognitives ont été observés. Une exposition de courte durée à la caféine améliore la mémoire, les capacités cognitives, l'attention et le traitement de l'information. Chez les rongeurs, des décennies de recherche confirment les effets positifs de la caféine sur l'apprentissage et la mémoire à travers diverses tâches comportementales. Plusieurs études longitudinales ont exploré le lien entre la consommation de café et le déclin cognitif ou le risque de

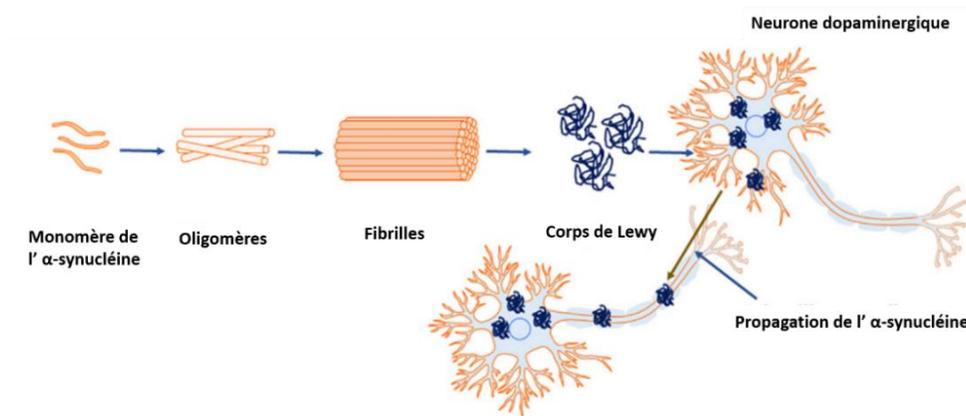
démence, notamment dans la MA. Dans l'étude FINE, menée en Finlande, en Italie et aux Pays-Bas, il a été constaté que chez les hommes âgés, la consommation de trois tasses de café par jour était associée au déclin cognitif le plus faible sur une période de dix ans. Ces résultats ont été confirmés dans des modèles animaux de MA et MP.<sup>52,53</sup> Ces études ont également démontré un effet neuroprotecteur de la caféine.<sup>54</sup> Un essai clinique de phase III (NCT04570085), dirigé par l'équipe du Dr. David Blum (Centre de Recherches Lille Neurosciences & Cognition), est actuellement en cours pour évaluer l'effet de la caféine sur le déclin cognitif chez des patients atteints de la MA.<sup>55</sup> Les résultats de cette étude sont attendus pour 2026. Les résultats prometteurs de la caféine sur les récepteurs A<sub>2A</sub> dans diverses pathologies soulignent ainsi l'intérêt thérapeutique des antagonistes du récepteur A<sub>2A</sub>.

## 1.2. Maladies neurodégénératives

Les maladies neurodégénératives forment un ensemble diversifié de pathologies complexes, caractérisées par une perte de neurones et une dégénérescence progressive affectant différentes régions du système nerveux. Ces maladies représentent la première cause de démence dans le monde et sont actuellement incurables, justifiant ainsi la recherche de nouvelles approches thérapeutiques et le développement de nouveaux candidats-médicaments. Les antagonistes du récepteur A<sub>2A</sub> sont apparus comme ayant un potentiel thérapeutique pour ces maladies.

### 1.2.1. Maladie de Parkinson

Les antagonistes du récepteur A<sub>2A</sub> ont, dans un premier temps, été étudiés pour le traitement de la maladie de Parkinson. La MP est une pathologie neurodégénérative progressive qui touche principalement le contrôle des mouvements. Elle résulte de la dégénérescence des neurones dopaminergiques due à l'accumulation de protéines telles que l' $\alpha$ -synucléine qui forme des corps de Lewy dans la substance noire du cerveau (**Figure 11**), une région clé pour la production de dopamine, un neurotransmetteur crucial pour la régulation des fonctions motrices.<sup>56</sup> Les symptômes cliniques de la MP se caractérisent par une triade : la bradykinésie/akinésie, la rigidité et les tremblements au repos.



**Figure 11. Processus d'agrégation de l' $\alpha$ -synucléine (Ray B. *et al.*, 2021).<sup>57</sup>**

Dans le contexte de la MP, les études sur la caféine ont révélé une réduction de 50% du risque de développer la pathologie chez les personnes consommant entre deux et quatre tasses de café par jour, par rapport à celles qui n'en consomment pas.<sup>58</sup> La caféine améliore également l'activité motrice altérée par la perte de dopamine et favorise la survie des neurones dopaminergiques grâce à ses propriétés neuroprotectrices. En outre, elle a été associée à une diminution de la perte de neurones dopaminergiques et à une réduction de la réponse inflammatoire, en agissant sur les récepteurs  $A_{2A}$ . L'effet bénéfique sur la motricité a été attribué à l'hétérodimérisation du récepteur  $A_{2A}$  avec le récepteur  $D_2$  de la dopamine, dont il antagonise les effets.<sup>27</sup> Ainsi, les antagonistes du récepteur  $A_{2A}$  pourraient accroître le signal dopaminergique  $D_2$ , offrant ainsi une approche thérapeutique pour la MP. L'effet protecteur serait attribuable à une modulation de la neuroinflammation dans la substance noire, grâce au blocage des récepteurs gliaux.<sup>59</sup>

Plusieurs antagonistes des récepteurs  $A_{2A}$  ont été développés pour le traitement de la MP, et certains ont atteint les phases II et III des essais cliniques comme le préladenant, le tozadenant, le vipadenant ou encore le ST-1535 (**Figure 12**). Malheureusement, des problèmes d'efficacité (préladenant) ou de toxicité (vipadenant et tozadenant) ont été rencontrés.<sup>60-62</sup> Le vipadenant a été arrêté en phase II à cause des résultats de toxicité obtenus lors des tests toxicologiques précliniques.<sup>16</sup> Le tozadenant, quant à lui, a été suspendu en phase III pour cause de septicémies associées à l'agranulocytose ayant entraîné la mort chez cinq patients.<sup>63</sup> Actuellement, l'istradefylline est le seul antagoniste  $A_{2A}$  disponible à la commercialisation au Japon et aux États-Unis (**Figure 12**). Utilisé en association avec la lévodopa, un précurseur de la dopamine, l'istradefylline améliore l'activité motrice sans entraîner de dyskinésies.<sup>64</sup>

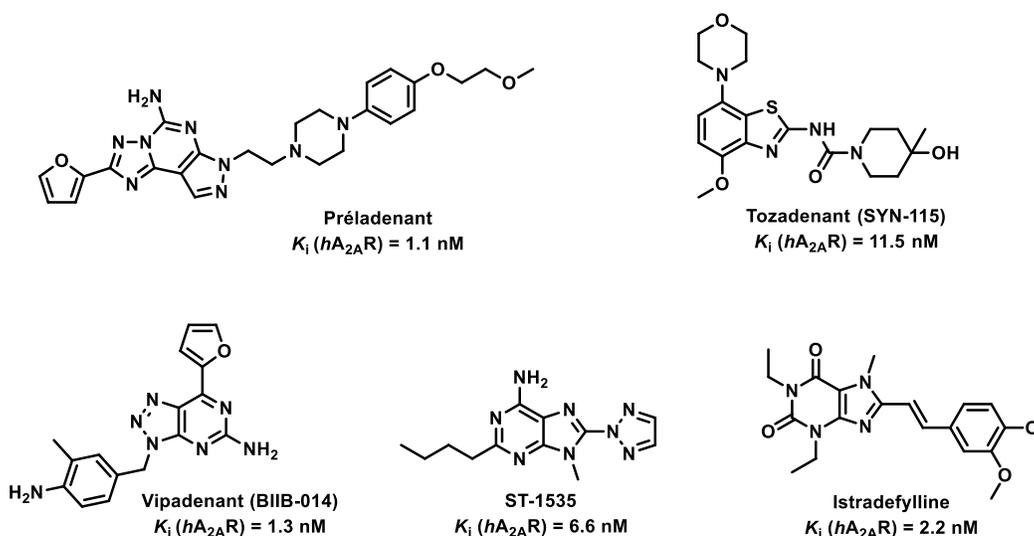
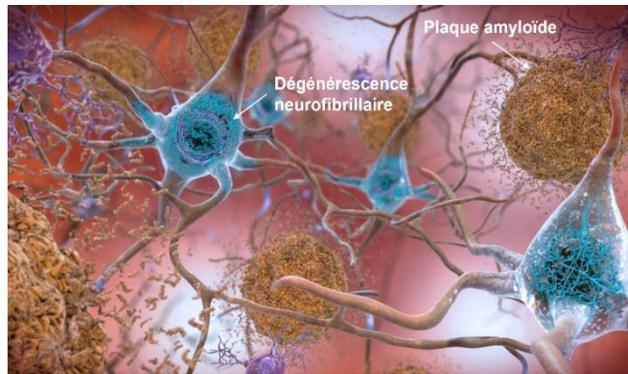


Figure 12. Structure des antagonistes du récepteur  $A_{2A}$ .

Les travaux réalisés sur la caféine dans le contexte de la MP et la commercialisation de l'istradefylline mettent en lumière l'intérêt thérapeutique des antagonistes  $A_{2A}R$  pour cette pathologie. Les difficultés rencontrées lors des essais cliniques de certains composés, tels que le préladénant et le vipadénant, soulignent la nécessité de poursuivre le développement de nouveaux antagonistes des récepteurs  $A_{2A}$ .

### 1.2.2. Maladie d'Alzheimer

La MA est une maladie neurodégénérative progressive qui constitue la cause de démence la plus courante.<sup>65</sup> Elle est caractérisée par une détérioration de la mémoire, des capacités cognitives et du comportement. De nombreux facteurs interviennent dans le développement de la MA mais elle est principalement causée par deux lésions (**Figure 13**) : l'agrégation de plaques de protéines bêta amyloïdes<sup>66</sup> (pathologie amyloïde) et la dégénérescence neurofibrillaire<sup>67</sup> (pathologie Tau). Les symptômes cliniques de la maladie d'Alzheimer incluent une perte de mémoire, des troubles cognitifs, une altération des capacités fonctionnelles ou encore des troubles du langage.<sup>68</sup>



**Figure 13. Plaques bêta amyloïdes et dégénérescence neurofibrillaire dans le cerveau.<sup>69</sup>**

De même que pour la MP, la caféine a montré des effets bénéfiques sur les symptômes de la MA. Depuis plusieurs années, il a été démontré que la caféine joue un rôle important dans l'amélioration de la mémoire et de l'apprentissage, comme le montrent divers tests comportementaux.<sup>51</sup> De nombreuses études ont ainsi établi un lien entre la consommation de café, le déclin cognitif et la MA. Les études épidémiologiques ont révélé que les personnes consommant entre trois et cinq tasses de café par jour présentent un risque réduit de 65% de développer la maladie d'Alzheimer par rapport à celles qui en boivent peu ou pas du tout.<sup>70</sup> De plus, cette consommation de café est liée à un ralentissement du déclin de la mémoire verbale et visuelle chez les individus de plus de 65 ans. Des travaux réalisés au sein de l'équipe « Alzheimer & Tauopathies » du Centre de Recherches Lille Neurosciences & Cognition ont démontré que le blocage sélectif des récepteurs  $A_{2A}$  atténue les troubles de la mémoire dans des modèles transgéniques reproduisant la pathologie amyloïde ou le développement de la pathologie Tau.<sup>52</sup> Les améliorations semblent être associées à une réduction de la charge lésionnelle (plaques amyloïdes et hyperphosphorylation de Tau) et de la neuroinflammation associée. Il a également été démontré que le traitement à la caféine réduit la phosphorylation de la protéine Tau dans des modèles cellulaires et animaux. Ces études confirment que le récepteur  $A_{2A}$  constitue une cible thérapeutique prometteuse pour la MA, tout en suggérant que ce récepteur joue un rôle clé dans le développement physiopathologique de la maladie. Les effets bénéfiques observés avec la caféine et les antagonistes du récepteur  $A_{2A}$  semblent provenir de la réduction de son activité dérégulée.

Le blocage du récepteur  $A_{2A}$  dans les modèles des maladies de Parkinson et d'Alzheimer semble avoir des effets plurimodaux, en agissant sur divers processus responsables des troubles moteurs et cognitifs associés à ces pathologies. L'utilisation d'antagonistes du récepteur  $A_{2A}$  semble offrir un potentiel thérapeutique prometteur, se montrant comme une approche intéressante pour le traitement des MND.

### 1.3. Cancers

Comme évoqué précédemment, les antagonistes du récepteur  $A_{2A}$  ont initialement été développés pour traiter les MND. Toutefois, ces dernières années, leur utilisation s'est étendue à d'autres domaines thérapeutiques, notamment en cancérologie.

Comme mentionné plus haut, le préladenant (**Figure 12**) a montré des résultats décevants en termes d'efficacité. Ces résultats ont posé question et ont remis en cause l'intérêt de cibler sélectivement les  $A_{2A}$ R seulement dans le traitement des maladies neurodégénératives. Ainsi, les antagonistes  $A_{2A}$ R ciblant le SNC pourraient être utilisés et réorientés dans le domaine de la cancérologie.<sup>41</sup> En effet, il a été montré que la signalisation des  $A_{2A}$ R apparaît comme une nouvelle voie de point de contrôle immunitaire.

Après la radiothérapie/chimiothérapie et la pharmacothérapie ciblée, l'immunothérapie du cancer est devenue la troisième stratégie révolutionnaire de lutte contre les maladies néoplasiques.<sup>71</sup> Il existe plusieurs types d'immunothérapies du cancer dont font partie les inhibiteurs de point de contrôle immunitaire. Ces dernières années, le blocage des voies de contrôle immunitaire a révolutionné la thérapie du cancer.<sup>72</sup> Les points de contrôle immunitaires désignent l'ensemble des voies inhibitrices que les cellules immunitaires possèdent pour réguler et contrôler la durabilité de la réponse immunitaire tout en maintenant l'autotolérance.<sup>73</sup> Deux anticorps bloquant deux récepteurs de contrôle différents ont été approuvés par la Food and Drug Administration (FDA) pour un usage clinique : un anticorps anti-CTLA-4 (antigène 4 associé aux lymphocytes T cytotoxiques) et un anticorps anti-PD-L1 (ligand de mort cellulaire programmée 1).

Le ciblage de la voie adénosine- $A_{2A}$ R est l'une des rares nouvelles approches très prometteuses en cancérologie. L'adénosine extracellulaire se lie aux  $A_{2A}$ R à la surface des cellules immunitaires et active la voie de l'AMPc en aval, ce qui pourrait conduire à l'inhibition de l'activation et de l'expansion des cellules T.<sup>74</sup> La voie adénosine- $A_{2A}$ R joue un rôle dans le contrôle des dommages inflammatoires causés par les cellules immunitaires anti-pathogènes hyperactives et réduit également les dommages causés aux tissus cancéreux par les cellules tueuses anti-tumorales. Des études ont montré que le microenvironnement des tumeurs solides présente souvent une hypoxie transitoire ou chronique, ce qui facilite l'accumulation d'adénosine extracellulaire. Cet excès d'adénosine devient donc disponible pour les cellules tumorales, les fibroblastes liés au cancer et certaines cellules immunitaires. Lorsque l'adénosine se lie au récepteur  $A_{2A}$ , elle active la signalisation AMPc-PKA, ce qui aide à réguler le système immunitaire. L'activation du récepteur  $A_{2A}$  est donc à l'origine de l'immunosuppression primaire dans le microenvironnement tumoral (**Figure 14**).

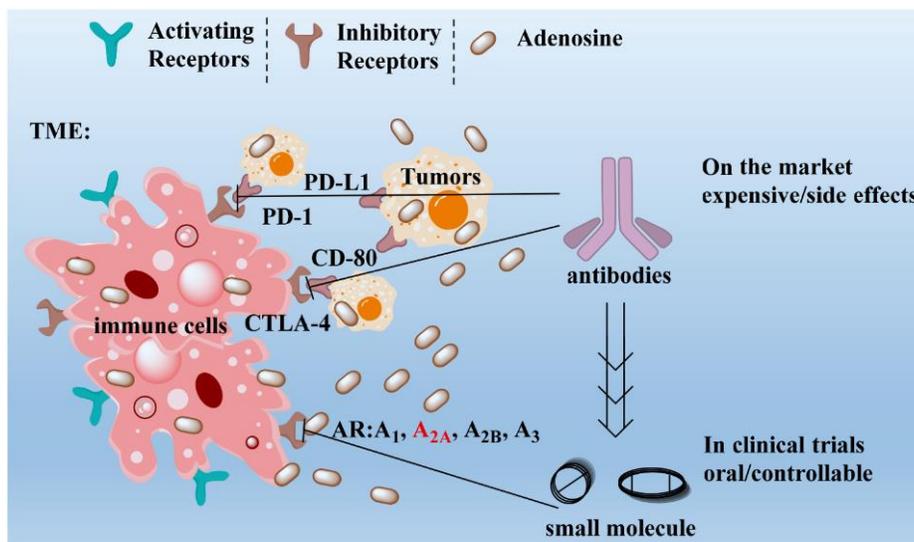


Figure 14. Voies de signalisation du point de contrôle immunitaire dans le microenvironnement tumoral (Yu F. *et al.*, 2020).<sup>41</sup>

Afin d'inhiber les effets immunosuppresseurs dans le microenvironnement tumoral du récepteur  $A_{2A}$ , de nombreux antagonistes  $A_{2A}R$  ont été repositionnés ou conçus et testés sur différentes lignées cancéreuses. Plusieurs études ont montré que certains antagonistes possèdent un effet anti-tumoral. Arcus Biosciences a développé un antagoniste  $A_{2A}R$ , l'etrumadenant (AB928), exerçant des effets anti-tumoraux significatifs sur les modèles de mélanome B16-F10 ou de tumeur AT3-OVA (Figure 15).<sup>75</sup> L'EXS21546 (structure non publiée), conçu par Evotec et Exscientia, entraîne une réduction de la fraction viable des cellules tumorales et augmente la fraction et le nombre relatif de cellules  $CD8^+T$  viables sur des modèles utilisant des épanchements pleuraux malins.<sup>76</sup>

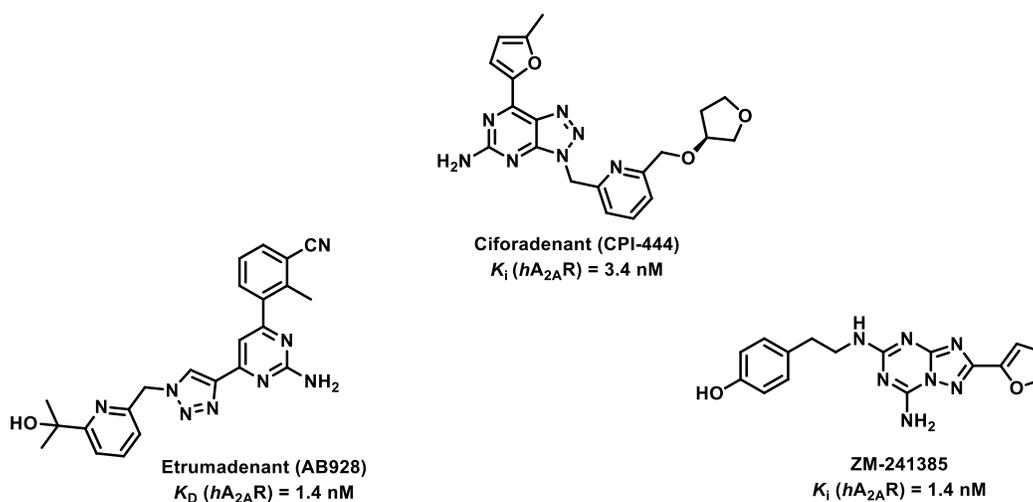


Figure 15. Structure de l'etrumadenant, du ciforadenant et du ZM-241385.

Le blocage du récepteur  $A_{2A}$  par le ciforadenant, un composé de la même famille que le vipadenant et développé par Vernalis, entraîne une inhibition dose-dépendante de la croissance tumorale dans divers modèles de tumeurs syngéniques chez la souris.<sup>77</sup> En raison de ses effets anti-tumoraux, qu'il soit utilisé seul ou en combinaison avec d'autres inhibiteurs de points de contrôle immunitaire, et suite à une étude de phase I sur la pharmacocinétique chez des sujets sains (NCT03237988), le ciforadenant fait actuellement l'objet d'un essai de phase Ib/II portant sur sa sécurité et sa tolérabilité dans les cancers avancés.<sup>78,79</sup> Par ailleurs, l'antagoniste ZM-241385, souvent utilisé comme composé de référence dans les études sur le récepteur  $A_{2A}$ , a montré qu'il ralentit la croissance du mélanome CL8-1 chez la souris tout en augmentant les niveaux de cellules T anti-tumorales endogènes.<sup>80,81</sup> Ces résultats montrent donc que les antagonistes  $A_{2A}$ R peuvent être appliqués en cancérologie en parallèle des neurosciences.

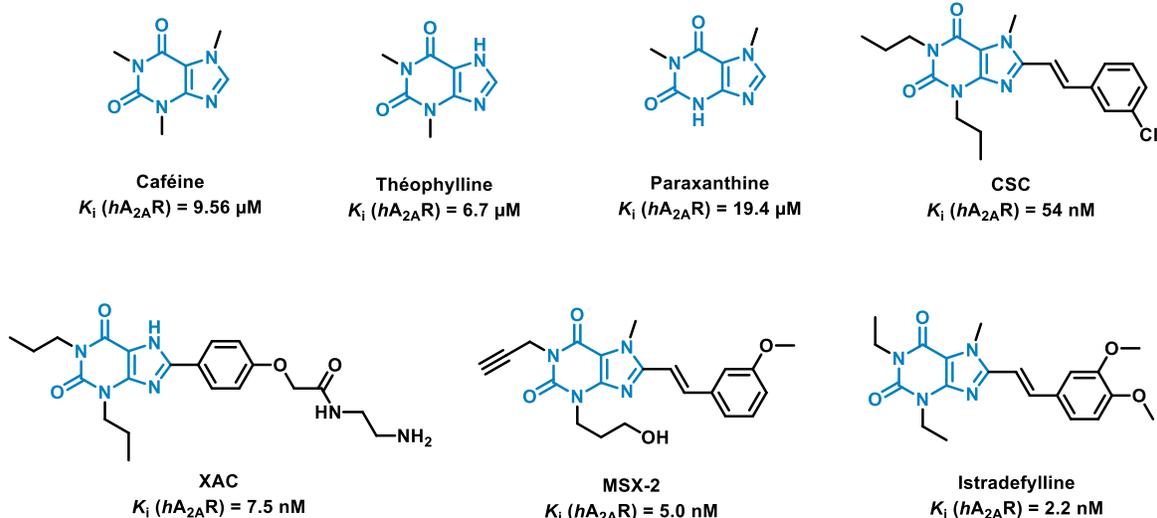
Le récepteur  $A_{2A}$  de l'adénosine représente une cible thérapeutique de premier intérêt. Il joue un rôle clé dans divers processus biologiques, tant en neurosciences qu'en cancérologie. Son inhibition par des antagonistes produit de nombreux effets bénéfiques, ce qui en fait des candidats prometteurs pour de futurs traitements dans plusieurs pathologies.

#### IV. Les antagonistes du récepteur $A_{2A}$

Les antagonistes du récepteur  $A_{2A}$  sont impliqués dans de nombreuses pathologies, ce qui explique que leur conception ait été étudiée depuis des décennies. De nombreux antagonistes ont ainsi été développés et répertoriés dans la littérature. Il existe une différence structurelle notable entre les agonistes et les antagonistes du récepteur  $A_{2A}$  : les agonistes possèdent une fonction ose absente chez les antagonistes. Les antagonistes sont généralement classés en deux grandes familles : les composés de type « xanthines-like » et ceux de type « non xanthines-like ». Les composés de type « xanthines-like » sont dérivés de la structure de la caféine. Cette partie présentera les différentes familles d'antagonistes.

##### 1. Les dérivés « xanthines-like »

Le motif xanthine, que l'on retrouve dans la structure de la caféine, a servi de point de départ pour développer des antagonistes du récepteur  $A_{2A}$  (**Figure 16**). La caféine agit en bloquant, de manière non sélective et avec une faible affinité, les récepteurs  $A_1$ ,  $A_{2A}$  et  $A_{2B}$ . Malgré ce manque de sélectivité, elle continue de faire l'objet d'études en raison de son potentiel thérapeutique dans le traitement de la MA et de la MP. Un essai clinique de phase III est actuellement en cours pour évaluer l'effet de cette molécule sur le déclin cognitif chez les patients atteints de la MA.<sup>55</sup> L'analogue de la caféine, la théophylline et son métabolite, la paraxanthine, sont également des antagonistes non sélectifs du récepteur  $A_{2A}$ . Leur effet permettrait de diminuer le risque de développer la MP.<sup>82</sup>



**Figure 16. Structures de ligands antagonistes du récepteur  $A_{2A}$  de type « xanthines-like ».**

Le premier antagoniste sélectif pour  $A_{2A}R$ , présentant une affinité nanomolaire, est un dérivé de la caféine : la 8-phényl-1,3-dipropylxanthine (**XAC**). Cette molécule est utilisée comme antagoniste de référence des  $A_{2A}R$  et également utilisée en tant que « radioligand ». <sup>83</sup> Diverses modifications, notamment l'ajout d'une chaîne styryle en position 8 de la structure xanthine, ont conduit à la synthèse d'antagonistes prometteurs tels que le **CSC**, le **MSX-2** et l'**istradefylline**. A l'heure actuelle, l'**istradefylline** est le seul antagoniste  $A_{2A}R$  qui a obtenu une autorisation pour son utilisation comme médicament antiparkinsonien au Japon et aux Etats-Unis en co-thérapie avec la lévodopa. <sup>64</sup> Ces trois composés et leurs dérivés appartiennent à la famille des 8-(E)-styrylxanthines. Toutefois, des précautions sont nécessaires car ces dérivés s'isomérisent en solution, produisant un mélange d'isomères (E) et (Z), l'isomère (Z) étant inactif. <sup>84</sup> De plus, sous l'effet de la lumière, les styrylxanthines peuvent se dimériser à l'état solide *via* une cycloaddition [2+2] sur la double liaison. Il est donc important de les stocker à l'abri de la lumière. De plus, ces dérivés présentent une faible solubilité. Pour surmonter ces limitations, d'autres structures, « non xanthines-like », ont été développées.

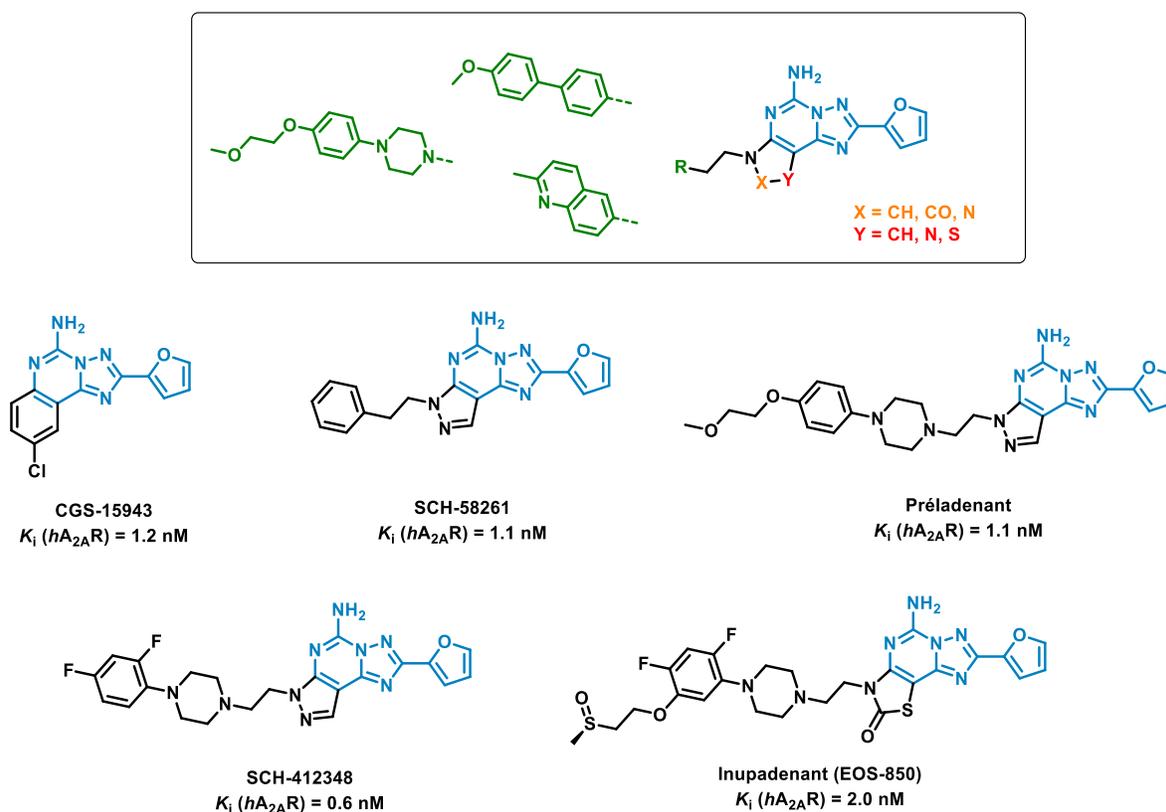
## 2. Les dérivés « non xanthines-like »

De nouveaux antagonistes du récepteur  $A_{2A}$  « non xanthines-like » ont été mis au point, présentant des structures à base de mono-, di- ou tri-hétérocycles.

### 1.1. Antagonistes tricycliques

La principale famille de composés tricycliques antagonistes du récepteur  $A_{2A}$  est celle des pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidines (PTP). Le dérivé **CGS-15943** est considéré comme le composé parent de cette famille (**Figure 17**). <sup>85</sup> Bien qu'il présente une affinité nanomolaire pour le récepteur  $A_{2A}$ , sa sélectivité

envers les autres récepteurs à l'adénosine est faible, ce qui en fait un point de départ intéressant pour une optimisation plus approfondie. Les modulations réalisées sur ce composé ont conduit à l'identification de la molécule **SCH-58261**.<sup>86</sup> Ce composé a montré des résultats prometteurs dans un modèle de la MP, mais il présentait une faible solubilité et une inactivité lorsqu'administré par voie orale. Cela n'a cependant pas empêché l'utilisation de ce composé comme pharmacophore dans la conception de « radioligands », de molécules pour l'imagerie de tomographie par émission de positons (TEP), ainsi que pour la synthèse de sondes fluorescentes *via* la substitution du groupement phényle par des substituants appropriés.<sup>87,88</sup> **SCH-58261** présente également des effets anti-tumoraux dans divers modèles de cancer.<sup>41</sup> Par exemple, son utilisation a permis de réduire les métastases dans des cancers du sein et des mélanomes. En raison de ses propriétés, il est aujourd'hui employé comme outil pharmacologique dans différents modèles tumoraux.



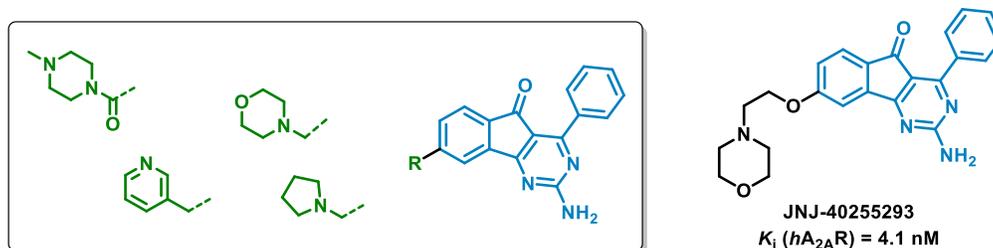
**Figure 17. Structures des antagonistes  $A_{2A}R$  de la famille des triazolopyrimidines.**

Différentes pharmacomodulations ont été réalisées à partir du composé **SCH-58261**, dont certaines sont représentées sur la **Figure 16**, à partir du pharmacophore triazolopyrimidine. L'ajout d'un groupement aryl-pipérazine s'est révélé particulièrement efficace pour améliorer la solubilité des composés, grâce à sa capacité à former des sels de chlorhydrate. Cette approche a conduit au développement du candidat

clinique **préladenant**, qui a montré une sélectivité 1600 fois supérieure pour le récepteur  $A_{2A}$  vis-à-vis du récepteur  $A_1$ .<sup>89</sup> De plus, ce dernier réverse la catalepsie induite par l'halopéridol de 77% dans des modèles de rats parkinsoniens, en plus d'être actif par voie orale.<sup>90</sup> Même si ce composé a atteint les essais cliniques de phase II, les études ont été interrompues par manque d'efficacité de la molécule en monothérapie pour le traitement de la MP. D'autres modifications apportées au composé **SCH-58261** ont conduit au dérivé **SCH-412348**, qui présente une bonne sélectivité et une activité anti-cataleptique relativement durable chez le rat. Cependant, aucune de ces modulations, y compris celle-ci, n'a surpassé les résultats obtenus avec le **préladenant**.

Plus récemment, des dérivés PTP ont été développés dans le domaine de l'oncologie par le groupe iTeos.<sup>91</sup> Ce développement a permis l'identification d'un antagoniste  $A_{2A}R$  très puissant, l'**inupadénant**. Cette molécule démontre une bonne sélectivité pour le récepteur  $A_{2A}$ , ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique (BHE) et inhibe l'AMPC dans le microenvironnement tumoral. Cela a conduit à une inhibition de la croissance tumorale avec un taux de réponse complète et a induit une mémoire immunologique dans le modèle murin EMT-6.<sup>92</sup> L'**inupadénant** est actuellement en essai clinique de phase II afin d'évaluer son efficacité et sa sécurité en association avec la chimiothérapie chez les adultes atteints de cancer du poumon non à petites cellules métastatique ayant progressé après une immunothérapie.

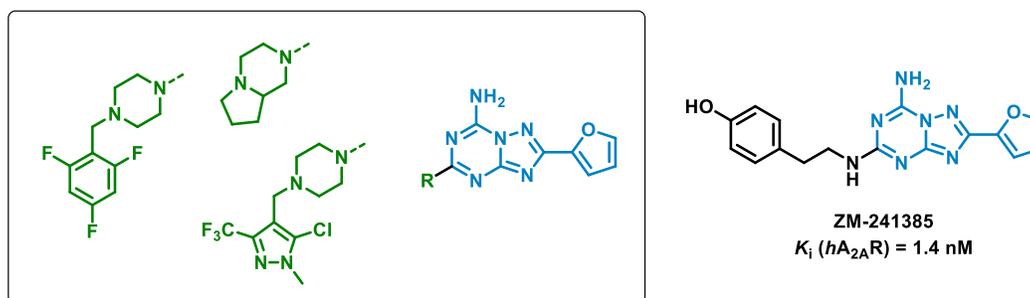
Grâce à un criblage réalisé par le groupe Janssen, une nouvelle famille de composés tricycliques, les aryles indénopyrimidines, a été développée (**Figure 18**).<sup>93,94</sup> L'optimisation de ces composés a conduit à la création d'antagonistes puissants à double affinité pour les récepteurs  $A_1/A_{2A}$ . C'est ainsi que le composé **JNJ-40255293** a été identifié. Cette molécule a démontré une activité *in vivo*, affichant ainsi un profil pharmacocinétique prometteur chez la souris, le rat et le singe. Des études précliniques menées chez le rat ont révélé que **JNJ-40255293** améliorait les fonctions cognitives grâce à son interaction avec le récepteur  $A_1$ , augmentait l'activité motrice par blocage du récepteur  $A_{2A}$ .<sup>95</sup> Malgré des résultats prometteurs, le développement de ce composé a été interrompu en raison de problèmes de toxicité observés lors des études précliniques.



**Figure 18. Structures des antagonistes  $A_{2A}R$  de la famille des indénopyrimidines.**

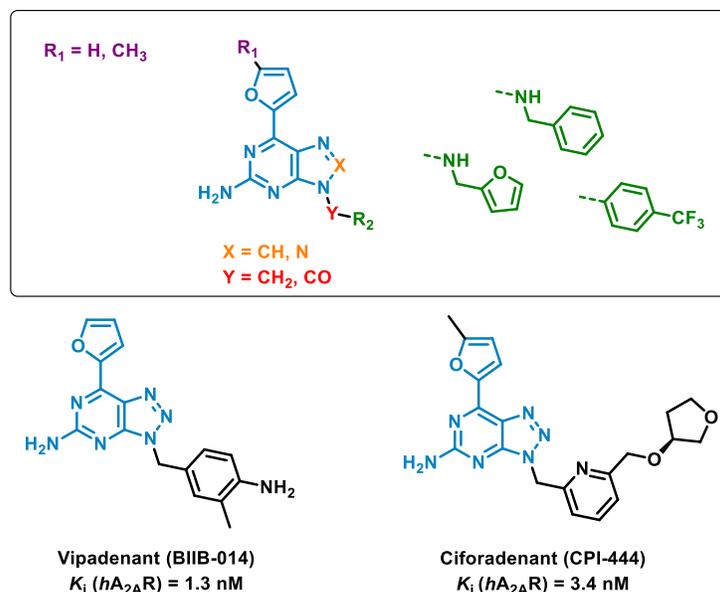
## 1.2. Antagonistes bicycliques

En raison de la faible solubilité et des difficultés de synthèse des composés trihétérocycliques, le groupe Zeneca a développé en 1995 un composé bicyclique triazolo-triazine, le **ZM-24138**, appartenant à la famille des 1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidines (**Figure 19**).<sup>96</sup> Cette molécule est largement utilisée comme outil pharmacologique et a permis d'obtenir la première structure co-cristallisée du récepteur  $A_{2A}$ . Tout comme le **SCH-58261**, le **ZM-241385** est également utilisé en tant qu'outil pharmacologique dans divers modèles de tumeurs.<sup>80,81</sup> Afin d'optimiser ses propriétés en tant que candidat médicament, des modifications ont été apportées afin d'améliorer sa biodisponibilité orale, sa capacité à traverser la BHE et son efficacité *in vivo*.<sup>97</sup> Cependant, aucune de ces modifications n'a permis d'obtenir de nouveaux candidats médicament à cause de faibles solubilités et de problèmes métaboliques persistants.



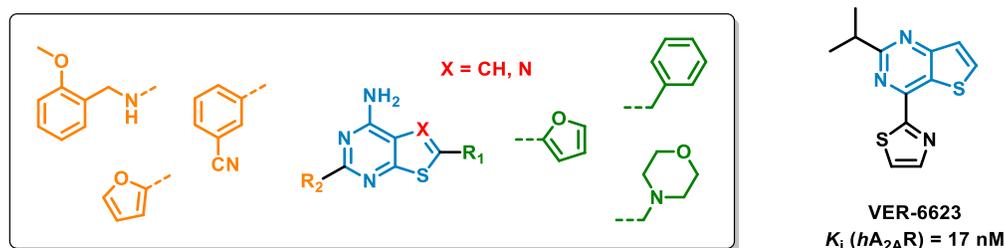
**Figure 19. Structures des antagonistes  $A_{2A}R$  de la famille des 1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidines.**

De nombreux dérivés purines ont été développés en tant qu'antagonistes du récepteur  $A_{2A}$  (**Figure 20**). La présence d'une amine libre et d'un groupement furane ou 5-méthylfurane sur le noyau purine a permis l'obtention de plusieurs molécules ayant une affinité nanomolaire. Une série de ces dérivés a été développée par Vernalis, possédant un squelette 2-amino-6-furyl-9-carboxamide.<sup>98</sup> Ces analogues ont conduit à l'identification du **vipadenant**. Ce dernier a démontré une efficacité clinique lors des essais de phase I/II, aussi bien en monothérapie qu'en combinaison avec la lévodopa pour le traitement de la MP. Cependant, Vernalis et Biogen ont décidé de suspendre son développement au profit du composé **ciforadenant**, en raison de problèmes de toxicité observés lors des tests toxicologiques précliniques. Ce composé de deuxième génération a montré un profil pharmacocinétique et de sécurité prometteur lors d'un essai de phase I chez des volontaires sains.<sup>99</sup> Malheureusement, cet essai a été interrompu en raison d'effets secondaires observés chez les volontaires sains. Cependant, le **ciforadenant** montre également des propriétés anti-tumorales et est donc réévalué comme point de contrôle immunitaire. Il est actuellement étudié, que ce soit en monothérapie ou en combinaison, dans le cadre d'un essai de phase Ib/II visant à évaluer sa sécurité et sa tolérabilité dans les cancers avancés.<sup>78,79</sup>



**Figure 20. Structures des antagonistes  $A_{2A}R$  de la famille des purines.**

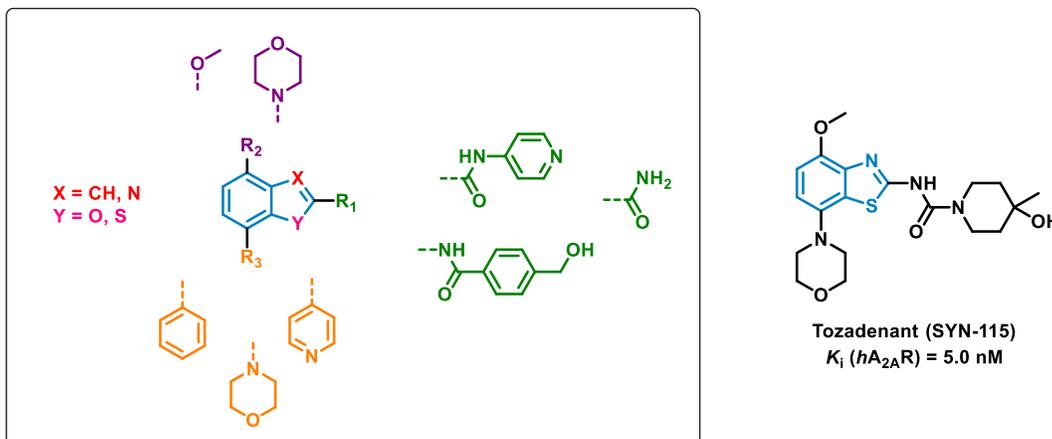
Les composés thiénoypyrimidines et thiazolopyrimidines, possédant une structure très similaire, se sont également révélés être de puissants antagonistes des  $A_{2A}R$  (**Figure 21**). Grâce à une approche *de novo*, les laboratoires J&J ont identifié et développé une série de thiénoypyrimidines ayant une activité antagoniste  $A_{2A}R$ .<sup>100</sup> Ces composés démontrent une grande capacité à traverser la BHE et affichent une activité *in vitro*, ainsi qu'une bonne efficacité dans l'inversion de la catalepsie induite par l'halopéridol chez les souris dans des modèles parkinsoniens. Des modulations sur cette famille chimique réalisées par le groupe Vernalis a permis d'identifier le composé **VER-6623**.<sup>101</sup> Cependant, ce composé présente une sélectivité modérée sur  $A_{2A}R$  vis-à-vis du récepteur  $A_1$  et une biodisponibilité orale médiocre.



**Figure 21. Structures des antagonistes  $A_{2A}R$  de la famille des thiénoypyrimidines et thiazolopyrimidines.**

D'autres composés bicycliques ont été développés et se sont révélés intéressants : les benzofuranes et les benzothiazoles (**Figure 22**). Un criblage à haut débit réalisé par le groupe Kyowa Hakko a permis d'identifier des composés benzofuraniques présentant une affinité subnanomolaire pour le récepteur  $A_{2A}$  et une inhibition allant jusqu'à 76% de la catalepsie avec un effet positif durable sur le handicap moteur et

l'activité locomotrice dans un modèle animal parkinsonien.<sup>102</sup> Certains composés présentent également une bonne solubilité et une stabilité métabolique, ainsi qu'une sélectivité satisfaisante.



**Figure 22. Structures des antagonistes  $A_{2A}R$  de la famille des benzofuranes et des benzothiazoles.**

Le squelette benzothiazole est également caractéristique de puissants antagonistes  $A_{2A}R$  développés par Roche dans plusieurs brevets.<sup>103</sup> Le dérivé morpholine **SYN115**, également connu sous le nom de **tozadenant**, est le membre le mieux caractérisé de cette classe de composés. Son profil pharmacologique *in vitro* et *in vivo*, ainsi que ses propriétés pharmacocinétiques et son efficacité sur le syndrome parkinsonien chez les animaux et les humains, ont été largement examinés. Le **tozadenant** a été évalué dans deux essais de phase II pour la MP, mais son développement a été suspendu en phase III en raison de septicémies liées à l'agranulocytose ayant entraîné la mort de cinq patients.<sup>62</sup> Malgré l'interruption de cet essai clinique, de nouvelles études ont montré que le **tozadenant** avait un effet anti-tumoral en inhibant la croissance de carcinome mammaire.<sup>104</sup>

En 2018, le groupe Arcus a publié deux brevets sur la famille des composés quinazoliques (**Figure 23**).<sup>105</sup> Ces composés se sont révélés efficaces dans le traitement du cancer en tant qu'antagonistes duaux des récepteurs  $A_{2A}$  et  $A_{2B}$ , avec des affinités subnanomolaires. Ces résultats soulignent l'intérêt des quinazolines en tant qu'antagonistes du récepteur  $A_{2A}$ .

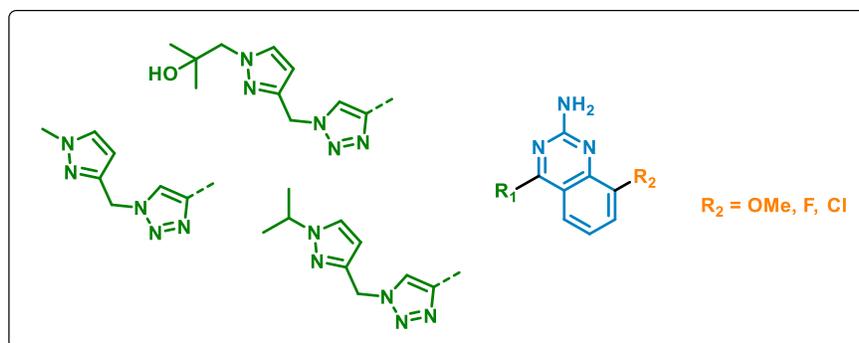
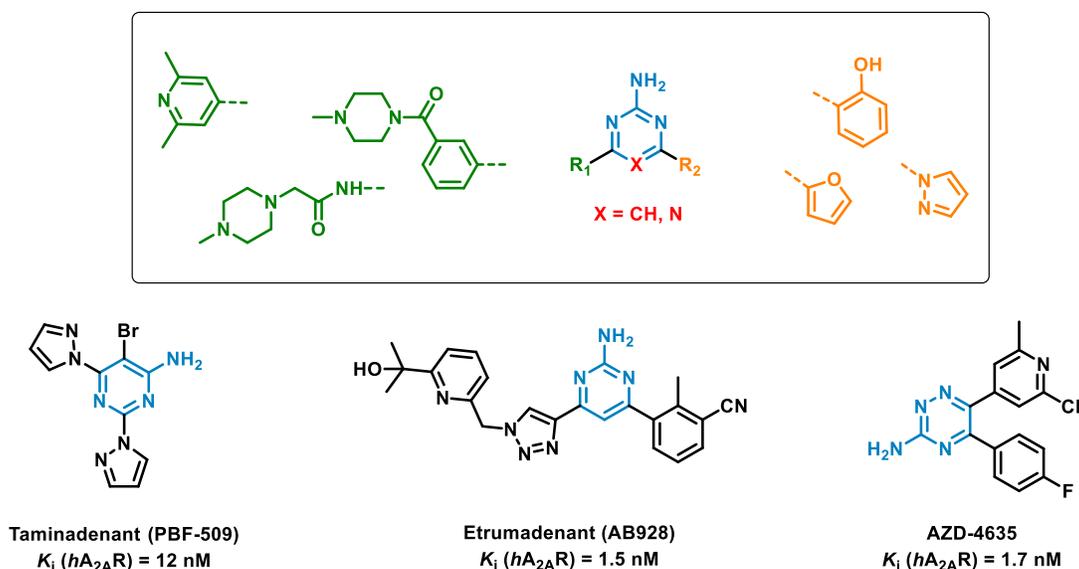


Figure 23. Structures des antagonistes  $A_{2A}R$  de la famille des quinazolines.

### 1.3. Antagonistes monocycliques

Les composés monocycliques de type pyrimidines et triazines (y compris leurs différents isomères) se sont révélés être des antagonistes puissants du récepteur  $A_{2A}$  (**Figure 24**).<sup>106–108</sup> Des composés pyrimidiques ont été développés par Palobiofarma, révélant ainsi une molécule très prometteuse, le **taminadenant**, qui présente une affinité de 12 nM pour le récepteur  $A_{2A}$ . Ce composé est capable d'inverser les déficiences motrices dans plusieurs modèles de troubles du mouvement chez le rat, notamment la catalepsie, les tremblements et l'hémi-parkinsonisme. Sur la base de ces résultats précliniques encourageants, un essai clinique de phase I a été mené, validant ainsi la sécurité, la tolérabilité et le profil pharmacocinétique du **taminadenant** chez des volontaires sains.<sup>109</sup> En plus de son effet sur les troubles liés à la MP, le **taminadenant** réduit également la croissance tumorale dans des modèles de souris.<sup>110</sup> Un essai clinique de phase II est actuellement en cours sur ce composé afin de valider son activité anti-tumorale chez des patients atteints d'un cancer du sein.



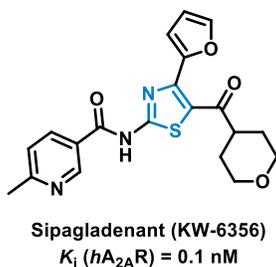
**Figure 24. Structures des antagonistes A<sub>2A</sub>R de la famille des pyrimidines.**

Le groupe Arcus Biosciences a également développé des antagonistes A<sub>2A</sub>R de type pyrimidique, tels que l'**etrumadenant**. Ce composé a montré des effets anti-tumoraux significatifs sur les modèles de mélanome B16-F10 ou de tumeur AT3-OVA.<sup>75</sup> Lors d'une étude de phase I, les résultats ont montré que l'**etrumadenant**, en combinaison avec la chimiothérapie, présentait des profils de sécurité et de pharmacocinétique favorables, conduisant à une réponse tumorale et à une stabilisation de la maladie chez les patients atteints de tumeurs avancées. Actuellement, sept essais de phase I/II sur l'**etrumadenant** sont en cours de recrutement pour évaluer sa sécurité, sa tolérabilité et son utilisation en thérapie combinée chez des patients atteints de divers cancers.

Concernant les dérivés triazines, plusieurs modulations ont permis d'obtenir le composé **AZD4635**. Récemment, la structure co-cristallisée de l'**AZD4635** a été résolue au sein du récepteur A<sub>2A</sub> (PDB : 6GT3). L'**AZD4635** se lie au récepteur avec une affinité de 1,7 nM et a montré une excellente sélectivité par rapport aux autres récepteurs à l'adénosine. *In vitro*, ce composé a supprimé de façon significative la croissance tumorale en combinaison avec un point de contrôle immunitaire. Ce composé a été licencié à AstraZeneca pour des essais cliniques en immuno-oncologie chez des patients atteints de tumeurs solides avancées.<sup>41</sup> Grâce à son excellent profil pharmacocinétique, l'**AZD4635** est actuellement évalué dans un essai clinique de phase II en combinaison avec une immunothérapie chez des patients atteints d'un cancer de la prostate métastatique progressif.<sup>111</sup>

Enfin, au Japon, un nouvel antagoniste A<sub>2A</sub>R basé sur un noyau thiazole a récemment été développé pour le traitement de la MP : le **sipagladenant (Figure 25)**.<sup>112</sup> En plus de son affinité subnanomolaire, ce

composé se distingue par une grande sélectivité pour le récepteur  $A_{2A}$ , bloquant non seulement la liaison de l'adénosine, mais inhibant également l'activité constitutive de ce récepteur. Le **sipagladenant** a démontré une activité antiparkinsonienne en monothérapie chez des primates atteints de la MP, sans provoquer de dyskinésie, et s'est révélé plus efficace que l'istradefylline.<sup>113</sup> Son efficacité et sa sécurité en monothérapie ont ensuite été confirmées lors d'un essai clinique de phase IIa chez des patients parkinsoniens. Un essai de phase IIb a également montré que le **sipagladenant**, utilisé en complément de la lévodopa, offrait une efficacité notable avec un profil de sécurité acceptable, justifiant ainsi la poursuite de son développement comme nouveau traitement contre la MP.<sup>114</sup> Ces résultats ravivent l'espoir pour l'utilisation des antagonistes  $A_{2A}R$  dans le traitement des maladies neurodégénératives.



**Figure 25. Structure du sipagladenant.**

Comme nous avons pu le voir dans cette partie, de nombreuses molécules dotées d'une affinité nanomolaire pour le récepteur  $A_{2A}$  ont déjà été développées. Cependant, la majorité d'entre elles rencontrent des problèmes tels qu'une toxicité, un manque d'efficacité ou des limitations pharmacocinétiques, notamment une faible solubilité, surtout dans les études liées aux MND. Notre défi consiste donc à identifier des ligands offrant un équilibre optimal entre affinité, propriétés pharmacocinétiques et caractéristiques physicochimiques.

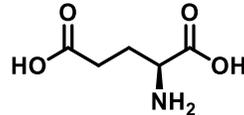
Comme mentionné précédemment, le récepteur  $A_{2A}$  peut former des hétérodimères avec le récepteur au glutamate  $mGlu_5$ . Cibler ces hétérodimères représente une nouvelle stratégie thérapeutique prometteuse, ce qui a motivé notre intérêt pour le récepteur  $mGlu_5$ . En effet, il est désormais reconnu qu'une approche multicible offre un avantage thérapeutique significatif dans le traitement des pathologies multifactorielles comme les maladies neurodégénératives.

## V. Les récepteurs au glutamate

Les récepteurs au glutamate font partie de la famille des RCPG, et leur ligand endogène est le glutamate.

### 1. Le glutamate

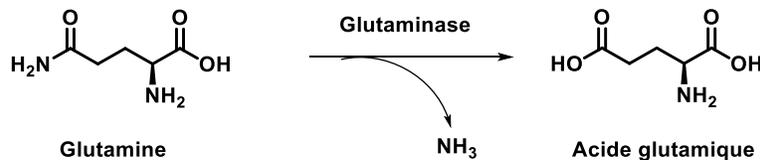
L'acide glutamique, appelé également glutamate sous sa forme anionique, est l'un des acides aminés non essentiels les plus présents dans la nature (**Figure 26**).<sup>115</sup> C'est un neurotransmetteur excitateur majeur dans le SNC où il joue un rôle essentiel dans la transmission des signaux entre les neurones.



**Figure 26. Structure de l'acide glutamique.**

Actif dans environ un tiers des synapses du SNC, le glutamate joue un rôle essentiel dans la maintenance et la plasticité synaptiques (la capacité des connexions entre neurones à se renforcer ou à s'affaiblir).<sup>116</sup> Il contribue à l'apprentissage et à la mémoire par des changements de l'efficacité synaptique dépendant de l'utilisation et joue un rôle dans la formation et la fonction du cytosquelette.

Le glutamate est principalement formé par une désamination oxydative de la glutamine, étant également un acide aminé, par l'enzyme glutaminase (**Figure 27**).<sup>117</sup> Cette réaction engendre la production d'ammoniaque qui devra être transporté vers les astrocytes afin d'être éliminé. Le glutamate, quant à lui, est ensuite stocké dans les vésicules des neurones glutaminergiques.



**Figure 27. Synthèse de l'acide glutamique à partir de la glutamine.**

Le glutamate exerce ses effets sur deux superfamilles de récepteurs : les récepteurs ionotropiques et les récepteurs métabotropiques. Les récepteurs ionotropiques sont composés des récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA),  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionate (AMPA) et les récepteurs kaïnates. Les récepteurs métabotropiques du glutamate (mGlu) sont des récepteurs couplés aux protéines G, comme les récepteurs à l'adénosine.

## 2. Classification des récepteurs métabotropiques du glutamate

Les récepteurs métabotropiques du glutamate sont au nombre de huit et sont classés en trois groupes (**Tableau 2**). Ils se distinguent par leur homologie de séquence, leur localisation (pré- et/ou post-synaptique), ainsi que par les voies de signalisation auxquelles ils sont associés.<sup>118</sup>

| Groupe     | Récepteur          | Localisation synaptique | Voie de signalisation   | Pathologies associées  |
|------------|--------------------|-------------------------|---|--|
| Groupe I   | mGluR <sub>1</sub> | Post-synaptique         | G <sub>q</sub><br>Stimulation PLC<br>Phosphorylation MAPK   | Schizophrénie, dépression, bipolarité                        |
|            | mGluR <sub>5</sub> |                         |   | Schizophrénie, anxiété, maladie d'Alzheimer, cancer          |
| Groupe II  | mGluR <sub>2</sub> | Pré- et post-synaptique | G <sub>i</sub><br>Inhibition adénylyl cyclase<br>Activation canaux K <sup>+</sup><br>Inhibition canaux Ca <sup>2+</sup> | Anxiété, maladie de Parkinson, épilepsie                     |
|            | mGluR <sub>3</sub> |                         |   | Schizophrénie, anxiété, maladie d'Alzheimer, dépression, AVC |
| Groupe III | mGluR <sub>4</sub> | Pré- et post-synaptique | G <sub>i</sub><br>Inhibition adénylyl cyclase<br>Activation canaux K <sup>+</sup><br>Inhibition canaux Ca <sup>2+</sup> | Maladie de Parkinson   |
|            | mGluR <sub>6</sub> | Post-synaptique         |   | Cancer de la prostate  |
|            | mGluR <sub>7</sub> | Pré- et post-synaptique |   | Schizophrénie, anxiété                                       |
|            | mGluR <sub>8</sub> | Pré-synaptique          |   | Maladie d'Alzheimer, maladie de Parkinson                    |

**Tableau 2. Les différents récepteurs métabotropiques du glutamate.**<sup>119</sup>

Le récepteur mGlu<sub>1</sub> a été découvert en premier et isolé pour la première fois par clonage d'expression, en 1991.<sup>120</sup> Le clonage des récepteurs mGlu suivants a donné lieu à une numérotation séquentielle et ces derniers ont été classés en trois groupes.

- Les récepteurs du groupe I, composé des récepteurs mGlu<sub>1</sub> et mGlu<sub>5</sub>, sont principalement localisés au niveau post-synaptique. Ils sont couplés à des protéines de type G<sub>q</sub> et activent la phospholipase C (**Figure 28**), ce qui entraîne l'hydrolyse des phosphatidylinositides et la génération d'inositol 1,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>) et de diacyl-glycérol (DAG). Cette voie classique conduit à la mobilisation du calcium et à l'activation de la PKC. Cependant, ces récepteurs peuvent également moduler d'autres voies de signalisation, y compris d'autres cascades en aval de G<sub>q</sub> ainsi que des voies issues de G<sub>i/o</sub>, G<sub>s</sub>, et d'autres molécules indépendantes des protéines G. Selon le type de cellule ou la population neuronale, les récepteurs mGlu du groupe I peuvent activer une série d'effecteurs en aval, y compris la phospholipase D, les voies des protéines kinases et les composants de la voie de

la protéine kinase activée par les mitogènes/récepteur extracellulaire kinase (MAPK/ERK). La voie MAPK/ERK est considérée comme particulièrement importante pour la régulation de la plasticité synaptique par les récepteurs mGlu du groupe I.

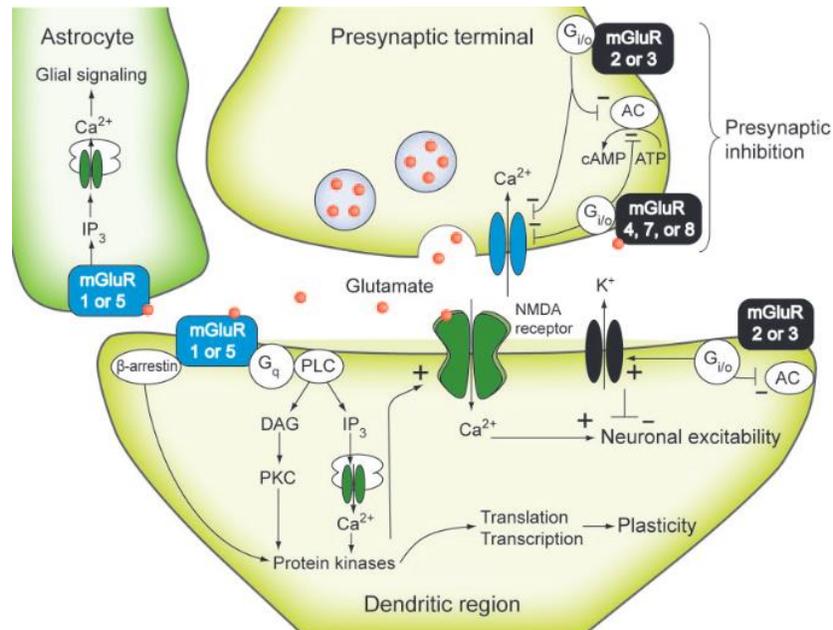


Figure 28. Synapse glutamatergique (Benarroch E. E., 2008).<sup>121</sup>

- Les récepteurs du groupe II (mGlu<sub>2</sub> et mGlu<sub>3</sub>) et du groupe III (mGlu<sub>4</sub>, mGlu<sub>6</sub>, mGlu<sub>7</sub> et mGlu<sub>8</sub>) sont localisés au niveau pré- et post-synaptique. Contrairement aux récepteurs du groupe I, ils sont couplés principalement aux protéines G<sub>i/o</sub>. Les récepteurs liés aux protéines G<sub>i/o</sub> sont classiquement couplés à l'inhibition de l'adénylyl cyclase et régulent directement les canaux ioniques et d'autres partenaires de signalisation en aval *via* la libération de sous-unités Gβγ. Comme pour les récepteurs mGlu du groupe I, les récepteurs des groupes II et III sont également couplés à d'autres voies de signalisation, y compris l'activation des voies MAPK et IP<sub>3</sub>, ce qui rend encore plus complexes les mécanismes par lesquels ces récepteurs peuvent réguler la transmission synaptique.

### 3. Intérêt thérapeutique des récepteurs métabotropiques du glutamate

Du fait de leur grande diversité et leur distribution hétérogène, les récepteurs métabotropiques du glutamate présentent un intérêt thérapeutique majeur en raison de leur rôle crucial dans la modulation de la neurotransmission et de la plasticité synaptique. Le développement de nombreux ligands (agonistes, antagonistes et modulateurs allostériques) a permis d'étudier et de prouver l'intérêt thérapeutique de ces

récepteurs dans le traitement de diverses pathologies. Un grand nombre d'études précliniques montrent qu'ils sont impliqués dans divers processus pathologiques, notamment dans les troubles neurologiques et psychiatriques.

Les composés qui antagonisent les récepteurs mGlu<sub>2</sub>, mGlu<sub>3</sub> et/ou mGlu<sub>5</sub> présentent des effets biochimiques indiquant des effets antidépresseurs ainsi qu'une activité *in vivo* dans des modèles animaux prédictifs de l'efficacité antidépressive.<sup>122</sup> Les agonistes des récepteurs du groupe II, mGlu<sub>2</sub> et mGlu<sub>3</sub>, et les antagonistes des récepteurs du groupe I, en particulier mGlu<sub>5</sub>, ont montré une activité dans des conditions de peur, d'anxiété ou de stress chez l'animal et/ou chez l'homme. Ces études indiquent que les récepteurs métabotropiques du glutamate sont de nouvelles cibles intéressantes pour traiter les troubles anxieux chez l'homme.<sup>123</sup> Des études animales et cliniques ont également montré que les agonistes des récepteurs mGlu du groupe II, mGluR<sub>2</sub> et mGluR<sub>3</sub>, sont efficaces dans le traitement des symptômes positifs de la schizophrénie, et des études animales suggèrent que les agonistes du mGluR<sub>5</sub> pourraient fournir une nouvelle approche pour le traitement de tous les principaux domaines de symptômes (positifs, négatifs et cognitifs) de ce trouble. La découverte de modulateurs allostériques positifs hautement sélectifs du mGluR<sub>2</sub> et du mGluR<sub>5</sub> a montré des effets bénéfiques dans les modèles animaux qui prédisent l'efficacité dans le traitement de la schizophrénie.<sup>124</sup>

Les récepteurs mGlu<sub>3</sub>, mGlu<sub>4</sub> et mGlu<sub>5</sub> présentent également un intérêt thérapeutique dans la MA. En effet, ces derniers jouent un rôle dans le développement de la maladie et dans la neuroinflammation associée.<sup>125</sup> Ces mêmes récepteurs interviennent également dans une autre maladie neurodégénérative, la MP. Il a été montré que ces récepteurs jouent un rôle dans le contrôle de la motricité.<sup>125</sup>

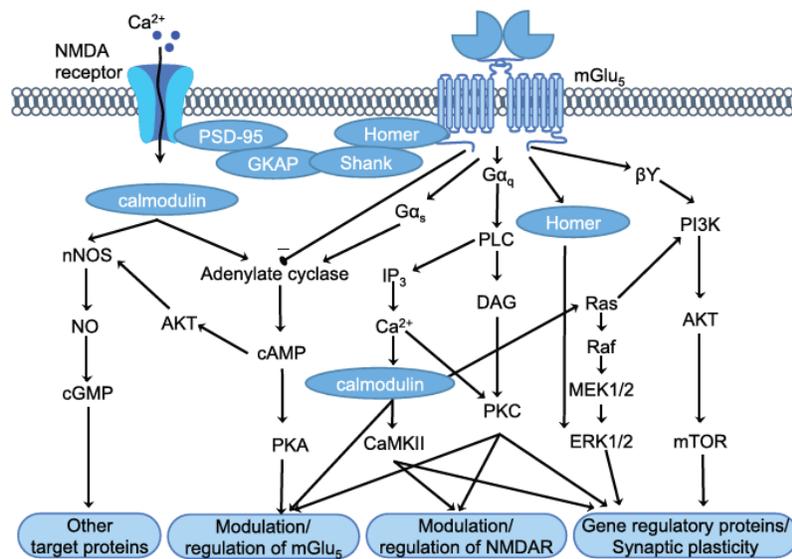
Plus récemment, les récepteurs mGlu ont également montré un intérêt thérapeutique dans le domaine de la cancérologie.<sup>126,127</sup> En effet, ces récepteurs sont les médiateurs prédominants de la signalisation glutamatergique dans de nombreux cancers et modulent la croissance tumorale.

## VI. Les récepteurs du glutamate mGlu<sub>5</sub>

### 1. Voie biochimique

Le récepteur mGlu<sub>5</sub> fait partie du sous-groupe I des récepteurs métabotropiques du glutamate. Il est largement exprimé dans le SNC, notamment dans des régions comme le cortex cérébral, l'hippocampe, le septum latéral, le striatum dorsal et le noyau accumbens, qui jouent un rôle clé dans la cognition, le contrôle moteur et les émotions.<sup>128</sup> Le récepteur mGlu<sub>5</sub> est principalement localisé dans la partie post-synaptique.

Le récepteur mGlu<sub>5</sub> est couplé à une protéine G<sub>αq/11</sub>.<sup>129</sup> Lors de la liaison du glutamate au récepteur mGlu<sub>5</sub>, G<sub>αq</sub> est activée par un échange de GDP contre GTP, ce qui entraîne la dissociation de G<sub>α</sub> de l'hétérodimère G<sub>βγ</sub>. La G<sub>αq</sub> liée au GTP entraîne l'activation de la PLC et la production d'IP<sub>3</sub> et de DAG, puis la mobilisation du Ca<sup>2+</sup>. Le calcium, en combinaison avec le DAG, entraîne l'activation de la PKC, de la PLA2, de la MAPK et la modulation des canaux ioniques. L'activation de cette voie de signalisation canonique est liée à divers processus cellulaires, y compris la plasticité synaptique. Le récepteur mGlu<sub>5</sub> se couple également à une protéine G<sub>s</sub> dans les cellules HEK293 et est lié à la formation d'AMPC dans les cellules LLCPK1 et les ovocytes.



**Figure 29. Différentes voies de signalisation du récepteur mGlu<sub>5</sub> (Sengmany K. et Gregory K. J., 2016).<sup>129</sup>**

En aval du couplage des protéines G, la stimulation agoniste des récepteurs mGlu<sub>5</sub> entraîne la phosphorylation de ERK1/2 et de p38 MAPK. La phosphorylation ERK1/2 médiée par le récepteur mGlu<sub>5</sub> entraîne l'activation de facteurs de transcription en aval, notamment Elk-1, la protéine de liaison de l'élément de réponse à l'AMPC et c-Jun, qui régulent l'expression des gènes impliqués dans la dépression à long terme.

Le récepteur mGlu<sub>5</sub> augmente également l'excitabilité neuronale et la plasticité synaptique par la phosphorylation des récepteurs NMDA. L'activation des récepteurs mGlu<sub>5</sub> dans les astrocytes déclenche également un signal Ca<sup>2+</sup> qui se propage dans le réseau astrocytaire.

## 2. Intérêt thérapeutique des modulateurs allostériques négatifs mGlu<sub>5</sub>

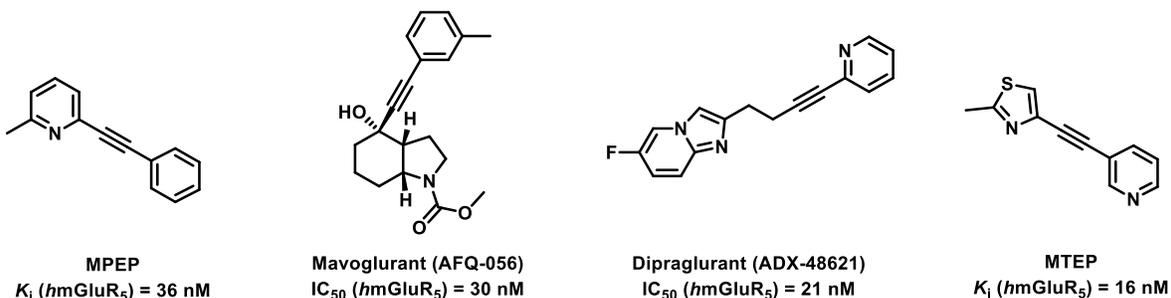
La littérature rapporte de plus en plus de modulateurs allostériques négatifs (NAMs) ciblant le récepteur mGlu<sub>5</sub>, actuellement en phase d'évaluation clinique pour diverses applications thérapeutiques. Ces modulateurs sont étudiés pour traiter l'anxiété, la dépression, la schizophrénie, les MND et différents cancers. Ces modulateurs allostériques ont été développés afin d'obtenir une meilleure sélectivité entre les différents récepteurs mGlu. Contrairement aux ligands qui ciblent le site orthostérique, lesquels permettent de distinguer entre différents groupes de récepteurs mGlu mais manquent de sélectivité au sein d'un même groupe, le ciblage du site allostérique offre une meilleure sélectivité entre les récepteurs d'un même groupe.<sup>130</sup>

### 1.1. Maladies neurodégénératives

#### 1.1.1. Maladie de Parkinson

Des études sur la riche distribution et des divers rôles physiologiques du récepteur mGlu<sub>5</sub> dans les ganglions de la base, indiquent que ce récepteur jouerait un rôle clé dans le contrôle moteur et pourrait constituer une cible thérapeutique pour le traitement de la MP et des troubles apparentés.<sup>131</sup> En conditions pathologiques, une augmentation des niveaux de récepteurs mGlu<sub>5</sub> est observée dans le striatum des patients parkinsoniens souffrant de complications motrices.

Depuis la synthèse du premier NAM pour les récepteurs mGlu<sub>5</sub>, le ligand MPEP (2-méthyl-6-(phényléthynyl)pyridine), de nombreuses études précliniques ont exploré le rôle de ce récepteur dans la MP (**Figure 30**). Il a été montré que le blocage du récepteur par un NAM dans un modèle de rat ayant le syndrome parkinsonien permet d'inverser les déficits moteurs et d'inhiber les phases de dyskinésie. L'administration chronique du MPEP améliore les déficits non moteurs, y compris la mémoire de travail et la mémoire de reconnaissance. De plus, chez des singes, l'ajout du MPEP au traitement à la lévodopa réduit l'intensité du score de dyskinésie sur un mois de traitement d'environ 70%.<sup>132</sup> Le MPEP améliore également l'effet anti-parkinsonien de la lévodopa.



**Figure 30. Structures de modulateurs allostériques négatifs du récepteur mGlu<sub>5</sub>.**

Suite à une excellente efficacité thérapeutique dans des modèles animaux précliniques de parkinsonisme plusieurs NAMs, dont le mavoglurant et le dipraglurant, ont atteint les essais cliniques de phase II/III, ce qui a permis de valider leur effet antidyskinésique chez des patients atteints de la MP (NCT00582673 et NCT01336088).<sup>133</sup>

Le récepteur mGlu<sub>5</sub> intervient également dans différents mécanismes de neurodégénérescence liés à la MP. En effet, l'excès de glutamate et la surexpression des mGluR<sub>5</sub> sont responsables de l'excitotoxicité, qui contribue à la neurodégénérescence dans le striatum. Un potentiel effet neuroprotecteur des NAMs du récepteur mGlu<sub>5</sub> a été rapporté chez les primates atteints du syndrome parkinsonien. Les singes atteints de la MP et traités chroniquement par la MTEP (3-((2-méthyl-4-thiazolyl)éthynyl)pyridine) (**Figure 30**), un NAM mGluR<sub>5</sub>, présentent une diminution de la toxicité au niveau neuronal.<sup>134</sup>

Ces différentes études démontrent donc l'intérêt thérapeutique des NAMs mGluR<sub>5</sub> dans le traitement de la MP, qui agissent à la fois sur les symptômes et le développement de la maladie.

### 1.1.2. Maladie d'Alzheimer

Le récepteur mGlu<sub>5</sub> semble jouer un rôle important dans les conditions pathologiques, notamment associées à la MA. En conditions pathologiques, le récepteur mGlu<sub>5</sub> est surexprimé au niveau neuronal et peut activer des voies de signalisation neurotoxiques, entraînant potentiellement la mort cellulaire. En revanche, le blocage du récepteur se révèle avoir des effets neuroprotecteurs.<sup>135</sup> Shrivastava *et al.*<sup>136</sup> ont rapporté un fort enrichissement des récepteurs mGlu<sub>5</sub> sur les astrocytes réactifs entourant les plaques du peptide A $\beta$ , ce qui a conduit à une augmentation de la libération d'ATP. Cette observation renforce le concept selon lequel le récepteur mGlu<sub>5</sub> joue un rôle majeur dans la neurodégénérescence médiée par le peptide A $\beta$ . Ainsi, le blocage du récepteur réduit également la neurotoxicité et la synaptotoxicité du peptide amyloïde *in vitro*, ainsi que les troubles mnésiques associés.<sup>137</sup> Ce phénomène a également été observé *in vivo* chez des souris transgéniques surexprimant le peptide précurseur de l'amyloïde, qui forme par la suite le peptide A $\beta$ .<sup>138</sup>

De plus, le récepteur mGlu<sub>5</sub> interagit avec la principale phosphatase de Tau, PP2A, empêchant son inactivation par phosphorylation et, de fait ralentissant l'hyperphosphorylation de Tau.<sup>139</sup>

Il a également été montré que le blocage de l'activité du récepteur mGlu<sub>5</sub> par des NAMs inverse les déficits d'apprentissage et de mémoire et favorisent la récupération des marqueurs synaptiques chez les souris transgéniques mimant la MA.

Le récepteur mGlu<sub>5</sub> semble jouer un rôle dans plusieurs aspects du développement de la MA, notamment en lien avec les deux principales lésions caractéristiques de cette pathologie : les pathologies amyloïdes et Tau. Cela en fait une cible thérapeutique prometteuse pour le traitement de la maladie d'Alzheimer.

## 1.2. Cancers

Tout comme les récepteurs A<sub>2A</sub>, les récepteurs mGlu<sub>5</sub> seraient impliqués dans différents types de cancer.<sup>29</sup> L'expression de mGlu<sub>5</sub> a été détectée dans les mélanocytes et les cellules de mélanome.<sup>140</sup> Ils peuvent jouer un rôle dans le contrôle de la prolifération des mélanocytes, mais leur toxicité potentielle peut également contribuer à des dommages cellulaires dans des conditions pathologiques. Il a également été démontré que la surexpression du récepteur mGlu<sub>5</sub> pouvait transformer les mélanocytes en mélanomes malins et une hyperactivation de la voie MAPK.

Le récepteur mGlu<sub>5</sub> joue aussi un rôle dans les cancers de la bouche. En effet, l'expression de mGlu<sub>5</sub> augmente au cours de la progression de ces cancers, ce qui correspond à un taux de survie à 5 ans inférieur à celui des patients atteints de cancers de la bouche sans expression de mGlu<sub>5</sub>.<sup>141</sup> Le traitement par le NAM MPEP diminue la formation de métastases et la migration des cellules tumorales HSC3, présentes dans ce type de cancers.

L'expression du récepteur mGlu<sub>5</sub> a été détectée dans les gliomes.<sup>142</sup> Plus précisément, il a été montré que ce récepteur était impliqué dans l'augmentation de la viabilité et de la prolifération des lignées cellulaires de gliome dans des conditions hypoxiques, dues à une augmentation du taux de glutamate. Quatre types différents de lignées cellulaires de gliomes humains ont été traités en conditions hypoxiques par un antagoniste mGlu<sub>5</sub> de référence, le MPEP, ce qui a permis de réduire la viabilité des cellules de gliome.

Ces différentes études montrent que les NAMs mGlu<sub>5</sub> jouent un rôle dans diverses pathologies. De plus, les modulateurs conçus pour cibler le SNC peuvent également être utilisés en cancérologie et présentent un intérêt thérapeutique dans ce domaine.

Les antagonistes du récepteur A<sub>2A</sub> et les modulateurs allostériques négatifs du récepteur mGlu<sub>5</sub> semblent être impliqués dans des pathologies similaires, ce qui pourrait s'expliquer par le fait qu'ils forment des hétérodimères, comme mentionné précédemment. De plus, une synergie a été observée entre ces deux récepteurs : l'inhibition de mGlu<sub>5</sub> renforce celle de A<sub>2A</sub>.<sup>50</sup> C'est pourquoi nous avons concentré notre attention sur ces deux récepteurs, avec l'objectif de développer des ligands duaux A<sub>2A</sub>/mGlu<sub>5</sub> pour traiter les MND. Il pourrait également être envisageable d'appliquer cette stratégie aux cancers du cerveau, tels que le gliome, voire à d'autres cancers périphériques.

## VII. Les modulateurs allostériques négatifs du récepteur mGlu<sub>5</sub>

Les premières stratégies de conception de médicaments ciblant le récepteur mGlu<sub>5</sub> se sont principalement concentrées sur de petites molécules capables d'entrer en compétition avec le glutamate au niveau du site de liaison orthostérique. Cependant, en raison de la forte conservation de ce site au sein de la famille des mGluR, il a été difficile d'obtenir une sélectivité satisfaisante entre les différents sous-types. De plus, de nombreux ligands orthostériques, souvent dérivés du glutamate, présentent des profils pharmacocinétiques inadéquats et une faible capacité à pénétrer la BHE. Plus récemment, l'intérêt s'est porté sur la conception et le développement de modulateurs allostériques, une approche alternative prometteuse. En particulier, la création de petites molécules NAMs ciblant mGlu<sub>5</sub> a suscité un vif engouement dans la recherche sur les modulateurs allostériques.

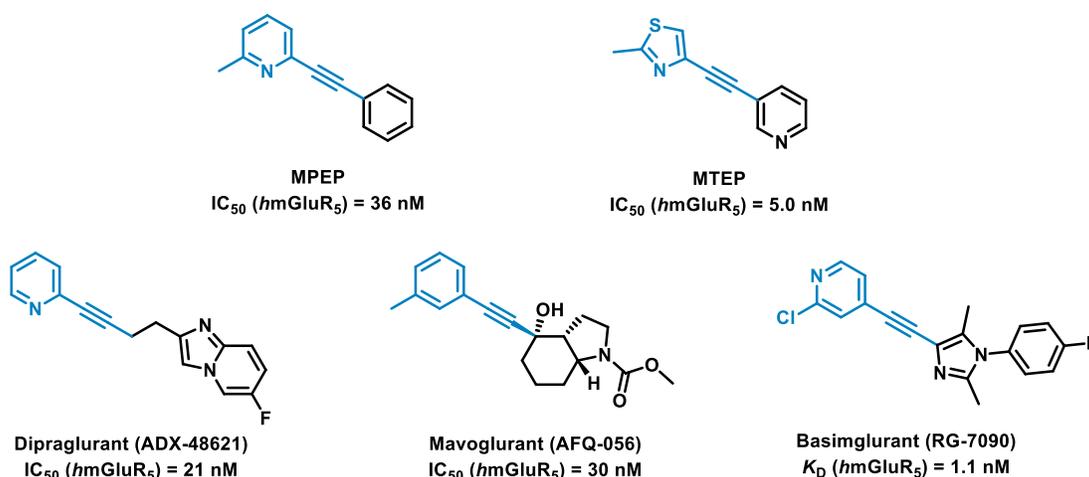
### 1. Dérivés alcynes

La fonction alcyne a été largement employée dans les premières phases de développement des modulateurs allostériques négatifs du récepteur mGlu<sub>5</sub>. Cette classe chimique constitue ainsi une part importante des composés ciblant ce récepteur.

Le **MPEP** a été l'un des premiers composés à agir en tant que NAM sélectif du récepteur mGlu<sub>5</sub> (**Figure 31**). Des études sur des modèles animaux ont montré ses effets neuroprotecteurs contre les crises épileptiques chez les rats.<sup>143</sup> Il a également démontré un effet bénéfique anti-dyskinétique chronique chez des singes parkinsoniens, soutenant ainsi l'intérêt thérapeutique des antagonistes du récepteur mGlu<sub>5</sub> dans la MP.<sup>144</sup> Cependant, le **MPEP** a présenté quelques inconvénients en tant que potentiel médicament. En effet, il manque de sélectivité par rapport au récepteur au glutamate NMDA et il est peu soluble, ce qui peut poser problème lors des études *in vivo* dans le SNC. Le **MPEP** a également montré des effets intéressants dans le domaine de l'oncologie. En effet, il diminue la formation de métastases et la migration des cellules tumorales HSC3, présentes dans ce type de cancers.

Bien que quelques recherches se poursuivent, le **MPEP** est principalement utilisé aujourd'hui comme outil pharmacologique, notamment en tant que « radioligand » et permet de mieux comprendre le rôle du récepteur mGlu<sub>5</sub> au sein du SNC.

Des études de relations structure-activité (RSA) réalisées autour du **MPEP** ont permis l'identification du **MTEP** développé par Merck.<sup>145</sup> Ce composé est un NAM puissant et sélectif du récepteur mGlu<sub>5</sub>, avec moins d'effets hors cible que le **MPEP**. Il produit des effets *in vivo* similaires à ceux du **MPEP**, mais de façon plus efficace. Le **MTEP** est aussi principalement utilisé comme outil pharmacologique dans divers modèles étudiant le récepteur mGlu<sub>5</sub>.



**Figure 31. Structures des NAMs mGluR<sub>5</sub> de la famille des alcynes.**

Dans un premier temps, la grande majorité de l'activité clinique des NAMs mGluR<sub>5</sub> s'est focalisée sur trois composés : le **dipraglurant**, le **mavoglurant** et le **basimglurant**. Ces trois composés font partie de la deuxième génération de NAMs ciblant le récepteur mGlu<sub>5</sub>.

Le **dipraglurant**, développé par le groupe Addex pour traiter la dyskinésie induite par la lévodopa dans la MP, a montré une efficacité contre les dyskinésies choréiques et dystoniques dans un modèle macaque parkinsonien.<sup>146</sup> En 2016, les résultats d'un essai clinique de phase IIa ont démontré que le **dipraglurant** était sûr et bien toléré lors de sa première administration chez des patients atteints de la MP.<sup>147</sup> Son efficacité à inverser la dyskinésie induite par la lévodopa a justifié des études supplémentaires sur un plus large panel de patients. Un essai clinique de phase III a été lancé auprès de 140 patients souffrant de dyskinésie induite par la lévodopa. Cependant, l'étude a été interrompue en raison du ralentissement du recrutement causé par la pandémie de COVID-19.

Novartis a réalisé plusieurs essais cliniques avec le NAM mGluR<sub>5</sub>, **mavoglurant**, chez des patients atteints de troubles liés au glutamate. Une étude évaluant l'efficacité, la sécurité et la tolérance du **mavoglurant** dans la prise en charge de la dyskinésie induite par la lévodopa a montré des résultats positifs, cohérents avec ceux observés précédemment dans des études sur des singes parkinsoniens.<sup>148,149</sup> Cependant, des études supplémentaires n'ont pas démontré une efficacité suffisante du **mavoglurant**, ce qui a conduit à son abandon en tant que traitement pour la MP.<sup>150</sup> Un essai clinique de phase III est actuellement menée avec ce composé dans le trouble de l'usage de la cocaïne.

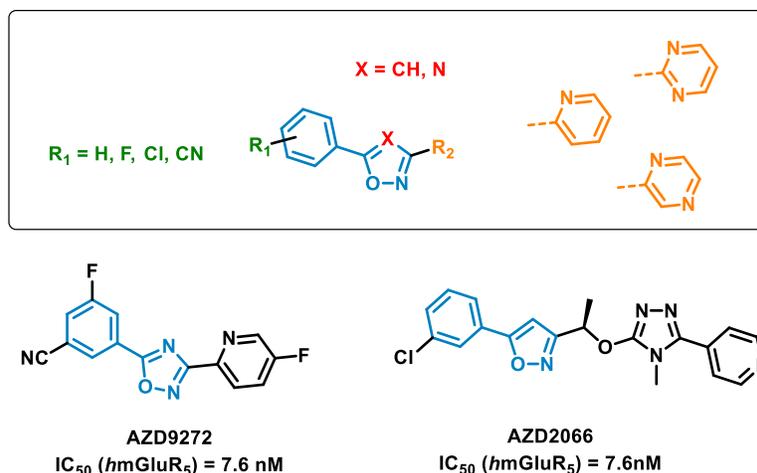
Enfin, le **basimglurant** est un NAM mGluR<sub>5</sub> puissant et sélectif. Des études précliniques avaient indiqué des effets positifs de ce composé dans le traitement du syndrome de l'X fragile. Toutefois, les résultats

d'un essai clinique de phase II n'ont montré aucune amélioration par rapport au placebo pour le **basimglurant**.<sup>151</sup> Des résultats similaires ont été observés dans un essai clinique où cette molécule était utilisée en complément d'un traitement antidépresseur chez des patients atteints de trouble dépressif majeur.<sup>152</sup> Le **basimglurant** pourrait connaître une nouvelle opportunité en tant que traitement pour les maladies respiratoires. En effet, il a été repositionné cette année pour le traitement de la fibrose pulmonaire idiopathique.<sup>153</sup>

Depuis quelques années, les composés de type alcynes sont de moins en moins développés. En effet, des études sur les composés contenant des alcynes ont révélé un risque d'activation métabolique et d'hépatotoxicité. Pfizer a également signalé des cas d'hyperplasie (augmentation anormale de la production de cellules dans un tissu) de l'épithélium biliaire lors d'études toxicologiques avec un NAM ciblant le récepteur mGlu<sub>5</sub>. La détection de conjugués de glutathion sur ces composés a mis en évidence la réactivité de ce dernier, liée à ces effets indésirables. Pour pallier ces problèmes, d'autres NAMs sans structure alcyne ont donc été développés.

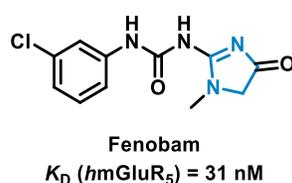
## 2. Dérivés non alcynes

Le groupe AstraZeneca a réalisé des études RSA autour d'un noyau oxadiazole, identifié par un criblage à haut débit de la collection de composés de NPS Pharmaceutical. Ces études ont mené à l'identification du composé **AZD9272 (Figure 32)**.<sup>154</sup> Ce composé est très affiné pour le récepteur mGlu<sub>5</sub>, sélectif et pénètre le cerveau avec un temps de demi-vie assez long. L'**AZD9272** était destiné à traiter la douleur, l'anxiété et le reflux gastro-œsophagien. Un essai de phase I a été réalisé sur cette molécule afin d'étudier l'effet d'une dose unique sur la douleur induite électriquement, la sensibilisation centrale et le déclenchement du réflexe axonique chez des personnes saines.<sup>155</sup> Cependant, l'**AZD9212** n'a eu aucune efficacité contre la douleur. Le composé est aujourd'hui utilisé en tant qu'outil pharmacologique, notamment en tant que « radioligand ». AstraZeneca a également développé l'**AZD2066**, un composé ayant un noyau oxazole. Il est sélectif, pénétrant dans le cerveau et actif contre les relaxations transitoires du sphincter inférieur de l'œsophage et les épisodes de reflux chez l'homme.<sup>156</sup> AstraZeneca a signalé des effets indésirables psychotiques graves chez une minorité de patients traités avec des composés de la même famille que l'**AZD9272** et l'**AZD2066**. En conséquence, les études sur ces composés ont été arrêtées, les disqualifiant ainsi comme candidats pour un usage thérapeutique.



**Figure 32. Structures des NAMs mGluR<sub>5</sub> de la famille des oxazoles et oxadiazoles.**

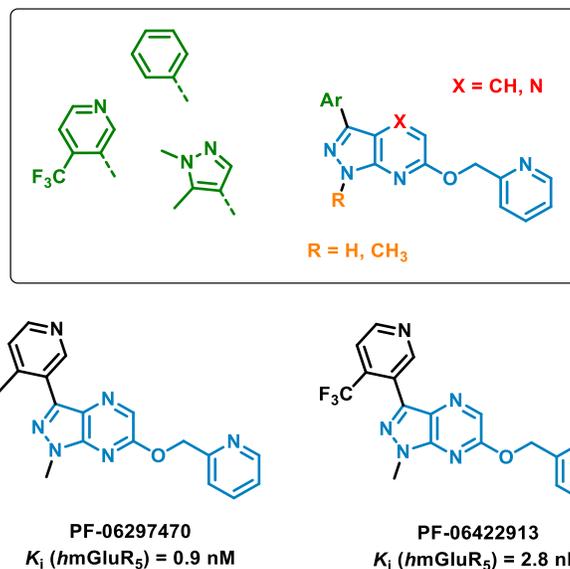
Le fénobam, un dérivé imidazole initialement développé dans les années 1970 comme anxiolytique non benzodiazépinique avec un bon profil de sécurité potentiel, a été identifié en 2005 comme un antagoniste puissant et non compétitif du mGluR<sub>5</sub> (**Figure 33**).<sup>157</sup> Il a été développé pour le traitement du syndrome de l'X fragile et de la douleur, et a également été étudié pour la MP.<sup>158</sup> Dans des modèles de dyskinésie induite par la lévodopa chez le rat et le singe, le fénobam a démontré pour la première fois qu'il pouvait réduire la sévérité maximale de la dyskinésie sans altérer l'effet anti-akinétique de la lévodopa. Chez le singe, il a montré une efficacité anti-dyskinétique supérieure à celle d'autres antagonistes du mGluR<sub>5</sub> testés. Il est actuellement utilisé comme composé principal pour le développement de nouveaux NAMs du récepteur mGlu<sub>5</sub> et en tant que « radioligand ».



**Figure 33. Structure du NAM mGluR<sub>5</sub> fenobam.**

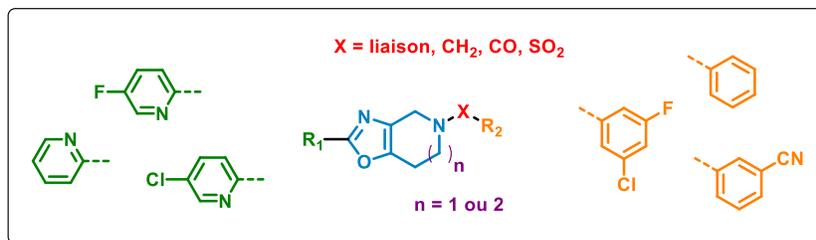
Le groupe Pfizer a étudié la famille des pyrazolopyrazines en tant que NAMs du récepteur mGlu<sub>5</sub> (**Figure 34**).<sup>159</sup> A partir d'un criblage à haut débit, la molécule **PF-06297470** a été identifiée comme étant la meilleure molécule avec un certain nombre d'avantages, notamment une excellente puissance et sélectivité mGluR<sub>5</sub> et une pharmacocinétique favorable. Ces composés pyrazolopyrazines ont été développés en vue d'être utilisés pour le traitement de la dyskinésie induite par la lévodopa. Le **PF-06297470** n'a pas atteint les phases cliniques en raison de la présence de lésions cutanées macroscopiques dans une étude de toxicologie réglementaire de 90 jours chez le primate, avec des lésions cutanées

microscopiques corrélatives présentant des caractéristiques compatibles avec une réaction d'hypersensibilité retardée de type IV.<sup>160</sup> La molécule **PF-06422913**, appartenant aussi à la famille des pyrazolopyrazines, a montré le même type de lésions cutanées.



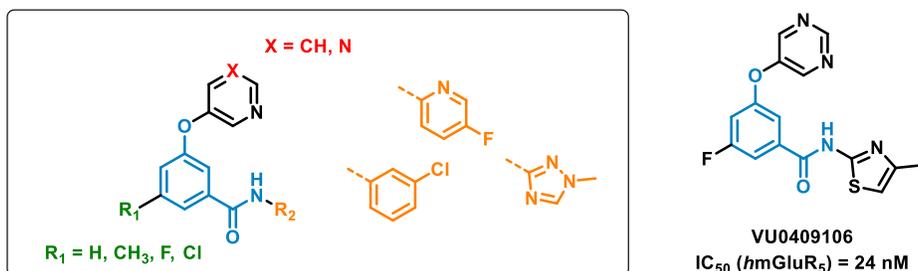
**Figure 34. Structures des NAMs mGluR<sub>5</sub> de la famille des pyrazolopyrazines.**

Les recherches menées par le groupe Sumitomo Dainippon Pharma ont permis de découvrir que les oxazolopipéridines et les oxazoloazépines agissent comme NAMs du récepteur mGlu<sub>5</sub> (**Figure 35**).<sup>161</sup> Des études RSA ont été réalisées d'abord sur la famille des oxazolopipéridines, avec la synthèse d'une vingtaine de molécules dont certaines se sont révélées être des NAMs mGlu<sub>5</sub> puissants. Des études pharmacocinétiques ont également été conduites sur certains composés chez le rat, où ils ont démontré une biodisponibilité allant jusqu'à 80%. Pour améliorer l'affinité de ces composés, un groupement méthylène a été ajouté, conduisant à la synthèse d'oxazoloazépines. Ces composés ont démontré une excellente puissance et sélectivité *in vitro*, une bonne pénétration cérébrale, ainsi qu'une forte occupation des récepteurs chez les rongeurs. Cependant, bien qu'ils aient montré une biodisponibilité orale acceptable chez ces derniers, leur demi-vie est courte, tant chez les rongeurs que chez les primates. Cette limitation empêche leur efficacité dans les modèles animaux de dyskinésie induite par la lévodopa, constituant un obstacle à leur développement pour le traitement de la MP. En conséquence, les oxazoloazépines ont récemment été repositionnées pour le traitement des lésions cérébrales à un stade avancé.<sup>162</sup>



**Figure 35. Structures des NAMs mGluR<sub>5</sub> de la famille des oxazolo-pipéridines et des oxazoloazépines.**

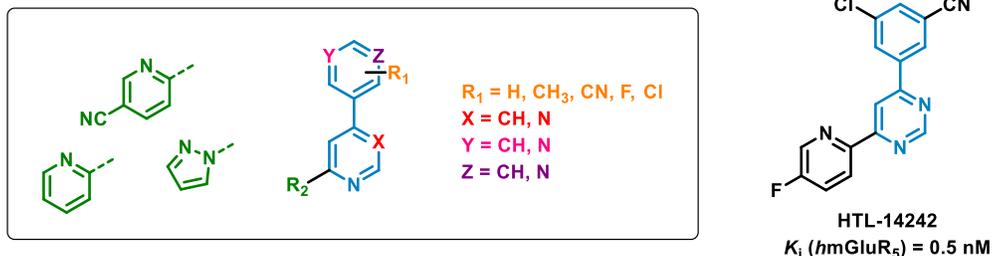
Grâce à un criblage à haut débit, il a été découvert que les composés aryl éther benzamide possédaient une activité sur le récepteur mGlu<sub>5</sub> (**Figure 36**).<sup>163</sup> Le **VU0409106** est un NAM puissant et sélectif du récepteur mGlu<sub>5</sub>, avec une bonne pénétration dans le SNC après administration intrapéritonéale chez la souris. Ce composé a montré une efficacité dans un modèle d'anxiété par enfouissement de marbre chez la souris, test particulièrement sensible aux NAMs mGlu<sub>5</sub>, et cette efficacité semble corrélée à son exposition cérébrale. Cependant, peu de données supplémentaires sont disponibles, hormis son potentiel intérêt pour traiter l'obésité.<sup>164</sup>



**Figure 36. Structures des NAMs mGluR<sub>5</sub> de la famille des aryl éther benzamides.**

Les pyrimidines et pyridines se sont également révélées être des NAMs du récepteur mGlu<sub>5</sub>. Heptares Therapeutics a également développé une nouvelle série de NAMs mGluR<sub>5</sub>, composée de cycles aromatiques benzonitriles et hétéroaryles substitués, liés à un noyau central de pyrimidine ou de pyridine, grâce à une approche de découverte de médicaments basée sur les fragments et la structure (**Figure 37**).<sup>165</sup> Les études de RSA ont montré qu'un groupement chlore en position 3 du benzonitrile, ainsi qu'un cycle pyrazol-1-yl ou 5-fluoropyridin-2-yl en position 6, amélioraient l'affinité. De plus, le noyau pyrimidine a démontré une affinité supérieure à celle de ses analogues pyridiniques. Le composé **HTL-14242** a été identifié comme présentant une excellente affinité subnanomolaire pour le récepteur mGlu<sub>5</sub>, ainsi qu'une grande sélectivité par rapport aux autres récepteurs du glutamate. Cette molécule a été co-cristallisée avec le récepteur mGlu<sub>5</sub> (PDB : 5CGD). **HTL-14242** possède de bonnes caractéristiques pharmacocinétiques chez le rat et le chien, démontre une activité *in vivo* dans un modèle pertinent, et affiche un profil favorable

dans une étude toxicologique à doses répétées chez le rat.<sup>166</sup> Ce composé a été sélectionné comme candidat principal pour poursuivre son développement.



**Figure 37. Structures des NAMs mGluR<sub>5</sub> de la famille des pyridines et des pyrimidines, développés par Heptares Therapeutics.**

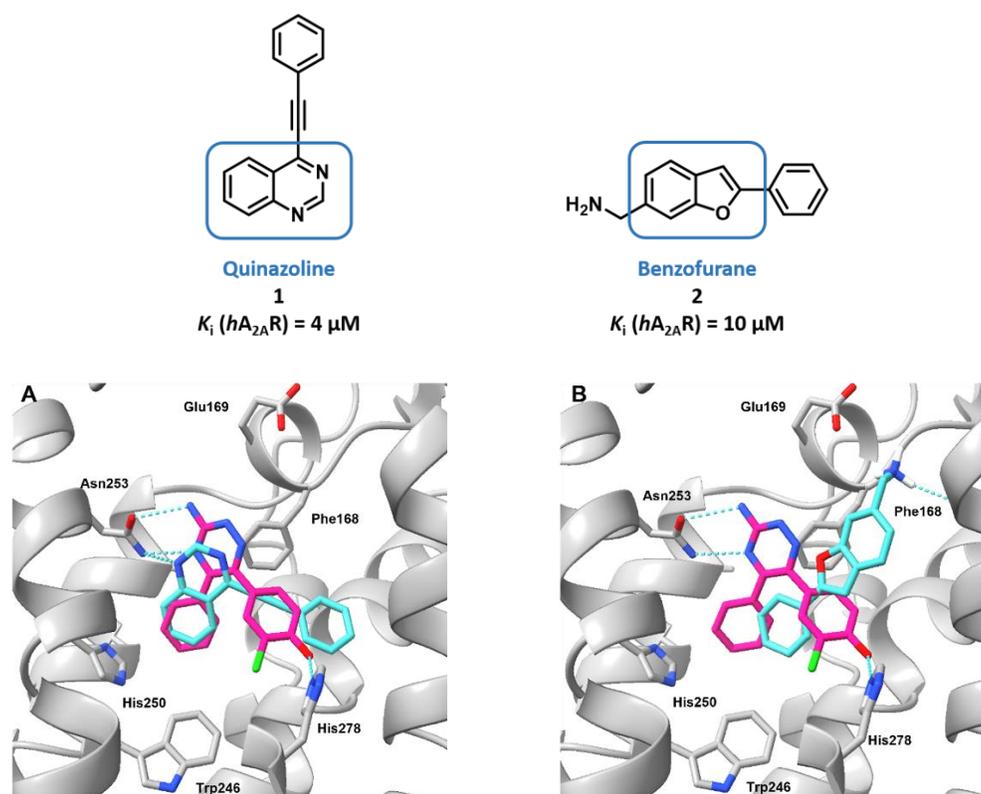
Comme nous avons pu le voir dans cette partie, de nombreux NAMs ciblant le récepteur mGlu<sub>5</sub> ont déjà été développés. Cependant, beaucoup d'entre eux rencontrent des problèmes tels qu'un manque d'efficacité et/ou des limitations pharmacocinétiques ou provoquent des effets indésirables. Tout comme pour les antagonistes du récepteur A<sub>2A</sub>, notre défi consiste donc à identifier des ligands offrant un équilibre optimal entre affinité, propriétés pharmacocinétiques et caractéristiques physicochimiques. Le développement de composés mixtes A<sub>2A</sub>R/mGluR<sub>5</sub> possédant de bonnes propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques pourrait permettre d'obtenir des composés plus efficaces, notamment dans le traitement des MND.

# Travaux préliminaires et objectifs

## Travaux préliminaires et objectifs

## 1. Point de départ du projet

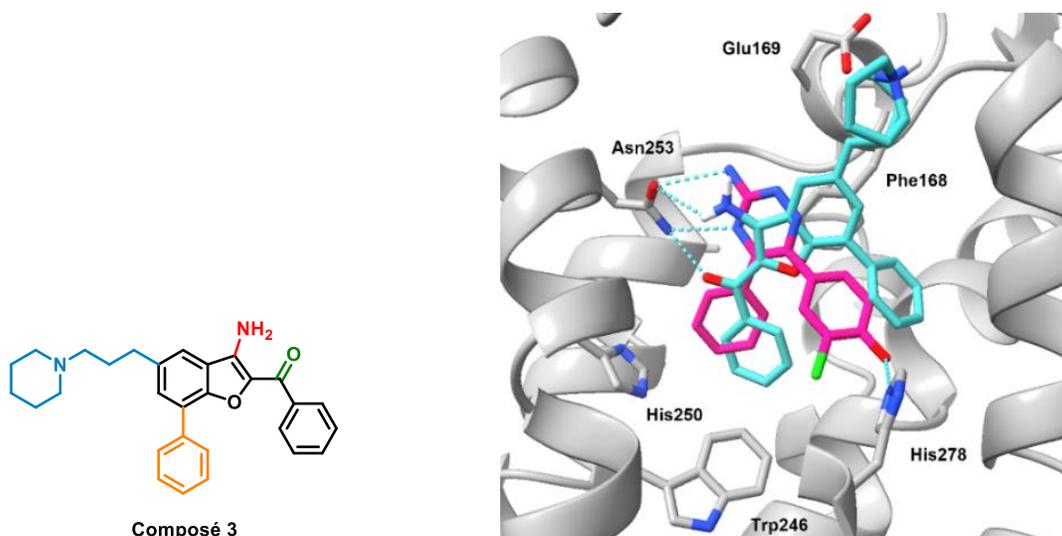
Dans le but de concevoir et de synthétiser de nouveaux antagonistes originaux des récepteurs  $A_{2A}$ , un criblage virtuel a été réalisé au début de ce projet. Ce criblage a été mené par le Dr. Nicolas Renault (Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol, Lille) lors des travaux de thèse de Romain Duroux (2014-2017).<sup>167</sup> La structure co-cristallisée du ligand triazine T4E (PDB: 3UZC) a servi de base à cette conception, car elle présente une poche de liaison capable d'accueillir une plus grande diversité chimique par rapport aux autres structures co-cristallisées. Ce criblage virtuel a été effectué à partir de 60 000 composés issus de la Chimiothèque Nationale. En appliquant différents filtres préétablis (présence d'au moins un cycle aromatique, éléments structuraux communs avec des antagonistes du  $A_{2A}R$ , et faible poids moléculaire), deux molécules « hit » ont été identifiées (**Figure 38**) : un composé quinazolinique (composé **1**) et un composé benzofuranique (composé **2**). Après évaluation *in vitro*, ces deux molécules ont montré une affinité micromolaire pour les  $A_{2A}R$ .



**Figure 38.** (A) Superposition de la pose docking sélectionnée du composé **1** (cyan) à la structure co-cristallisée du composé triazine (rose) au sein du récepteur  $hA_{2A}R$ . (B) Superposition de la pose docking sélectionnée du composé **2** (cyan) à la structure co-cristallisée du composé triazine (rose) au sein du récepteur  $hA_{2A}R$ . (PDB : 3UZC)

## 2. Composés benzofuraniques

Des études de modélisation moléculaire approfondies autour de la structure benzofuranique du composé « hit » ont été menées lors de la thèse de Raphaël Bolteau (2017-2020).<sup>168</sup> Ces travaux ont été guidés par le modèle pharmacophorique des antagonistes des récepteurs  $A_{2A}$  décrits dans la littérature et par la structure co-cristallisée du ligand triazine T4E (PDB : 3UZC).<sup>169-171</sup> Grâce à ces études, les positions et la nature des pharmacomodulations possibles autour du composé « hit » ont été identifiées. Différents groupements fonctionnels ont été apportés sur le noyau benzofuranique tels qu'une amine en position C3 pour augmenter l'affinité, un linker cétonique en position C2, une chaîne propyl-amine en position C5 pour améliorer la solubilité et un groupement phényle en position C7. Ces modulations ont conduit au composé tétrasubstitué **3** présenté ci-dessous :



**Figure 39. Superposition de la pose docking sélectionnée du composé 3 (cyan) à la structure co-cristallisée du composé triazine (rose) au sein du récepteur  $A_{2A}$ . (PDB : 3UZC)**

A partir de la structure du composé **3**, deux séries de molécules tri- et tétrasubstitués ont été envisagées autour du noyau benzofuranique (**Figure 40**).

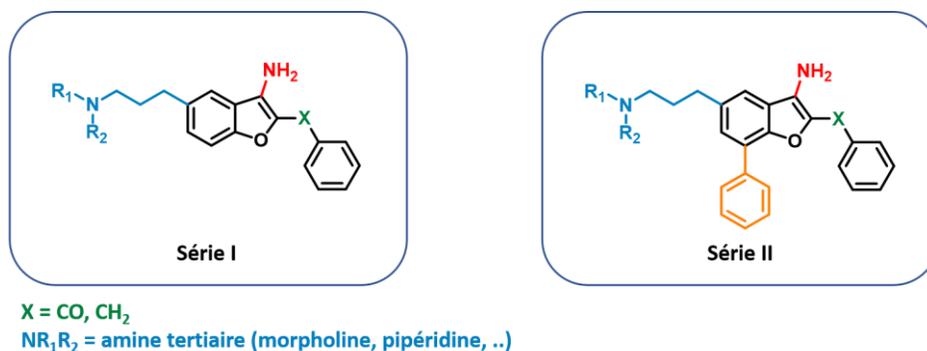


Figure 40. Séries benzofuraniques I et II envisagées.

En raison de difficultés chimiques, les composés cibles des séries I et II n'ont malheureusement pas pu être synthétisés. Toutefois, certains intermédiaires réactionnels ont pu être évalués pour leur affinité envers le récepteur  $hA_{2A}$ , grâce à un test de « radiobinding », lors d'un criblage à 10  $\mu\text{M}$  (Tableau 3).

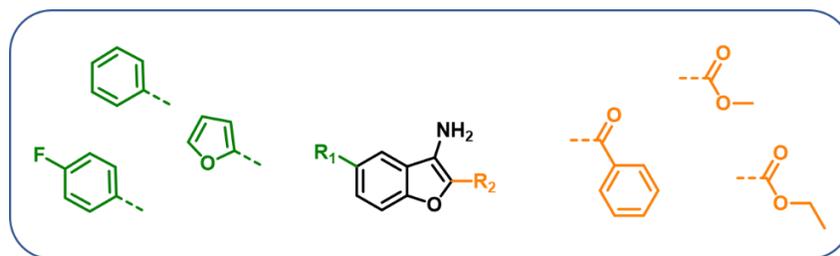
| Structure | $hA_{2A}R$<br>(%déplacement) <sup>a</sup> | Structure | $hA_{2A}R$<br>(%déplacement) <sup>a</sup> |
|-----------|---|-----------|---|
|           | N.D.                                      |           | 23  |
|           | 13  |           | N.D.                                      |
|           | 9   |           | 14  |
|           | 11  |           | 8   |

<sup>a</sup> Pourcentage de déplacement spécifique du [ $^3\text{H}$ ]-ZM241385 à 10  $\mu\text{M}$ .

Tableau 3. Pourcentage de déplacement spécifique du [ $^3\text{H}$ ]-ZM241385 à 10  $\mu\text{M}$  des composés benzofuraniques sur  $hA_{2A}R$ .

Malheureusement, ces premiers résultats préliminaires se sont avérés décevants, avec des constantes d'inhibition ( $K_i$ ) dépassant les 10  $\mu\text{M}$ . De plus, des problèmes de solubilité ont été rencontrés pour certains composés (N.D.) lors des tests d'affinité. Les modulations apportées ne semblent donc pas adéquates afin d'obtenir une affinité pour les récepteurs  $A_{2A}$ . De plus, ces tests ont démontré le manque de solubilité de ces composés, paramètre qui fait défaut chez de nombreux antagonistes  $A_{2A}$ . Il est donc nécessaire d'apporter de nouvelles modulations sur les composés benzofuraniques et d'améliorer leur solubilité.

Le premier objectif de ma thèse était donc de réaliser de nouvelles modulations sur les composés benzofuraniques afin d'obtenir des composés ayant une meilleure affinité et de réaliser des RSA autour de ce noyau benzofuranique. Grâce à la modélisation moléculaire, de nouvelles modulations ont été envisagées en apportant différents groupements aromatiques en position C5 et différents groupements comportant une liaison C=O en position C2 (**Figure 41**).



**Figure 41. Nouvelles modulations envisagées sur le noyau benzofuranique.**

### 3. Composés quinazoliniques

Les recherches menées par Romain Duroux durant sa thèse sur le composé quinazolinique « hit » ont permis d'effectuer des modifications structurales, basées sur la structure co-cristallisée du ligand triazine et sur le positionnement en docking du composé quinazolinique « hit ».<sup>167</sup> Différentes pharmacomodulations ont donc été effectuées. Dans un premier temps, le groupement phénylacétylène a été substitué par un groupement phényle et une amine primaire en position C2 a été incorporée permettant ainsi d'interagir par liaison hydrogène avec l'Asn253. Ces deux modulations ont permis d'identifier un composé chef de file **4 (Figure 42)** tout en apportant un gain d'affinité important par rapport au composé « hit » de départ ( $K_i (hA_{2A}R) = 198 \text{ nM}$ ). De plus, ce composé est intéressant puisqu'il passe la BHE sur un modèle *in vitro* (Pr. Fabien Gosselet, LBHE – Lens).

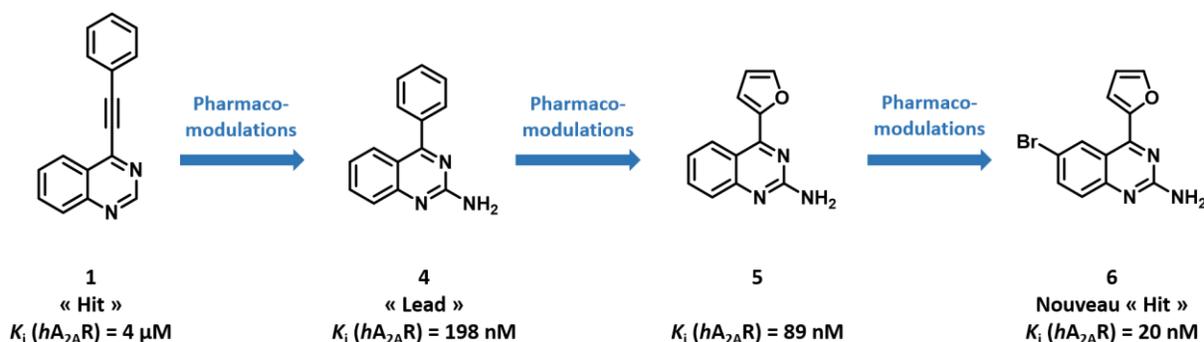
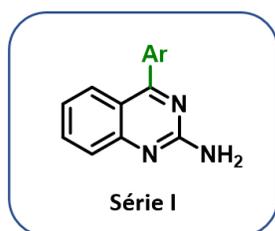


Figure 42. Pharmacomodulations réalisées à partir du composé quinazolinique « hit » 1.

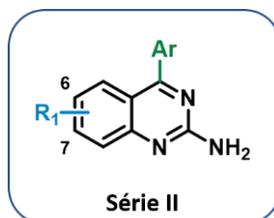
Grâce au nouveau composé « lead » obtenu, de nouvelles modulations ont été réalisées sur les composés quinazoliniques dans les travaux de thèse de Raphaël Bolteau.<sup>168</sup> Dans un premier temps, des modulations de plus faible impact stérique ont été réalisées en position C4 (**Figure 43**). Ces modulations ont consisté à remplacer le groupement phényle par différents groupements aromatiques (2-furane, 2-thiophène, *p*-fluorophényle, ...). Une première série de nouvelles molécules à base de quinazoline a été synthétisée, révélant que le groupement 2-furane améliore l'affinité pour le récepteur  $A_{2A}$ , avec l'identification du composé 5 ( $K_i (hA_{2A}R) = 89 nM$ ).



Ar = 2-furane, 2-thiophène, *p*-fluorophényle, ...

Figure 43. Série I des composés quinazoliniques synthétisés.

Par la suite, de nouvelles modifications en positions C6 et C7 en utilisant des groupements à faible encombrement stérique tels que le brome ou le méthyle. Une deuxième série chimique sur les composés quinazolines a donc été synthétisée par Raphaël Bolteau lors de sa thèse (**Tableau 4**).<sup>168</sup>



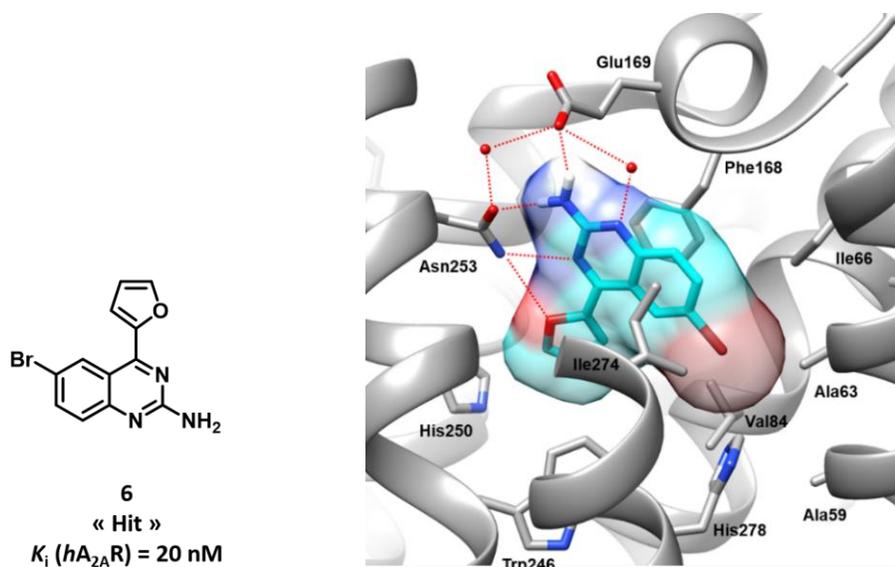
| R <sub>1</sub>    | Ar | K <sub>i</sub> (hA <sub>2A</sub> R) (nM) <sup>a</sup> |
|-------------------|----|---|
| 6-Br              |    | 20  |
| 6-CH <sub>3</sub> |    | 22  |
| 7-CH <sub>3</sub> |    | 141   |
| 7-CH <sub>3</sub> |    | 40  |

<sup>a</sup>K<sub>i</sub> des composés déterminées par « radiobinding » (N=3) en compétition avec [<sup>3</sup>H]-ZM241385.

**Tableau 4. Constantes d'inhibition des composés quinazoliniques de la série II sur hA<sub>2A</sub>R.**

Ces modifications ont permis d'identifier un nouveau composé « hit », le composé **6**, qui présente une excellente affinité de 20 nM pour les récepteurs A<sub>2A</sub>. Ce composé possède un groupement 2-furane en position C4 et un groupement brome en position C6.

Des études cristallographiques ont été réalisées sur ce nouveau composé « hit » en collaboration avec l'équipe du Pr. Vadim Cherezov (Département de Chimie – The Bridge Institute) de l'Université de Californie du Sud à Los Angeles. Les travaux menés par le Dr. Benjamin Stauch et Anna Shiriaeva ont abouti à l'obtention d'une nouvelle structure co-cristallisée des récepteur A<sub>2A</sub> avec le composé **6** (PDB : 8DU3), avec une résolution de 2,5 Å (**Figure 44**).



**Figure 44. Structure co-cristallisée et mode de liaison du composé 6.<sup>172</sup> (PDB : 8DU3)**

Comme nous pouvons l'observer sur la **Figure 44**, l'amine primaire en position C2 forme des liaisons hydrogène avec l'Asn253 et le Glu169. Le furane établit une liaison hydrogène avec l'Asn253 et interagit par liaison hydrophobe avec le Trp246. Enfin, l'hétérocycle quinazoline interagit avec la Phe168 par interaction  $\pi$ -stacking et avec l'Asn253 par liaison hydrogène *via* son atome d'azote intracyclique en position C3. Cette structure co-cristallisée a pu confirmer un nouveau mode de liaison des quinazolines prédit par modélisation moléculaire. Grâce à ces résultats, un premier article sur les composés quinazoliques, auquel j'ai contribué, a pu être publié en 2022 dans le *European Journal of Medicinal Chemistry*.<sup>172</sup> (DOI : 10.1016/j.ejmech.2022.114620. Epub 2022 Jul 22)

À la suite de ces résultats, le second objectif de ma thèse était d'explorer davantage les RSA autour des quinazolines et d'améliorer la solubilité de ces composés tout en gardant une affinité de l'ordre du nanomolaire. En effet, la solubilité fait défaut à de nombreux antagonistes des récepteurs  $A_{2A}$  décrits dans la littérature et aux composés synthétisés par Raphaël Bolteau.<sup>168</sup> Obtenir des composés avec une forte affinité et ayant une solubilité suffisante permettrait de les évaluer *in vivo* et de les valider dans plusieurs modèles animaux, confirmant ainsi l'intérêt thérapeutique de ces molécules. Grâce à la modélisation moléculaire, de nouvelles modulations ont été réalisées en position C6 et C7 afin d'explorer la poche hydrophobe du récepteur et en position C2, en ajoutant des chaînes amines salifiables afin d'augmenter la solubilité (**Figure 45**).

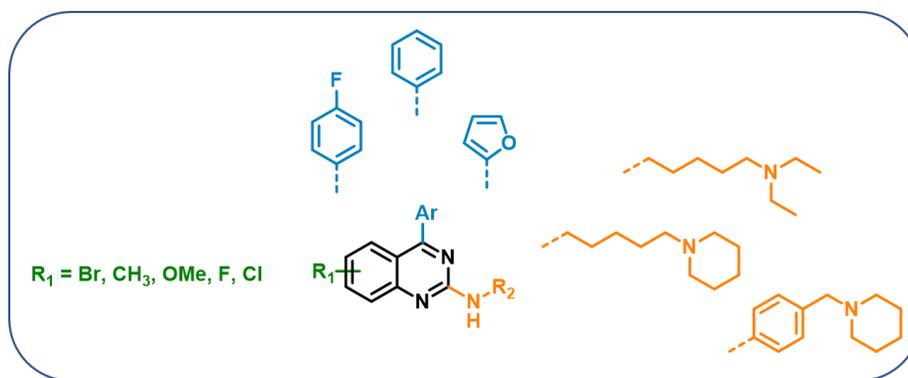


Figure 45. Nouvelles modulations envisagées sur le noyau quinazolinique.

#### 4. Ligands duaux $A_{2A}R/mGluR_5$

Des premiers ligands duaux  $A_{2A}R/mGluR_5$  ont été développés lors des travaux de thèse de Raphaël Bolteau.<sup>168</sup> Le noyau quinazolinique a été utilisé comme point de départ pour la conception de ces ligands duaux, en particulier pour le composé **4** mentionné précédemment, dont la structure est illustrée ci-dessous (Figure 46).

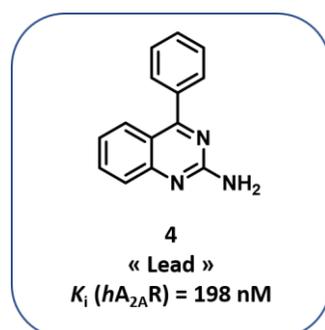
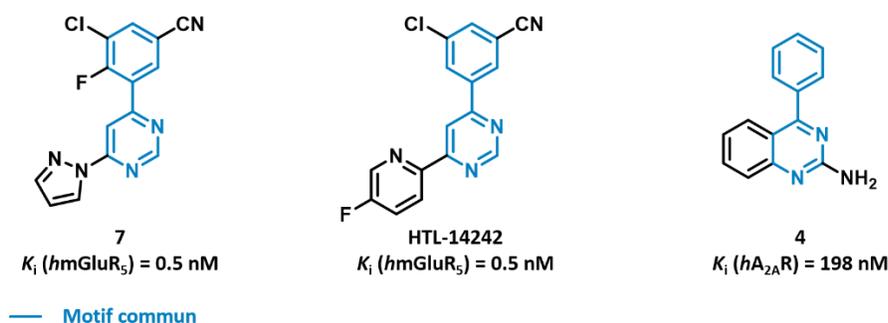


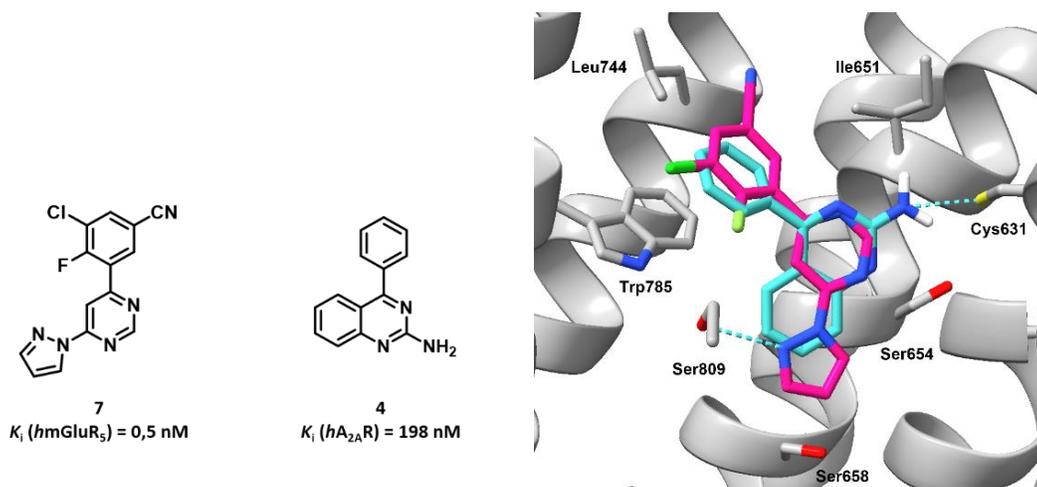
Figure 46. Structure du composé 4.

En effet, ce composé présente une affinité submicromolaire sur le récepteur  $A_{2A}$  et possède une structure de petite taille, ce qui le rend facilement modulable. De plus, ce composé présente une ressemblance avec certains modulateurs allostériques des récepteurs  $mGlu_5$ , notamment les pyrimidines.

Plusieurs composés possédant un noyau pyrimidine ont été décrits dans les travaux de Christopher J. A. *et al.* (Figure 47) et ont montré d'excellentes affinités envers les récepteurs  $mGlu_5$  ( $K_i (hmGluR_5) = 0.5 \text{ nM}$ ).<sup>166</sup> Ces études ont conduit à la co-cristallisation des deux composés illustrés sur la Figure 47 au sein du site allostérique du récepteur  $mGlu_5$ .

Figure 47. Structures des composés pyrimidiques.<sup>166</sup>

En plus de leur ressemblance structurale, les composés pyrimidiques et le composé **4** ont montré par modélisation moléculaire un mode de liaison quasi-similaire au sein du récepteur  $mGlu_5$  (**Figure 48**). Le composé **4** interagirait principalement par interaction  $\pi$ -stacking avec le Trp785 et par liaisons hydrogènes avec la Ser654.

Figure 48. Superposition de la pose docking sélectionnée du composé **4** (cyan) à la structure co-cristallisée du composé **7** (rose) au sein du site allostérique du récepteur  $hmGluR_5$ . (PDB : 5CGC)

Pour concevoir des ligands duaux  $A_{2A}R/mGluR_5$ , une stratégie de ligands « fusionnés » a été développée à partir des structures des composés quinazoliques et pyrimidiques. Cette approche a conduit à la conception et à la synthèse de ligands appartenant à une nouvelle famille chimique : les 2-aminopyrimidines (**Figure 49**). La fonction amine a été ajoutée en position C2 de la pyrimidine, car cette fonction est présente chez de nombreux antagonistes  $A_{2A}R$  et semble nécessaire pour obtenir une bonne affinité pour ces récepteurs. L'ajout de cette amine pourrait conférer une affinité supplémentaire pour les récepteurs  $A_{2A}$ , en plus de celle pour les récepteurs  $mGlu_5$ .

Le motif 2-aminopyrimidine est également présent dans la structure de l'étrumadenant (**Figure 15, p 20**), un antagoniste  $A_{2A}R$  avec un excellent  $K_D$  de 1,4 nM, actuellement en phase II pour le traitement du cancer colorectal métastatique.<sup>75</sup> L'étrumadenant et les composés pyrimidiques ciblant  $mGluR_5$  démontrent ainsi que les composés 2-aminopyrimidiques possèdent un réel potentiel thérapeutique en tant que ligands duaux  $A_{2A}R/mGluR_5$ .

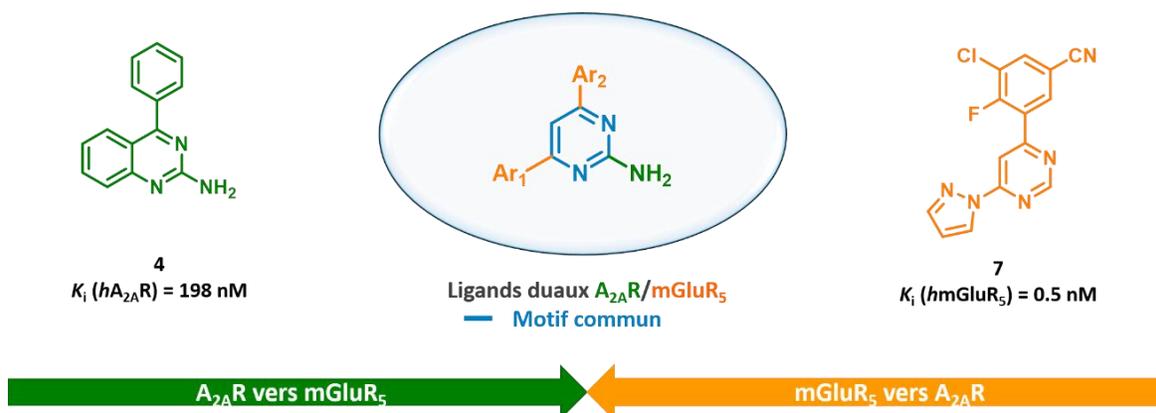


Figure 49. Stratégie de ligands « fusionnés ».

Des premiers composés ont été synthétisés et évalués *in vitro* sur le récepteur  $mGluR_5$  au sein du laboratoire, ce qui a permis d'identifier le composé « hit » **8 (Figure 50)**. Ce composé présente une affinité micromolaire (à 10  $\mu\text{M}$ ) sur le récepteur  $mGluR_5$  tout en conservant une affinité submicromolaire sur le récepteur  $A_{2A}$  ( $K_i (hA_{2A}R) = 774 \text{ nM}$ ). Ce composé apparaît donc comme étant notre premier « hit » multifonctionnel puisqu'il présente une affinité envers les deux récepteurs. De plus, il présente un mode de liaison similaire aux deux composés de départ **4** et **7** au sein de chacun des deux récepteurs (**Figure 51**).

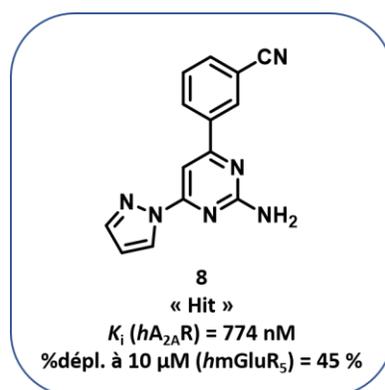
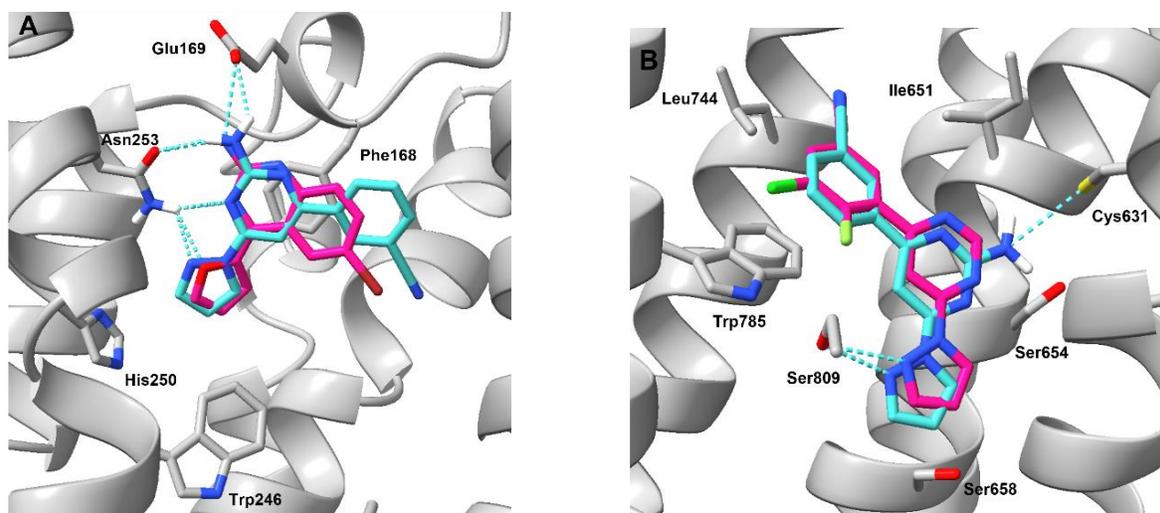
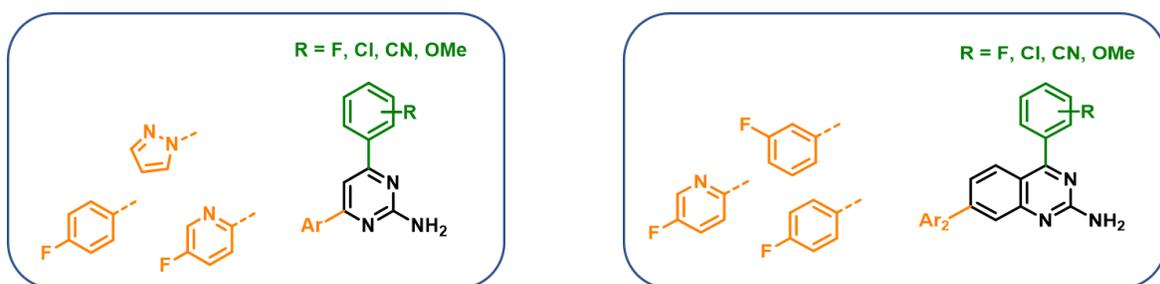


Figure 50. Structure du composé « hit » multifonctionnel.



**Figure 51. (A) Superposition de la pose docking sélectionnée du composé 8 (cyan) à la structure co-cristallisée du composé 6 (rose) au sein du récepteur  $hA_{2A}R$ . (PDB : 8DU3) (B) Superposition de la pose docking sélectionnée du composé 8 (cyan) à la structure co-cristallisée du composé 7 (rose) au sein du site allostérique du récepteur  $hmGluR_5$ . (PDB : 5CGC)**

Le concept de ligands mixtes ciblant les récepteurs  $A_{2A}$  et  $mGlu_5$  a donc été prouvé pour la première fois au sein de notre laboratoire avec l'obtention du composé mixte « hit ». À partir de la structure de cette molécule, le troisième objectif de ma thèse était de développer de nouvelles molécules conservant une affinité submicromolaire pour les récepteurs  $A_{2A}$  et présentant également une affinité submicromolaire voire nanomolaire pour les récepteurs  $mGlu_5$ . Un autre objectif était de mieux comprendre les relations structure-activité des composés duaux pour les deux récepteurs  $A_{2A}$  et  $mGlu_5$ . Pour cela, deux familles de composés ont été envisagées : les 2-aminopyrimidines afin de continuer les études sur ces composés et les quinazolines.



**Figure 52. Nouvelles modulations envisagées pour les ligands duaux  $A_{2A}R/mGluR_5$ .**

Pour évaluer l'affinité des composés, une nouvelle méthode biophysique a dû être développée et validée. Par conséquent, ce nouvel objectif a été intégré à ma thèse, et plusieurs mois de travail ont été consacrés

à sa réalisation. Enfin, le dernier objectif de cette thèse était de vérifier le pouvoir antagoniste de nos meilleurs composés envers le récepteur  $A_{2A}$ , grâce à un test de fonctionnalité.

Ce manuscrit de thèse sera ainsi composé de quatre chapitres :

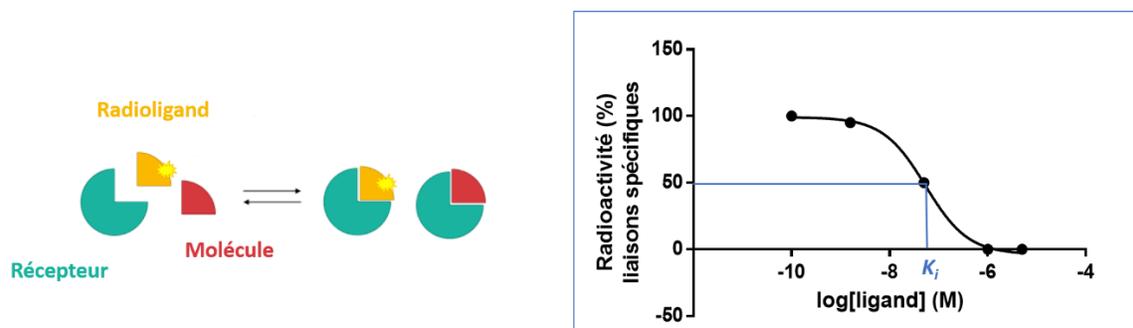
- Le **chapitre 1** décrira, dans une première partie, la mise en place et l'optimisation d'un test de polarisation de fluorescence sur les récepteurs  $A_{2A}$  afin de mesurer l'affinité des ligands  $A_{2A}R$ , ainsi que la synthèse d'une sonde visant les récepteurs  $mGlu_5$ . Dans une seconde partie, le principe et la validation d'un test de fonctionnalité sur les récepteurs  $A_{2A}$  seront présentés.
- Les études réalisées sur les composés benzofuraniques seront présentées dans le **chapitre 2**. Dans un premier temps, la conception et la synthèse de ces ligands seront décrites. Dans un second temps, les mesures d'affinités de ces composés seront exposées.
- Le **chapitre 3** sera dédié à l'étude des composés quinazoliniques dérivés du composé « hit » **6**. Cette partie détaillera la conception, la synthèse et l'évaluation pharmacologique de ces composés. Les relations structure-activité basées sur les résultats obtenus seront également discutées. Grâce aux résultats obtenus, une nouvelle sonde fluorescente  $A_{2A}R$  a été conçue. La synthèse de cette sonde sera également décrite.
- Enfin, le **chapitre 4** évoquera le développement de nouveaux ligands multifonctionnels visant  $A_{2A}R$  et  $mGlu_5$ . La conception, la synthèse et l'évaluation pharmacologique de ces composés seront décrites dans ce chapitre.

# **Chapitre 1 : Développement de tests par polarisation de fluorescence**

Un des grands objectifs de ma thèse était de déterminer l'affinité des composés synthétisés de manière rapide et efficace afin de réaliser des relations structure-activité et de concevoir de nouvelles molécules en fonction des résultats obtenus. Malheureusement, la technique de mesure d'affinité, le « radiobinding », déjà développée auparavant n'a pu être utilisée durant ma thèse. En effet, le compteur à scintillation permettant la mesure de la radioactivité est tombé en panne au début de ma deuxième année de thèse. Cependant, cela m'a donné l'opportunité de développer et d'optimiser un nouveau test d'affinité sur les récepteurs  $A_{2A}$ , ce qui a constitué une partie essentielle de mes travaux de thèse. L'ensemble des expériences de mesure d'affinité a été réalisé au sein de notre laboratoire, et j'ai eu la chance d'être aidée par le Dr. Séverine Ravez et le Dr. Sergio Hernandez-Tapia tout au long de la mise en place et de l'optimisation de cette nouvelle méthode de mesure de l'affinité.

### I. Mesure de l'affinité par polarisation de fluorescence

Initialement, l'affinité des antagonistes  $A_{2A}R$  et des ligands duaux  $A_{2A}R/mGluR_5$  était déterminée par un test de « radiobinding ». Le « radiobinding » est une technique biochimique permettant de déterminer l'affinité, c'est-à-dire la force avec laquelle un ligand va se lier à un récepteur grâce à une expérience de compétition entre un « radioligand » (molécule de référence marquée radioactivement) et notre composé à tester (**Figure 53**).<sup>173,174</sup>



**Figure 53. Principe du « radiobinding » et courbe dose-réponse théorique d'une expérience de compétition entre un « radioligand » et un ligand non radiomarqué.**

Malheureusement, le compteur à scintillation utilisé au sein de la plateforme de binding de la Faculté de Pharmacie de Lille (Dr. Christophe Furman) n'est plus en service et aucun autre appareil en format plaque 96 puits n'est disponible dans la région de Lille. De surcroît, malgré le fait que cette technique biochimique soit une méthode très utilisée pour la mesure d'affinité, de plus en plus de laboratoires cherchent à remplacer cette méthode par d'autres techniques biophysiques. En effet, le « radiobinding » présente d'importants inconvénients en termes de coût, de rentabilité et il devient difficile d'évacuer des déchets

radioactifs.<sup>175</sup> Afin de pallier ces problèmes et de mesurer l'affinité de nos composés, nous avons décidé de mettre en place une nouvelle technique de mesure d'interactions ligand-récepteur au sein de notre laboratoire. Différentes techniques biophysiques ont été développées ces dernières années afin de mesurer l'affinité d'un ligand sur un RCPG, telles que le FRET<sup>175</sup> (transfert d'énergie par résonance de fluorescence), la cytométrie<sup>88</sup> en flux ou encore la polarisation de fluorescence (FP).<sup>176</sup> Nous avons choisi de développer un test de FP car ce dernier a déjà été décrit dans les travaux de Kecskés M. *et al.*<sup>176</sup> sur les A<sub>2A</sub>R et leur a permis d'obtenir des constantes d'inhibition similaires à celles obtenues en « radiobinding » pour des agonistes et antagonistes A<sub>2A</sub>R de référence. Cette technique de mesure présente également de nombreux avantages en comparaison du « radiobinding », comme décrit dans le **Tableau 5** ci-après. En effet, la FP permet la réalisation de tests dans de meilleures conditions en termes de sécurité car l'emploi d'éléments radioactifs n'est pas nécessaire ainsi que leur élimination qui doit être réalisée avec précaution.<sup>175</sup> Contrairement aux fluorophores, la durée de conservation des « radioligands » peut être relativement courte, cela dépend de la demi-vie de l'isotope radioactif. Par exemple, le fluor-18 (<sup>18</sup>F) a une demi-vie d'environ 110 minutes, il doit donc être utilisé dans les heures qui suivent sa fabrication.<sup>177</sup> Le tritium (<sup>3</sup>H), quant à lui, a une demi-vie de 12,3 ans, ce qui permet une utilisation plus prolongée de plusieurs mois voire années.<sup>178</sup> Les « radioligands » peuvent également subir un phénomène de décomposition par auto-radiolyse.<sup>179</sup> L'auto-radiolyse est engendrée par l'émission de rayons émis par le composé lui-même. De plus, des étapes de filtration sont nécessaires pour réaliser de tels essais de « radiobinding » et ceux-ci prennent du temps. En plus d'être une technique moins coûteuse et plus sécurisée, la FP permet d'obtenir un test ayant une sensibilité, une précision et une spécificité comparable à celle d'un test de « radiobinding ».

| Critères                    | « Radiobinding »   | Polarisation de fluorescence   |
|-----------------------------|--|--|
| Sensibilité                 | Très élevée grâce au radioligand   | Élevée, permet une détection rapide  |
| Précision et spécificité    | Très précise et spécifique   | Très précise et spécifique   |
| Consommation d'échantillons | Requiert de petites quantités  | Requiert de petites quantités, miniaturisation possible                      |
| Séparation des composants   | Nécessité de séparer les composants libres et liés                               | Pas de séparation nécessaire   |
| Manipulation et sécurité    | Nécessite des précautions et une infrastructure adaptée aux composés radioactifs | Ne nécessite pas de précautions spéciales                                    |
| Durée de vie des réactifs   | Radioligands ont une durée de vie limitée  | Fluorophores ont une durée de vie plus longue                                |
| Coût et logistique          | Très coûteuse (plusieurs milliers d'euros) et logistique complexe                | Moins coûteuse (quelques centaines d'euros) et plus simple à mettre en œuvre |
| Sécurité et élimination     | Nécessite une manipulation et une élimination appropriée des radioligands        | Pas de préoccupations nécessaires de sécurité et d'élimination               |

Vert : avantage, orange : avantage moyen, rouge : inconvénient

**Tableau 5. Avantages et inconvénients de la FP par rapport au « radiobinding ».**

De surcroît, la FP a également été développée sur d'autres RCPG tels que les récepteurs muscariniques  $M_1$ , les récepteurs à la sérotonine  $5-HT_{2C}$  ou encore les récepteurs de la neurotensine de type 1 (NTS1) afin de réaliser des criblages à haut débit.<sup>180-182</sup> Ces travaux mettent en lumière la possibilité de mettre en place ce test également sur les  $mGluR_5$ , qui sont également des RCPG, malgré le fait que la FP ne soit pas encore décrite sur ces récepteurs.

La FP présentant donc de nombreux avantages, nous avons décidé de mettre en place ce test de mesure de l'affinité sur les récepteurs  $A_{2A}$ , en s'inspirant des travaux de la littérature. Des essais de mise en place de ce même test sur les récepteurs  $mGlu_5$  ont également été envisagés. Nous avons pu démarrer rapidement la mise en place du test car nous disposons d'un lecteur de plaques Clariostar Plus, indispensable pour la mesure de la FP.

## 1. Principe de la polarisation de fluorescence

### 1.1. Polarisation et dépolarisation

La polarisation de fluorescence est une technique biophysique utilisée pour suivre les événements de liaison dans les solutions, afin d'étudier les interactions biomoléculaires, notamment les interactions ligand-récepteur, les liaisons protéines-protéines, et les interactions ADN-protéines.<sup>183-185</sup> La FP nécessite

la présence d'un fluorophore, une molécule qui émet de la lumière lorsqu'elle est excitée par une lumière d'une longueur d'onde spécifique. Elle repose sur la capacité de ce fluorophore à être excité par la lumière polarisée et la capacité de rotation d'une petite molécule liée à ce même fluorophore durant son état « excité ». Le degré de polarisation de fluorescence, défini par le taux de polarisation permet de mesurer les changements d'orientation de l'émission de fluorescence après excitation du fluorophore par une lumière polarisée. Ainsi, si une petite molécule fluorescente, est « libre », sa capacité de rotation dans le milieu sera élevée, ce qui induira l'émission d'une lumière non polarisée et donc une dépolarisation de l'émission de fluorescence (**Figure 54**). A contrario, si la petite molécule est liée à un complexe moléculaire plus large comme une protéine ou un récepteur, sa capacité de rotation sera fortement réduite, et par conséquent provoquera l'émission d'une lumière polarisée et donc une polarisation de l'émission de fluorescence.

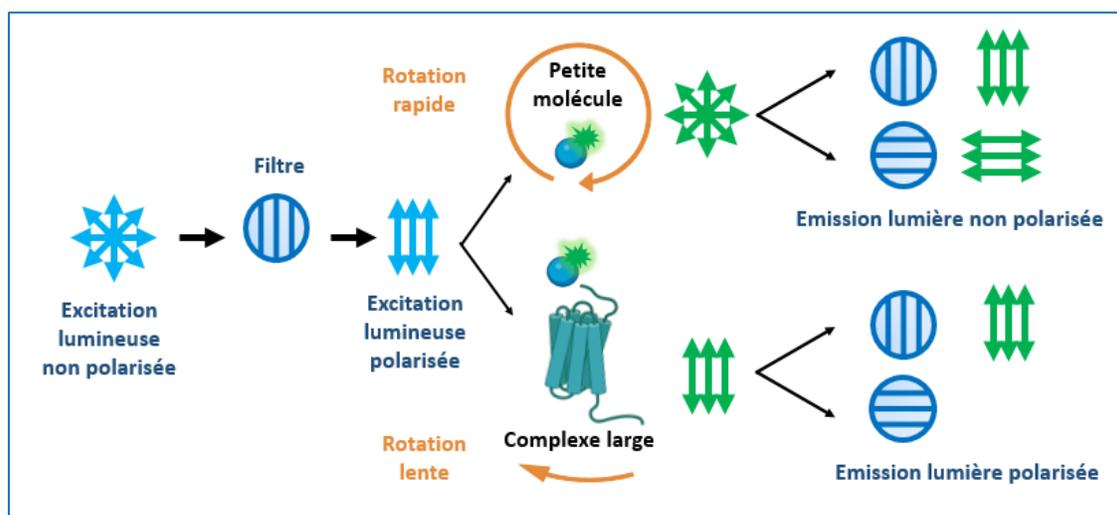


Figure 54. Principe de la polarisation de fluorescence.

### 1.2. Mesure de la polarisation

La FP est mesurée en excitant l'échantillon avec une lumière polarisée et en détectant l'intensité de la lumière fluorescente émise dans les directions parallèles et perpendiculaires par rapport à la direction de la lumière d'excitation. La polarisation, exprimée en unités de milli P, ou mP, est calculée à partir des mesures des valeurs d'intensité de fluorescence parallèle ( $I_{para}$ ) et perpendiculaire ( $I_{perp}$ ) détectées par rapport au sens de la lumière d'excitation polarisée (**Figure 55**).<sup>184</sup> Le facteur G (G) est utilisé pour corriger les effets des composants optiques tels que les filtres, les polariseurs et les monochromateurs, qui peuvent influencer les valeurs de polarisation.

$$mP = 1000 * \frac{I_{para} - G(I_{perp})}{I_{para} + G(I_{perp})}$$

Figure 55. Formule mathématique permettant de déterminer la polarisation.<sup>184</sup>

### 1.3. Expérience de compétition

Dans le but de mesurer l'affinité de composés grâce au test de FP, il est nécessaire d'avoir une molécule liée à un fluorophore, également appelée sonde. Comme expliqué précédemment, c'est la liaison de cette sonde aux récepteurs qui va permettre de déterminer le taux de polarisation de la lumière. Pour mesurer l'affinité d'un composé, une expérience de compétition est réalisée entre la sonde et ce même composé. Cette expérience est réalisée avec des concentrations croissantes de ligand à tester tout en maintenant des concentrations fixes de sonde et de récepteurs. Plus le ligand testé sera affin pour le récepteur, plus il déplacera le complexe sonde-récepteur et donc plus la lumière émise sera dépolarisée. La différence de polarisation entre ces deux états permettra de quantifier l'affinité de ce ligand pour le récepteur et ainsi obtenir une constante d'inhibition. La constante d'inhibition correspond à la concentration à laquelle la liaison spécifique de la sonde est réduite de 50%. Elle est déterminée à partir de l'équation de Cheng et Prusoff (**Figure 56**).<sup>186</sup> Un  $K_i$  plus faible indique une meilleure affinité du ligand testé pour le récepteur.

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[sonde]}{K_D}}$$

Figure 56. Équation de Cheng et Prusoff.<sup>186</sup>

## 2. Mise en place du test de polarisation de fluorescence sur les récepteurs A<sub>2A</sub>

Comme mentionné précédemment, nous nous sommes inspirés des travaux réalisés par Kecskés M. *et al.*<sup>176</sup> afin de mettre en place ce test. Dans ces travaux, les tests sont effectués en plaques 96 puits mais nous avons décidé de réaliser nos tests en plaque 384 puits afin de miniaturiser le test. En effet, cela permet de réduire la quantité des composants par dix et donc ainsi de réduire le coût des tests. De plus, la miniaturisation d'un test est très utile pour réaliser des criblages de molécules. Afin de mettre en place le test, différents facteurs ont été optimisés tels que le choix de la sonde, les concentrations en sonde et en préparations membranaires utilisées ou encore le temps d'incubation. La mise en place et l'optimisation du test de FP sur les récepteurs A<sub>2A</sub> seront décrites dans cette partie.

## 2.1. Choix de la sonde fluorescente A<sub>2A</sub>R

Comme évoqué ci-dessus, il est nécessaire d'avoir une sonde pour mettre en place le test de FP. Concernant les récepteurs A<sub>2A</sub>, nous avons débuté une collaboration avec le Dr. Kenneth A. Jacobson, travaillant sur les A<sub>2A</sub>R au National Institute of Health, à Bethesda (Maryland, USA). En effet, plusieurs sondes fluorescentes A<sub>2A</sub>R ont été synthétisées au sein de son laboratoire, dont une, MRS7416, ayant une très bonne affinité de 30 nM pour les récepteurs A<sub>2A</sub> (**Figure 57**).<sup>88</sup> Cette collaboration nous a donc permis d'utiliser MRS7416 comme sonde afin de mettre en place le test. Cette sonde s'inspire de celle synthétisée par Kecskés M. *et al.*<sup>176</sup>, MRS5346, ayant une affinité de 111 nM pour les récepteurs A<sub>2A</sub>. MRS5346 a été développée à partir d'un antagoniste sélectif de référence des A<sub>2A</sub>R, le SCH442416 ( $K_i(hA_{2A}R) = 4,1$  nM), qui a ensuite été couplé, *via* un linker, à un AlexaFluor 488 ( $\lambda_{ex.} = 488$  nm et  $\lambda_{em.} = 519$  nm), fluorophore très souvent utilisé en FP (**Figure 57**). Ce fluorophore présente des propriétés intéressantes en raison de son temps de demi-vie de 4,1 ns. L'optimisation de la taille de la chaîne carbonnée du linker par Duroux R. *et al.*<sup>88</sup> a permis l'obtention d'une sonde plus affine pour les récepteurs A<sub>2A</sub> ( $K_i(hA_{2A}R) = 30$  nM), MRS7416.

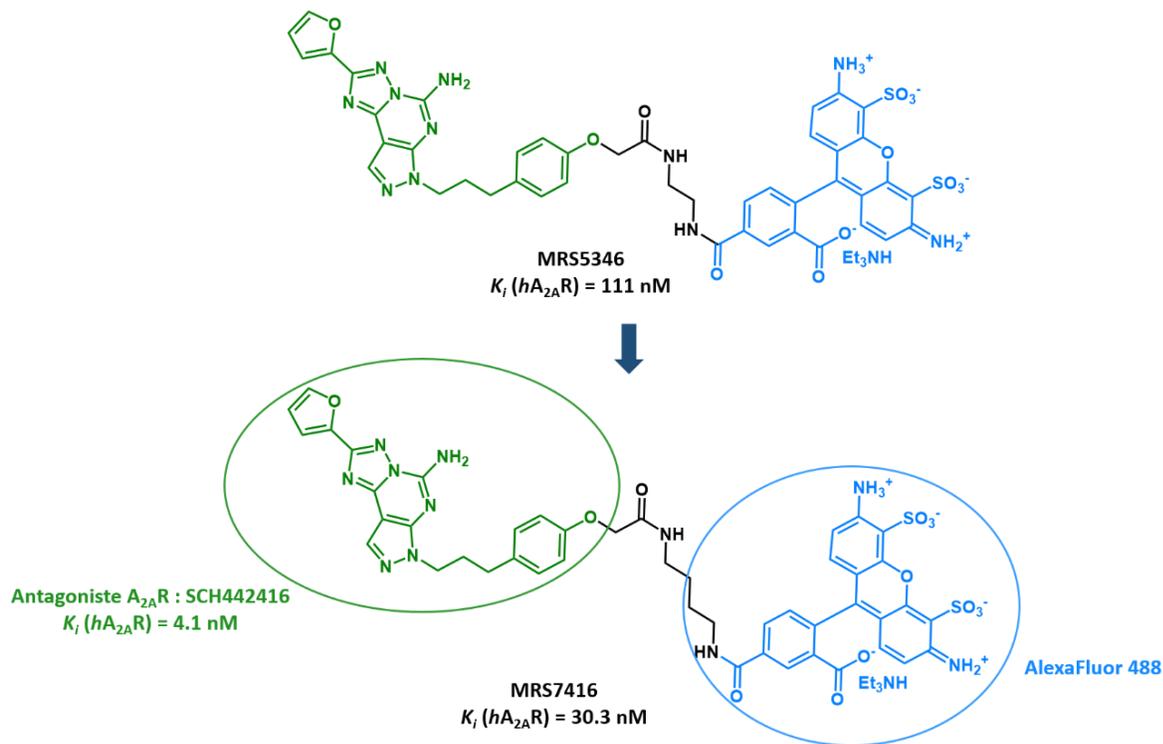


Figure 57. Structures des sondes fluorescentes MRS5346 et MRS7416.<sup>88,176</sup>

C'est donc cette sonde que nous avons utilisé pour réaliser tous nos tests de FP sur  $A_{2A}R$ . La synthèse du composé MRS7416 a été réalisée au sein du laboratoire du Dr. K. A. Jacobson, comme décrit dans les travaux de Duroux *et al.*<sup>88</sup>

## 2.2. Détermination des concentrations en sonde et en membranes

La deuxième étape de mise en place du test était de déterminer les concentrations en sonde et en préparations membranaires  $hA_{2A}R$  optimales. En effet, les concentrations doivent être adaptées au format d'expérience en plaques 384 puits afin d'obtenir une amplitude de signal entre le 0 et 100% de polarisation adéquat (40 à 50 mP). Pour des raisons pratiques et afin de gagner du temps, nous avons utilisé des membranes purifiées surexprimant le récepteur humain  $A_{2A}$  auprès de Revvity (référence commerciale : RBHA2AM400UA). Ces membranes sont préparées à partir de cellules HEK293. De plus, ces mêmes membranes étaient utilisées pour les tests de « radiobinding ».

Différentes concentrations de membranes et de sonde ont été testées, comme indiqué dans le **Tableau 6**. Pour chaque test, une expérience de compétition avec un antagoniste de référence des  $A_{2A}R$ , le ZM-241385 ( $K_i(hA_{2A}R) = 1,4$  nM), a été réalisée.

| [Membranes $A_{2A}R$ ] ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) | [Sonde] (nM) | [ZM-241385] ( $\mu\text{M}$ ) |
|--|--------------|-------------------------------|
| 0,2  | 1            | 0 à 10 (8 points)             |
| 0,2  | 3            | 0 à 10 (8 points)             |
| 0,4  | 5            | 0 à 10 (8 points)             |
| 0,2  | 10           | 0 à 10 (8 points)             |
| 0,4  | 10           | 0 à 10 (8 points)             |
| 0,8  | 10           | 0 à 10 (8 points)             |
| 0,2  | 20           | 0 à 10 (8 points)             |

**Tableau 6. Différentes concentrations en membranes  $hA_{2A}R$  et en sonde testées.**

Les meilleurs résultats ont été obtenus avec une concentration de préparations membranaires de 0,8  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  et une concentration de sonde de 10 nM. En effet, ces conditions ont permis d'obtenir une amplitude de signal supérieure, avec une différence de 40 mP entre les polarités de fluorescence à 0% et 100%. De plus, le test de compétition avec le ZM-241385 a produit une courbe dose-réponse précise, comme illustré sur la **Figure 58**, et a permis d'obtenir une constante d'inhibition de 3,0 nM. Cette valeur est identique à celle obtenue en « radiobinding ». Les autres conditions expérimentales n'ont pas produit de résultats aussi satisfaisants en raison de quantités insuffisantes de préparations membranaires et/ou de sonde. En effet, une quantité de sonde trop faible ne permet pas de saturer tous les  $hA_{2A}R$ . En revanche,

une quantité excessive de sonde empêchera le composé testé de déplacer complètement le complexe sonde-membrane, ce qui affectera les résultats d'affinité.

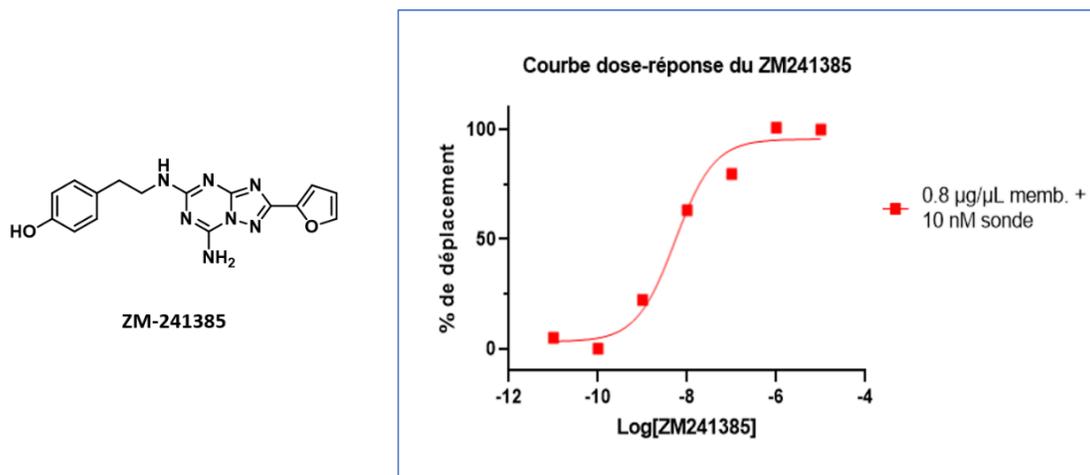


Figure 58. Courbe dose-réponse du ZM-241385 sur le récepteur  $hA_{2A}$  à une concentration en membranes  $hA_{2A}R$  à  $0,8 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  et une concentration en sonde à  $10 \text{ nM}$  en  $N=1$  (GraphPad Prism).

Lors de ces tests, nous avons constaté que les préparations membranaires de chez Revvity présentait un aspect très visqueux et non homogène, ce qui a fortement impacté les tests puisque nous avons rencontré des difficultés à obtenir des résultats reproductibles. En effet, en polarisation de fluorescence, un milieu non homogène peut altérer la trajectoire de la lumière et donc donner des résultats incorrects. De plus, ces préparations sont vendues en petites quantités ( $400 \mu\text{L}$ ) et à un coût élevé ( $1200 \text{ euros}$ ), rendant difficile le test de toutes nos molécules.

Pour pallier ces problèmes, nous avons décidé de produire nous-même des membranes surexprimant les récepteurs  $A_{2A}$ . La culture cellulaire, réalisée par le Dr. Sergio Hernandez-Tapia au sein de notre laboratoire, a été effectuée par transfection d'un plasmide ADORA2A sur des cellules HEK293T. La concentration des préparations membranaires obtenues a été déterminée par un test de Bradford qui se caractérise par un dosage colorimétrique, basé sur le changement d'absorbance et utilisé pour déterminer la concentration de protéines en solution.<sup>187</sup> La concentration en membranes  $hA_{2A}R$  obtenue est d'environ  $9 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

La suite des tests de polarisation de fluorescence a donc été réalisée avec ces nouvelles préparations membranaires. La solution mère de ces membranes est ensuite diluée dans le tampon afin d'atteindre une concentration finale dans le puits de  $0,8 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

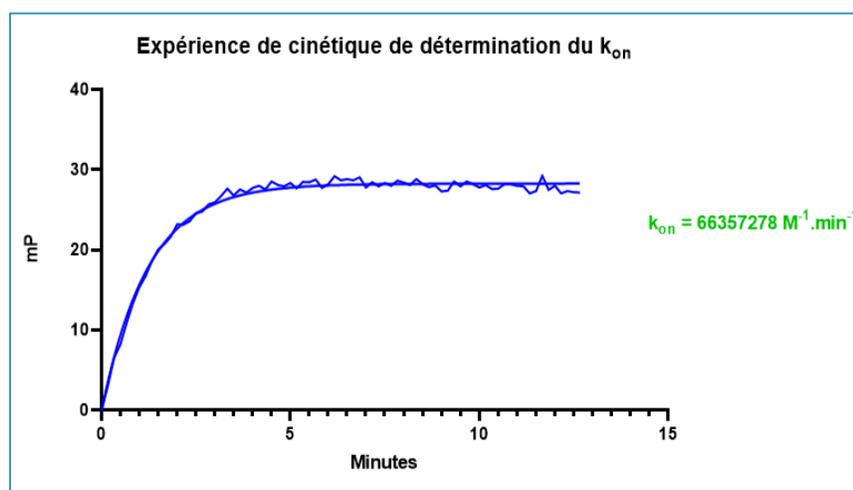
### 2.3. Détermination du $K_D$ de la sonde sur les membranes $hA_{2A}R$

Afin de déterminer les constantes d'inhibition de nos composés, il est nécessaire de connaître la constante de dissociation à l'équilibre ( $K_D$ ) de la sonde utilisée. Pour cela, des expériences de cinétique ont été réalisées afin de déterminer la constante de vitesse d'association  $k_{on}$  et la constante de vitesse de dissociation  $k_{off}$ . Le rapport de ces deux constantes permet de calculer le  $K_D$ . Les conditions expérimentales de ces deux expériences sont décrites ci-dessous, dans le **Tableau 7**.

|  |                         | Expérience $k_{on}$                             | Expérience $k_{off}$                            |
|--|-------------------------|---|---|
| <b>Membranes <math>hA_{2A}R</math></b>   |                         | <b>0,8 <math>\mu\text{g}/\mu\text{L}</math></b> | <b>0,8 <math>\mu\text{g}/\mu\text{L}</math></b> |
| <b>Sonde MRS7416</b>                     |                         | <b>10 nM</b>                                    | <b>10 nM</b>                                    |
| <b>CGS-21680 (agoniste)</b>              |                         | <b>/</b>  | <b>10 <math>\mu\text{M}</math></b>              |
| <b>Température et temps d'incubation</b> |                         | <b>30 °C, 15 min</b>                            | <b>30 °C, 30 min</b>                            |
| <b>Composition du tampon de binding</b>  | <b>Tris-base</b>        | <b>50 mM</b>                                    | <b>50 mM</b>                                    |
|  | <b>MgCl<sub>2</sub></b> | <b>10 mM</b>                                    | <b>10 mM</b>                                    |
|  | <b>pH</b>               | <b>7,4</b>                                      | <b>7,4</b>                                      |

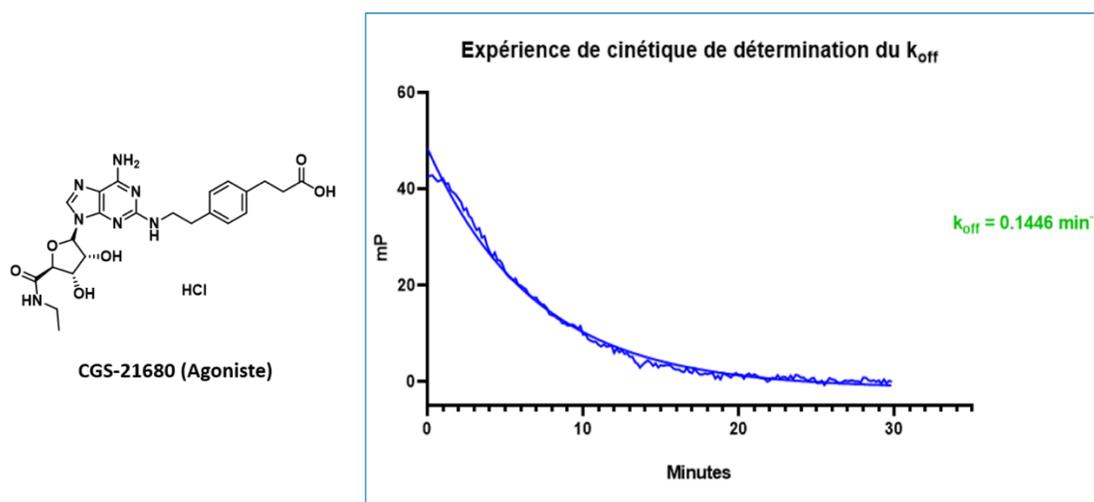
**Tableau 7. Conditions expérimentales utilisées pour les expériences de  $k_{on}$  et  $k_{off}$ .**

Dans un premier temps, l'expérience de cinétique de détermination du  $k_{on}$  a été réalisée. Ce test nécessite uniquement la présence de préparations membranaires et de sonde. Cette expérience permet d'observer la formation du complexe membranes/sonde, comme illustré sur la **Figure 59**, avec une augmentation de la polarisation de fluorescence au cours des premières minutes, suivie d'une stabilisation. Grâce à la courbe obtenue, une valeur de  $k_{on}$  de  $66 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  a été déterminée.



**Figure 59. Détermination de la constante d'association  $k_{on}$  de la sonde MRS7416 sur les membranes  $hA_{2A}R$  en N=3 (GraphPad Prism).**

Dans un second temps, l'expérience de cinétique de détermination du  $k_{off}$  a été réalisée. Dans le même puits utilisé pour déterminer le  $k_{on}$ , un agoniste de référence, le CGS-21680, a été ajouté à une concentration finale de 10  $\mu\text{M}$ . Cela nous a permis d'observer la dissociation du complexe membranes/sonde, comme illustré sur la **Figure 60**, avec une diminution de la polarisation de fluorescence au cours des premières minutes, suivie d'une stabilisation. Grâce à la courbe obtenue, une valeur de  $k_{off}$  de 0,1446  $\text{min}^{-1}$  a été déterminée. Le rapport de ces deux valeurs de  $k_{on}$  et  $k_{off}$ , a permis de déterminer une valeur de  $K_D$  de 2,1 nM. Cette valeur a été utilisée pour les expériences de validation du test de polarisation de fluorescence et pour l'ensemble des tests d'affinité réalisés sur nos composés.



**Figure 60. Détermination de la constante de dissociation  $k_{off}$  de la sonde MRS7416 sur les membranes  $hA_{2A}R$  en présence de CGS-21680 à 10  $\mu\text{M}$  en N=3 (GraphPad Prism).**

Lors des expériences de cinétique d'association, nous avons observé que le complexe membranes/sonde commençait à se dégrader après quinze minutes de réaction. En effet, à partir de ce moment-là, la polarisation de fluorescence commence à diminuer. Nous avons donc décidé de réaliser des tests de stabilité pour voir comment se comportaient les préparations membranaires au cours du temps. Pour cela, nous avons repris exactement les mêmes conditions que décrites précédemment pour la détermination du  $k_{on}$ . Différentes expériences ont été réalisées sur un même aliquot de préparations membranaires. Cet aliquot a été décongelé une première fois. Une partie a été maintenue sur glace toute la journée pour suivre la cinétique à des intervalles de trois heures et demie, tandis qu'une autre partie a été recongelée, puis décongelée une seconde fois afin d'observer l'effet de ce processus sur les membranes.

Comme le montre la **Figure 61**, l'intensité du signal de polarisation de fluorescence diminue au cours de la journée. En effet, lors de la première mesure effectuée le matin, la valeur maximale de polarisation de fluorescence atteint 60 mP, tandis que la mesure maximale prise sept heures plus tard avoisine les 40 mP.

Il y a donc un écart de 20 mP entre ces deux valeurs, ce qui correspond à un tiers du signal initial et est donc non négligeable. De plus, nous avons remarqué qu'un cycle supplémentaire de congélation/décongélation affecte les membranes de manière similaire, entraînant une diminution de 20 mP du signal.

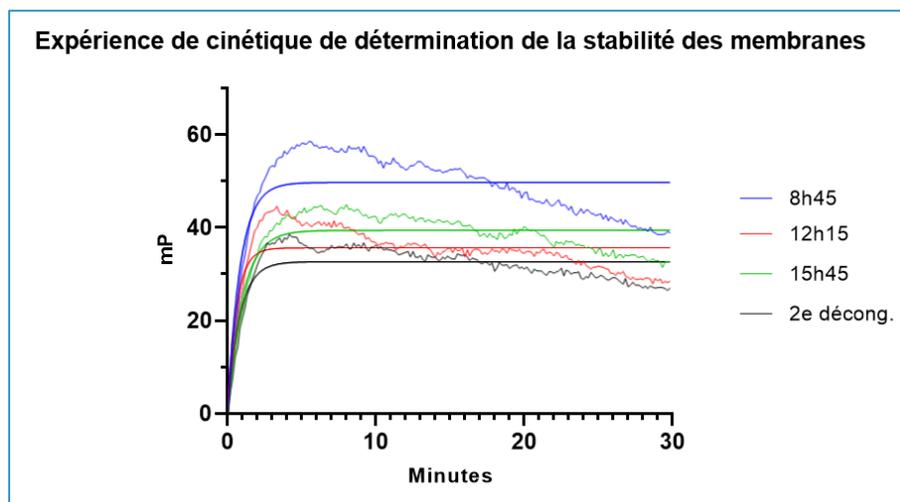


Figure 61. Détermination de la stabilité des membranes  $hA_{2A}R$  sur la journée en N=3 (GraphPad Prism).

Pour résoudre les problèmes liés à la stabilité des préparations membranaires, nous avons décidé, pour les prochains tests, de stocker les membranes en aliquots plus petits, 20  $\mu$ L, quantité suffisante pour réaliser une gamme de concentration d'un composé. Ces aliquots seront utilisés immédiatement après décongélation et ne seront pas recongelés. Nous avons également décidé d'adopter un temps d'incubation de dix minutes et de mesurer les valeurs à ce moment-là afin d'obtenir un signal optimal avant que les membranes ne montrent des signes de dégradation.

#### 2.4. Validation du test de polarisation de fluorescence sur les récepteurs $A_{2A}$

Les conditions expérimentales optimales étant établies, la dernière étape pour mettre en place le test de polarisation de fluorescence sur  $A_{2A}R$  consiste à valider le test en mesurant l'affinité de composés de référence. Deux composés ont été ainsi testés : le ZM-241385 et le composé **6**, qui est un composé « hit » sur ce projet, très affin pour  $A_{2A}R$  ( $K_i(hA_{2A}R) = 20$  nM), synthétisé et testé par « radiobinding » au laboratoire. Les conditions utilisées pour ces tests d'affinité sont décrites dans le **Tableau 8** ci-dessous. Les tests ont été réalisés en triplicata expérimental.

|                                   |                   | Conditions  |
|-----------------------------------|-------------------|---|
| Membranes $hA_{2A}R$              |                   | 0,8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$   |
| Sonde MRS7416                     |                   | 10 nM   |
| Composé à tester                  |                   | ZM-241385 : 0-4 $\mu\text{M}$ (9 points)<br>Composé 6 : 0-10 $\mu\text{M}$ (8 points) |
| Température et temps d'incubation |                   | 30 °C, 10 min   |
| Composition du tampon de binding  | Tris-base         | 50 mM   |
|                                   | MgCl <sub>2</sub> | 10 mM   |
|                                   | pH                | 7,4   |

Tableau 8. Conditions expérimentales utilisées pour les mesures d'affinités du ZM-241385 et du composé 6.

Les tests sur le ZM-241385 ont permis d'obtenir des résultats précis, comme illustré sur la **Figure 62**. La constante d'inhibition obtenue pour ce composé est de 3,0 nM, ce qui est en accord avec les valeurs de la littérature et les résultats de « radiobinding », qui sont d'environ 1,4 nM. De plus, comme le montrent les écarts-types sur la courbe, les résultats sont reproductibles.

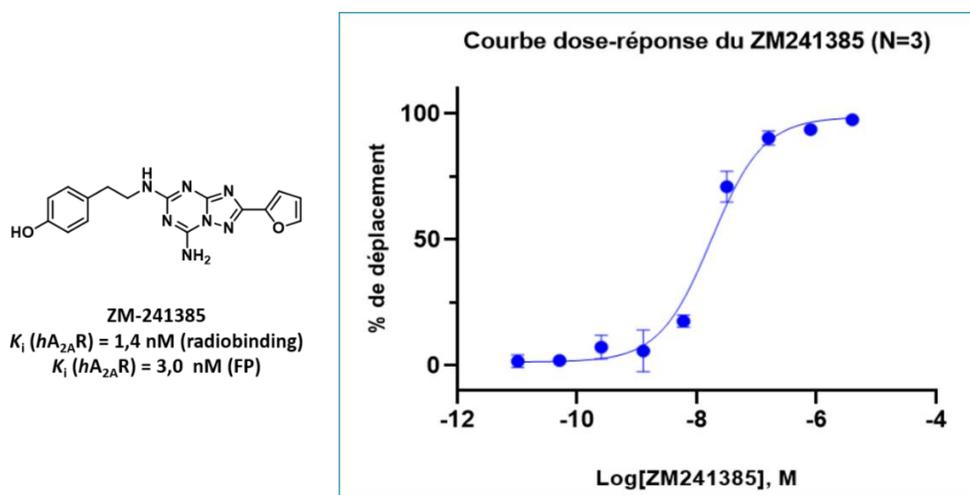


Figure 62. Courbe dose-réponse du ZM-241385 sur le récepteur  $hA_{2A}$  en N=3 (GraphPad Prism).

De même, pour le composé 6, les résultats sont cohérents avec ceux obtenus par « radiobinding », avec une constante d'inhibition de 23 nM en polarisation de fluorescence contre 20 nM en « radiobinding » (**Figure 63**). De plus, les résultats sont également reproductibles.

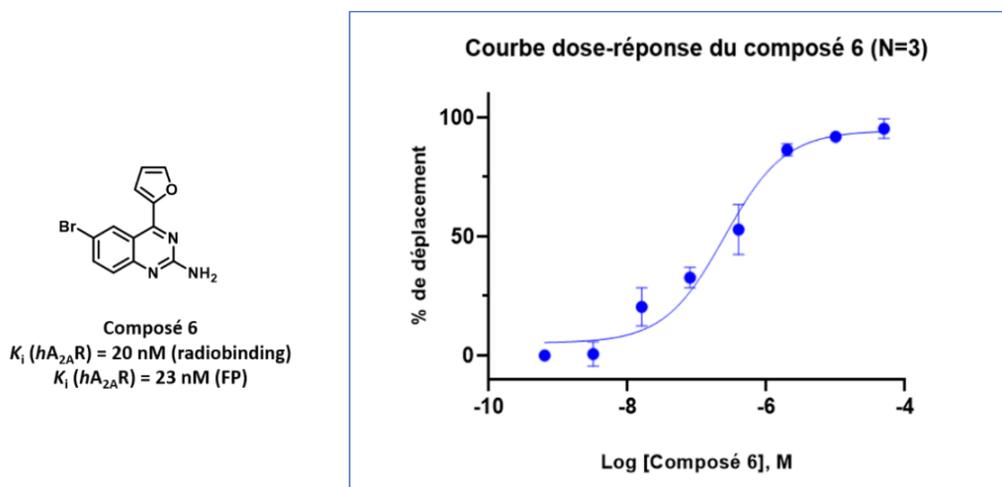


Figure 63. Courbe dose-réponse du composé 6 sur le récepteur  $hA_{2A}$  en N=3 (GraphPad Prism).

Grâce à ces résultats, le test de FP a été validé. Toutes les conditions expérimentales ont été optimisées afin d'avoir un test totalement reproductible et fiable. Un test de mesure de l'affinité par polarisation de fluorescence a donc été développé au sein de notre laboratoire. Nous avons ainsi pu tester l'ensemble de nos composés afin de déterminer leur affinité et établir des RSA autour des  $A_{2A}R$ . Les résultats de ces tests d'affinité sur les composés synthétisés tout au long de ma thèse seront présentés plus loin dans ce manuscrit.

### 3. Mise en place du test de polarisation de fluorescence sur les récepteurs $mGlu_5$

#### 3.1. Design et synthèse d'une sonde fluorescente $mGluR_5$

Concernant les récepteurs  $mGlu_5$ , la technique de polarisation de fluorescence n'a pas encore été développée et aucune sonde adaptée n'a été synthétisée dans la littérature. Nous avons donc décidé de concevoir une sonde spécifique à ces récepteurs et de la synthétiser au sein de notre laboratoire. Pour cela, nous avons pris comme point de départ un dérivé du composé MTEP (Figure 64) qui est un modulateur allostérique négatif très connu et très affiné pour les  $mGluR_5$  ( $K_i (hmGluR_5) = 16 \text{ nM}$ ).<sup>188</sup>

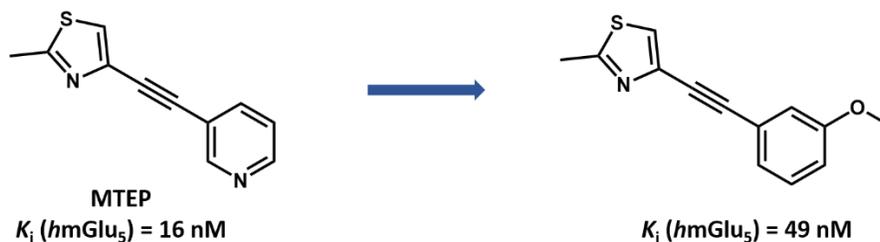
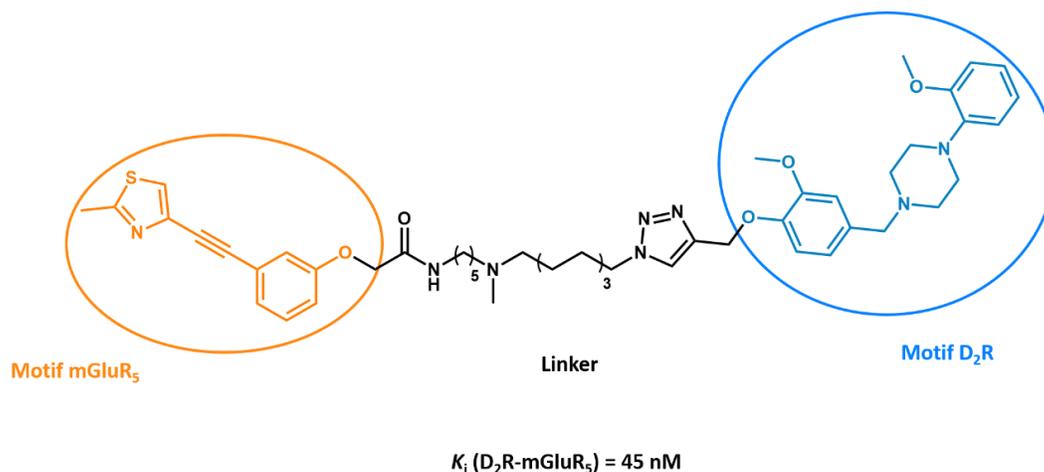


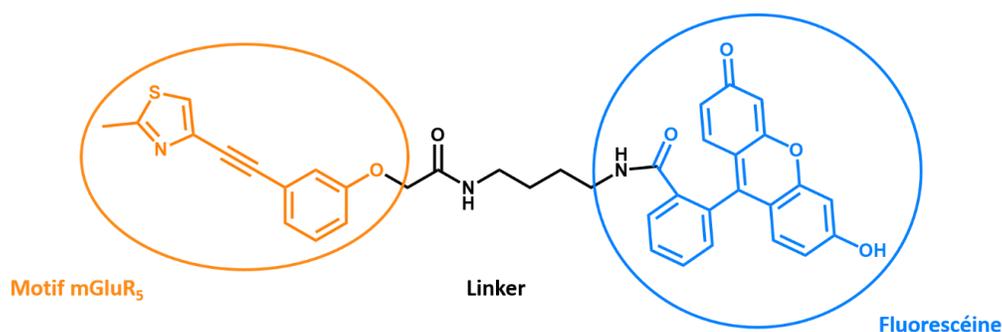
Figure 64. Structures de MTEP et de son dérivé.

Dans les travaux de Qian M. *et al.*<sup>189</sup>, un linker a été ajouté à l'analogue méthoxyphényle du MTEP afin de concevoir des ligands duaux D<sub>2</sub>R/mGlu<sub>5</sub>R (**Figure 65**). Cela démontre qu'il est possible d'ajouter un linker à cette molécule tout en maintenant son affinité pour mGlu<sub>5</sub>. Nous avons opté pour l'incorporation d'un linker avec une chaîne alkyle à quatre carbones, similaire à celle utilisée pour la sonde A<sub>2A</sub>R, MRS7416 (**Figure 57, p. 70**).



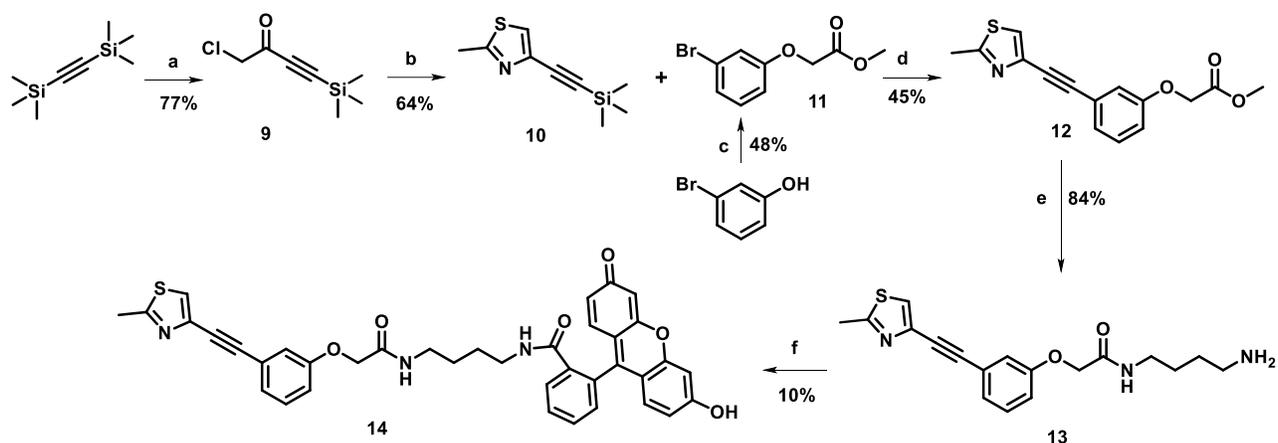
**Figure 65. Structure de la molécule duale D<sub>2</sub>R/mGlu<sub>5</sub>.**<sup>189</sup>

Pour le choix du fluorophore, nous avons opté pour la fluorescéine, qui est couramment utilisée dans les tests de fluorescence. La synthèse de la fluorescéine se réalise facilement en une seule étape, contrairement à l'AlexaFluor 488 qui nécessite six étapes de synthèse.<sup>190</sup> De plus, la fluorescéine est beaucoup plus accessible (< 100 €/g) que d'autres fluorophores comme l'AlexaFluor 488 (> 500 €/mg), tout en conservant les mêmes longueurs d'onde d'excitation et d'émission ( $\lambda_{ex.} = 490$  nm et  $\lambda_{em.} = 515$  nm). La structure de notre sonde est illustrée ci-dessous (**Figure 66**).



**Figure 66. Structure de la sonde mGlu<sub>5</sub> envisagée.**

Le schéma réactionnel de la synthèse de cette sonde est décrit ci-dessous (**Schéma 1**) :



**Réactifs et conditions :** a) chlorure de chloroacétyle (1.1 éq.),  $\text{AlCl}_3$  (1.4 éq.), DCM, 0-25 °C, 2 h; b) thioacétamide (1.3 éq.), DMF, TA, 16 h; c) bromoacétate de méthyle (0.8 éq.),  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (3.0 éq.), acétone, TA, 16 h; d)  $\text{CuI}$  (0.1 éq.),  $\text{Et}_3\text{N}$  (1.5 éq.), TBAF (1.1 éq.),  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$  (0.05 éq.), DMF, 85 °C, 1 h; e) putrescine/méthanol (1:9, v/v), TA, 16 h; f) fluorescéine (1.0 éq.), HOBt (1.2 éq.), EDCI (1.2 éq.),  $\text{Et}_3\text{N}$  (3.2 éq.), DCM, 0-25 °C, 2 h.

### Schéma 1. Schéma réactionnel conduisant à la synthèse de la sonde 14.

La première étape de synthèse consiste à faire réagir le chlorure de chloroacétyle sur le bis(triméthylsilyl)acétylène afin d'obtenir le composé **9**.<sup>191</sup> Une cyclisation intramoléculaire est réalisée sur ce dernier en présence de thioacétamide afin d'obtenir la molécule **10**. Une réaction de type Sonogashira a ensuite été réalisée entre les composés **10** et **11** en présence de TBAF afin de réaliser également la déprotection *in situ* du groupement triméthylsilyle en vue d'obtenir le composé **12** avec un rendement de 45%.<sup>188</sup> Le dérivé bromé **11** a également été synthétisé à partir du 3-bromophénol par action du bromoacétate de méthyle. Ensuite, le composé **13** est obtenu par action de la putrescine sur le composé **12**. Enfin, la dernière étape de synthèse est un couplage réalisé entre le composé **13** et la fluorescéine, afin d'obtenir la sonde **14** ciblant les récepteurs mGlu<sub>5</sub>.<sup>192</sup>

Nous avons également réalisé la synthèse de la fluorescéine par nos propres moyens. Cette synthèse est simple et ne nécessite qu'une seule étape. La réaction entre le résorcinol et l'anhydride phtalique se fait généralement en présence de  $\text{ZnCl}_2$  ou d'acide méthanesulfonique.<sup>193</sup> Nous avons choisi d'utiliser l'acide méthanesulfonique, car il permet d'obtenir de meilleurs rendements en jouant à la fois le rôle d'acide de Lewis et de solvant. La fluorescéine (composé **15**) a ainsi été obtenue avec un rendement excellent de 98%. (Schéma 2).

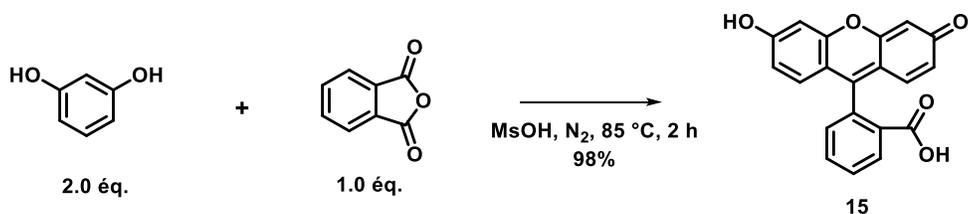


Schéma 2. Synthèse de la fluorescéine.

Le mécanisme de cette réaction étant complexe, celui-ci est décrit sur la **Figure 67**.<sup>194</sup> La réaction de condensation entre le résorcinol et l'anhydride phtalique suit un mécanisme impliquant plusieurs acylations successives de type Friedel-Crafts. Dans un premier temps, l'acide méthanesulfonique protonne l'anhydride phtalique, augmentant ainsi l'électrophilie du carbone carbonyle. Le résorcinol attaque alors ce carbone activé, provoquant l'ouverture du cycle anhydride et la formation d'un intermédiaire acylé. Une seconde molécule de résorcinol réagit ensuite avec l'autre groupe carbonyle de cet intermédiaire, aboutissant à un composé bis-acylé. Une cyclisation intramoléculaire s'opère ensuite, générant le noyau xanthène caractéristique de la fluorescéine. Enfin, une dernière étape de déshydratation permet d'obtenir la fluorescéine.

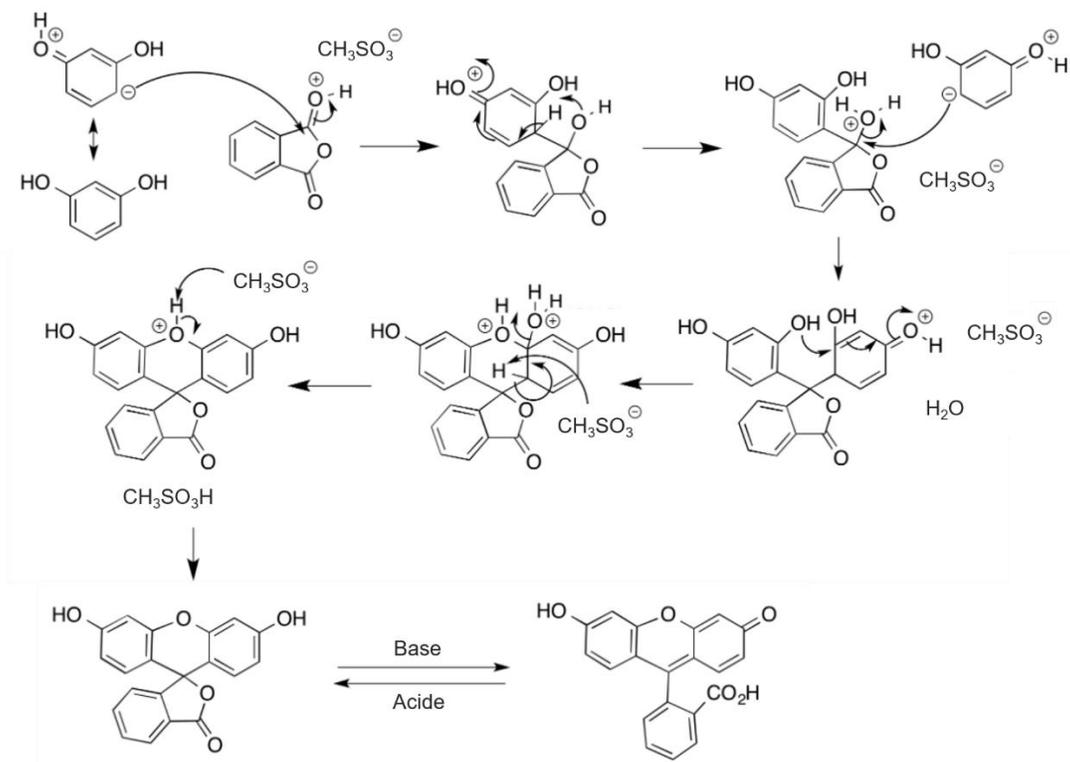
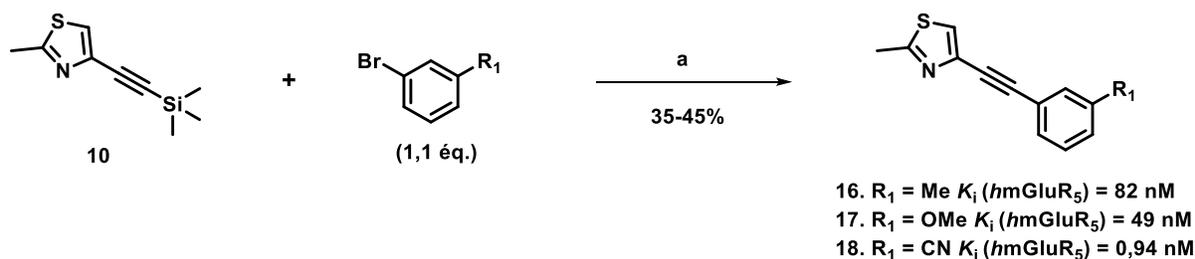


Figure 67. Mécanisme réactionnel de formation de la fluorescéine en présence d'acide méthane sulfonique.<sup>194</sup>

### 3.2. Synthèse de ligands de référence mGluR<sub>5</sub>

Afin de déterminer si la polarisation de fluorescence permet d'obtenir des valeurs de  $K_i$  comparables à celles obtenues par « radiobinding », divers ligands mentionnés dans la littérature ont été synthétisés. Ces composés appartiennent à la même famille que le dérivé initial utilisé pour la sonde.<sup>188</sup> La synthèse de ces composés a été effectuée à partir de la molécule **10** selon le même protocole que décrit précédemment (**Schéma 3**) :



**Réactifs et conditions :** a) CuI (0.1 éq.), Et<sub>3</sub>N (1.5 éq.), TBAF (1.1 éq.), Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0.05 éq.), DMF, 85 °C, 1 h.

Schéma 3. Synthèse des ligands mGluR<sub>5</sub> de référence.

### 3.3. Tests de polarisation de fluorescence

La première étape dans le développement du test de FP consiste à réaliser une expérience de saturation afin de déterminer la concentration de préparation membranaire à utiliser. Nous avons utilisé des membranes purifiées surexprimant le récepteur humain *hmGluR<sub>5</sub>* auprès de Revvity (référence commerciale : ES-555-M400UA) et préparées à partir de cellules CHO. Il est à noter que les tests sur *mGluR<sub>5</sub>* ont été effectués avant ceux sur *A<sub>2A</sub>R*. À ce moment-là, nous ne savions donc pas encore que ces membranes n'étaient pas adaptées à la polarisation de fluorescence.

Des premiers résultats ont montré une augmentation de la FP en fonction de la concentration des membranes, sans toutefois indiquer un déplacement significatif du complexe sonde-récepteur par le MPEP. Lors d'une seconde expérience avec des concentrations membranaires plus élevées, les résultats obtenus n'ont pas été concluants, avec des valeurs de FP très faibles et aucune variation en fonction de la concentration.

Ce problème pourrait être lié à la solution de préparations membranaires, qui est non homogène et visqueuse, comme cela a été observé pour les préparations membranaires *hA<sub>2A</sub>R* de chez Revvity. En effet, une solution non homogène peut interférer avec la polarisation de la lumière, entraînant des signaux très faibles et incohérents. L'effet de concentration observé lors de la première expérience pourrait donc être simplement dû au hasard.

Il serait donc pertinent de produire également des préparations membranaires *hmGluR<sub>5</sub>* par nos propres moyens, comme cela a été fait pour *A<sub>2A</sub>R*. De plus, ayant déjà mis en place le test sur *A<sub>2A</sub>R* dans notre laboratoire, nous connaissons maintenant les étapes à suivre pour optimiser ce test dans de bonnes conditions. Cependant, il est important de noter que la mise en place et l'optimisation du test de « radiobinding » pour les *mGluR<sub>5</sub>* étaient beaucoup plus complexes et longues que pour *A<sub>2A</sub>R*. Il est possible que cela soit également vrai pour le test de polarisation de fluorescence.

Malheureusement, le manque de temps m'a empêché d'avancer davantage sur la mise en place du test de polarisation de fluorescence sur les récepteurs *mGlu<sub>5</sub>*.

## II. Etude fonctionnelle de ligands *A<sub>2A</sub>R*

Afin de vérifier si nos composés les plus affins pour *A<sub>2A</sub>R* sont effectivement des antagonistes, nous avons mené des études de fonctionnalité. À cet effet, nous avons utilisé un test basé sur la mesure de l'AMPC intracellulaire. Le principe et la validation de ce test sont détaillés ci-après.

### 1. Production de l'AMPc intracellulaire

Pour rappel, les récepteurs  $A_{2A}$  modulent la production d'AMPc en se couplant à une protéine  $G_s$  stimulatrice (**Figure 2, p 3**).<sup>19,74</sup> Ainsi, un agoniste peut augmenter l'activité de l'adénylate cyclase, ce qui entraîne une augmentation de la production intracellulaire d'AMPc. À l'inverse, un antagoniste peut inhiber l'activité de l'adénylate cyclase, empêchant ainsi la production d'AMPc intracellulaire. La quantification de l'AMPc intracellulaire est donc une méthode idéale pour déterminer l'effet fonctionnel de divers ligands. Il est à noter que les antagonistes  $A_{2A}R$  mentionnés dans la littérature ne contiennent pas de sucres dans leur structure. En effet, cette absence de sucres constitue la principale différence structurale entre les agonistes et les antagonistes des récepteurs  $A_{2A}$ .<sup>195,196</sup>

### 2. Tests de dosage de l'AMPc intracellulaire

Dans un premier temps, une lignée cellulaire stable de cellules HEK293 surexprimant les récepteurs  $A_{2A}$  a été établie par Mathilde Coevoet, pour la réalisation de ces tests. Ce processus a impliqué la transfection des cellules HEK293 avec le plasmide  $hA_{2A}R$  ADORA2A. Dans un second temps, nous avons utilisé le kit commercialisé par Revvity LANCE Ultra cAMP Detection Kit (référence : TRF0262) pour mesurer l'AMPc intracellulaire afin d'évaluer l'effet fonctionnel de nos composés. Cette méthode de dosage est extrêmement sensible et robuste. Le test fonctionnel repose sur un test TR-FRET basé sur une compétition entre de l'AMPc marquée à l'euporium et de l'AMPc non marquée, vis-à-vis d'anticorps anti-AMPc marqués avec un fluorophore. Comme illustré sur la **Figure 68**, en l'absence d'AMPc libre, les anticorps anti-AMPc marqués interagissent uniquement avec l'AMPc marquée à l'euporium présente dans le milieu. Cette absence d'AMPc libre est produite par le blocage de l'activation du récepteur par action d'un composé antagoniste sur ce dernier. Grâce à la technique biophysique TR-FRET, l'énergie émise par l'euporium excité à 340 nm est transférée aux fluorophores des anticorps anti-AMPc, qui émettent à 665 nm. En présence d'AMPc libre, il y a compétition entre l'AMPc libre et l'AMPc marquée à l'euporium. La présence d'AMPc libre est produite par l'activation du récepteur par action d'un composé agoniste sur ce dernier. Plus la concentration d'AMPc libre est élevée, plus le signal mesuré en TR-FRET sera faible. Il convient de noter que l'étude d'un composé antagoniste doit être réalisée en présence d'une concentration fixe d'agoniste, généralement autour de l' $EC_{80}$  de celui-ci (valeur préconisée par le fournisseur).

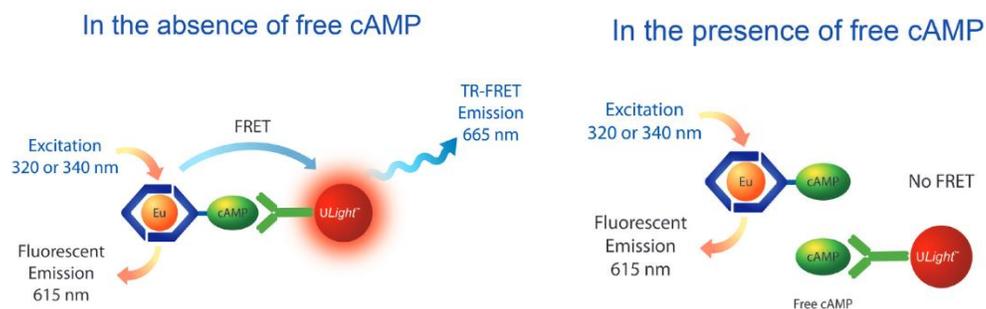


Figure 68. Principe du dosage de l'AMPc par TR-FRET.<sup>197</sup>

Afin de garantir la validité de ce test de fonctionnalité, deux molécules de référence ont été utilisées : le CGS-21680 (agoniste, **Figure 69**) et le ZM-241385 (antagoniste, **Figure 70**).

Tout d'abord, le composé CGS-21680 a été testé. La courbe dose-réponse présentée dans la **Figure 69** montre que cette molécule agit comme un agoniste des A<sub>2A</sub>R. En effet, à mesure que la concentration de CGS-21680 augmente, la quantité d'AMPc augmente également. Un composé agoniste active le récepteur, ce qui stimule la production d'AMPc, comme illustré ici.

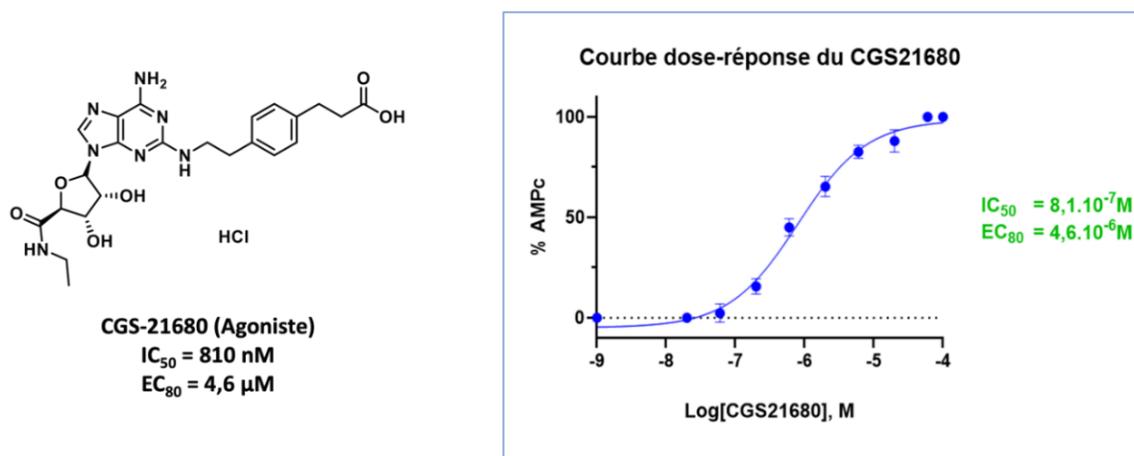
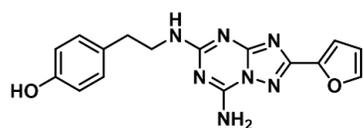


Figure 69. Courbe dose-réponse du CGS-21680 pour le dosage de l'AMPc en N=3.

Cette courbe a également permis de déterminer la concentration inhibitrice médiane ( $IC_{50}$ ) égale à 810 nM, ainsi que la concentration efficace à 80% ( $EC_{80}$ ) de 4,6  $\mu\text{M}$  qui permettra de tester le pouvoir antagoniste du ZM-241385 ainsi que celui de nos composés, comme évoqué précédemment.

Le composé ZM-241385 a donc été testé en présence de CGS-21680 à une concentration fixe de 4,5  $\mu\text{M}$ . La courbe dose-réponse présentée dans la **Figure 70** montre que ce composé agit comme un antagoniste des A<sub>2A</sub>R. En effet, à mesure que la concentration de ZM-241385 augmente, la quantité d'AMPc diminue.

Un composé antagoniste bloque l'activation du récepteur, ce qui bloque également la production d'AMPC, comme illustré ici. L' $IC_{50}$  obtenue pour le ZM-241385 est de 227 nM.



ZM-241385 (Antagoniste)  
 $IC_{50} = 227$  nM

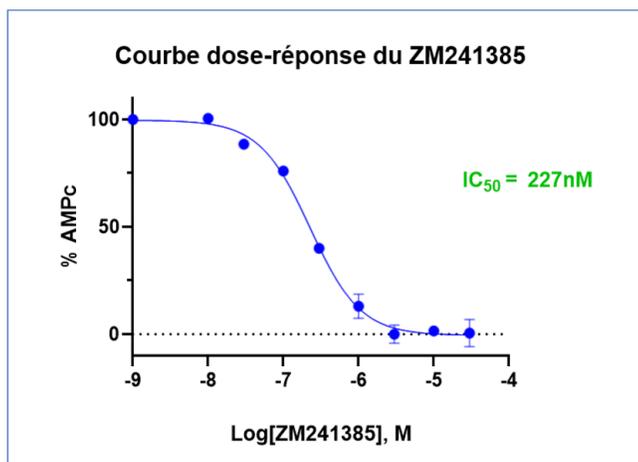


Figure 70. Courbe dose-réponse du ZM-241385 pour le dosage de l'AMPC en présence de CGS-21680 (4,5  $\mu$ M) en N=3.

Grâce à ces résultats, le test de fonctionnalité par dosage de l'AMPC a été validé. Nous avons ainsi pu tester l'ensemble de nos composés les plus affins pour vérifier leur caractère antagoniste. Les résultats de ces tests seront présentés plus loin dans ce manuscrit.

# **Chapitre 2 : La famille des benzofuranes**

## I. Conception de nouveaux composés benzofuraniques

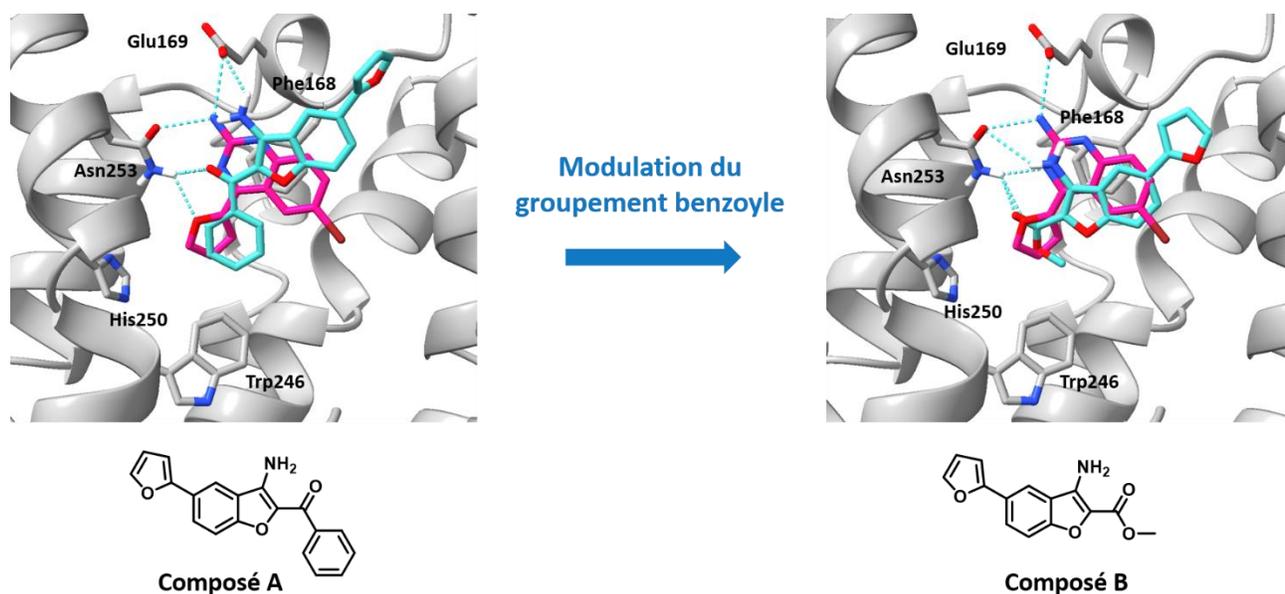
Comme mentionné précédemment, les premiers composés benzofuraniques synthétisés dans ce projet n'ont pas produit de résultats satisfaisants. En effet, leur affinité pour les récepteurs  $A_{2A}$  dépasse  $10 \mu\text{M}$ . Un des objectifs de ma thèse était donc de développer des composés benzofuraniques plus affins pour les  $A_{2A}$ R. Afin d'obtenir des composés plus affins et de préciser les relations structure-activité de la famille des composés benzofuraniques, de nouvelles modulations ont été envisagées en position C2 et C5 du noyau benzofurane. Pour cela, des études de modélisation moléculaire ont été réalisées avec l'aide du Dr. Maxime Liberelle.

### 1. Modulations en position C5

Tout d'abord, des modifications ont été effectuées en position C5 pour explorer la partie supérieure du récepteur. Divers groupements aromatiques ont été testés par modélisation moléculaire, et le groupement furane a donné les meilleurs résultats. En effet, le furane pourrait établir une interaction hydrophobe avec la poche hydrophobe constituée par Ile66, Leu167, Leu267 et Tyr271. Par ailleurs, le groupement furan-2-yl est fréquemment présent dans les structures des antagonistes du récepteur  $A_{2A}$  décrits dans la littérature et permet d'obtenir des ligands très affins, comme mentionné précédemment dans l'introduction.

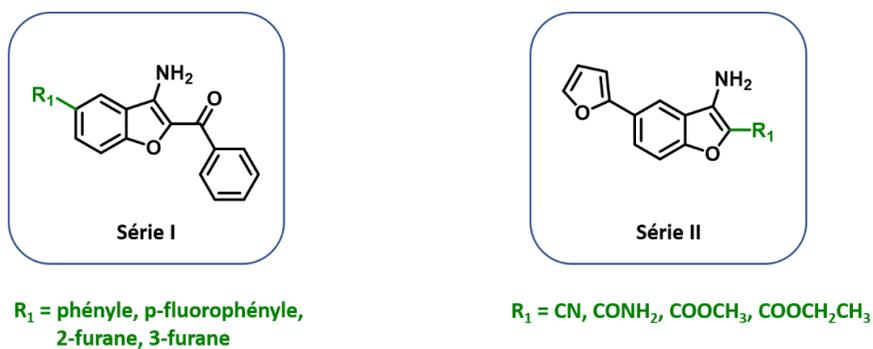
### 2. Modulations en position C2

En ce qui concerne la position C2, nous avons décidé de remplacer le groupement benzoylé par des groupements moins encombrants. Le groupement benzoylé avait été choisi pour son accessibilité chimique et sa présence chez certains antagonistes  $A_{2A}$ R. La présence d'un groupement cétonique semble potentiellement renforcer l'interaction avec l'Asn253, par liaison hydrogène. C'est pourquoi nous avons choisi des groupements tels que le formamide et l'ester méthylique afin de garder cette liaison C=O tout en diminuant l'encombrement lié au phényle du benzoylé. La potentielle interaction hydrogène avec l'Asn253 sera donc conservée, comme illustrée sur la **Figure 71**. Ces modulations seront réalisées sur le dérivé benzofuranique comportant le groupement 2-furane en position C5.



**Figure 71. Superposition de la pose docking sélectionnée du composé A et du composé B (cyan) à la structure co-cristallisée du composé 6 (rose) au sein du récepteur  $hA_{2A}$ . (PDB : 8DU3)**

Deux séries de molécules ont donc été envisagées à partir de ces résultats (**Figure 72**). La synthèse et l'évaluation pharmacologique de ces composés seront donc décrites dans la suite de ce chapitre.

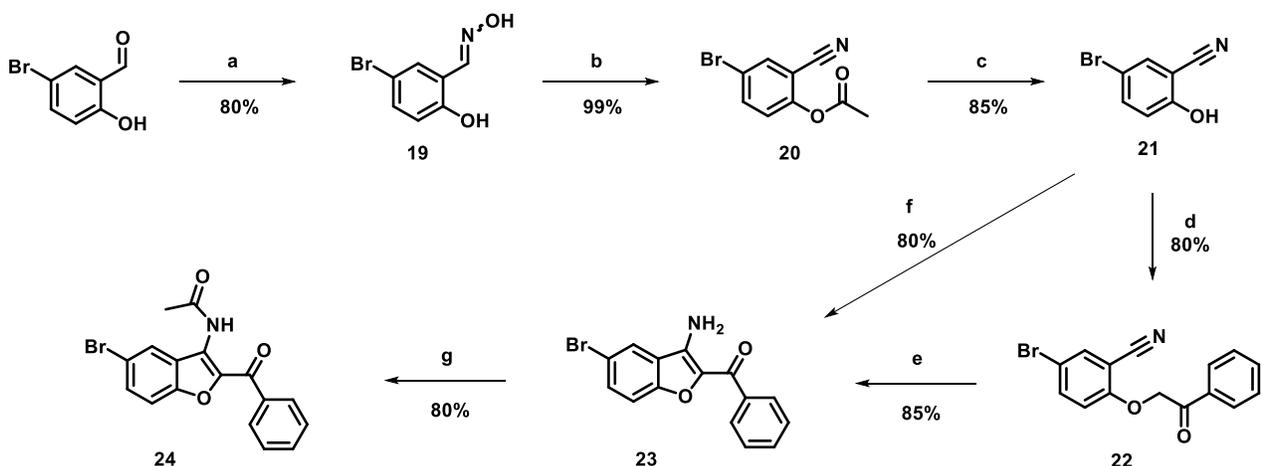


**Figure 72. Structures des séries I et II benzofuraniques.**

## II. Synthèse des composés benzofuraniques

### 1. Synthèse de la série I

Le schéma réactionnel pour la synthèse du synthon clé benzofuranique a été établi lors de la thèse de Raphaël Bolteau et est décrit ci-dessous (**Schéma 4**).



**Réactifs et conditions :** a) chlorhydrate d'hydroxylamine (1.2 éq.),  $K_2CO_3$  (1.0 éq.), EtOH, reflux, 2 h; b) anhydride acétique, reflux, 4 h; c) i) NaOH (2.0 éq.),  $H_2O$ , 60 °C, 2 h ii) HCl; d) 2-bromoacétophénone (1.1 éq.),  $K_2CO_3$  (1.0 éq.), acétone, TA, 4 h; e)  $K_2CO_3$  (2.0 éq.), acétone, reflux, 16 h; f) 2-bromoacétophénone (1.1 éq.),  $K_2CO_3$  (3.0 éq.), DMF, 60 °C, 2 h; g) chlorure d'acétyle (3.0 éq.), pyridine (1.5 éq.), DCM, reflux, 2 h.

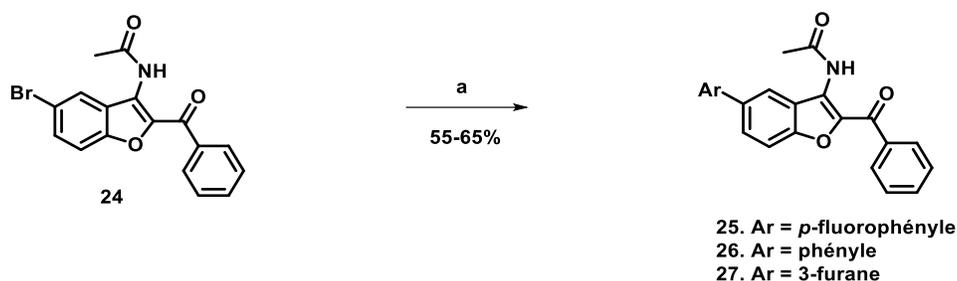
#### Schéma 4. Schéma réactionnel du synthon clé.

À partir du 5-bromo-2-hydroxybenzaldéhyde, disponible dans le commerce, l'aldoxime correspondante, **19**, est formée par réaction de condensation avec le chlorhydrate d'hydroxylamine, au reflux de l'éthanol, avec un rendement de 80%. La déshydratation de cet aldoxime, au reflux de l'anhydride acétique, conduit au cyanoester **20** avec un rendement quantitatif. Ensuite, une réaction de saponification, réalisée par chauffage en milieu basique (NaOH), permet d'obtenir le phénol **21**, avec un rendement de 85%. Le composé **21** peut également être obtenu en une seule étape à partir du 5-bromo-2-hydroxybenzaldéhyde. Comme décrit dans les travaux de S. G. Lambert *et al.*, cette réaction s'effectue en utilisant le chlorhydrate d'hydroxylamine dans l'acide formique.<sup>198</sup> Il est à noter que ce composé **21** est également disponible dans le commerce, mais nous avons choisi de le synthétiser car nous disposons des réactifs nécessaires à sa production.

Une réaction d'O-alkylation est réalisée selon les conditions de l'éthérisation de Williamson<sup>199</sup>, en utilisant la 2-bromoacétophénone en présence de  $K_2CO_3$  dans l'acétone à température ambiante, ce qui conduit à l'intermédiaire O-alkylé **22**. En chauffant ce mélange au reflux de l'acétone avec un excès de  $K_2CO_3$ , une cyclisation intramoléculaire se produit, formant le composé benzofuranique **23** avec un rendement de 85%. Il est à noter que le même composé **23** peut également être obtenu en utilisant la 2-bromoacétophénone avec un excès de  $K_2CO_3$  (3.0 éq.) dans le DMF, chauffé à 60 °C. Ces conditions expérimentales permettent une synthèse plus rapide du composé **23** (2 heures) comparé aux conditions utilisant l'acétone comme solvant (16 heures), tout en maintenant le même rendement.

Enfin, le synthon clé (composé **24**) est obtenu selon une variante de la réaction de Schotten-Baumann<sup>200</sup>, une réaction très souvent utilisée en chimie organique pour la formation d'amides, en présence de chlorure d'acétyle et de pyridine dans le dichlorométhane au reflux, avec un rendement de 85%. Cette réaction est réalisée afin de protéger l'amine et d'éviter d'éventuelles réactions secondaires lors des réactions de type pallado-catalysées qui seront effectuées par la suite.

Après avoir réalisé la synthèse du synthon clé, un couplage pallado-catalysé de type Suzuki a été réalisé afin d'apporter le groupement aromatique en position C5 du noyau benzofuranique.<sup>201</sup> En effet, les couplages pallado-catalysés sont très fréquemment utilisés dans le but de créer des liaisons carbone-carbone. Le couplage est réalisé comme décrit dans le **Schéma 5** et a permis d'obtenir les composés **25-27**.



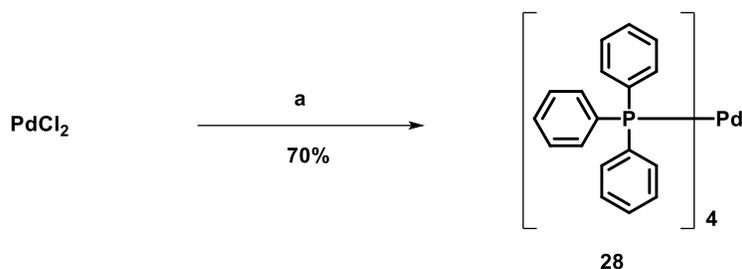
**Réactifs et conditions** : Acide boronique (2.25 éq.), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (4.5 éq.), bromure de tétrabutylammonium (0.11 éq.), Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0.05 éq.), dioxane/eau, 100 °C, 16 h.

#### Schéma 5. Schéma de synthèse des composés 25-27 par couplage de Suzuki.

Des couplages de Suzuki ont été réalisés afin d'apporter les différents groupements aromatiques en position C5 du cycle benzofuranique. Cette réaction est fréquemment utilisée pour former une liaison carbone-carbone entre un halogénure organique et un acide boronique, en présence de complexes de palladium.<sup>202</sup> Le couplage est souvent réalisé avec des bromures d'aryle car plus réactifs que les chlorures correspondants. Cette réaction permet ainsi la possibilité de synthétiser de nombreuses molécules, souvent difficiles à obtenir par les méthodes conventionnelles de la chimie organique.<sup>203</sup> Les acides boroniques présentent un avantage car ils sont peu toxiques et leurs sous-produits, les borates, sont faciles à éliminer. Cette méthode trouve donc de nombreuses applications dans la synthèse de produits pharmaceutiques.

Le couplage pallado-catalysé de type Suzuki, a été effectué en faisant réagir l'acide boronique correspondant au groupement aromatique souhaité en présence du tétrakis(triphénylphosphine)palladium(0) (Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>) comme catalyseur, avec de rendements de 50 à 65%. Le bromure de tétrabutylammonium a été utilisé en tant que catalyseur de transfert de phase afin d'améliorer l'efficacité de la réaction.

La synthèse du catalyseur tétrakis(triphénylphosphine)palladium(0) a également été effectuée au laboratoire (**Schéma 6**).



**Réactifs et conditions** : a) i) PPh<sub>3</sub> (2.0 éq.), DMSO, 150 °C, 1 h puis 130 °C; ii) hydrazine monohydrate (2.5 éq.).

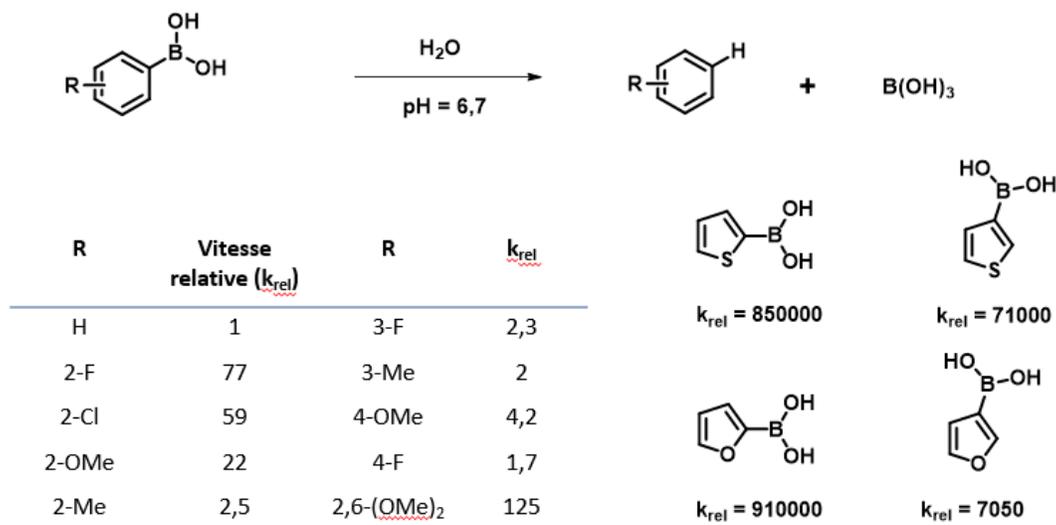
#### Schéma 6. Synthèse du tétrakis(triphénylphosphine)palladium(0).

Le tétrakis(triphénylphosphine)palladium(0) est synthétisé à partir de dichlorure de palladium et de triphénylphosphine dans le DMSO, sous atmosphère inerte. La molécule PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> formée subit ensuite une réduction par l'ajout d'hydrazine monohydrate.<sup>204</sup> Cette réaction entraîne ainsi la formation d'un précipité jaune, le tétrakis(triphénylphosphine)palladium(0), qui est filtré sous un courant d'azote, puis lavé avec de l'éthanol absolu et de l'éther diéthylique. Ce procédé permet d'obtenir le composé désiré **28** avec un rendement de 70%.

**Remarque** : Le couplage de Suzuki peut également être réalisé en utilisant l'acétate de palladium comme catalyseur et la triphénylphosphine comme ligand. En effet, un essai a permis d'obtenir le composé **25** avec un rendement de 60%. Ainsi, les deux conditions expérimentales sont équivalentes.

Ce même couplage a également été tenté sur le composé **24** avec l'acide 2-furane boronique pour incorporer le groupement 2-furane en position C5 du benzofurane. Cependant, aucune réaction significative n'a été observée, ou elle s'est produite avec des rendements très faibles (< 10%), contrairement aux réactions effectuées avec d'autres acides boroniques.

Des investigations ont été menées pour comprendre les raisons du comportement distinct de l'acide 2-furane boronique par rapport aux autres acides boroniques. Il a été démontré que dans un milieu contenant de l'eau, une réaction de protodéboration se produit. Comme illustré dans le schéma ci-dessous (**Schéma 7**), la vitesse de cette réaction de protodéboration est très faible pour les composés aromatiques sans hétéroatomes.<sup>205</sup> En revanche, pour les hétérocycles tels que le furane et le thiophène, la vitesse de réaction est considérablement élevée. Cette réaction de protodéboration se déroule si rapidement que le couplage de Suzuki ne peut avoir lieu, car l'acide boronique nécessaire n'est plus disponible dans le milieu réactionnel. De plus, la position de l'acide boronique sur l'hétérocycle influence également la vitesse de réaction de protodéboration : la position 2 accélère cette réaction plus que la position 3.

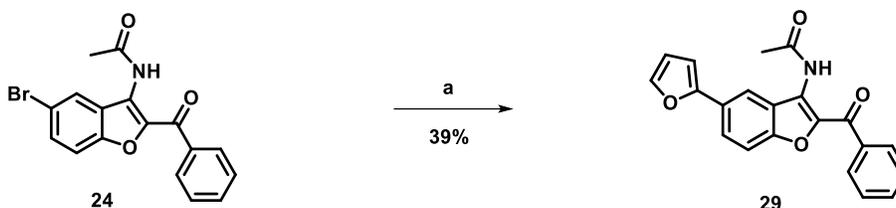


**Schéma 7. Schéma de réaction de protodéboration et vitesses relatives de composés aromatiques.**<sup>205</sup>

L'influence de la position de l'acide boronique sur l'hétérocycle a été confirmée : le composé **27**, comportant un groupement 3-furane, a été obtenu avec un bon rendement de 50 % en utilisant les mêmes conditions que pour les dérivés phényle et *p*-fluorophényle. La position de l'acide boronique joue donc une grande importance dans les rendements de réactions pallado-catalysées.

Pour éviter cette réaction de protodéboration, il est préférable d'utiliser des conditions anhydres, des esters boroniques ou encore des dérivés stanniques à la place des acides boroniques. Nous avons donc décidé de réaliser un couplage pallado-catalysé de type Stille grâce au tributyl(furan-2-yl)stannane (**Schéma 8**). Le tétrakis(triphenylphosphine)palladium(0) a été utilisé comme catalyseur et ligand afin d'obtenir le composé **29** avec un rendement acceptable de 39%.

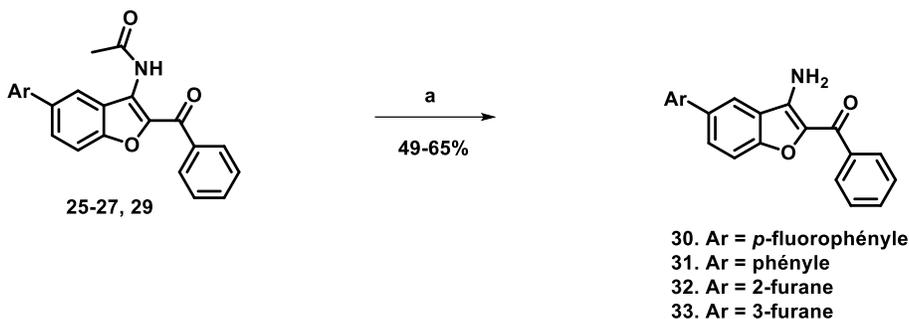
Les dérivés stanniques sont donc une très bonne alternative aux acides boroniques car ils permettent une meilleure stabilité et de plus, sont moins coûteux. Comme le couplage de Suzuki, le couplage de Stille permet de créer des liaisons carbone-carbone, cette fois-ci entre un halogénure organique et un composé organostannique.<sup>206</sup> Ce couplage est compatible avec de nombreux groupements fonctionnels, ce qui en fait une méthode couramment utilisée pour la synthèse de molécules complexes. Les organostannanes sont relativement insensibles à l'humidité et à l'oxygène, permettant ainsi une meilleure stabilité que les acides boroniques.<sup>207</sup> Toutefois, le principal inconvénient du couplage de Stille est l'utilisation de composés stanniques, souvent très toxiques. De plus, l'élimination des dérivés stanniques formés au cours de la réaction est difficile, ce qui peut poser problème lors de la production de composés pharmaceutiques.



**Réactifs et conditions :** a) Tributyl(furan-2-yl)stannane (1.1 éq.), Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0.04 éq.), dioxane, 100 °C, 16 h.

### Schéma 8. Synthèse du composé 29 par couplage de Stille.

Après avoir réalisé la substitution de différents groupements aromatiques en position C5 du noyau benzofurane, le groupement amine primaire en position C3 a été déprotégé (**Schéma 9**). La déprotection est réalisée par hydrolyse basique de l'acétamide en présence de soude dans le méthanol, afin d'obtenir les produits finaux désirés **30-33**.



**Réactifs et conditions :** a) NaOH (2.5 éq.), méthanol, 60 °C, 12 h.

### Schéma 9. Etape de déprotection de l'amine primaire en position C3.

Les composés benzofuraniques de la série I ont ainsi pu être synthétisés. Ces composés ont été testés pour leur affinité sur les récepteurs A<sub>2A</sub> par polarisation de fluorescence. Les résultats de ces tests seront détaillés un peu plus loin dans ce chapitre.

## 2. Synthèse de la série II

À la suite des résultats obtenus en modélisation moléculaire, nous avons décidé de concevoir une seconde série chimique sur les benzofuranes en réalisant des modulations en position C2 avec des groupements moins encombrants que le groupement benzoyle (**Figure 73**). Ces modifications ont été effectuées sur le dérivé portant un groupement 2-furane en position C5, car, comme l'ont montré les structures des ligands décrits dans la littérature et les études préliminaires menées sur les quinazolines, le groupement 2-furane confère une bonne affinité pour le récepteur A<sub>2A</sub>.

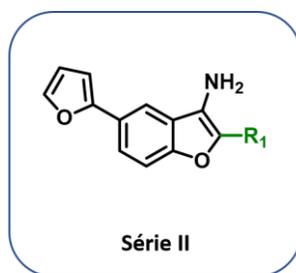
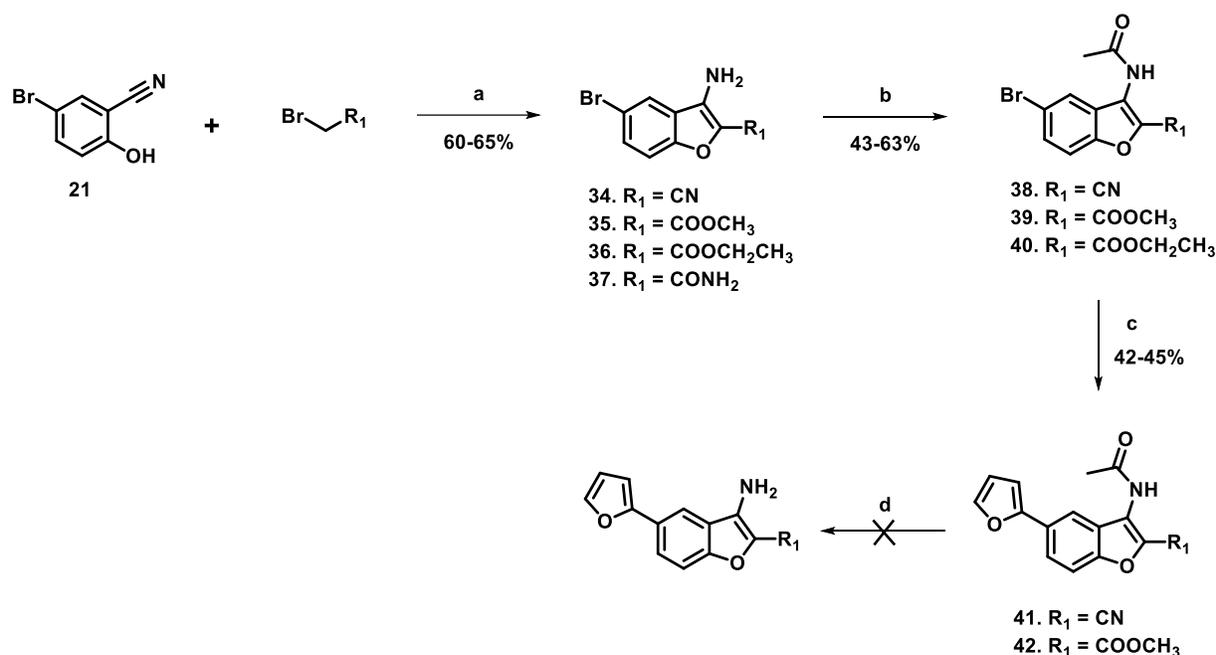


Figure 73. Structures des composés benzofuraniques de la série II.

Le schéma réactionnel de ces composés suit le même procédé que celui décrit pour les composés de la série I. Les trois premières étapes étant identiques à celles déjà mentionnées, elles ne seront pas détaillées à nouveau ici. La suite de la synthèse est illustrée dans le **Schéma 10** ci-dessous.



**Réactifs et conditions :** a) R<sub>1</sub>CH<sub>2</sub>Br (1.1 éq.), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (5.0 éq.), DMF, 80 °C, 2 h; b) chlorure d'acétyle (3.0 éq.), pyridine (1.5 éq.), DCM, reflux, 2 h; c) tributyl(furan-2-yl)stannane (1.5 éq.), PPh<sub>3</sub> (0.04 éq.), Pd(OAc)<sub>2</sub> (0.04 éq.), dioxane, 110 °C, 16 h; d) NaOH (2.5 éq.), méthanol, 60 °C.

Schéma 10. Schéma réactionnel pour la synthèse des composés de la série II.

Les composés **34-37** sont obtenus à partir du composé **21** par cyclisation intramoléculaire en présence du dérivé bromé correspondant à la modulation souhaitée en position C2 et d'un excès de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (5.0 éq.) dans le DMF, avec des rendements de 60 à 65%. Cette réaction a également été réalisée en utilisant de l'acétone comme solvant. Cependant, elle s'est déroulée plus lentement que l'essai réalisé lors de la synthèse de la **série I** et, même après plusieurs heures, on observe encore la présence de composé O-

alkylé non cyclisé en plus du composé cyclisé. Les composés **38-40** ont ensuite été obtenus grâce à une variante de la réaction de Schotten-Baumann, en présence de chlorure d'acétyle et de pyridine dans le dichlorométhane sous reflux, avec des rendements de 70 à 80%. Une tentative de protection de l'amine primaire en position C3 a également été effectuée en utilisant le  $\text{Boc}_2\text{O}$  en présence de DMAP et de triéthylamine dans le dichlorométhane à température ambiante. Cette méthode aurait permis d'éviter une étape de déprotection en milieu basique et donc éviter la saponification des composés estérifiés en position C2. Cependant, un mélange de composé de départ, de composé monoprotégé par le Boc et de composé diprotégé par le Boc est obtenu lors de la réaction. Un excès de  $\text{Boc}_2\text{O}$  avait été ajouté dans le milieu afin d'obtenir seulement le composé disubstitué mais malheureusement la réaction n'avancait plus. Cette méthode n'a donc pas été utilisée pour la protection de l'amine primaire.

Une réaction de type Stille catalysée par le palladium a été réalisée sur les composés **38** et **39** en utilisant le tributyl(furan-2-yl)stannane dans le dioxane à 100 °C. Le composé **41** a été obtenu avec un rendement de 45% et le composé **42** avec un rendement de 42%. La dernière étape de la synthèse consistait à déprotéger l'amide en position C3 à l'aide de soude dans le méthanol. Malheureusement, cette étape a échoué pour les deux composés. Pour le composé **41**, le produit s'est dégradé au cours de la réaction. Pour le composé **42**, l'ester a subi une saponification, comme attendu, formant l'acide carboxylique correspondant, tandis que la fonction amide n'a pas été hydrolysée.

Pour résoudre ces problèmes de déprotection, une autre voie de synthèse a été adoptée. Cette fois, la réaction de Stille a été réalisée directement après la cyclisation intramoléculaire, sans protéger l'amine primaire en position C3 (**Schéma 11**). Ces conditions ont permis d'obtenir les composés désirés **43-46** avec de plus faibles rendements mais sans dégradation et ont réduit le nombre d'étapes de synthèse, ce qui a également permis un gain de temps.

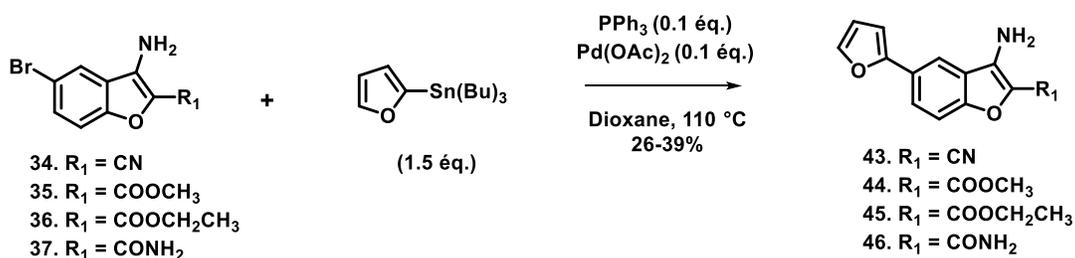
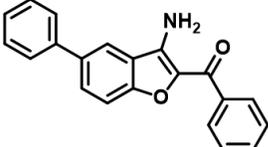
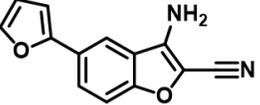
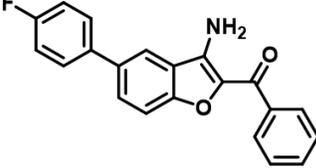
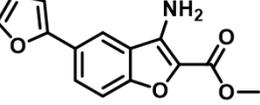
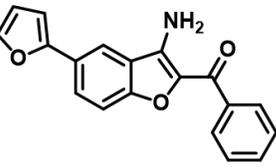
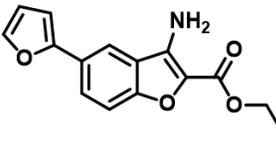
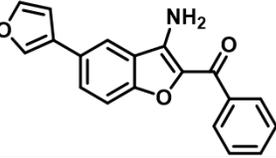
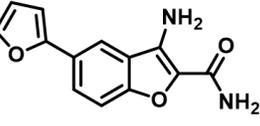


Schéma 11. Nouvelle voie de synthèse des composés de la série II.

Les composés benzofuraniques de la **série II** ont ainsi pu être synthétisés. Ces composés, tout comme ceux de la série I, ont été testés pour leur affinité sur les récepteurs  $A_{2A}$  par polarisation de fluorescence. Les résultats sont décrits dans la partie ci-après.

### III. Evaluation pharmacologique des benzofuranes

Deux séries de composés benzofuraniques ont été synthétisées et évaluées pour leur affinité envers les récepteurs  $A_{2A}$  à l'aide de la polarisation de fluorescence. Un criblage a été effectué à une concentration de 1  $\mu$ M, et les résultats obtenus sont présentés dans le **Tableau 9** ci-dessous.

| Structure   | $hA_{2A}R$<br>(%déplacement) <sup>a</sup> | Structure  | $hA_{2A}R$<br>(%déplacement) <sup>a</sup> |
|---|---|--|---|
|    | 35  |    | 40  |
|   | 37  |    | 56  |
|  | 48  |  | 53  |
|  | 40  |  | 43  |

<sup>a</sup>Pourcentage de déplacement de la sonde MRS7416 à 1  $\mu$ M de composé.

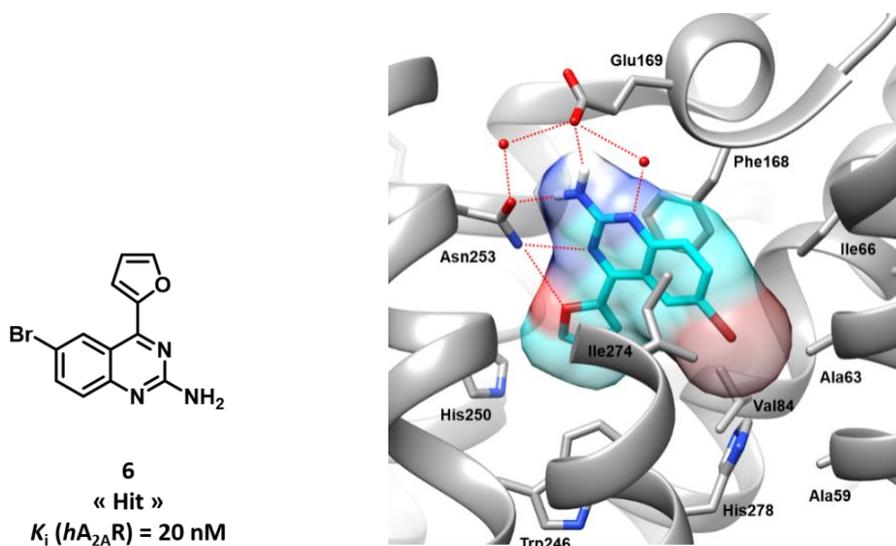
**Tableau 9. Pourcentage de déplacement de la sonde MRS7416 à 1  $\mu$ M des composés benzofuraniques de la série I et II sur  $hA_{2A}R$  (N=3).**

Bien que les pourcentages d'inhibition soient légèrement supérieurs à ceux obtenus dans la thèse de Raphaël Bolteau, ces résultats demeurent assez décevants. En effet, les pourcentages de déplacement sont de l'ordre du micromolaire, indiquant qu'aucune réelle amélioration n'a été obtenue en réalisant ces modulations en positions C2 et C5. Il faudrait refaire des études de modélisation moléculaire plus approfondies afin de développer de nouveaux composés plus affins. La nature et/ou la position des différentes fonctions chimiques étudiées ne semble pas être favorables pour créer une interaction avec les récepteurs  $A_{2A}$ .

# **Chapitre 3 : La famille des quinazolines**

### I. Développement de nouveaux antagonistes $A_{2A}R$ quinazoliques

Comme évoqué dans la partie travaux préliminaires de ce manuscrit, notre équipe a précédemment identifié la 6-bromo-4-(furan-2-yl)quinazolin-2-amine **6** (**Figure 74**) comme un nouveau composé quinazoline « hit » ayant une forte affinité pour le récepteur  $A_{2A}$  ( $K_i (hA_{2A}R) = 20$  nM), comme décrit dans R. Bolteau *et al.*<sup>172</sup> La structure co-cristallisée de ce composé nous a servi de point de départ et d'outil à la conception de nouveaux ligands quinazoliques.



**Figure 74. Structure co-cristallisée et mode de liaison du composé 6.**<sup>172</sup>

#### 1. Modulations en positions C4, C6 et C7 du composé « hit »

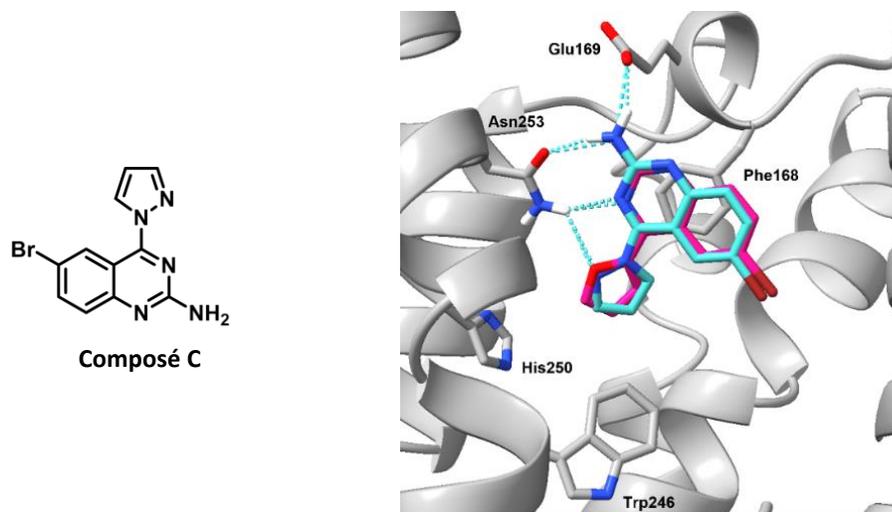
##### 1.1. Conception par modélisation moléculaire

Des études de modélisation moléculaire ont été réalisées afin d'optimiser l'activité du composé « hit » envers les récepteurs  $A_{2A}$ .

##### ▪ Modulations en position C4

Le furane est un groupement connu pour sa faible stabilité chimique et également métabolique. Notre premier objectif était donc d'éviter ce problème d'instabilité en remplaçant le groupement 2-furane en position C4 du « hit » de départ. Les travaux de Raphaël Bolteau ont démontré que la 2-aminoquinazoline non substituée avec un groupement *p*-fluorophényle en position C4 ( $K_i (hA_{2A}R) = 80$  nM) présente une affinité comparable à celle de son analogue furanique ( $K_i (hA_{2A}R) = 89$  nM). De plus, ce groupement est plus stable chimiquement.<sup>205</sup> Nous avons donc décidé de moduler le 2-furane pour un groupement *p*-fluorophényle sur le composé **6** afin de vérifier si ce groupement permet de maintenir une même affinité

sur les quinazolines substituées en position C6 ou C7. Un remplacement par un groupement phényle a également été envisagé afin de comparer son effet par rapport au *p*-fluorophényle. Une substitution du furane par un groupement pyrazole a également été envisagé. En effet, grâce à l'azote présent en position 2, ce groupement permettrait de garder l'interaction par liaison hydrogène avec l'Asn253 au sein du récepteur, contrairement aux groupements *p*-fluorophényle et phényle, tout en augmentant la stabilité de la molécule (**Figure 75**).



**Figure 75. Superposition de la pose docking sélectionnée du composé quinazolinique C (cyan) à la structure co-cristallisée du composé 6 (rose) au sein du récepteur *hA*<sub>2A</sub>. (PDB : 8DU3)**

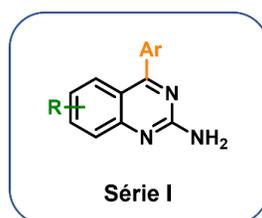
- Modulations en position C6 et C7

De nouvelles modulations ont également été envisagées en position C6 du cycle quinazoline, notamment en remplaçant l'atome de brome par un atome de chlore, de fluor, un groupement trifluorométhyle, nitrile ou encore un groupement méthoxy. L'atome de brome ne créerait pas d'interactions essentielles avec le récepteur et engendrerait des réactions secondaires notamment lors de l'incorporation du groupement aromatique en position C4. Ces différents groupements, non réactifs, permettraient donc de faciliter la synthèse des composés tout en conservant le même positionnement de la molécule au sein du récepteur et en maintenant l'affinité du composé **6**. Ces différentes modulations pourront également permettre de comprendre davantage les relations structure-activité autour des composés quinazoliques au sein du récepteur *A*<sub>2A</sub>. Des modifications ont également été envisagées en position C7 du noyau quinazolinique. L'objectif de ces modifications est d'explorer la poche hydrophobe constituée par Ala63, Ile66, Val84 et Ile274, de comparer l'effet de la position des substituants sur l'affinité et de déterminer s'il existe une

différence entre les positions C6 et C7. Des substituants tels que le brome, le méthyle et le chlore ont donc été envisagés en position C7 afin de les comparer avec leur analogue C6.

Par la suite, la solubilité des composés les plus affins sera mesurée et de nouvelles modulations seront envisagées afin d'améliorer leur solubilité. En effet, la solubilité fait défaut à de nombreux antagonistes A<sub>2A</sub>R. Obtenir des composés solubles fait donc partie de nos objectifs.

A partir de ces études de modélisation moléculaire, une première série de molécules a été envisagée (**Figure 76**). La synthèse et l'évaluation pharmacologique de ces composés sont décrits ci-après.

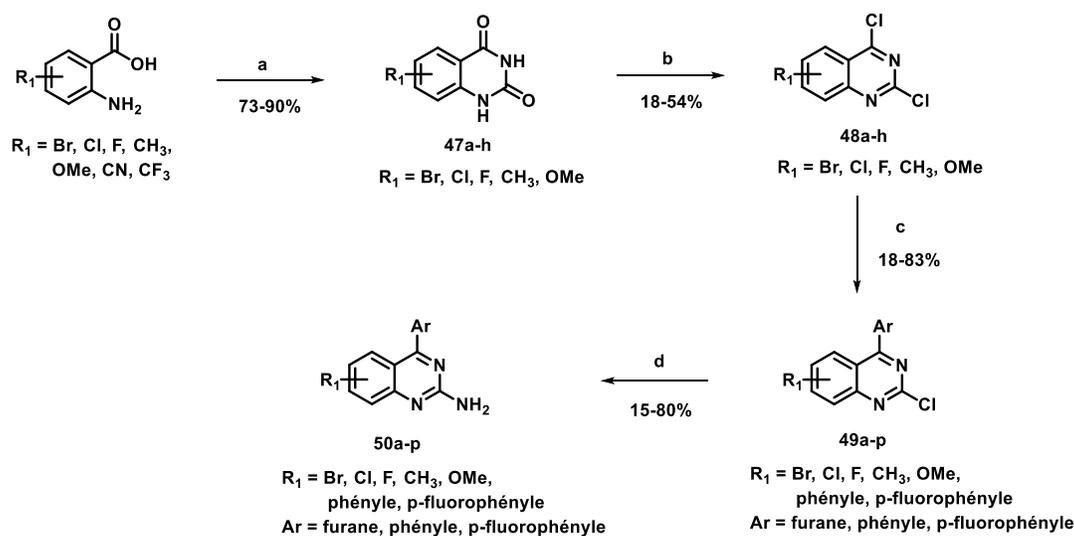


R = Br, Cl, F, CN, CF<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>, OMe  
Ar = 2-furane, p-fluorophényle, phényle, pyrazole

**Figure 76.** Structure de la série I quinazolinique.

### 1.2. Synthèse des composés de la série I

La synthèse des composés quinazolinqiques de la **série I** est décrite dans le **Schéma 12**, ci-dessous :



**Réactifs et conditions :** a) urée (10.0 éq.), 160 °C, 16 h; b) POCl<sub>3</sub> (10.0 éq.), 2,6-lutidine (1.0 éq.), reflux, 16 h; c) acide arylboronique (1.1 éq.), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2.0 éq.), PPh<sub>3</sub> (0.04 éq.), Pd(OAc)<sub>2</sub> (0.02 éq.), dioxane/H<sub>2</sub>O, 40 °C, 16 h ou 2-(tri-n-butylstannyl)furane (1.0 éq.), PPh<sub>3</sub> (0.04 éq.), Pd(OAc)<sub>2</sub> (0.02 éq.), dioxane, 40 °C, 16 h; d) NH<sub>3</sub> (g), MeOH, reflux, 16 h ou i) 4-méthoxybenzylamine (2.0 éq.), DIPEA (2.5 éq.), dioxane, reflux, 16 h ii) TFA, TA, 72 h.

**Schéma 12.** Schéma réactionnel conduisant à la synthèse des composés de la série I.

Le chauffage à fusion de l'urée en présence de l'acide anthranilique commercial convenablement substitué conduit avec de très bons rendements aux dérivés quinazolinediones correspondants **47a-h**.<sup>208</sup> Concernant la quinazolinedione substituée par un groupement nitrile en C6, le rendement obtenu est beaucoup plus faible (46%) et, de plus, un produit secondaire dimérisé au niveau de l'acide carboxylique du composé de départ est formé. Ensuite, pour le composé comportant le groupement CF<sub>3</sub>, la réaction à fusion entre l'urée et l'acide anthranilique n'a pas permis d'obtenir le produit désiré, seuls le produit de départ et des produits secondaires ont été obtenus. Un autre essai de synthèse a été réalisé par action du cyanate de potassium dans l'acide acétique.<sup>209</sup> Cette méthode a permis d'obtenir le produit désiré mais avec un rendement très faible de 9%. Cette difficulté de ces acides anthraniliques à réagir s'explique par le fait que le groupement nitrile est 100 fois plus attracteur par effet inductif que le brome et le groupement CF<sub>3</sub>, quant à lui, est 1000 fois plus attracteur.<sup>210,211</sup> La synthèse de ces deux quinazolines, comportant un groupement nitrile ou trifluorométhyle en position C6, a donc été arrêtée en raison de la difficulté à obtenir des rendements corrects dès la première étape de la synthèse.

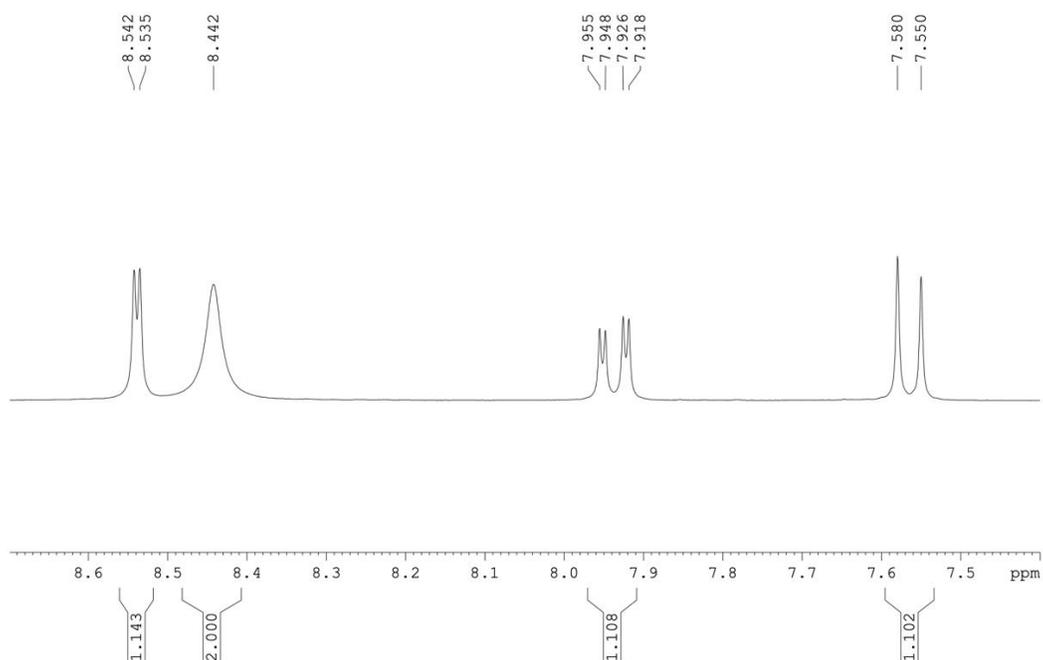
A partir des quinazolinediones **47a-h**, une réaction de chloration est réalisée au reflux de POCl<sub>3</sub>, avec la présence de 2,6-lutidine dans le but d'obtenir les composés 2,4-dichloroquinazolines **48a-h**.<sup>212</sup> Les rendements obtenus pour ces composés ne sont pas très élevés. L'hydrolyse de POCl<sub>3</sub> pourrait être la cause de ces rendements moyens. En effet, la présence d'eau dans une solution de POCl<sub>3</sub> conduit à la formation d'acide phosphorique et d'acide chlorhydrique, empêchant ainsi la réaction de chloration de se réaliser totalement.<sup>213</sup>

Les composés 2,4-dichloroquinazolines ont été fonctionnalisés en position C4 grâce à un couplage pallado-catalysé de type Suzuki ou de type Stille pour les dérivés furaniques afin d'obtenir les composés **49a-p**.<sup>214-216</sup> Il est intéressant de noter qu'il existe une différence de réactivité notable entre le chlore en position C2 et celui en position C4. En effet, la position C4 est plus réactive du fait d'un encombrement électronique important en position C2. Ce dernier est dû à la présence de doublets non liants des atomes d'azote en positions 1 et 3. Cette étape de synthèse permet d'apporter une diversité structurale en position C4. Le groupement 2-furane est incorporé par couplage de Stille et non de Suzuki car, comme décrit dans le chapitre sur les benzofuranes, l'acide 2-furane boronique est beaucoup trop instable chimiquement, contrairement à son analogue stannique. Les composés di-substitués **49i** et **49j** ont été obtenus en ajoutant un excès d'acide boronique correspondant en présence de la 2,4-dichloroquinazoline bromée en position C6.

Enfin, les composés finaux 2-aminoquinazolines **50a-p** ont été synthétisés soit directement par substitution nucléophile dans un tube scellé avec une solution saturée d'ammoniac au reflux du méthanol<sup>217</sup>, soit par l'introduction de 4-méthoxybenzylamine suivie d'une étape de débenzylation dans le TFA.<sup>218</sup>

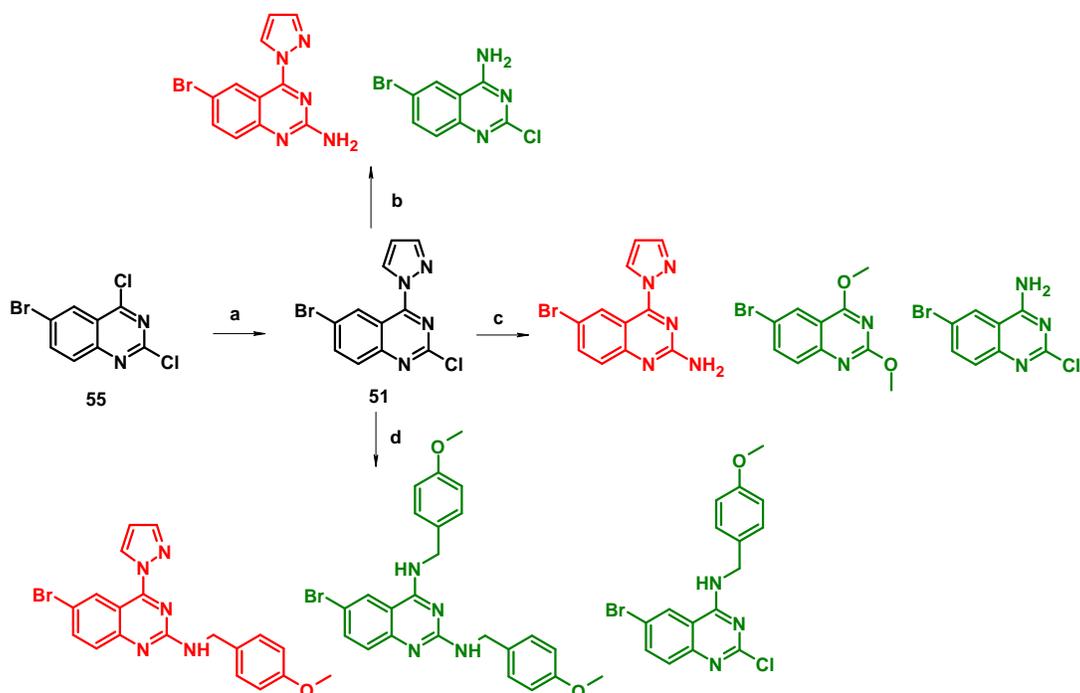
Remarque : Au début de ma thèse, l'incorporation de l'amine primaire en position C2 des quinazolines était réalisée par substitution nucléophile du chlore par l'ammoniac gazeux dans le méthanol. Cependant, de faibles rendements ( $\approx 10\%$ ) étaient obtenus avec ces conditions et, de plus, le méthanol réagissait avec le chlore de la quinazoline conduisant ainsi à des composés comportant un méthoxy à la place de l'amine primaire. C'est pour cela que nous avons décidé d'apporter l'amine protégée grâce à la 4-méthoxybenzylamine puis de déprotéger par action du TFA. Malgré le fait qu'il y ait une étape de synthèse en plus, les rendements sont meilleurs permettant ainsi d'obtenir davantage de produit. De plus, la 4-méthoxybenzylamine est beaucoup plus accessible, moins dangereuse à utiliser et moins coûteuse que l'ammoniac gazeux. L'utilisation de la 4-méthoxybenzylamine est donc plus aisée.

Pour remplacer le furane par un cycle pyrazole, la 6-bromo-2,4-dichloroquinazoline **48a**, un intermédiaire clé, a été utilisée comme réactif de départ (**Schéma 13**). À partir de cette molécule, une réaction de substitution nucléophile par action du 1H-pyrazole dans le dioxane a permis d'obtenir le composé **51** avec un rendement de 81%. La deuxième étape impliquait également une réaction de substitution nucléophile, cette fois avec de l'ammoniac gazeux dans de l'isopropanol. Malheureusement, le produit souhaité n'a pas pu être obtenu. En effet, le cycle pyrazole a été substitué par l'ammoniac, car cet hétérocycle est un excellent groupement partant.<sup>219</sup> L'analyse par RMN a révélé la disparition des protons aromatiques du pyrazole et l'apparition d'un singulet à 8,44 ppm, correspondant aux deux protons de l'amine primaire (**Figure 77**).



**Figure 77. Spectre RMN 1H de la molécule obtenue lors de la substitution nucléophile du composé 51 avec l'ammoniac gazeux, dans le DMSO.**

La réaction réalisée dans du méthanol à 80 °C a conduit au même résultat, avec en plus la formation d'un composé disubstitué en positions C2 et C4 par un groupement méthoxy. Une tentative de substitution avec de la 4-méthoxybenzylamine dans du dioxane à 110 °C a donné un mélange de composés mono et disubstitués par l'amine, identifiés par LC-MS. La même réaction effectuée à température ambiante et à 0 °C n'a pas non plus été concluante, ne produisant qu'un mélange du produit de départ et du composé monosubstitué en C4.



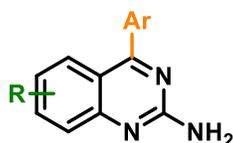
**Réactifs et conditions :** a) 1H-pyrazole (1.2 éq.),  $K_2CO_3$  (2.0 éq.), dioxane, 60 °C, 16 h; b)  $NH_3$  (g), isopropanol, 100 °C, 12 h; c)  $NH_3$  (g), méthanol, 80 °C, 16 h; d) 4-méthoxybenzylamine (2.0 éq.), DIPEA (2.5 éq.), dioxane, 110 °C, 16 h.

**Schéma 13. Essais de synthèse de remplacement du 2-furane par un groupement pyrazole en position C4 de la quinazoline.**

Malheureusement, suite aux échecs obtenus, la substitution du furane par un pyrazole en position C4 n'est pas possible dans notre cas. Il faudrait réessayer la synthèse avec un hétérocycle différent du pyrazole comportant un accepteur de liaison hydrogène, afin de garder la liaison hydrogène avec l'Asn253, tel qu'un oxazole ou encore le 5-méthylfuran qui est beaucoup plus stable chimiquement que le furane.<sup>220-222</sup>

### 1.3. Evaluation de l'affinité des composés de la série I et relations structure-activité

Les composés quinazoliques de la **série I** ont ensuite été évalués pour leur affinité sur le récepteur  $A_{2A}$ , grâce au test de polarisation de fluorescence. Les résultats obtenus sont reportés dans le **Tableau 10**, ci-après.



| Composé | R                            | Ar                      | $K_i$ $hA_{2A}R$ (nM) <sup>a</sup> |
|---------|------------------------------|-------------------------|------------------------------------|
| 6       | 6-Br                         | 2-furane                | 23 ± 7                             |
| 50a     | 6-Br                         | Phényle                 | 92 ± 17                            |
| 50b     | 6-Br                         | <i>p</i> -fluorophényle | 220 ± 64                           |
| 50c     | 6-CH <sub>3</sub>            | 2-furane                | 45 ± 7                             |
| 50d     | 6-CH <sub>3</sub>            | Phényle                 | 83 ± 4                             |
| 50e     | 6-CH <sub>3</sub>            | <i>p</i> -fluorophényle | 283 ± 74                           |
| 50f     | 6-OMe                        | 2-furane                | >10000                             |
| 50g     | 6-F                          | 2-furane                | >10000                             |
| 50h     | 6-Cl                         | 2-furane                | 28 ± 8                             |
| 50i     | 6-( <i>p</i> -fluorophényle) | <i>p</i> -fluorophényle | >10000                             |
| 50j     | 6-phényle                    | Phényle                 | 318 ± 23                           |
| 50k     | 7-Br                         | 2-furane                | 28 ± 9                             |
| 50l     | 7-Br                         | <i>p</i> -fluorophényle | 150 ± 27                           |
| 50m     | 7-CH <sub>3</sub>            | 2-furane                | 5 ± 2                              |
| 50n     | 7-CH <sub>3</sub>            | Phényle                 | 45 ± 6                             |
| 50o     | 7-CH <sub>3</sub>            | <i>p</i> -fluorophényle | 73 ± 9                             |
| 50p     | 7-Cl                         | 2-furane                | 20 ± 1                             |

<sup>a</sup>Les valeurs  $K_i$  ont été déterminées à partir d'une analyse non linéaire des courbes de compétition utilisant le MRS7416 comme sonde fluorescente et sont exprimées en moyenne ± SEM de trois expériences indépendantes, en duplicata.

**Tableau 10. Modulations en positions C4, C6 et C7 du noyau quinazolinique.**

A la lecture des résultats décrits dans le **Tableau 10**, nous avons pu établir de nouvelles relations structure-activité et en tirer les conclusions suivantes :

- [Modulations en position C4](#)

L'introduction d'un groupement 2-furane en position C4 de la quinazoline, par rapport à un groupement phényle ou *p*-fluorophényle, a donné les meilleures affinités. Ces résultats confirment que le furane est le

substituant hétérocyclique optimal pour les interactions hydrophobes aromatiques avec Trp246 et His250, ainsi que pour compléter le réseau de liaison hydrogène entre l'oxygène du furane et Asn253.

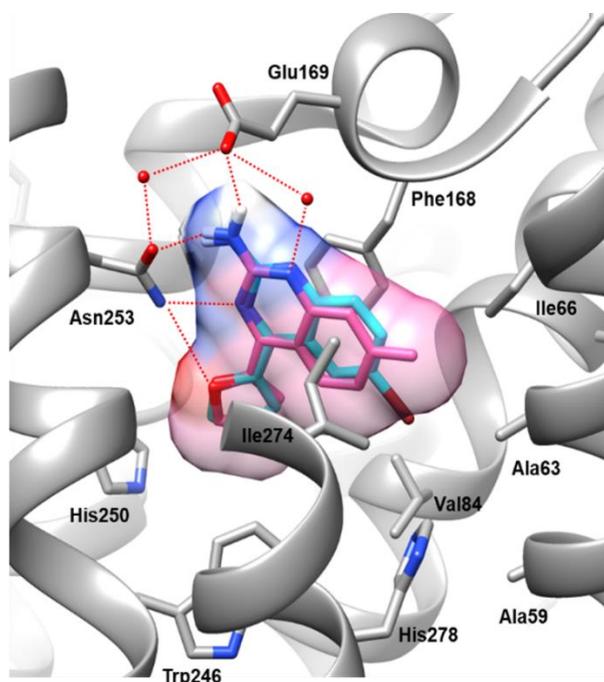
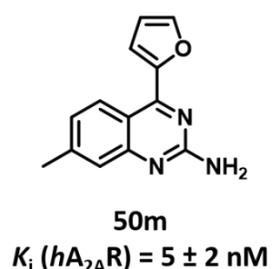
- [Modulations en position C6](#)

Des modifications en position C6 ont ensuite été effectuées. Le remplacement du brome par de petits substituants, tels qu'un groupement méthyle ou chlore, a permis de maintenir l'affinité dans le même ordre de grandeur (**50c**,  $K_i(hA_{2A}R) = 45 \text{ nM}$  ; **50h**,  $K_i(hA_{2A}R) = 28 \text{ nM}$ ) que le composé de référence (**6**,  $K_i(hA_{2A}R) = 23 \text{ nM}$ , valeur déterminée par polarisation de fluorescence). En revanche, des substituants plus importants tels que le phényle ou le *p*-fluorophényle réduisent de manière significative ou suppriment pratiquement l'affinité (**50i**,  $K_i(hA_{2A}R) > 10 \text{ }\mu\text{M}$  ; **50j**,  $K_i(hA_{2A}R) = 318 \text{ nM}$ ). Il est intéressant de noter que la substitution par un petit groupe méthoxy ou fluor supprime aussi complètement l'affinité (**50f** et **50g**,  $K_i(hA_{2A}R) > 10 \text{ }\mu\text{M}$ ). Ces résultats indiquent clairement que les petits motifs hydrophobes tels que le méthyle, le chlore ou le brome sont les plus appropriés pour interagir avec la poche hydrophobe formée par Ala59, Ala63, Val84 et His278.

- [Modulations en position C7](#)

Des modifications ont également été introduites en position C7 afin d'étudier les différences potentielles par rapport à la position C6. Indépendamment du substituant en C4, l'introduction de substituants optimaux tels que le brome (**50k**), le chlore (**50p**) ou les groupes méthyles (**50m**) en C7 donne des affinités de liaison comparables à celles observées pour les molécules correspondantes substituées en C6. Il est intéressant de noter que le composé **50m** substitué par le méthyle en C7 présente une affinité encore plus élevée que son homologue en C6 **50c** ( $K_i(hA_{2A}R) = 45 \text{ nM}$ ) et que le composé de référence **6** ( $K_i(hA_{2A}R) = 23 \text{ nM}$ ), ce qui en fait un ligand très puissant pour les récepteurs  $A_{2A}$  ( $K_i(hA_{2A}R) = 5 \text{ nM}$ ).

Des études de docking ont été réalisées sur le composé **50m** et révèlent que ce dernier se superpose parfaitement au composé de référence **6** co-cristallisé avec le récepteur  $hA_{2A}$ , formant le même réseau de liaisons hydrogènes. En se concentrant sur les interactions impliquant le groupe méthyle en position C7, il présente des interactions de Van der Waals étroites avec une poche hydrophobe formée par Ala63, Ile66 et Ile274, améliorant ainsi l'affinité du composé **50m** par rapport aux analogues bromés (**Figure 78**).



**Figure 78. Prédiction du mode de liaison du nouveau « hit » 50m (rose) dans la structure co-cristallisée de 6 (cyan) liée au récepteur  $hA_{2A}$ . (PDB : 8DU3)**

Grâce aux modulations réalisées sur le composé **6**, un nouveau composé « hit » **50m** a été découvert ( $K_i (hA_{2A}R) = 5 \text{ nM}$ ). De nouvelles modulations seront réalisées à partir de la structure de ce nouveau « hit ».

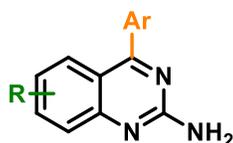
#### 1.4. Etude de la solubilité des 2-aminoquinazolines

La solubilité des composés **6**, **50c** et **50m** a été évaluée. Pour cela, chaque composé a été dissous dans une solution de DMSO et dans une solution de PBS. Les produits sont totalement solubles dans le DMSO, ces solutions servent donc de référence (Concentration 100%). Cependant, les produits ne sont pas totalement solubles dans le PBS et ont été filtrés. Les solutions obtenues ont ensuite été analysées par HPLC. Le rapport des aires obtenues dans le DMSO par rapport à celles obtenues dans le PBS a permis de déterminer la solubilité, grâce à la formule suivante :

$$S = \frac{\text{Aire PBS}}{\text{Aire DMSO}} \times \text{Concentration } 100\%$$

**Figure 79. Equation permettant de déterminer la solubilité.**

Les valeurs de solubilité obtenues sont reportées dans le **Tableau 11** ci-dessous :



| Composé    | R                 | Ar       | Solubilité PBS (mM) |
|------------|-------------------|----------|---------------------|
| <b>6</b>   | 6-Br              | 2-furane | 0.15                |
| <b>50c</b> | 6-CH <sub>3</sub> | 2-furane | 0.10                |
| <b>50m</b> | 7-CH <sub>3</sub> | 2-furane | 0.80                |

Tableau 11. Valeurs de solubilité dans le PBS des composés **6**, **50c** et **50m**.

Au vu des résultats, les 2-aminoquinazolines **6**, **50c** et **50m** présentent des solubilités faibles (< 200  $\mu$ M) ou modérées (< 1 mM). Un des autres objectifs des travaux réalisés sur les composés quinazoliques était d'améliorer la solubilité de ces derniers. Pour rappel, le manque de solubilité fait défaut chez de nombreux antagonistes des récepteurs A<sub>2A</sub>. De nouvelles modulations ont donc été réalisées afin d'améliorer la solubilité de nos composés quinazoliques.

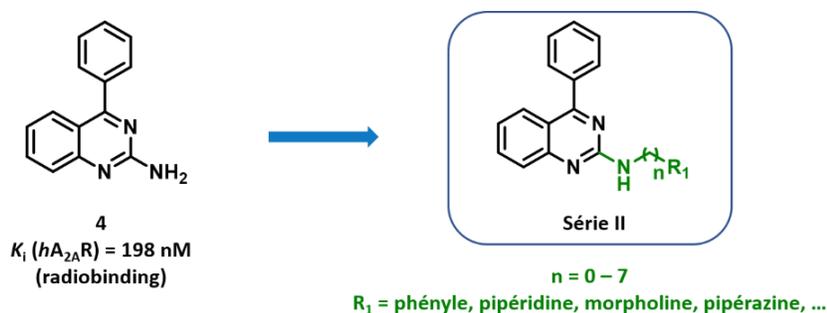
## 2. Amélioration de la solubilité des composés quinazoliques

### 2.1. Modulations envisagées en position C2

Afin d'améliorer la solubilité de nos composés quinazoliques, des modulations ont été envisagées en position C2. L'ajout de chaînes de type aminoalkyles et aminoaryles présenterait plusieurs avantages. En effet, l'introduction de telles chaînes permettrait d'augmenter la solubilité de nos composés par la présence d'une amine tertiaire salifiable. De plus, cette amine tertiaire salifiée pourrait renforcer l'interaction ionique avec Glu169, conservant ainsi une bonne affinité pour le récepteur A<sub>2A</sub> et offrant potentiellement une sélectivité élevée pour ce récepteur. En effet, des travaux de modélisation moléculaire effectués lors de la thèse de Romain Duroux ont permis l'identification d'un cluster acide présent uniquement au sein du récepteur A<sub>2A</sub>.<sup>167</sup> Ce dernier est situé dans la région extracellulaire et est caractérisé par la présence des acides aminés Glu169 et Asp170. Ainsi, établir une interaction avec Glu169 permettrait une potentielle sélectivité vis-à-vis des autres récepteurs à l'adénosine. L'introduction de telles chaînes pourrait également améliorer le pouvoir antagoniste de ces molécules en plus de leur solubilité et leur sélectivité. Nous avons donc envisagé d'introduire des substituants plus importants, similaires à ceux trouvés sur le préladénant et le ZM-241385.<sup>169-171</sup> Il est connu que l'augmentation de la taille et du volume des ligands des RCPG peut favoriser le passage à une activité antagoniste complète.<sup>223</sup>

Ces modifications ont donc d'abord été envisagées sur le composé **6**, qui a servi de point de départ, ainsi que sur le composé **50c** et notre nouveau composé « hit » **50m**. Cependant, ces trois composés comportent un groupement 2-furane qui est, comme déjà évoqué, instable chimiquement. Pour éviter de

perdre du temps sur l'optimisation de la synthèse, potentiellement complexe pour les dérivés furaniques, nous avons décidé de réaliser ces modifications et d'optimiser leur synthèse à partir du composé 2-aminophénylquinazoline **4** (**Figure 80**). De plus, cette méthode nous permettra d'identifier les chaînes les plus prometteuses en termes d'activité et de les transposer aux dérivés furaniques sans avoir à refaire toutes les modifications sur ces derniers. Une deuxième série de molécules quinazolines a donc été développée à partir du dérivé 2-aminophénylquinazoline.

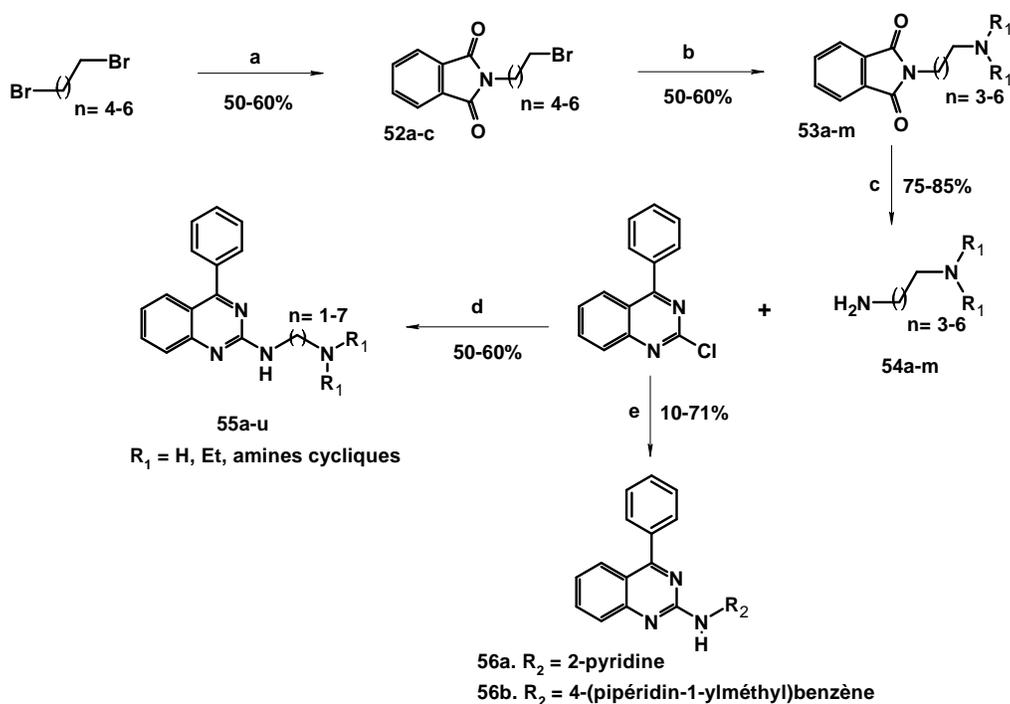


**Figure 80. Modulations envisagées en position C2 de la quinazoline.**

Certaines de ces molécules avaient été synthétisées et testées pour leur affinité par « radiobinding » lors de la thèse de Romain Duroux.<sup>167</sup> Afin de compléter les relations structure-activité autour de ces composés, des modulations supplémentaires ont été réalisées durant mes travaux de thèse. Certaines molécules déjà décrites ont été synthétisées à nouveau afin de les tester cette fois-ci par polarisation de fluorescence.

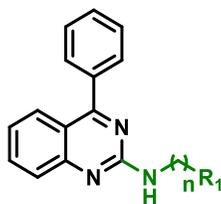
## 2.2. Synthèse des composés de la série II

La synthèse de ces composés 2-aminoalkylquinazolines et 2-aminoarylquinazolines (**série II**) est décrite dans le **Schéma 14**, ci-dessous :



### 2.3. Evaluation de l'affinité des composés de la série II et relations structure-activité

Les affinités obtenues pour les composés quinazolines de la **série II** sont reportées dans le **Tableau 12**, ci-après.



| Composé    | n | R <sub>1</sub>                    | K <sub>i</sub> hA <sub>2A</sub> R (nM) <sup>a</sup> | Composé    | n | R <sub>1</sub>          | K <sub>i</sub> hA <sub>2A</sub> R (nM) <sup>a</sup> |
|------------|---|-----------------------------------|---|------------|---|-------------------------|---|
| <b>4</b>   | 0 | H                                 | 203 ± 56  | <b>55j</b> | 5 | pipéridine              | 294 ± 37  |
| <b>56a</b> | 0 | 2-pyridine                        | >10000  | <b>55k</b> | 5 | morpholine              | 674 ± 96  |
| <b>55a</b> | 0 | 4-benzylpipéridine                | 1110 ± 412  | <b>55l</b> | 5 | méthylpipérazine        | 790 ± 126   |
| <b>56b</b> | 0 | 4-[(pipéridin-1-yl)méthyl]benzène | 52 ± 16   | <b>55m</b> | 5 | boc-pipérazine          | 687 ± 192   |
| <b>55b</b> | 1 | 2-pyridine                        | > 10000   | <b>55n</b> | 5 | pipérazine              | 1218 ± 385  |
| <b>55c</b> | 1 | phényle                           | > 10000   | <b>55o</b> | 5 | pyrrolidine             | 519 ± 44  |
| <b>55d</b> | 1 | 4-benzonitrile                    | > 10000   | <b>55p</b> | 5 | diéthylamine            | 310 ± 107   |
| <b>55e</b> | 1 | 4-methoxyphényle                  | > 10000   | <b>55q</b> | 5 | tétrahydro-isoquinoline | 297 ± 86  |
| <b>55f</b> | 2 | 4-phénol                          | 1453 ± 405  | <b>55r</b> | 5 | 4-benzylpipéridine      | 927 ± 146   |
| <b>55g</b> | 2 | pipéridine                        | 1781 ± 315  | <b>55s</b> | 5 | NH <sub>2</sub>         | > 10000   |
| <b>55h</b> | 3 | pipéridine                        | 1335 ± 482  | <b>55t</b> | 6 | pipéridine              | 233 ± 68  |
| <b>55i</b> | 4 | pipéridine                        | 469 ± 83  | <b>55u</b> | 7 | pipéridine              | 834 ± 91  |

<sup>a</sup>Les valeurs K<sub>i</sub> ont été déterminées à partir d'une analyse non linéaire des courbes de compétition utilisant le MRS7416 comme sonde fluorescente et sont exprimées en moyenne ± SEM de trois expériences indépendantes, en duplicata.

**Tableau 12. Modulations en position C2 du noyau quinazolinique.**

A la lecture des résultats décrits dans le **Tableau 12**, nous avons pu établir de nouvelles relations structure-activité et en tirer les conclusions suivantes :

- [Introduction de groupements aminoaryles](#)

L'introduction de groupements tels que la 2-pyridine, la benzylpipéridine ou la benzylamine, ainsi que le substituant 4-(2-aminoéthyl)phénol, retrouvé chez le ZM-241385, a donné lieu à des composés ayant une faible affinité (**55a**, K<sub>i</sub> (hA<sub>2A</sub>R) = 1,1 μM et **55f**, K<sub>i</sub> (hA<sub>2A</sub>R) = 1,4 μM) ou nulle (**55b**, **55c** et **55d**, K<sub>i</sub> (hA<sub>2A</sub>R) > 10 μM) pour le récepteur hA<sub>2A</sub>.

- [Ajout de chaînes aminoalkyles](#)

Par la suite, nous avons étudié l'introduction de chaînes aminoalkyles, en variant à la fois la longueur de la chaîne carbonée et la nature de l'amine tertiaire. Dans un premier temps, nous avons étudié l'incorporation d'un groupement pipéridine séparé de l'hétérocycle 2-aminoquinazoline par des chaînes alkyles allant de 2 à 7 atomes de carbone. Des activités de liaison optimales ont été observées avec des longueurs de chaîne de 5 et 6 atomes de carbone (**55j**,  $K_i(hA_{2A}R) = 294$  nM ; **55t**,  $K_i(hA_{2A}R) = 233$  nM), tandis qu'un allongement supplémentaire réduisait l'affinité (**55u**,  $K_i(hA_{2A}R) = 834$  nM).

- [Modulations de l'amine tertiaire des chaînes aminoalkyles](#)

La nature chimique de l'amine tertiaire a ensuite été étudiée. Le remplacement de la pipéridine par des analogues plus polaires, tels que la morpholine (**55k**,  $K_i(hA_{2A}R) = 674$  nM) ou la pipérazine (**55n**,  $K_i(hA_{2A}R) = 687$  nM) et ses dérivés (**55l**,  $K_i(hA_{2A}R) = 790$  nM ; **55m**,  $K_i(hA_{2A}R) = 1218$  nM), ou par un analogue plus contraint, tel que la pyrrolidine (**55o**,  $K_i(hA_{2A}R) = 519$  nM), a réduit l'affinité de manière significative.

Toutefois, la pipéridine a pu être remplacée sans perte d'affinité par une amine tertiaire moins hydrophobe comme la diéthylamine (**55p**,  $K_i(hA_{2A}R) = 310$  nM) ou plus hydrophobe comme la tétrahydroisoquinoléine (**55q**,  $K_i(hA_{2A}R) = 297$  nM). L'introduction d'une benzylpipéridine plus hydrophobe et stériquement encombrée a réduit l'affinité à la gamme micromolaire (**55r**,  $K_i(hA_{2A}R) = 927$  nM). Enfin, l'analogue amine primaire de **55j** (**55s**,  $K_i(hA_{2A}R) > 10$   $\mu$ M) a perdu toute affinité pour le récepteur  $A_{2A}$ . Ces résultats montrent que si la présence d'une amine tertiaire est cruciale pour l'affinité, l'hydrophobie et l'encombrement stérique sont tolérés dans une certaine mesure.

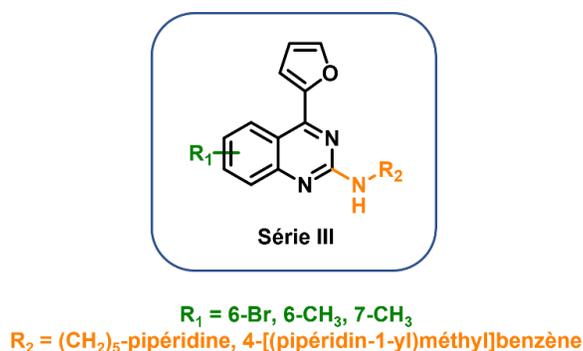
- [Rigidification de la chaîne aminopentylpipéridine](#)

Il est intéressant de noter que le remplacement de la chaîne aminopentylpipéridine (**55j**,  $K_i(hA_{2A}R) = 294$  nM) par un équivalent contraint, la 4-[(pipéridin-1-yl)méthyl]aniline, en conservant une longueur linéaire similaire de cinq carbones, a augmenté de manière significative l'affinité de liaison avec le récepteur  $hA_{2A}$  (**56b**,  $K_i(hA_{2A}R) = 52$  nM). Ce résultat renforce la conclusion qu'une longueur de chaîne optimale est nécessaire et que la nature de cette chaîne, qu'il s'agisse d'un groupement alkyle linéaire ou d'un aromatique plus rigide, n'a pas d'effet négatif sur l'affinité de liaison envers les récepteurs  $A_{2A}$ .

Les chaînes aminopentylpipéridine et 4-[(pipéridin-1-yl)méthyl]aniline apparaissent donc comme étant les deux chaînes les plus optimales afin de maintenir une affinité équivalente voire meilleure à celle du composé 2-aminophénylquinazoline **4** ( $K_i(hA_{2A}R) = 203$  nM).

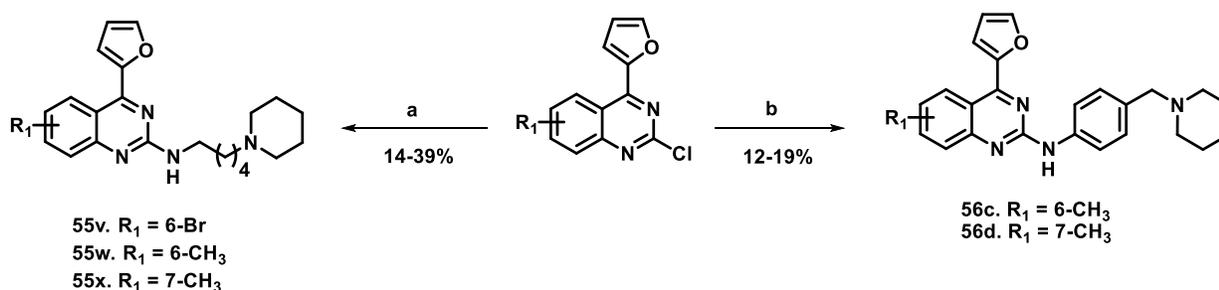
## 2.4. Modulations en position C2 des dérivés furaniques

Ces deux chaînes aminopentylpipéridine et 4-[(pipéridin-1-yl)méthyl]aniline ont donc été introduites sur les dérivés 4-furan-2-yl-2-aminoquinazolines **6** ( $K_i$  ( $hA_{2A}R$ ) = 23 nM), **50c** ( $K_i$  ( $hA_{2A}R$ ) = 45 nM) et **50m** ( $K_i$  ( $hA_{2A}R$ ) = 5 nM). Une troisième série de molécules quinazoliniques a donc été envisagée dans le but d'améliorer la solubilité des 2-aminoquinazolines tout en maintenant leur affinité envers les récepteurs  $A_{2A}$  (**Figure 81**).



**Figure 81. Structures envisagées des composés quinazoliniques de la série III.**

Cette série de molécules a été synthétisée en suivant les mêmes conditions établies pour les dérivés phénylquinazolines (**Schéma 15**).



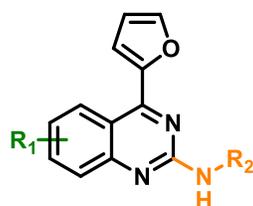
**Réactifs et conditions :** a) 5-(pipéridin-1-yl)pentan-1-amine (3.0 éq.), DIPEA (3.0 éq.), dioxane, reflux, 16 h; b) 4-(pipéridylméthyl)aniline (1.0 éq.), BINAP (0.1 éq.),  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (3.0 éq.),  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  (5%), dioxane, reflux, 16 h.

**Schéma 15. Synthèse conduisant aux composés de la série III.**

A partir des différents dérivés 2-chloro-4-furan-2-yl-quinazolines, une réaction de substitution nucléophile avec la 5-(pipéridin-1-yl)pentan-1-amine a permis d'obtenir les composés **55v-55x**. Les molécules **56c** et **56d** ont été synthétisées par une réaction pallado-catalysée de type Buchwald, par action de la 4-[(pipéridin-1-yl)méthyl]aniline.

Remarque : La réaction de Buchwald n'a pas pu être réalisée sur le dérivé bromé en position C6. En effet, le brome, étant plus réactif que le chlore en position C2, aurait également réagi au cours de la réaction, rendant l'obtention du composé souhaité très difficile. Un essai d'incorporation du groupement 4-[(pipéridin-1-yl)méthyl]aniline par condensation en présence de DIPEA a été tenté, sans succès. En effet, l'aniline est très peu réactive lors de substitution nucléophile, ce qui a empêché la réaction de se produire. Aucune conversion n'a été observée lors de cet essai. Un essai par radiation aux micro-ondes a été tenté, mais cela s'est également conclu par un échec.

L'affinité des composés de la **série III** a été évaluée. Les résultats obtenus sont reportés dans le **Tableau 13**.



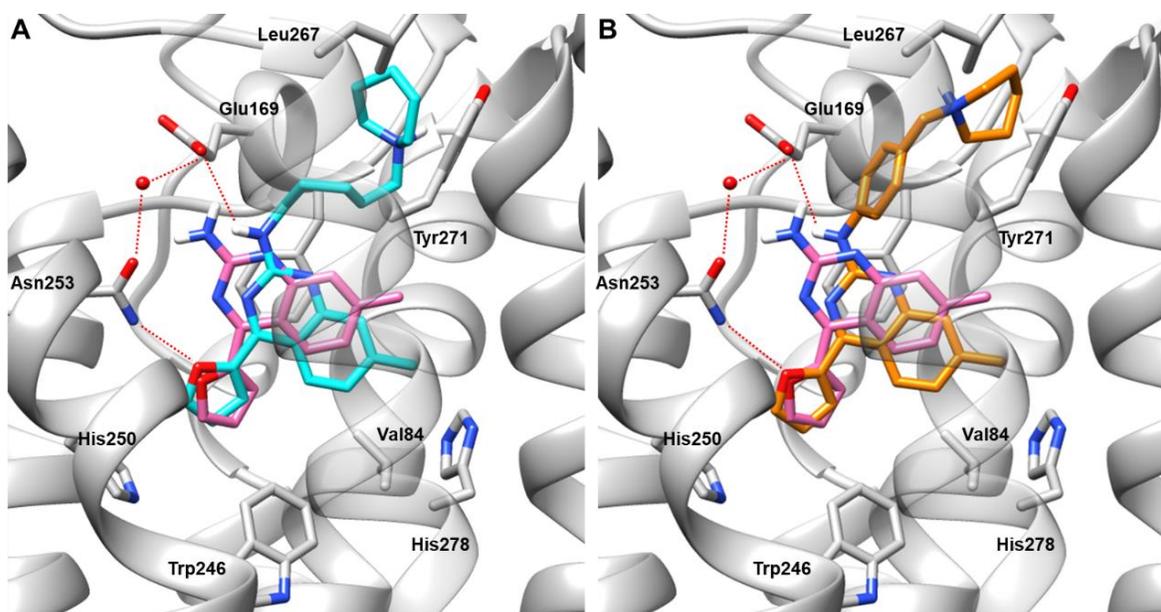
| Composé    | R <sub>1</sub>    | R <sub>2</sub>                              | K <sub>i</sub> hA <sub>2A</sub> R (nM) <sup>a</sup> | Solubilité PBS (mM) |
|------------|-------------------|---|---|---------------------|
| <b>6</b>   | 6-Br              | H   | 23 ± 7  | 0,15                |
| <b>55v</b> | 6-Br              | (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -pipéridine | >10000  | 14,15               |
| <b>50c</b> | 6-CH <sub>3</sub> | H   | 45 ± 7  | 0,10                |
| <b>55w</b> | 6-CH <sub>3</sub> | (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -pipéridine | 61 ± 15   | 2,15                |
| <b>56c</b> | 6-CH <sub>3</sub> | 4-[(pipéridin-1-yl)méthyl]benzène           | 65 ± 21   | 10,3                |
| <b>50m</b> | 7-CH <sub>3</sub> | H   | 5 ± 2   | 0,8                 |
| <b>55x</b> | 7-CH <sub>3</sub> | (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -pipéridine | 21 ± 2  | 12,0                |
| <b>56d</b> | 7-CH <sub>3</sub> | 4-[(pipéridin-1-yl)méthyl]benzène           | 15 ± 2  | 3,0                 |

<sup>a</sup>Les valeurs K<sub>i</sub> ont été déterminées à partir d'une analyse non linéaire des courbes de compétition utilisant le MRS7416 comme sonde fluorescente et sont exprimées en moyenne ± SEM de trois expériences indépendantes, en duplicata.

**Tableau 13. Modulations en position C2 en vue d'améliorer la solubilité des dérivés de 4-(furan-2-yl)quinazolin-2-amine.**

Indépendamment du type de chaîne, les composés ont montré des affinités de liaison autour de 60 nM pour les dérivés substitués par 6-méthyle (**55w**, K<sub>i</sub> (hA<sub>2A</sub>R) = 61 nM ; **56c**, K<sub>i</sub> (hA<sub>2A</sub>R) = 65 nM) et entre 15 et 20 nM pour leurs homologues 7-méthyle (**55x**, K<sub>i</sub> (hA<sub>2A</sub>R) = 21 nM ; **56d**, K<sub>i</sub> (hA<sub>2A</sub>R) = 15 nM). De manière

surprenante, le composé **55v** substitué en C6 par un brome et en C2 par la chaîne aminopentylpipéridine a perdu toute affinité pour le récepteur. Afin d'émettre des hypothèses permettant de mieux comprendre ces différences d'affinité, des études de docking ont été réalisées (**Figure 82**). Les deux composés occupent le site de liaison de manière similaire, le cycle aminoquinazoline du composé **55x** se déplaçant d'environ 1,5 Å par rapport à son homologue non substitué sur l'amine **50m**, ce qui entraîne une perte d'interactions au sein du réseau de liaison hydrogène. Cette perte est compensée par une augmentation des interactions hydrophobes à travers le motif pipéridine, qui est situé près de Leu267 et Tyr271. Quelque soit la nature du bras tenseur, chaîne linéaire carbonnée ou de type benzylque, la pipéridine est orientée et positionnée de la même façon dans le site actif. Ces résultats suggèrent que l'introduction d'amines tertiaires apolaires, telles que la diéthylamine (**55p**), la pipéridine (**55j**) ou la tétrahydroisoquinoline (**55q**), augmente l'affinité plus efficacement que l'introduction d'une amine primaire hautement polaire (**55s**). Concernant le dérivé bromé **55v**, il semblerait que la présence d'un brome volumineux en position C6 empêche la molécule de se lier correctement au site actif en raison d'un conflit stérique avec Val84.

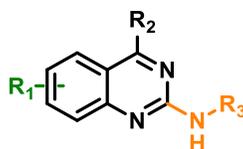


**Figure 82. (A) Prédiction du mode de liaison des composés 50m (rose) et 55x (cyan) dans le récepteur *hA<sub>2A</sub>*. (B) Prédiction du mode de liaison des composés 50m (rose) et 56d (cyan) dans le récepteur *hA<sub>2A</sub>*. (PDB : 8DU3)**

L'incorporation d'un groupement fonctionnel tel qu'une amine tertiaire qui peut être protonée à un pH physiologique (7,4) peut améliorer de manière significative la solubilité du composé. Alors que les 2-aminoquinazolines **6**, **50c** et **50m** présentent des solubilités faibles (< 200  $\mu\text{M}$ ) ou modérées (< 1 mM), l'introduction de chaînes pipéridines augmente leur solubilité à des concentrations allant de 2 à 14 mM. Ces résultats confirment que les substitutions en position C2 des quinazolines sont bénéfiques, car elles maintiennent une affinité élevée, tout en améliorant la solubilité.

### 2.5. Etude fonctionnelle des composés quinazoliniques

L'activité fonctionnelle des composés ayant des affinités de liaison inférieures à 70 nM a été évaluée à l'aide du kit commercialisé par Revvity LANCE Ultra cAMP Detection Kit (référence : TRF0262) pour mesurer l'inhibition de la libération d'AMPC stimulée par le récepteur  $hA_{2A}$  dans les cellules HEK, avec l'aide de Mathilde Coevoet. Le principe de ce test a été décrit dans le **chapitre 1** de ce manuscrit. L'agoniste CGS21680 a été utilisé à la concentration de son  $EC_{80}$  (4,5  $\mu\text{M}$ ), recommandée par le fabricant. Le composé inactif **50f** ( $K_i(hA_{2A}R) > 10 \mu\text{M}$ ) a servi de contrôle négatif, tandis que le ZM-241385, avec une  $IC_{50}$  de 227 nM, a servi de contrôle positif. Ces résultats sont cohérents avec les données obtenues précédemment. Les résultats de cette étude fonctionnelle sont reportés dans le **Tableau 14** suivant, les valeurs de constantes d'affinité ( $K_i$ ) étant rappelées :



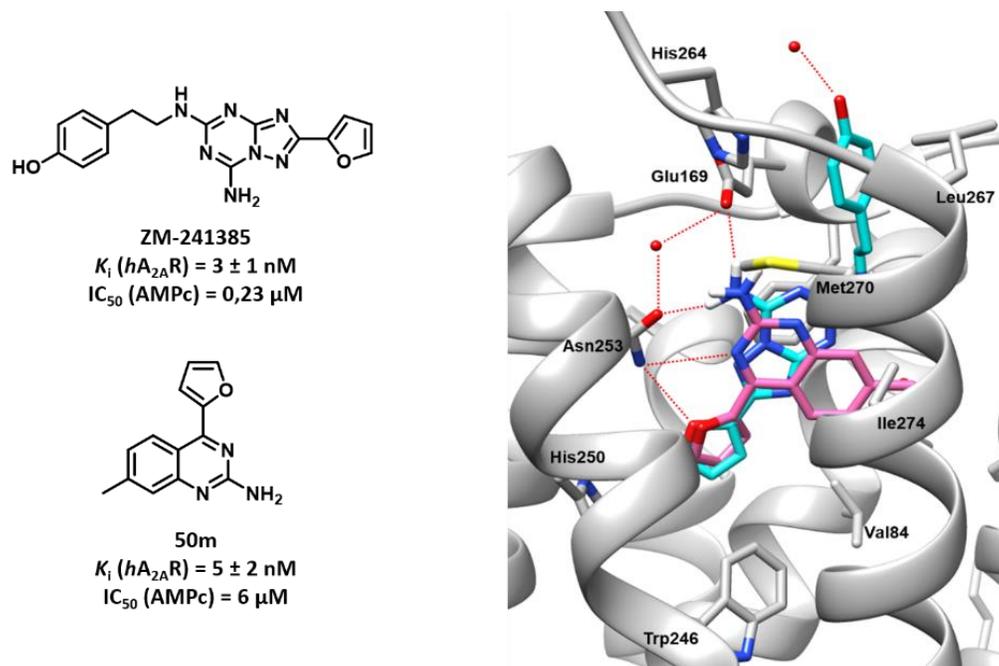
| Composé   | R <sub>1</sub>     | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub>                              | IC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup> | K <sub>i</sub> hA <sub>2A</sub> R (nM) <sup>b</sup> |
|-----------|--------------------|----------------|---|------------------------------------|---|
| ZM-241385 | /                  | /              | /   | 0,23 ± 0,02                        | 3 ± 1   |
| 6         | 6-Br               | 2-furane       | H   | >30                                | 23 ± 7  |
| 50c       | 6-CH <sub>3</sub>  | 2-furane       | H   | >30                                | 45 ± 7  |
| 55w       | 6- CH <sub>3</sub> | 2-furane       | (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -pipéridine | 14 ± 2                             | 61 ± 15   |
| 56c       | 6- CH <sub>3</sub> | 2-furane       | 4-[(pipéridin-1-yl)méthyl]benzène           | 12 ± 2                             | 65 ± 21   |
| 50h       | 6-Cl               | 2-furane       | H   | 39 ± 14                            | 28 ± 8  |
| 50f       | 6-OMe              | 2-furane       | H   | >30                                | >10 000   |
| 50k       | 7-Br               | 2-furane       | H   | >30                                | 28 ± 9  |
| 50m       | 7- CH <sub>3</sub> | 2-furane       | H   | 6 ± 1                              | 5 ± 2   |
| 55x       | 7-CH <sub>3</sub>  | 2-furane       | (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -pipéridine | 9 ± 5                              | 21 ± 2  |
| 56d       | 7- CH <sub>3</sub> | 2-furane       | 4-[(pipéridin-1-yl)méthyl]benzène           | 5 ± 1                              | 15 ± 2  |
| 50n       | 7- CH <sub>3</sub> | phényle        | H   | >30                                | 45 ± 6  |
| 50p       | 7-Cl               | 2-furane       | H   | 8 ± 6                              | 20 ± 1  |

<sup>a</sup>Test AMPc Lance Ultra, les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM de trois expériences indépendantes, en duplicata. <sup>b</sup>Les valeurs K<sub>i</sub> ont été déterminées à partir d'une analyse non linéaire des courbes de compétition utilisant le MRS7416 comme sonde fluorescente et sont exprimées en moyenne ± SEM de trois expériences indépendantes, en duplicata.

**Tableau 14. Valeurs des IC<sub>50</sub> obtenues lors de l'étude fonctionnelle des composés quinazoliques.**

De manière surprenante, seuls les composés **50m** et **50p**, portant une substitution 7-méthyle ou 7-chloro, ont montré des activités antagonistes avec des IC<sub>50</sub> de 6 et 8 μM, respectivement. Les autres dérivés 2-aminoquinazolines testés n'ont montré aucune activité à des concentrations supérieures à 30 μM. L'écart entre les résultats de l'affinité de liaison et les activités antagonistes peut s'expliquer par le mode de liaison différent des molécules par rapport au ZM-241385, l'antagoniste sélectif des récepteurs A<sub>2A</sub> de référence (**Figure 83**). Le ZM-241385 présente le même réseau d'interaction que le composé **50m** grâce à la position de son amine primaire et de son furane, mais il interagit également avec la partie supérieure de la poche de liaison.<sup>226,227</sup> En effet, le groupement hydroxyle phénolique du ZM-241385 forme une liaison hydrogène avec une molécule d'eau ordonnée, tandis que le cycle phényle engage des interactions hydrophobes avec

His264, Leu267 et Met270. Cependant, le ZM-241385 n'interagit pas avec la poche hydrophobe occupée par les groupements phényles substitués des dérivés de la quinazoline.



**Figure 83. Prédiction du mode de liaison du nouveau « hit » 50m (rose) dans la structure co-cristallisée du ZM-241385 (cyan) lié au récepteur  $hA_{2A}$ . (PDB : 3EML)**

L'hypothèse selon laquelle l'augmentation de la taille et du volume des molécules pour imiter les antagonistes  $A_{2A}R$  de référence peut améliorer leurs activités antagonistes n'est pas fortement démontrée par les résultats que nous avons obtenus. Bien que l'introduction d'une chaîne contenant de la pipéridine ait légèrement amélioré l'activité antagoniste des composés **55w** et **56c**, dont la valeur  $IC_{50}$  est d'environ  $10 \mu\text{M}$  par rapport à la 6-méthyl-2-aminoquinazoline **50c** ( $IC_{50} > 30 \mu\text{M}$ ), cette amélioration n'était pas cohérente pour les composés **55x** ( $IC_{50} = 9 \mu\text{M}$ ) et **56d** ( $IC_{50} = 5 \mu\text{M}$ ). Ces composés ont conservé leurs activités antagonistes proches de la gamme micromolaire, comme le composé **50m** ( $IC_{50} = 6 \mu\text{M}$ ).

De nouveaux composés quinazoliniques très affins pour les récepteurs  $A_{2A}$  ont donc été synthétisés. L'introduction d'une chaîne amine en position C2 a permis d'obtenir des composés affins ayant une excellente solubilité. Certains composés, dont le nouveau « hit » **50m** ( $K_i (hA_{2A}R) = 5 \text{ nM}$ ), ont prouvé leur activité antagoniste sur le récepteur  $A_{2A}$  mais l'ajout de chaîne amine ne semble pas vraiment impacter ce facteur.

## II. Conception et synthèse de sondes fluorescentes A<sub>2A</sub>R

En nous basant sur les résultats précédemment obtenus concernant les composés quinazoliniques, nous avons entrepris la conception et la synthèse de sondes fluorescentes ciblant les récepteurs A<sub>2A</sub>, en utilisant le noyau quinazoline comme base. Comme décrit dans le **chapitre 1** de ce manuscrit, nous avons utilisé le composé MRS7416, synthétisé au sein du laboratoire du Dr. K. A. Jacobson, comme sonde fluorescente afin de tester l'affinité de nos composés par polarisation de fluorescence.<sup>88</sup> L'utilisation de cette sonde nous a également permis de développer le test de polarisation de fluorescence de manière robuste et reproductible. Cependant, la synthèse de cette sonde n'est réalisable qu'en très faibles quantités et s'avère très coûteuse. En effet, le réactif de départ, SCH442416 et le fluorophore Alexa Fluor 488, sont extrêmement coûteux, obligeant à limiter la synthèse à quelques milligrammes. De plus, travailler à une si petite échelle complique encore davantage la réalisation de la synthèse. C'est donc pour ces raisons que nous avons décidé de concevoir nos propres sondes fluorescentes. De plus, ces sondes appartiendraient à la même famille structurale que nos composés les plus affins, les quinazolines.

### 1. Conception de sondes fluorescentes pour A<sub>2A</sub>R

La conception et la synthèse de ces sondes ont été réalisées avec l'aide du Dr. Robin Dufosse. Afin de concevoir ces sondes, nous nous sommes basés sur la structure de notre nouveau composé « hit » quinazolinique **50m** ( $K_i$  ( $hA_{2A}R$ ) = 5 nM). En effet, utiliser un composé très affiné comme point de départ permettrait de garder une affinité inférieure à la centaine de nanomolaire lors de l'ajout du linker et du fluorophore.

Comme nous avons pu le voir plus tôt dans ce chapitre, l'ajout d'une chaîne amine pentylpipéridine en position C2 du noyau quinazoline permet de maintenir une affinité du même ordre de grandeur que le dérivé 2-aminoquinazoline (**55x** ;  $K_i$  ( $hA_{2A}R$ ) = 21 nM). Pour la partie linker de notre sonde, nous avons opté pour une chaîne pentylpipérazine en position C2 de la quinazoline afin de permettre des substitutions nucléophiles et de fonctionnaliser le groupement pipérazine. Comme décrit dans le **Tableau 12**, une perte d'affinité d'un facteur deux est observé entre la pipérazine et la pipéridine. Cependant, l'utilisation de la pipérazine comme linker reste tout de même envisageable. Nous avons envisagé un linker plus long que celui de la sonde MRS7416. En effet, un linker relativement long permettrait au fluorophore de se situer en dehors de la poche du récepteur A<sub>2A</sub>, évitant ainsi d'éventuels encombrements stériques. Ainsi, la position et les modes de liaison du composé antagoniste initial ne seraient pas modifiés. Pour ce faire, nous avons considéré l'utilisation de chaînes PEG-2 et PEG-4 pour fonctionnaliser la pipérazine et ainsi allonger la taille du linker. L'effet de la longueur du linker sera donc étudié avec ces deux groupements.

Les groupements PEG sont connus pour leur solubilité supérieure par rapport aux chaînes carbonées, ce qui nous permettra d'éviter tout problèmes de solubilité.<sup>228,229</sup>

Comme mentionné précédemment, le fluorophore AlexaFluor 488 est extrêmement coûteux. Par conséquent, nous avons choisi d'utiliser la fluorescéine, couramment employée dans les tests de fluorescence, comme pour la sonde mGluR<sub>5</sub> (**cf. chapitre 1**). De plus, elle est beaucoup plus accessible que d'autres fluorophores et permet de conserver les mêmes longueurs d'onde d'excitation et d'émission ( $\lambda_{ex}$  = 490 nm et  $\lambda_{em}$  = 515 nm). Cependant, pour la synthèse de cette sonde, nous utiliserons un dérivé de la fluorescéine, l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) beaucoup plus réactif et conduisant à des couplages quantitatifs (**Figure 84**). En effet, l'acide carboxylique de la fluorescéine est très peu réactif en raison de son encombrement stérique. En revanche, le groupement isothiocyanate de la FITC, situé en position *para*, est beaucoup plus réactif, ce qui facilitera la synthèse et permettra d'obtenir un rendement plus élevé.<sup>230</sup>



**Figure 84. Structures de la fluorescéine et de la FITC.**

Comme évoqué plus tôt, l'instabilité chimique du groupement 2-furane rend les étapes d'optimisation de synthèse difficile. A nouveau, nous avons donc choisi de nous familiariser avec la synthèse de sondes et de l'optimiser sur le dérivé 2-aminophénylquinazoline **4**. Les structures des sondes sont illustrées dans la **Figure 85**, ci-dessous.

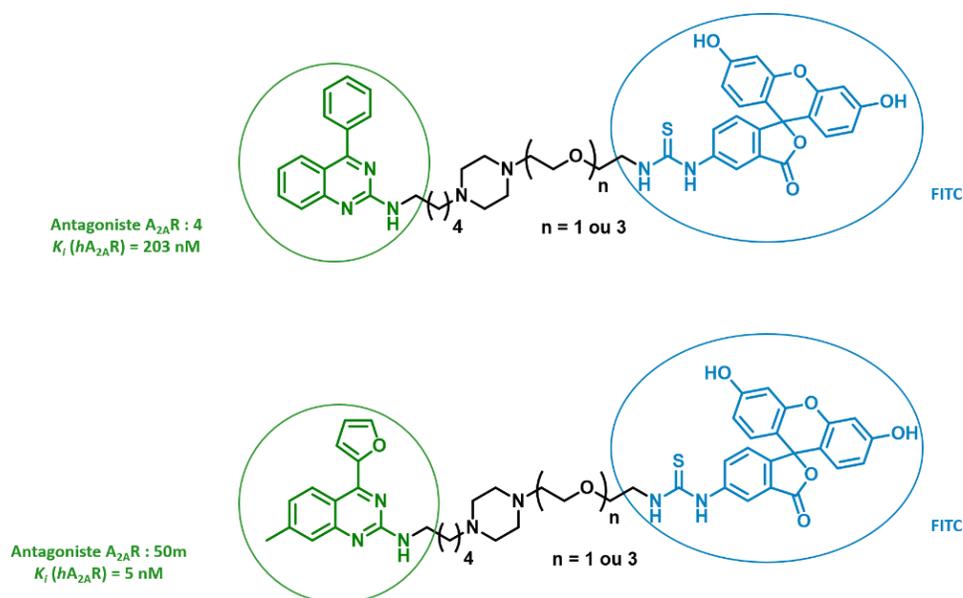


Figure 85. Structures des sondes fluorescentes  $A_{2A}R$  envisagées.

Avant de débiter la synthèse de ces sondes, nous avons décidé de synthétiser des sondes « modèles », non fluorescentes. De manière générale et comme décrit dans l'article de Kecskés M. *et al.*<sup>176</sup>, l'affinité des sondes fluorescentes est déterminée par un test de « radiobinding » avant d'être utilisée pour une autre méthode biophysique. N'ayant pas le matériel nécessaire pour réaliser ce test, nous ne pourrions donc pas déterminer l'affinité exacte de nos sondes fluorescentes. Des sondes « modèles » ont été envisagées afin d'estimer l'ordre de grandeur de l'affinité que nous pourrions atteindre. Pour cela, le fluorophore est remplacé par un groupement diphenyle (**Figure 86**).

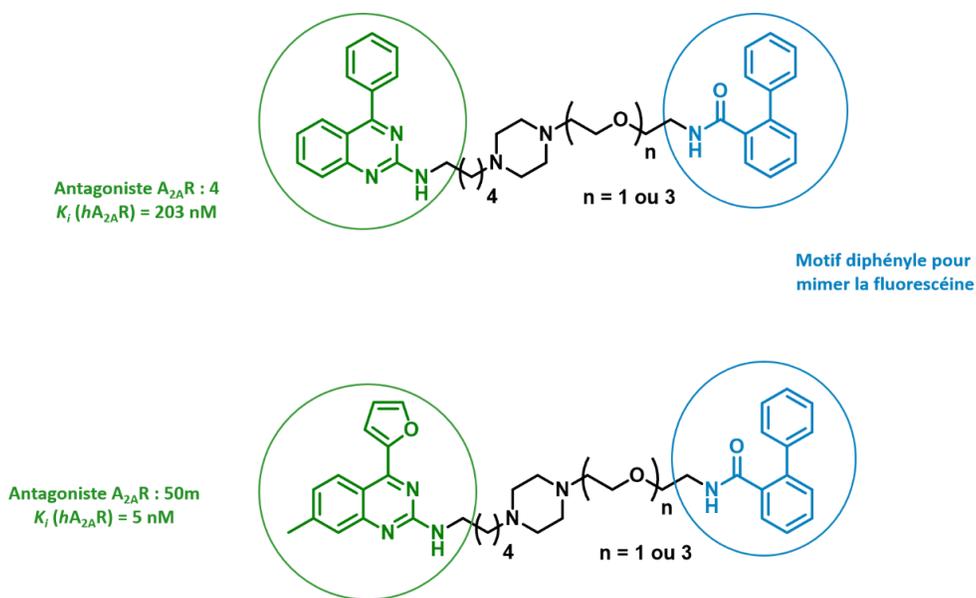
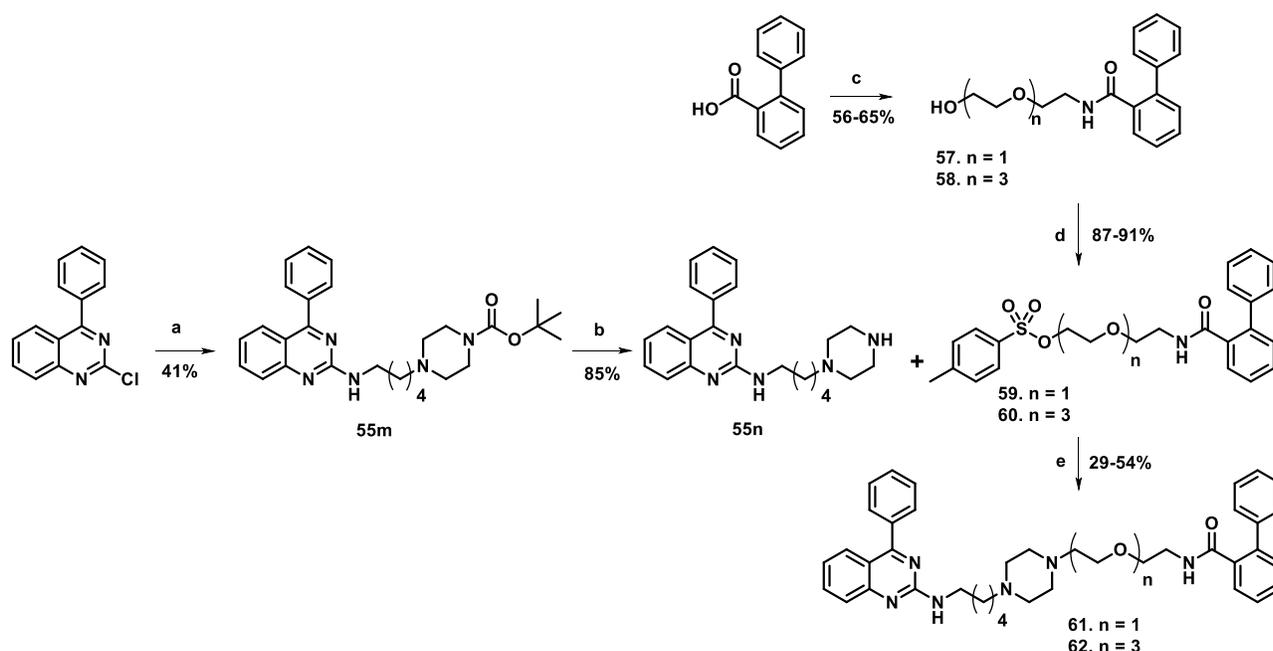


Figure 86. Structures des sondes « modèles » fluorescentes  $A_{2A}R$  envisagées.

Ce choix s'explique par la disponibilité de l'acide biphenyle carboxylique au laboratoire et de son encombrement stérique, qui permet de mimer la fluoescéine sans fluorophore. Comme pour les sondes fluorescentes, la synthèse des sondes « modèles » a d'abord été optimisée sur le dérivé 4-phénylquinazoline avant d'être réalisée sur le dérivé furanique.

## 2. Synthèse des sondes 4-phénylquinazolines

Dans un premier temps, les sondes « modèles » des dérivés quinazoliques possédant un phényle en position C4 ont été synthétisés. Le schéma de synthèse de ces dernières est décrit dans le **Schéma 16**, ci-après.



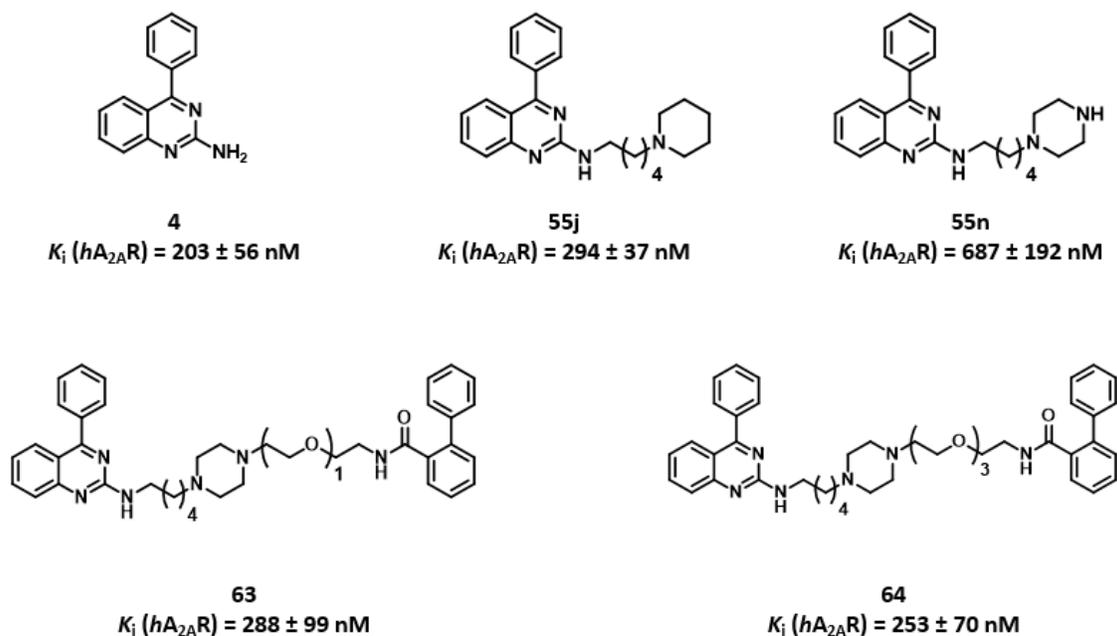
**Réactifs et conditions :** a) 4-(5-aminopentyl)pipérazine-1-carboxylate de tert-butyle (1.1 éq.), DIPEA (3.0 éq.), DMF, 90 °C, 16 h; b) HCl (12.0 éq.), DCM, TA, 16 h; c) PEG-2 ou PEG-4 (1.0 éq.), Et<sub>3</sub>N (2.2 éq.), HOBT (1.2 éq.), EDCI (1.2 éq.), DCM, 0-20 °C, 2 h; d) chlorure de tosylate (1.5 éq.), Et<sub>3</sub>N (3.0 éq.), DCM, TA, 16 h; e) DIPEA (3.0 éq.), toluène, reflux, 2 h.

### Schéma 16. Schéma réactionnel des sondes « modèles ».

À partir de la 2-chloro-4-phénylquinazoline, disponible dans le commerce, une réaction de substitution nucléophile est réalisée avec la chaîne pentylpipérazine protégée par un groupement Boc, pour obtenir l'intermédiaire **55m**. Le groupement protecteur « Boc » de l'amine primaire de ce dernier est ensuite hydrolysé par action de l'acide chlorhydrique dans le dichlorométhane, produisant ainsi le composé **55n**. Les intermédiaires **57** et **58** ont été synthétisés à partir de l'acide 2-biphénylcarboxylique. Un couplage avec les dérivés aminés PEG-2 et PEG-4 permet d'obtenir les composés **57** et **58**.<sup>231</sup> Ensuite, une réaction de tosylation par action du chlorure de tosylate est réalisée pour obtenir les intermédiaires **59** et **60**.<sup>232</sup> Enfin,

une substitution nucléophile des groupements tosylés par le dérivé pipérazine **55n** permet d'obtenir les sondes « modèles » souhaitées **61** et **62**.

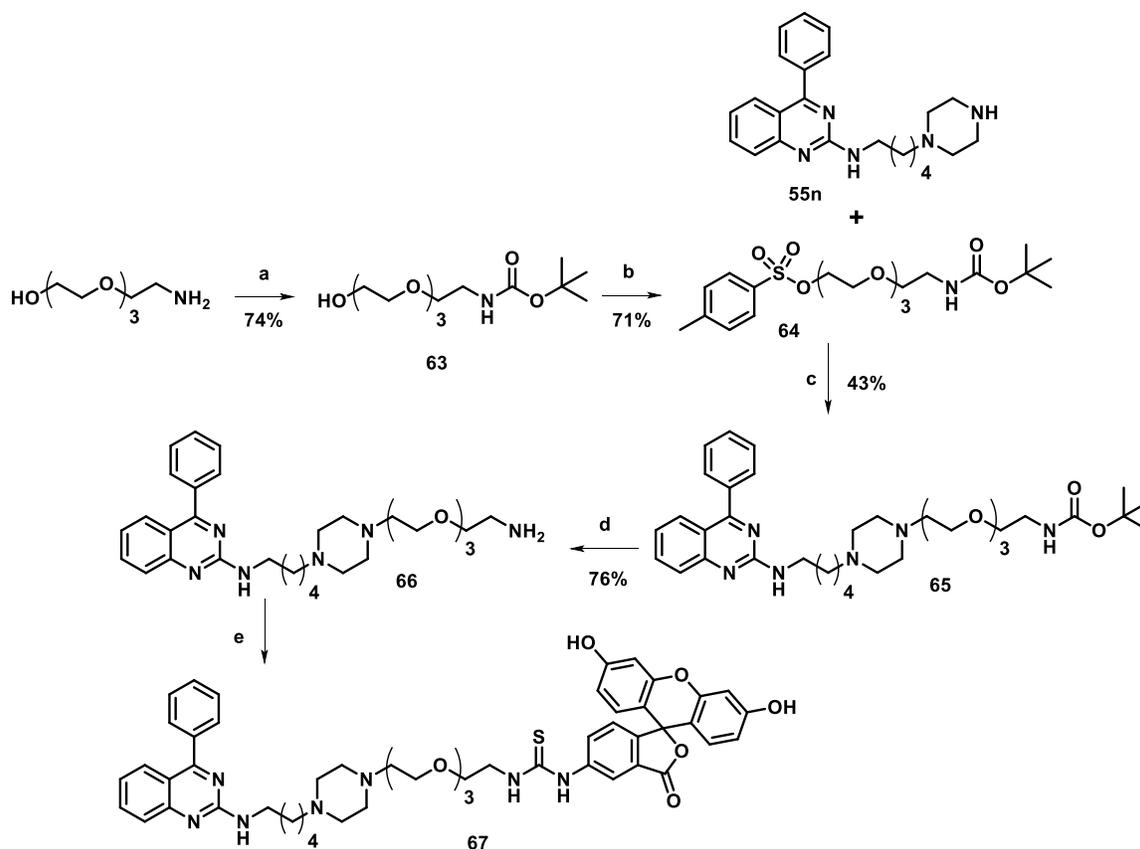
Leur affinité a été déterminée par polarisation de fluorescence (**Figure 87**). Les deux composés **61** et **62** présentent une affinité similaire (**61** ;  $K_i(hA_{2A}R) = 288$  nM et **62** ;  $K_i(hA_{2A}R) = 253$  nM). La taille du linker et plus précisément de la chaîne PEG ne semble donc pas affecter l'affinité. De plus, la présence du groupement diphenyle ne semble pas causer de clashes stériques ou modifier le mode de liaison puisque nous n'avons pas de perte totale de l'affinité. Le plus intéressant, c'est que nous conservons le même ordre de grandeur d'affinité que le dérivé 2-aminoquinazoline **4** ( $K_i(hA_{2A}R) = 203$  nM) et le composé **55j** ( $K_i(hA_{2A}R) = 294$  nM) possédant une chaîne pentylpipéridine. De plus, l'ajout du linker permet d'améliorer l'affinité obtenue pour le composé **55n**, comportant la chaîne pentylpipérazine, d'un facteur deux.



**Figure 87. Structures et affinités sur  $hA_{2A}R$  des deux sondes « modèles » et des composés 4, 55j et 55n.**

Pour la suite du développement des sondes, nous avons décidé de travailler seulement avec la chaîne PEG-4. En effet, il n'est pas nécessaire de continuer la synthèse des deux dérivés PEG-2 et PEG-4 puisque ces derniers sont équivalents. Le choix s'est porté sur le PEG-4 car il confère une très légère amélioration de l'affinité.

Par la suite, la synthèse de la sonde fluorescente 4-phénylquinazoline a été réalisée. Le schéma réactionnel de cette sonde est illustré dans le **Schéma 17**.



**Réactifs et conditions :** a)  $\text{Boc}_2\text{O}$  (1.1 éq.),  $\text{Et}_3\text{N}$  (3.0 éq.), DCM, TA, 16 h; b) chlorure de tosyloyle (1.5 éq.),  $\text{Et}_3\text{N}$  (3.0 éq.), DMAP (0.2 éq.), DCM, TA, 16 h; c)  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (2.0 éq.),  $\text{Et}_3\text{N}$  (2.0 éq.), DMF, 90 °C, 16 h; d) HCl (12.0 éq.), DCM, TA, 4 h; e) FITC (1.0 éq.), DMF, TA, 16 h.

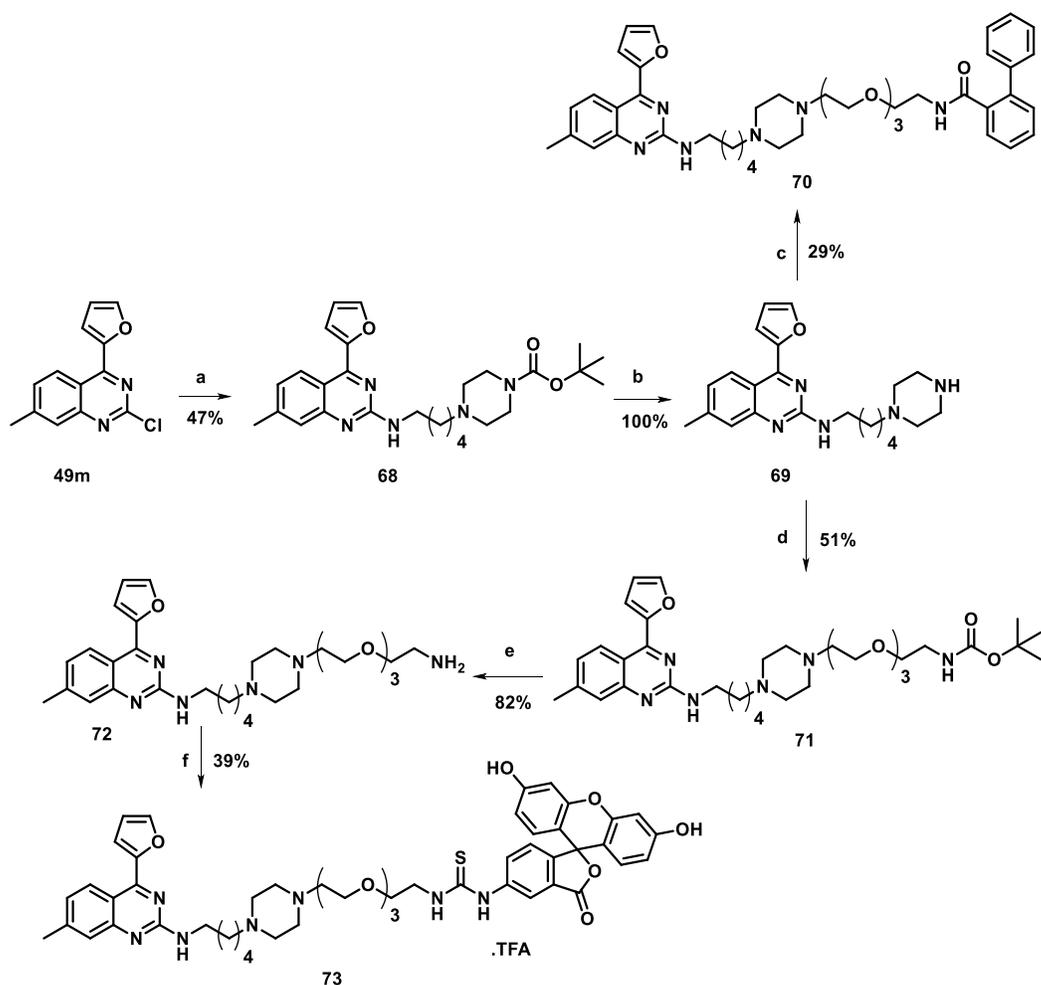
**Schéma 17. Schéma réactionnel de la synthèse de la sonde quinazolinique avec le groupement phényle en position C4.**

L'intermédiaire **55n** a été obtenu selon le même procédé que précédemment décrit. Ici, la chaîne PEG-4 a d'abord été placée sur la quinazoline pentylpipérazine et non directement sur le fluorophore afin de limiter les étapes de synthèse en présence du fluorophore. Cela permet de simplifier la synthèse et d'éviter une dégradation potentielle du fluorophore et de son intensité de fluorescence par la lumière. Tout d'abord, l'amine primaire du réactif PEG-4 a été protégée par action du  $\text{Boc}_2\text{O}$  afin d'obtenir le composé **63**. Le groupement hydroxyle de ce dernier a subi une réaction de tosylation grâce au chlorure de tosyloyle donnant ainsi le composé **64** avec un rendement de 74%. Une substitution nucléophile est ensuite réalisée entre les composés **64** et **55n**. Le dérivé amine **66** est obtenu par déprotection du groupement Boc par action de l'acide chlorhydrique dans le dichlorométhane. Enfin, la sonde fluorescente **67** a été obtenue par couplage entre le dérivé **66** et l'isothiocyanate de fluorescéine dans le DMF.

Des difficultés de purification ont empêché d'isoler la sonde **67** avec une pureté suffisante pour pouvoir la tester en polarisation de fluorescence. Aucun test n'a donc été effectué avec cette sonde. Cependant, grâce à l'optimisation de la synthèse réalisée sur cette dernière, nous avons décidé d'entreprendre la synthèse de la sonde « modèle » et la sonde fluorescente sur le dérivé quinazolinique comportant un furane en position C4 et un méthyle en position C7.

### 3. Synthèse des sondes 4-furan-2-yl-quinazolines

Le schéma réactionnel de ces deux molécules est identique à celui utilisé pour les dérivés 4-phénylquinazolines. La synthèse est exposée dans le **Schéma 18** ci-après, mais les étapes de synthèse ne seront pas décrites à nouveau.

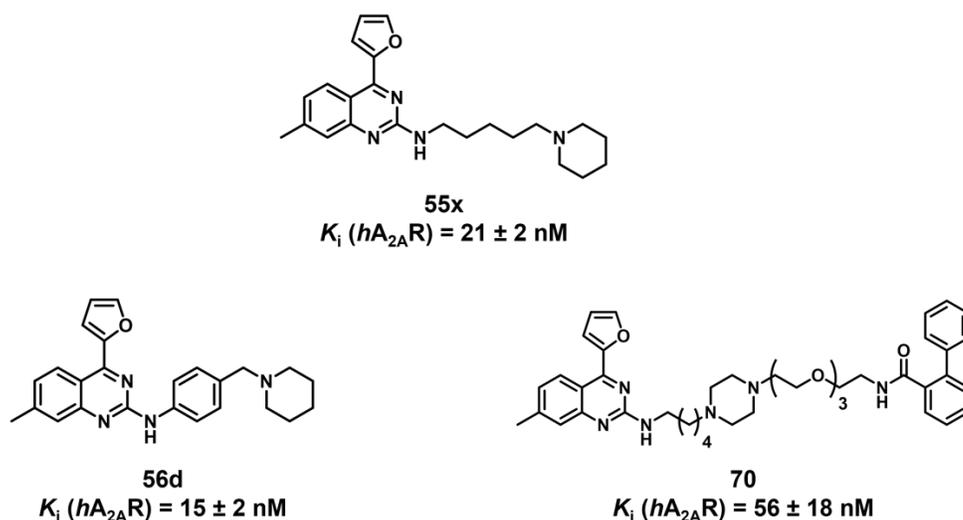


**Réactifs et conditions :** a) 4-(5-aminopentyl)pipérazine-1-carboxylate de tert-butyle (1.1 éq.), DIPEA (3.0 éq.), DMF, 90 °C, 16 h; b) HCl (12.0 éq.), DCM, TA, 2 h; c) **60** (2.0 éq.), DIPEA (3.0 éq.), toluène, reflux, 2 h; d) **64** (1.2 éq.), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2.0 éq.), Et<sub>3</sub>N (2.0 éq.), DMF, 90 °C, 16 h; e) HCl (12.0 éq.), DCM, TA; f) FITC (1.0 éq.), DMF, TA, 16 h.

**Schéma 18.** Synthèse de la sonde « modèle » et de la sonde fluorescente quinazolinique.

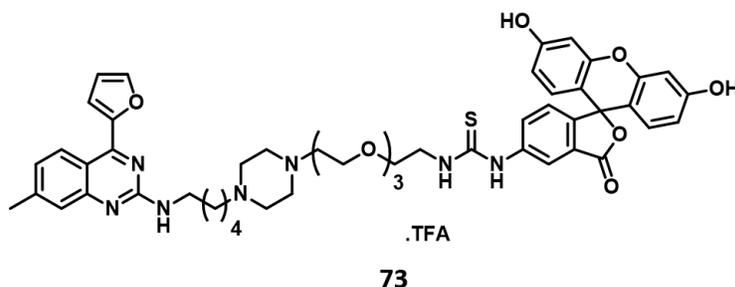
La sonde « modèle » **70** a été obtenue avec un rendement de 29%. Cette dernière a été évaluée pour son affinité en polarisation de fluorescence afin de vérifier que l'ajout du linker et du groupement diphenyle ne réduisait pas significativement son affinité.

Le composé **70** a montré une affinité tout à fait satisfaisante de 56 nM (**Figure 88**). Une légère perte d'affinité est observée par rapport aux composés **55x** ( $K_i(hA_{2A}R) = 21$  nM) et **56d** ( $K_i(hA_{2A}R) = 15$  nM) mais cette valeur reste dans l'ordre de grandeur des affinités de nos composés quinazoliques les plus affins, étant inférieur à la centaine de nanomolaire. De plus, une légère baisse de l'affinité était totalement attendue avec l'ajout d'une chaîne en position C2. Pour rappel, la sonde MRS5346 développée par Kecskés M. *et al.*<sup>176</sup> possède une affinité supérieure, de 111 nM, pour les récepteurs  $A_{2A}$ . Cette dernière a tout de même pu être utilisée en polarisation de fluorescence malgré une différence d'affinité de plus de 100 nM avec le composé de référence SCH442416 ( $K_i(hA_{2A}R) = 4,1$  nM).



**Figure 88.** Structures et affinités sur  $hA_{2A}R$  de la sonde « modèle » **70** et des composés **55x** et **56d**.

Suite aux résultats encourageants obtenus pour la sonde « modèle » **70**, la sonde fluorescente **73** a aussi été synthétisée et obtenue avec un rendement de 39%, après purification, sous forme de sel de TFA (**Figure 89**).



**Figure 89.** Structure de la sonde fluorescente **73**.

Des tests cinétiques identiques à ceux effectués pour la sonde MRS7416 ont été menés pour déterminer la valeur du  $K_D$  de cette nouvelle sonde. Malheureusement, ces tests n'ont pas abouti. Le premier essai visant à déterminer la constante de vitesse d'association  $k_{on}$  et à observer la formation du complexe membrane-sonde n'a en effet pas fonctionné. Le complexe ne semble pas se former avec la sonde **73**, produisant ainsi des valeurs similaires à celles du contrôle négatif, où les membranes sont absentes. Ce test a été réalisé en triplicata technique et expérimental, donnant chacun des résultats non concluants.

Pour comprendre les raisons de ces résultats, nous avons décidé de comparer la fluorescence de notre sonde à celle de MRS7416. Nous avons en effet émis l'hypothèse que notre sonde n'était pas suffisamment fluorescente, rendant sa détection en polarisation de fluorescence difficile voire quasi impossible.

Pour cela, la fluorescence des sondes **73** et MRS7416 et de la FITC seule a été mesurée grâce à un lecteur de plaques multimodes, le Varioskan Flash, aux concentrations de 1  $\mu$ M et 100 nM. Les mesures de fluorescence ont été réalisées à une longueur d'onde d'excitation de 490 nm et une longueur d'onde d'émission de 510 nm, également utilisées en polarisation de fluorescence. La fluorescence mesurée pour notre sonde est dix fois inférieure à celle de la sonde MRS7416. En comparaison, la FITC présente une fluorescence trois fois plus faible que celle de MRS7416. La fluorescence de la sonde « modèle » **70** et du précurseur de synthèse **72** a également été testée. Cette dernière est presque inexistante, ce qui confirme que la fluorescence observée provient bien du fluorophore et non de la molécule elle-même. Pour détecter la sonde en polarisation de fluorescence, il serait donc nécessaire d'utiliser une concentration dix fois plus élevée. Cependant, cela n'est pas faisable, car une concentration trop élevée de sonde empêcherait les composés à tester de déplacer le complexe membrane-sonde, ce qui entraînerait des valeurs de constante d'inhibition trop faibles. Le couplage entre la FITC et la quinazoline semble réduire davantage la fluorescence. Cette diminution de la fluorescence pourrait être due à l'absorption de la fluorescence par la quinazoline ou le fluorophore.

Nous nous sommes donc demandé s'il y avait un phénomène de « quenching » de l'absorbance. Nous avons donc décidé de mesurer l'absorbance des composés, également à 1  $\mu$ M et 100 nM. Les mesures ont été réalisées aux longueurs d'onde 480, 490, 500, 510 et 520 nm. Malheureusement, aucune absorption n'a été détectée à ces concentrations. Nous avons donc réalisé la même expérience à une concentration de 100  $\mu$ M en composés. Les valeurs d'absorbance des sondes MRS7416 et **73** sont similaires ( $\approx 0.5$ ) tandis que la FITC possède une absorbance deux fois plus importante ( $\approx 1$ ). Nous ne pouvons donc pas tirer de conclusion par rapport à ces données. Ces résultats pourraient être attribués à une dégradation de la fluorescéine lors de la synthèse de la sonde, possiblement en raison d'une exposition prolongée à la lumière. De plus, le fait que la sonde soit sous forme de sel de TFA pourrait également influencer son

absorbance et sa fluorescence. Ces hypothèses n'ont pas pu être explorées davantage, et aucune autre expérience n'a pu être menée avec la sonde **73** en raison du manque de temps.

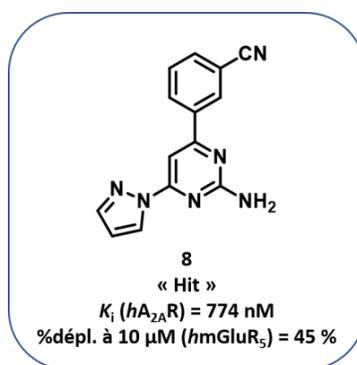
# Chapitre 4 : Ligands duaux

## $A_{2A}R/mGluR_5$

Un des derniers objectifs de ma thèse était de développer de nouveaux ligands duaux visant les récepteurs A<sub>2A</sub> et mGlu<sub>5</sub>. En effet, il a été montré que l'approche multicible présente de nombreux avantages thérapeutiques dans le cadre de pathologies multifactorielles, telles que les maladies neurodégénératives.<sup>233-236</sup> Il a été démontré que les récepteurs A<sub>2A</sub> agissent en synergie avec les récepteurs mGlu<sub>5</sub>, en plus de leur hétérodimérisation.<sup>48</sup> C'est pour cela que nous avons décidé de cibler les récepteurs mGlu<sub>5</sub> en plus des récepteurs A<sub>2A</sub>.

### I. Conception de nouveaux ligands duaux A<sub>2A</sub>R/mGluR5

Comme évoqué dans la partie travaux préliminaires de ce manuscrit, un premier composé « hit » **8** à visée mixte a été synthétisé au sein de notre laboratoire (**Figure 90**). Ce composé a été conçu à partir de composés pyrimidiques décrits dans la littérature, auxquels les éléments pharmacophoriques pour A<sub>2A</sub>R ont été incorporés. A partir de ce composé, de nouveaux composés duaux de la famille des 2-aminopyrimidines ont pu être conçus.



**Figure 90. Structure du composé « hit » multifonctionnel.**

Une seconde famille de composés a été développée en utilisant le squelette des quinazolines, qui sont nos composés les plus affins pour le récepteur A<sub>2A</sub>. À partir de ce squelette, des éléments pharmacophoriques spécifiques aux récepteurs mGlu<sub>5</sub> ont été incorporés.

Ces composés ont été développés à nouveau grâce à la stratégie de ligands dit « fusionnés », première stratégie que nous avons mis en place (**Figure 91**). Grâce à cette stratégie, ces deux familles chimiques, les 2-aminopyrimidines et les 2-aminoquinazolines, permettront d'intégrer les éléments pharmacophoriques des deux récepteurs.

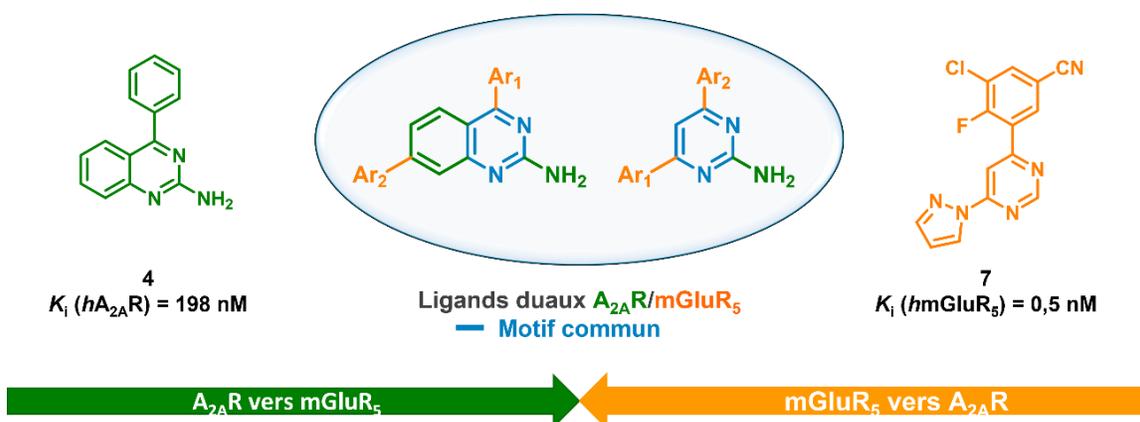


Figure 91. Stratégie de ligands « fusionnés » utilisée pour la conception de nouveaux ligands duaux.

## 1. Composés 2-aminopyrimidines

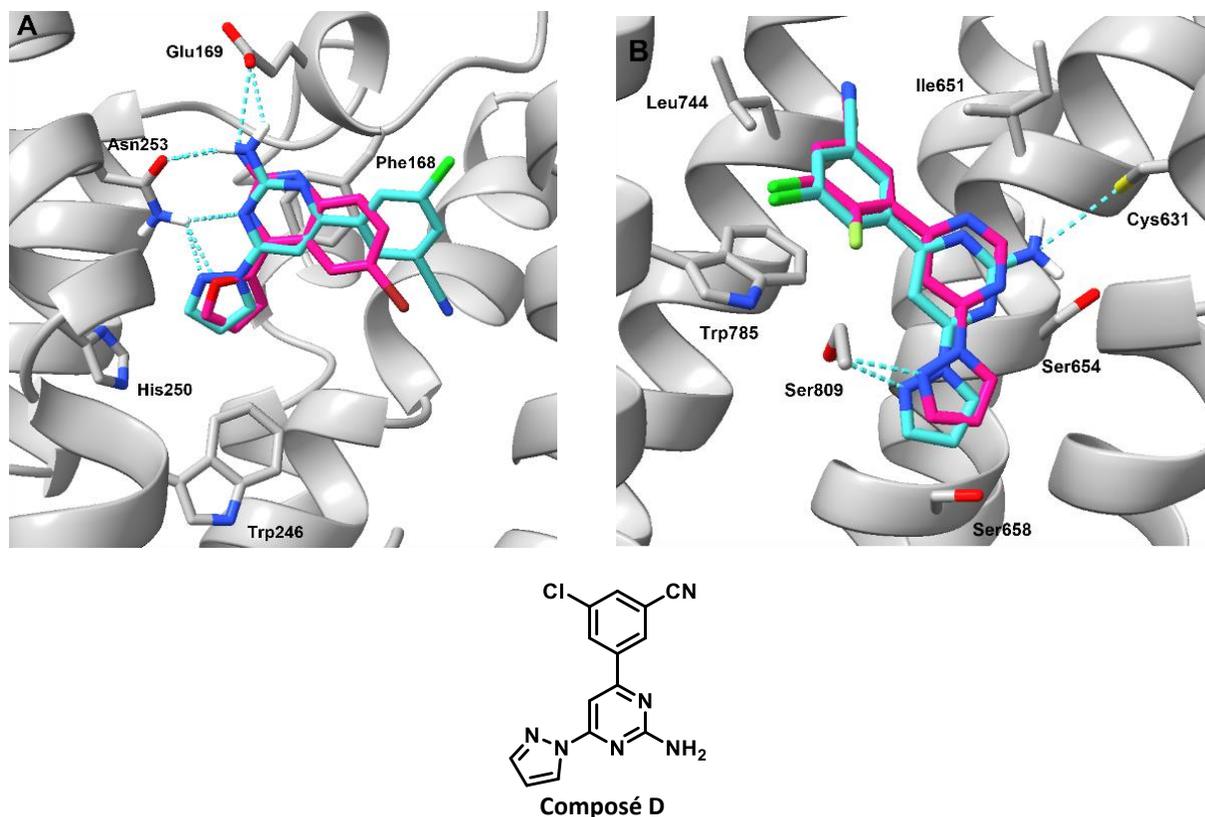
### 1.1. Conception

Comme décrit dans la littérature, les composés pyrimidiques sont des ligands très affins pour les récepteurs mGlu<sub>5</sub> avec un fort potentiel thérapeutique pour le traitement de maladies neurodégénératives.<sup>166</sup> Ce motif est également présent dans la structure de différents antagonistes A<sub>2A</sub>R, comme l'etremadenant (**Figure 15, p 21**). Ce composé possède un  $K_D$  de 1,4 nM et est actuellement en phase II pour le traitement du cancer colorectal métastatique.<sup>75</sup> Dans le but d'obtenir également une affinité envers les récepteurs A<sub>2A</sub>, les éléments pharmacophoriques essentiels à cette interaction ont été incorporés à la structure des ligands mGluR<sub>5</sub>. L'amine primaire, dont la présence est essentielle afin d'interagir par liaison hydrogène avec l'Asn253 au sein du récepteur, a donc été ajoutée afin d'obtenir des composés 2-aminopyrimidines tels que le composé « hit » **8** (% déplacement à 10  $\mu\text{M}$  ( $hmGluR_5$ ) = 45%). Ce composé étant un très bon point de départ pour la conception de composés mixtes, d'autres molécules de la famille des 2-aminopyrimidines ont donc été dockées.

L'ajout d'atomes d'halogènes de type chlore et fluor sur le benzonitrile en position C4 du composé **8** permet d'obtenir de meilleurs résultats par modélisation moléculaire (

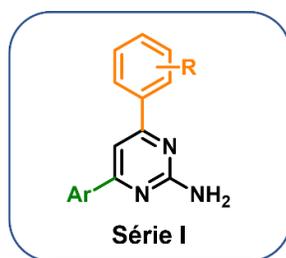
**Figure 92**). De plus ce composé se positionne de façon identique aux composés de référence au sein des deux récepteurs, gardant ainsi les interactions essentielles. L'introduction de substituants comme le fluor, le chlore ou encore le groupement méthoxy en positions *para*, *mé*ta et *ortho* sur le phényle en position C4 semble également intéressante. Ces modulations permettront de voir l'influence de la nature et de la position des substituants sur l'affinité. Des molécules di- ou trisubstituées sur ce même phényle pourraient également permettre de rendre compte de l'espace présent dans la poche de chaque récepteur.

Le remplacement du groupement pyrazole en position C6 par un groupement tel que le 4-fluorophényle pourrait également apporter une plus-value et voir ainsi si un groupement un peu plus volumineux peut accéder aux poches des deux récepteurs.



**Figure 92. (A) Superposition de la pose docking sélectionnée du composé 2-aminopyrimidine D (cyan) à la structure co-cristallisée du composé 6 (rose) au sein du récepteur *hA<sub>2A</sub>*. (PDB : 8DU3) (B) Superposition de la pose docking sélectionnée du composé 2-aminopyrimidine D (cyan) à la structure co-cristallisée du composé 7 (rose) au sein du récepteur *hmGlu<sub>5</sub>*. (PDB : 5CGC)**

A partir de ces différentes modulations proposées à l'aide de la modélisation moléculaire, une première série de molécules à visée mixte, basée sur le squelette 2-aminopyrimidine, a donc été développée (**Figure 93**).

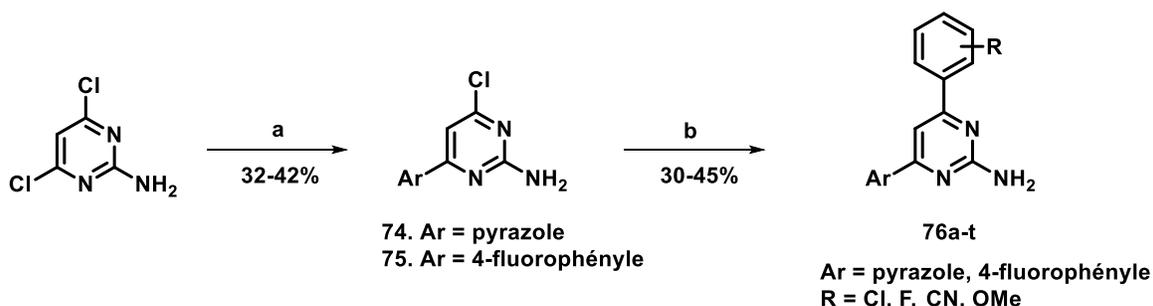


R = F, Cl, OMe, CN  
Ar = pyrazole, *p*-fluorophényle

**Figure 93. Structures envisagées des composés à visée mixte de la série I.**

### 1.2. Synthèse

La synthèse des composés de la **série I** s'effectue en deux étapes seulement et est représentée ci-dessous (**Schéma 19**) :



**Réactifs et conditions :** a) 1H-pyrazole (1.5 éq.), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2.0 éq.), DMF, 80 °C, 16 h ou acide boronique (1.1 éq.), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2.0 éq.), PPh<sub>3</sub> (0.1 éq.), Pd(OAc)<sub>2</sub> (0.1 éq.), THF/eau, 40 °C, 16 h; b) acide boronique (1.1 éq.), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2.0 éq.), PPh<sub>3</sub> (0.1 éq.), Pd(OAc)<sub>2</sub> (0.1 éq.), THF/eau, 100 °C, 16 h.

**Schéma 19. Schéma réactionnel conduisant à la synthèse des composés 2-aminopyrimidines.**

#### Pour Ar = pyrazole :

La première étape consiste en une réaction de substitution nucléophile réalisée entre la 2-amino-4,6-dichloropyrimidine et le 1H-pyrazole en présence de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> dans le DMF à 80 °C. En raison de la symétrie de la 2-amino-4,6-dichloropyrimidine, les deux atomes de chlore présentent une réactivité équivalente. Par conséquent, la formation de produit disubstitué par le 1H-pyrazole est inévitable, ce qui explique le rendement de 42%. Un couplage pallado-catalysé de type Suzuki est ensuite effectué afin d'obtenir les composés désirés **76a-n** avec des rendements de 30 à 45%.

#### Pour Ar = 4-fluorophényle :

La première étape est un couplage pallado-catalysé de type Suzuki réalisé entre la 2-amino-4,6-dichloropyrimidine et l'acide 4-fluorophénylboronique en présence de triphénylphosphine et de Pd(OAc)<sub>2</sub>

comme catalyseur dans le dioxane. En raison de la réactivité identique des deux atomes de chlore sur la 2-amino-4,6-dichloropyrimidine et de la forte réactivité des acides boroniques, la réaction est réalisée à 40 °C pour réduire la formation du composé disubstitué par le groupement 4-fluorophényle. La réaction aboutit ainsi à un mélange de dichloropyrimidine, de produit monosubstitué et de produit disubstitué, ce qui justifie le rendement de 32% obtenu. Un second couplage pallado-catalysé de type Suzuki est ensuite effectué, en chauffant à 100 °C cette fois-ci afin d'obtenir les composés finaux **76o-t**.

## 2. Composés quinazoliniques

### 2.1. Conception

Afin de garder une potentielle affinité envers les récepteurs A<sub>2A</sub>, l'amine primaire en position C2 a été conservée sur le noyau quinazolinique, permettant ainsi la liaison hydrogène avec l'Asn253. Des modulations de ce cycle quinazoline ont été envisagées en positions C4 et C7, en apportant des groupements aromatiques comportant des halogènes, un groupement méthoxy et/ou un groupement nitrile afin d'obtenir également une affinité pour les récepteurs mGlu<sub>5</sub>. En effet, de nombreux modulateurs allostériques du récepteur mGlu<sub>5</sub> décrits dans la littérature possèdent des groupements aromatiques comportant des halogènes ainsi qu'un groupement nitrile.<sup>237-239</sup> Le groupement aromatique en position C4 permettra de garder une ressemblance structurale avec les composés quinazoliniques déjà synthétisés, possédant tous un groupement aromatique en cette position. L'ajout du deuxième groupement aromatique en position C7, quant à lui, permettra d'apporter un élément pharmacophorique des mGlu<sub>R5</sub>. Par modélisation moléculaire, ces composés envisagés, tel que le **composé E**, se positionnent de la même manière que le ligand de référence **7** au sein du récepteur mGlu<sub>5</sub>, tout en gardant les interactions essentielles avec ce récepteur (**Figure 94**).

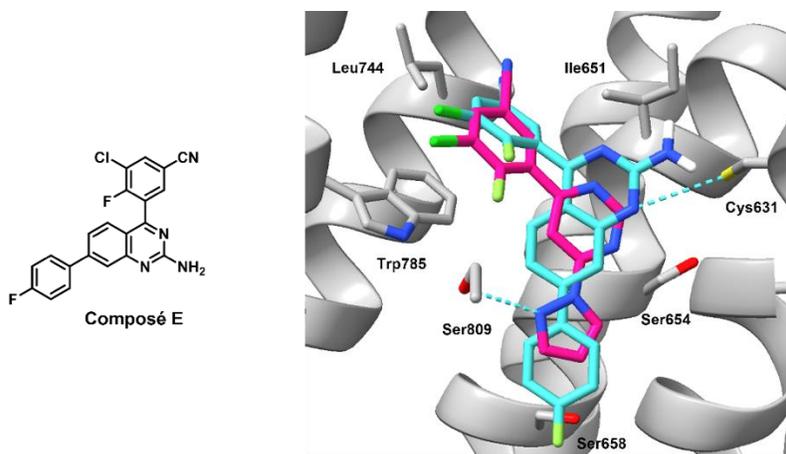


Figure 94. Superposition de la pose docking sélectionnée du composé quinazolinique E (cyan) à la structure co-cristallisée du composé 7 (rose) au sein du récepteur *hmGlu<sub>5</sub>*. (PDB : 5CGC)

Grâce aux modulations proposées par modélisation moléculaire, une deuxième série de molécules quinazoliniques a été développée en tant que ligands duaux A<sub>2A</sub>R/mGluR<sub>5</sub> (Figure 95).

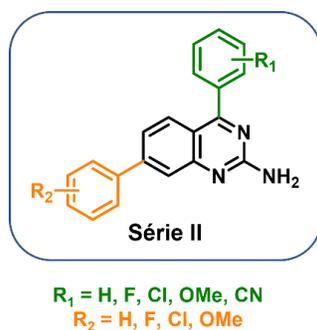
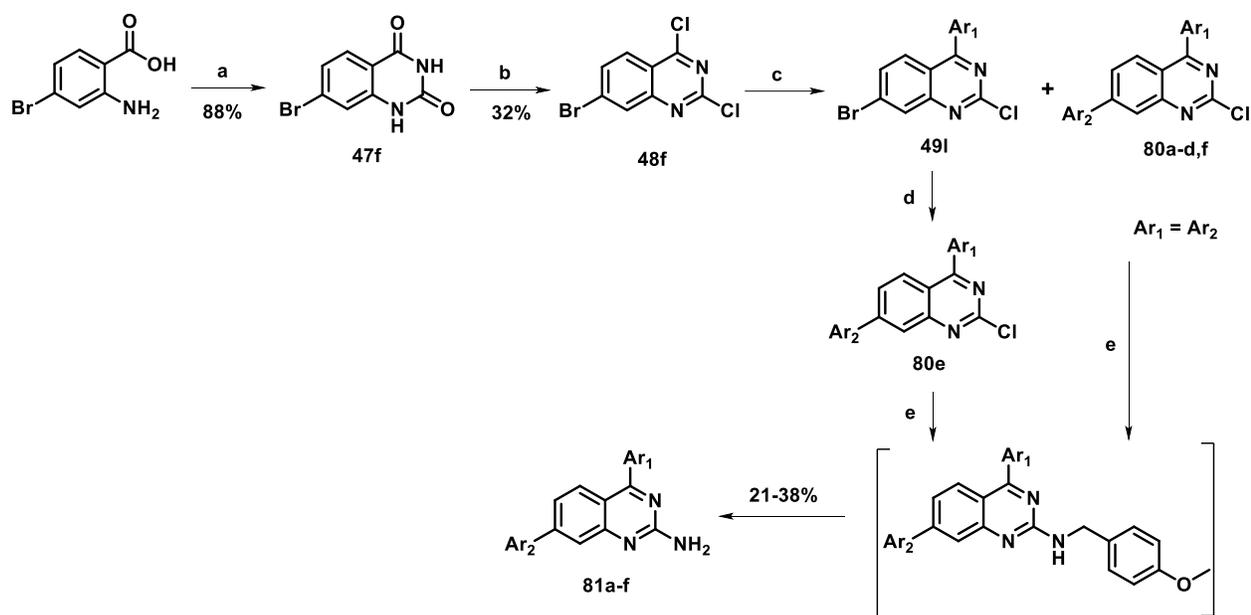


Figure 95. Structures envisagées des composés à visée mixte de la série II.

Concernant la synthèse des quinazolines à visée mixte, le schéma réactionnel est similaire à celui décrit précédemment pour les quinazolines antagonistes A<sub>2A</sub>R (Schéma 20).



**Réactifs et conditions :** a) urée (10.0 équ.), 140 °C, 16 h; b) POCl<sub>3</sub> (10.0 équ.), reflux, 16 h; c) acide boronique (1.0 équ.), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2.0 équ.), PPh<sub>3</sub> (0.04 équ.), Pd(OAc)<sub>2</sub> (0.02 équ.), dioxane/eau (4/1), TA, 16 h; d) acide boronique (1.0 équ.), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2.0 équ.), PPh<sub>3</sub> (0.04 équ.), Pd(OAc)<sub>2</sub> (0.02 équ.), dioxane/eau (4/1), 40 °C, 16 h; e) i) 4-méthoxybenzylamine (2.0 équ.), DIPEA (2.5 équ.), dioxane, 110 °C, 16 h; ii) TFA, TA, 72 h.

**Schéma 20. Schéma réactionnel conduisant à la synthèse des composés quinazolines à visée mixte.**

De façon identique à celle décrite dans le **chapitre 3**, la molécule **48f** est obtenue par chauffage à fusion de l'urée et de l'acide anthranilique, suivie d'une chloration. Le composé chloré est ensuite fonctionnalisé en position C4 par une réaction pallado-catalysée de type Suzuki. Cependant, un mélange produit de départ, composé monosubstitué en C4 et composé disubstitués en C4 et C7 est obtenu. Différentes conditions ont été utilisées afin de pallier ce problème notamment en modifiant la température de réaction ou le nombre d'équivalent de l'acide boronique. Malheureusement, ce mélange est toujours obtenu avec les mêmes proportions de chaque produit (**Tableau 15**).

| Conditions  | Proportions                        |
|---|------------------------------------|
| Acide boronique (1.0 éq.), K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (2.0 éq.), PPh <sub>3</sub> (0.04 éq.), Pd(OAc) <sub>2</sub> (0.02 éq.), dioxane/eau (4/1), <b>60 °C</b> , 12 h       | MP : 24%<br>Mono : 35%<br>Di : 51% |
| Acide boronique (1.0 éq.), K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (2.0 éq.), PPh <sub>3</sub> (0.04 éq.), Pd(OAc) <sub>2</sub> (0.02 éq.), dioxane/eau (4/1), <b>40 °C</b> , 12 h       | MP : 21%<br>Mono : 32%<br>Di : 47% |
| Acide boronique (1.0 éq.), K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (2.0 éq.), PPh <sub>3</sub> (0.04 éq.), Pd(OAc) <sub>2</sub> (0.02 éq.), dioxane/eau (4/1), <b>TA</b> , 12 h          | MP : 19%<br>Mono : 36%<br>Di : 45% |
| Acide boronique ( <b>0.8 éq.</b> ), K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (2.0 éq.), PPh <sub>3</sub> (0.04 éq.), Pd(OAc) <sub>2</sub> (0.02 éq.), dioxane/eau (4/1), <b>TA</b> , 12 h | MP : 21%<br>Mono : 35%<br>Di : 44% |

MP : matière première, Mono : produit monosubstitué en 4, Di : produit disubstitué en C4 et C7.

**Tableau 15. Conditions utilisées pour la formation des quinazolines monosubstituées.**

Les composés disubstitués ont donc été utilisés afin d'obtenir des composés finaux sans passer par un second couplage de Suzuki. Pour le composé monosubstitué, un second couplage pallado-catalysé de type Suzuki est ensuite effectué afin d'apporter le groupement aromatique en position C7. Une nouvelle stratégie de synthèse serait de réaliser le couplage de Suzuki en position C7 dès le départ sur l'acide anthranilique afin de ne plus obtenir de mélange de produits mono et di-substitué.

Par la suite, une réaction de substitution nucléophile est réalisée par la 4-méthoxybenzylamine dans le dioxane, suivie d'une réaction de déprotection de l'amine primaire par action du TFA à température ambiante afin d'obtenir les composés finaux **81a-f**.

## II. Affinités et relations structure-activité des ligands duaux A<sub>2A</sub>R/mGluR<sub>5</sub>

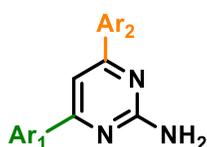
### 1. Composés 2-aminopyrimidines

Les composés 2-aminopyrimidines de la **série I** ont été évalués pour leur affinité. Les résultats obtenus sont reportés dans le **Tableau 16**, ci-dessous. Les composés **8**, **77**, **78** et **79** avaient été synthétisés et testés pour leur affinité en « radiobinding » par Raphaël Bolteau. Ces quatre composés ont été testés à nouveau par polarisation de fluorescence afin d'avoir des résultats homogènes. A la lecture des résultats décrits dans le **Tableau 16**, nous avons pu établir de nouvelles relations structure-activité :

#### ▪ Modulations du groupement Ar<sub>1</sub>

Deux composés 2-aminopyrimidiques disubstitués soit par un cycle pyrazole soit par un cycle 2-furane avaient été synthétisés lors des travaux de Raphaël Bolteau (**78**, K<sub>i</sub> (hA<sub>2A</sub>R) = 719 nM et **79**, K<sub>i</sub> (hA<sub>2A</sub>R) = 27 nM). Bien que le composé **79** présente une excellente affinité de 27 nM pour le récepteur A<sub>2A</sub>, il n'a pas

été retenu comme composé « hit » en raison de son affinité supérieure à 10 µM pour le récepteur mGlu<sub>5</sub> (% déplacement à 10 µM (*hmGluR<sub>5</sub>*) = 5%). Quelle que soit la nature du groupement aromatique en position C4, l'introduction du groupement *p*-fluorophényle en position C6 confère une affinité de liaison légèrement plus faible à celle du groupement pyrazole, comme par exemple pour les composés comportant un groupement 3-fluorophényle (**76b**,  $K_i$  (*hA<sub>2A</sub>R*) = 194 nM et **76p**,  $K_i$  (*hA<sub>2A</sub>R*) = 345 nM) ou 4-fluorophényle (**76c**,  $K_i$  (*hA<sub>2A</sub>R*) = 231 nM et **76o**,  $K_i$  (*hA<sub>2A</sub>R*) = 344 nM) en position C4. La substitution des groupements 3,5-difluorophényle (**76n** et **76q**,  $K_i$  (*hA<sub>2A</sub>R*) > 10 µM) et 3-chloro-5-cyanophényle (**76i** et **76s**,  $K_i$  (*hA<sub>2A</sub>R*) > 10 µM) supprime l'affinité envers les récepteurs A<sub>2A</sub> que ce soit en présence du groupement pyrazole ou *p*-fluorophényle.



| Composé    | Ar <sub>1</sub>         | Ar <sub>2</sub>          | $K_i$ <i>hA<sub>2A</sub>R</i> (nM) <sup>a</sup> | <i>hmGlu<sub>5</sub></i> (% dépl.) <sup>b</sup> |
|------------|-------------------------|--------------------------|---|---|
| <b>8</b>   | Pyrazole                | 3-cyanophényle           | 145 ± 31  | 45  |
| <b>77</b>  | Pyrazole                | Phényle                  | 124 ± 31  | 23  |
| <b>78</b>  | Pyrazole                | Pyrazole                 | 719 ± 117                                       | 2   |
| <b>79</b>  | Furane                  | Furane                   | 27 ± 4  | 5   |
| <b>76a</b> | Pyrazole                | 2-fluorophényle          | 244 ± 56  | /   |
| <b>76b</b> | Pyrazole                | 3-fluorophényle          | 194 ± 30  | /   |
| <b>76c</b> | Pyrazole                | 4-fluorophényle          | 231 ± 37  | /   |
| <b>76d</b> | Pyrazole                | 3-chlorophényle          | 346 ± 41  | /   |
| <b>76e</b> | Pyrazole                | 4-chlorophényle          | >10000  | /   |
| <b>76f</b> | Pyrazole                | 3,4-dichlorophényle      | >10000  | /   |
| <b>76g</b> | Pyrazole                | 3-méthoxyphényle         | 118 ± 9   | /   |
| <b>76h</b> | Pyrazole                | 4-méthoxyphényle         | >10000  | /   |
| <b>76i</b> | Pyrazole                | 3-chloro-5-cyanophényle  | >10000  | /   |
| <b>76j</b> | Pyrazole                | 2,3,5-trifluorophényle   | >10000  | /   |
| <b>76k</b> | Pyrazole                | 2,3-difluorophényle      | 137 ± 25  | /   |
| <b>76l</b> | Pyrazole                | 3,4-difluorophényle      | >10000  | /   |
| <b>76m</b> | Pyrazole                | 3-chloro-5-fluorophényle | >10000  | /   |
| <b>76n</b> | Pyrazole                | 3,5-difluorophényle      | >10000  | /   |
| <b>76o</b> | <i>p</i> -fluorophényle | 4-fluorophényle          | 344 ± 42  | /   |
| <b>76p</b> | <i>p</i> -fluorophényle | 3-fluorophényle          | 345 ± 81  | /   |
| <b>76q</b> | <i>p</i> -fluorophényle | 3,5-difluorophényle      | >10000  | /   |
| <b>76r</b> | <i>p</i> -fluorophényle | 3-cyanophényle           | 297 ± 63  | /   |
| <b>76s</b> | <i>p</i> -fluorophényle | 3-chloro-5-cyanophényle  | >10000  | /   |
| <b>76t</b> | <i>p</i> -fluorophényle | 3-méthoxyphényle         | 328 ± 34  | /   |

<sup>a</sup>Les valeurs  $K_i$  ont été déterminées à partir d'une analyse non linéaire des courbes de compétition utilisant le MRS7416 comme sonde fluorescente et sont exprimées en moyenne ± SEM de trois expériences indépendantes, en duplicata. <sup>b</sup>Pourcentage de déplacement spécifique du [<sup>3</sup>H]-MPEP à 10 µM.

**Tableau 16. Affinités des composés 2-aminopyrimidines à visée mixte.**

- Modulations du groupement Ar<sub>2</sub>

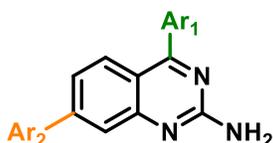
Le composé « hit » multifonctionnel **8** présente une meilleure affinité par polarisation de fluorescence que par « radiobinding » (FP,  $K_i$  ( $hA_{2A}R$ ) = 145 nM et « radiobinding »,  $K_i$  ( $hA_{2A}R$ ) = 774 nM). Cette différence pourrait être due à une mauvaise solubilité du composé en « radiobinding ». En effet, les solutions de composés utilisées en polarisation de fluorescence possèdent un pourcentage de DMSO plus élevé (5%) que celles utilisées en « radiobinding » (1%), ce qui diminue le risque de précipitation des composés. Les trois autres composés **77**, **78** et **79**, quant à eux, ont donné des valeurs cohérentes à celles obtenues par « radiobinding ».

Le remplacement du groupement nitrile du composé « hit » en position *mé*ta par un hydrogène (**77**,  $K_i$  ( $hA_{2A}R$ ) = 124 nM), un fluor (**76b**,  $K_i$  ( $hA_{2A}R$ ) = 194 nM) ou encore un groupement méthoxy (**76g**,  $K_i$  ( $hA_{2A}R$ ) = 118 nM) ne modifie pas l'affinité de liaison. Seul le groupement chlore (**76d**,  $K_i$  ( $hA_{2A}R$ ) = 346 nM) cause une légère perte de l'affinité. Etonnamment, la di- ou trisubstitution du phényle par des atomes de fluor, chlore ou un groupement nitrile abolie totalement l'affinité sauf pour le groupement 2,3-difluorophényle (**76k**,  $K_i$  ( $hA_{2A}R$ ) = 137 nM). La substitution en *para* semble impacter l'affinité par une suppression totale de cette dernière pour les groupements chlore (**76e**,  $K_i$  ( $hA_{2A}R$ ) > 10 μM) et méthoxy (**76h**,  $K_i$  ( $hA_{2A}R$ ) > 10 μM), contrairement à leur analogue en position *mé*ta (**76d**,  $K_i$  ( $hA_{2A}R$ ) = 346 nM et **76g**,  $K_i$  ( $hA_{2A}R$ ) = 118 nM). De plus, la taille du groupement en cette position *para* semble également jouer un rôle car un plus petit groupement comme le fluor permet de récupérer une affinité de 231 nM (**76c**). La position *mé*ta semble être la position optimale afin de réaliser des substitutions par différents groupements afin d'établir une affinité avec le récepteur.

Malheureusement, seules les relations structure-activité sur les récepteurs A<sub>2A</sub> ont pu être réalisées. Il serait intéressant d'étudier l'affinité de ces composés sur les récepteurs mGlu<sub>5</sub> afin de vérifier si les différentes modulations permettent de garder une activité mixte ou non.

## 2. Composés quinazoliniques

L'affinité des composés quinazoliniques de la **série II** a également été évaluée. Les résultats obtenus sont reportés dans le **Tableau 17**, ci-dessous.



| Composé    | Ar <sub>1</sub>     | Ar <sub>2</sub>     | K <sub>i</sub> hA <sub>2A</sub> R (nM) <sup>a</sup> |
|------------|---------------------|---------------------|---|
| <b>81a</b> | Phényle             | Phényle             | >10000  |
| <b>81b</b> | 2-fluorophényle     | 2-fluorophényle     | >10000  |
| <b>81c</b> | 3-fluorophényle     | 3-fluorophényle     | >10000  |
| <b>81d</b> | 4-fluorophényle     | 4-fluorophényle     | >10000  |
| <b>81e</b> | 4-fluorophényle     | 3-chlorophényle     | >10000  |
| <b>81f</b> | 3,5-difluorophényle | 3,5-difluorophényle | >10000  |

<sup>a</sup>Les valeurs K<sub>i</sub> ont été déterminées à partir d'une analyse non linéaire des courbes de compétition utilisant le MRS7416 comme sonde fluorescente et sont exprimées en moyenne ± SEM de trois expériences indépendantes, en duplicata.

**Tableau 17. Affinités des composés quinazoliniques à visée mixte.**

Malheureusement, l'analyse des résultats révèle que ces composés ne présentent aucune affinité pour les récepteurs A<sub>2A</sub>. En effet, les six composés montrent tous une affinité supérieure à 10 μM. Toutefois, ces résultats sont cohérents avec les relations structure-activité décrites précédemment sur la famille des quinazolines. Ces résultats auraient donc pu être anticipés si le test de polarisation de fluorescence avait été mis en place plus tôt, avant la synthèse de ces composés. La présence des groupements *p*-fluorophényle et phényle en position C6 sur les composés **50i** et **50j**, diminue de manière significative l'affinité envers les récepteurs A<sub>2A</sub> ou la supprime totalement (**50i**, K<sub>i</sub> (hA<sub>2A</sub>R) > 10 μM et **50j**, K<sub>i</sub> (hA<sub>2A</sub>R) = 318 nM). La présence de groupements aromatiques volumineux affecte donc l'affinité des composés et ne semble pas adaptée pour interagir avec la poche hydrophobe formée par Ala59, Ala63, Val84 et His278, contrairement aux groupements plus petits, comme le méthyle ou le brome. De plus, nous avons constaté que les substitutions en positions C6 et C7 offrent des affinités de liaison similaires pour les groupements brome, méthyle et chlore. De la même manière, pour les groupements aromatiques, qu'ils soient en position C6 ou C7, l'affinité diminue drastiquement.

Les composés quinazoliniques portant des groupements aromatiques en position C7 ne sont donc pas des composés affins pour les récepteurs A<sub>2A</sub> et ne pourront pas être utilisés comme ligands duaux A<sub>2A</sub>R/mGluR<sub>5</sub>. L'affinité de ces composés pourrait être évaluée sur les récepteurs mGlu<sub>5</sub> afin de déterminer s'ils peuvent agir comme modulateurs allostériques négatifs de ces récepteurs.

# **Conclusion et perspectives**

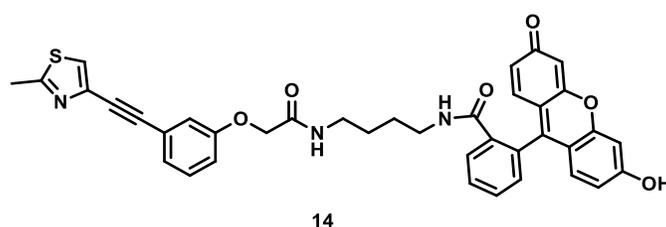
## Conclusion et perspectives

Les travaux réalisés lors de ma thèse ont porté sur la conception, la synthèse et l'évaluation pharmacologique d'antagonistes  $A_{2A}R$  et de ligands duaux  $A_{2A}R/mGluR_5$ . Ces travaux font suite aux résultats obtenus lors des travaux de thèse de Romain Duroux et Raphaël Bolteau.<sup>167,168</sup> Le premier objectif de ma thèse était de développer une nouvelle méthode de mesure de l'affinité par polarisation de fluorescence afin de remplacer le « radiobinding ». Le second objectif était de développer de nouveaux antagonistes ciblant  $A_{2A}R$ , basés sur les structures des benzofuranes et des quinazolines et ayant de bonnes affinités et solubilités. Enfin, le dernier objectif de ma thèse était de développer des ligands duaux ciblant les récepteurs  $A_{2A}$  et  $mGlu_5$ . En guise de conclusion, nous allons synthétiser les points essentiels abordés et envisager quelques perspectives.

### ▪ Développement d'un test de polarisation de fluorescence

Un test de polarisation de fluorescence a été mis en place et optimisé dans notre laboratoire sur les récepteurs  $A_{2A}$ . Cela a été rendu possible grâce à une collaboration avec le Dr. K. A. Jacobson, qui nous a fourni la sonde fluorescente MRS7416. Cette méthode a permis d'évaluer l'affinité de tous les composés synthétisés au cours de ma thèse. Grâce à cette approche, nous avons pu envisager de nouvelles modulations et approfondir les relations structure-activité de nos séries chimiques.

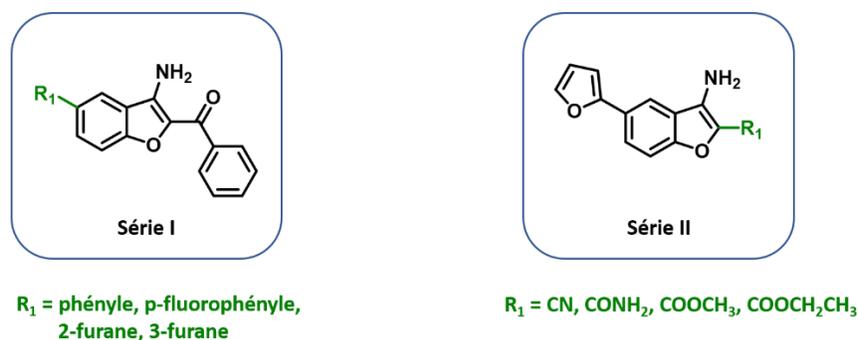
Une sonde fluorescente, **14**, visant les récepteurs  $mGlu_5$  a été synthétisée (**Figure 96**). Quelques essais par polarisation de fluorescence ont été réalisés avec cette sonde sur les récepteurs  $mGlu_5$  mais le test n'a pu être optimisé davantage par manque de temps. Il faudrait d'abord de s'assurer que la sonde émet suffisamment de fluorescence pour une utilisation en FP. Egalement, il serait pertinent de produire nos propres préparations membranaires exprimant les récepteurs  $mGlu_5$ , afin de garantir l'obtention de résultats homogènes.



**Figure 96. Structure de la sonde 14.**

- Famille des benzofuranes

De nouvelles modulations ont été envisagées par modélisation moléculaire sur la structure des benzofuranes en positions C2 et C5 afin d'améliorer l'affinité de ces derniers et d'établir de nouvelles relations structure-activité autour des A<sub>2A</sub>R. Ces modulations ont permis la synthèse de deux nouvelles séries de molécules (**Figure 97**).



**Figure 97. Structures des séries I et II benzofuraniques.**

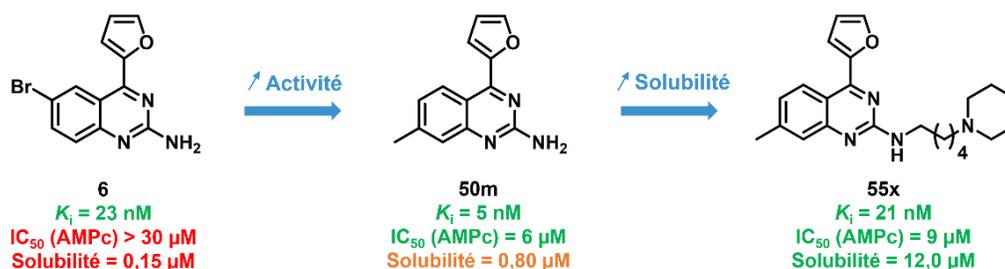
Ces modulations ont consisté à moduler la position C5 avec différents groupements aromatiques, tels qu'un phényle, *p*-fluorophényle ou encore un groupement furane. La position C2 a été modulée avec différents groupements possédant une liaison C=O, tels qu'un ester méthylique ou éthylique. L'affinité de ces composés sur les récepteurs A<sub>2A</sub> a été mesurée mais aucune de ces modulations n'a permis d'obtenir une affinité considérable envers ces récepteurs. En effet, tous les composés présentent une affinité de l'ordre du micromolaire ou plus. Ces résultats n'ont donc pas permis de déterminer de nouvelles relations structure-activité. Les composés benzofuraniques ont montré des résultats décevants. Bien qu'ayant une structure originale par rapport aux autres antagonistes A<sub>2A</sub>R, ces molécules ne semblent pas être des ligands pouvant montrer une meilleure affinité envers les récepteurs A<sub>2A</sub>. Il serait pertinent de mener de nouvelles études de modélisation moléculaire en effectuant des modifications supplémentaires sur d'autres positions du cycle benzofurannique que nous n'avons pas exploré. En effet, comme illustré dans l'introduction (**Figure 22, p 27**), des substitutions aux positions C4 et C7 semblent favoriser une affinité pour le récepteur A<sub>2A</sub>R. La substitution en position C5 pourrait expliquer le manque d'affinité de nos composés, étant donné que ceux utilisés en position C2 sont comparables à ceux décrits dans la littérature.

- Famille des quinazolines

Les travaux réalisés sur les quinazolines font suite à ceux obtenus lors de la thèse de Raphaël Bolteau.<sup>168</sup> Pour rappel, ces travaux avaient permis d'obtenir le composé « hit » **6** possédant une affinité de 23 nM

pour les récepteurs A<sub>2A</sub>. Grâce à ce composé, une structure co-cristallisée avait pu être obtenue, validant ainsi le positionnement et les interactions essentielles réalisés par la molécule au sein du récepteur.<sup>172</sup>

Dans le but d'améliorer l'affinité et la solubilité du composé **6**, différentes modulations ont été réalisées autour de ce composé (**Figure 98**). Ces modulations ont également pu permettre d'approfondir les relations structure-activité autour des composés quinazoliniques.



**Figure 98. Modulations réalisées sur le composé « hit » 6.**

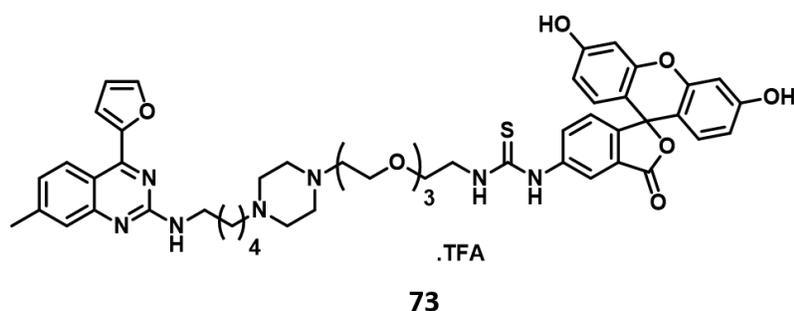
Dans le cadre de mes travaux de thèse, des modulations ont d'abord porté sur le groupement aromatique en position C4. Il est apparu que le 2-furane offrait une meilleure affinité à cette position, comparé au phényle et au *p*-fluorophényle. Les positions C6 et C7 ont par la suite été modulées avec différents groupements afin de voir l'impact de ces derniers sur l'affinité. Les résultats ont montré que ces deux positions apportent une affinité similaire, indépendamment du substituant utilisé. La substitution de l'atome de brome en C6 par un groupement méthyle en position C7 a permis l'identification d'un nouveau composé « hit » **50m** ayant une excellente affinité de 5 nM (**Figure 98**).

Le deuxième objectif était d'améliorer la solubilité de ce nouveau composé « hit », cette dernière étant modérée (0,80 µM). Pour cela, l'ajout de différentes chaînes amines en position C2 de la quinazoline a été étudié. Les chaînes aminopentylpipéridine et 4-[(pipéridin-1-yl)méthyl]aniline sont apparues comme étant les deux chaînes les plus optimales afin de maintenir une affinité équivalente au dérivé 2-aminophénylquinazoline **4**. Ces deux chaînes ont donc été incorporées sur la structure du composé **50m**, ce qui a permis d'obtenir des composés ayant une forte affinité pour le récepteur A<sub>2A</sub> (**55x**,  $K_i$  ( $hA_{2A}R$ ) = 21 nM ; **56d**,  $K_i$  ( $hA_{2A}R$ ) = 15 nM) tout en augmentant plus de dix fois la solubilité (**55x**,  $s = 12,0$  µM). De plus, ces composés ont montré un pouvoir antagoniste envers les récepteurs A<sub>2A</sub> avec des valeurs acceptables de l'ordre du micromolaire (**55x**,  $IC_{50}$  (AMPC) = 9 µM ; **56d**,  $IC_{50}$  (AMPC) = 5 µM). Toutefois, il serait intéressant d'obtenir des molécules ayant un pouvoir antagoniste plus élevé. En effet, une molécule telle que le ZM-241385 possède une  $IC_{50}$  de 227 nM, ce qui est bien meilleur que celle de nos composés.

Les composés conçus et synthétisés ont montré des résultats très prometteurs. Ces derniers nous ont permis la publication d'un article autour des composés quinazoliques, publié dans le journal *Molecules* (DOI : <https://doi.org/10.3390/molecules29163847>).<sup>240</sup>

Nous avons donc réussi à atteindre notre objectif de développer des antagonistes des récepteurs A<sub>2A</sub> à la fois affins et solubles grâce aux modulations apportées au composé **6**. La sélectivité des composés les plus puissants envers les récepteurs A<sub>2A</sub> devra être évaluée. Des études pharmacocinétiques seraient également envisageables pour ensuite, si les résultats sont intéressants, tester les molécules chez différents modèles animaux de MA et MP.

A partir des résultats obtenus pour les composés quinazoliques, une sonde fluorescente, **73**, basée sur le squelette du composé « hit » **50m** a également été développée et synthétisée (**Figure 99**).

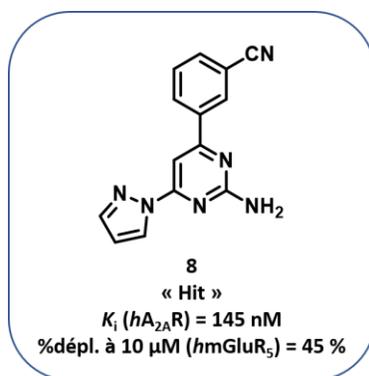


**Figure 99. Structure de la sonde fluorescente 73.**

Malheureusement, cette sonde n'a pas donné de résultats concluants et n'a pas pu être utilisée pour effectuer des tests de polarisation de fluorescence. Cependant, la synthèse des sondes « modèles » a permis de mettre en lumière que l'ajout de longues chaînes en position C2 permet de garder une affinité du même ordre de grandeur que les dérivés 2-aminoquinazolines. Ce point est intéressant pour la conception de ligands mixtes A<sub>2A</sub>R/mGlu<sub>5</sub>, par la stratégie utilisant un « linker » entre deux composés.

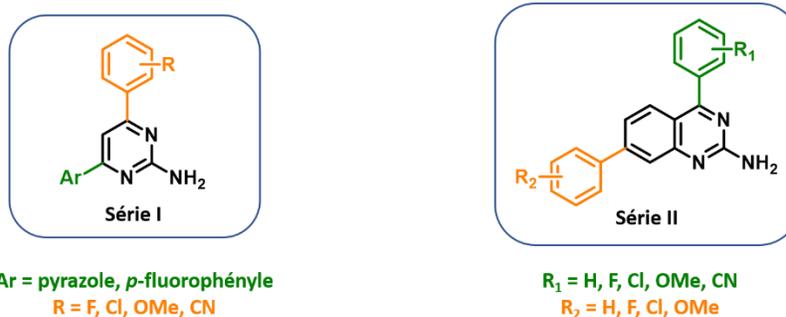
- Ligands duaux A<sub>2A</sub>R/mGlu<sub>5</sub>

Les travaux réalisés sur les ligands duaux A<sub>2A</sub>R/mGlu<sub>5</sub> font suite aux résultats obtenus sur un premier composé 2-aminopyrimidine « hit » **8** (**Figure 100**).<sup>168</sup> Ce composé présente une affinité micromolaire (à 10 μM) sur le récepteur mGlu<sub>5</sub> tout en conservant une affinité submicromolaire sur le récepteur A<sub>2A</sub> (K<sub>i</sub> (hA<sub>2A</sub>R) = 145 nM).



**Figure 100. Structure du composé « hit » multifonctionnel.**

Dans le but d'améliorer davantage l'affinité et d'étudier les relations structure-activité des composés 2-aminopyrimidines au sein des deux récepteurs, de nouveaux composés de cette famille chimique ont été développés. Une seconde série chimique de composés, basée sur la structure des quinazolines, a également été développée afin de garder un motif  $A_{2A}R$  auquel les pharmacophores de  $mGluR_5$  ont été apportés. Deux séries de molécules ont ainsi été synthétisées.



**Figure 101. Structures des séries I et II des ligands à visée mixte.**

Ces deux séries de composés ont seulement pu être testées pour leur affinité pour les récepteurs  $A_{2A}$ . Les composés 2-aminopyrimidines ont présenté des affinités intéressantes de l'ordre de la centaine de nanomolaire. Les différentes modulations ont montré qu'un aromatique di- ou trisubstitué en position C4 causait une perte de l'affinité ( $K_i (hA_{2A}R) > 10 \mu\text{M}$ ). La position *mé*ta semble être la plus favorable pour être substituée et maintenir une affinité correcte. La substitution en position C6 du groupement pyrazole par un *p*-fluorophényle n'affecte pas l'affinité.

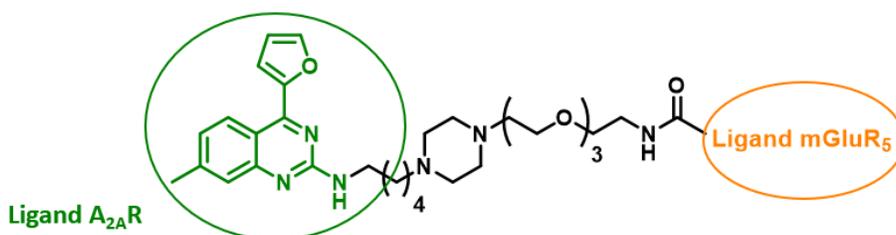
Malheureusement, les composés quinazolines portant des groupements aromatiques en position C7 n'ont pas montré d'affinité pour les récepteurs  $A_{2A}$ , avec des affinités supérieures à  $10 \mu\text{M}$ . Ces composés ne pourront donc pas être utilisés comme ligands duaux  $A_{2A}R/mGluR_5$ . L'affinité de ces composés pourrait

être évaluée sur les récepteurs mGlu<sub>5</sub> afin de déterminer s'ils peuvent agir comme modulateurs allostériques négatifs de ces récepteurs.

## Perspectives

Il serait intéressant, dans un premier temps, de développer le test de polarisation de fluorescence sur les récepteurs mGlu<sub>5</sub>, afin de tester les composés à visée mixte les plus intéressants sur ces derniers. Pour cela, il faudrait d'abord produire nos propres membranes surexprimant les récepteurs mGlu<sub>5</sub>. Cela a été fait pour les récepteurs A<sub>2A</sub> et nous a permis d'obtenir des solutions de membranes homogènes et ainsi avoir des résultats reproductibles. Il serait ensuite nécessaire de réaliser des tests de fluorescence et de cinétique sur la sonde pour mGluR<sub>5</sub> **14**, synthétisée au laboratoire. Puisqu'elle n'est pas documentée dans la littérature, il est important de vérifier si elle est adaptée à la FP avant d'envisager de nouveaux tests d'optimisation par polarisation de fluorescence.

De nouveaux composés duaux A<sub>2A</sub>R/mGluR<sub>5</sub> pourraient être envisagés par la stratégie utilisant un « linker » entre deux molécules à la place de la stratégie de ligands « fusionnés ». En effet, le linker développé pour les sondes ciblant A<sub>2A</sub>R a montré des résultats intéressants en n'impactant que légèrement l'affinité des composés de référence. Lier une molécule ciblant A<sub>2A</sub>R (quinazoline) grâce à ce linker à une molécule ciblant mGluR<sub>5</sub> permettrait ainsi de créer de nouvelles molécules duales (**Figure 102**). De plus, de nombreux ligands duaux ont été développés à partir de la stratégie utilisant un « linker » entre deux composés.<sup>189,241,242</sup>



**Figure 102. Structures envisagées de molécules duales A<sub>2A</sub>R/mGluR<sub>5</sub>.**

Comme évoqué dans l'introduction, les stratégies visant à cibler et moduler le récepteur A<sub>2A</sub> en tant que point de contrôle immunitaire ont démontré leur potentiel à produire des effets thérapeutiques significatifs. Le récepteur A<sub>2A</sub> est impliqué dans divers cancers tels que le mélanome, le cancer du sein ou encore le gliome. Il serait donc intéressant de tester nos meilleurs composés sur les lignées cellulaires impliquées dans ces cancers afin de voir si elles ont un intérêt thérapeutique dans ce domaine, par le biais de collaborations avec des laboratoires en cancérologie.

# Partie expérimentale

## I. Chemistry

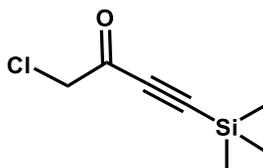
### Material and instrumentation

Chemicals and solvents were obtained from commercial sources and used without further purification unless otherwise noted. Reactions were monitored by TLC performed on Macherey–Nagel Alugram® Sil 60/UV254 sheets (thickness 0.2 mm, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Germany). Purification of products was carried out by recrystallization or column chromatography. Column chromatography was carried out using Macherey–Nagel silica gel (230–400 mesh, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Germany). Melting points were determined on a Büchi SMP-20 capillary apparatus (Büchi SARL, Villebon sur Yvette, France) and are uncorrected. NMR spectra were recorded on a Bruker DRX 300 spectrometer (Division Biospin, Wissembourg, France) operating at 300 MHz for <sup>1</sup>H and 75 MHz for <sup>13</sup>C. Chemical shifts are expressed in ppm relative to tetramethylsilane (TMS). Chemical shifts are reported as position ( $\delta$  in ppm), multiplicity (s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, p = pentet, dd = double doublet, br = broad, and m = multiplet), coupling constant (J in Hz), relative integral, and assignment. Mass spectra of compounds were recorded with decimal precision using a Waters AcQuity UPLC I-Class with UV detection (PDA) and an electrospray mode (ESI) (Waters Corporation, Milford, MA, USA). UPLC-MS Waters system was equipped with a UPLC I SMP MGR-FTN sample manager, an ACQUITY UPLC I-Class eK photodiode array detector (210–400 nm), and an ACQUITY QDa (Performance) detector (scan 50–1250) (Waters Corporation, Milford, MA, USA). Acquity BEH C18 column (50 mm  $\times$  2.1 mm, 1.7  $\mu$ m, Waters) was used. The injection volume was 0.5  $\mu$ L. A mixture of water and acetonitrile was used as mobile phase in gradient elution. The pH of the mobile phase was adjusted with HCOOH and NH<sub>4</sub>OH to form a buffer solution at pH 3.8. The analysis time was 5 min (at a flow rate of 600  $\mu$ L/min), 10 min (at a flow rate of 600  $\mu$ L/min), or 30 min (at a flow rate of 600  $\mu$ L/min). Unless otherwise specified, the purity of evaluated compounds was judged to be >95% as determined by UPLC-UV-MS system.

1. Synthesis of mGluR<sub>5</sub> probe

The synthesis of the fluorescent probe MRS7416 was carried out according to published procedures.<sup>88</sup>

## 1-Chloro-4-(trimethylsilyl)-3-butyne-2-one (9)

**Procedure:**

AlCl<sub>3</sub> (1.4 eq., 5.48 g, 41.08 mmol) was suspended in DCM (25 mL) and cooled in an ice bath. Bis(trimethylsilyl)acetylene (1.0 eq., 5.00 g, 29.34 mmol) and chloroacetyl chloride (1.1 eq., 2.57 mL, 32.28 mmol) were combined in DCM and the solution was added to the AlCl<sub>3</sub> suspension dropwise. The dark brownish-red solution was stirred at 0 °C for 1 hour, then the ice bath was removed. After 1 hour at room temperature, the reaction was cooled at 0 °C and quenched by slow addition of HCl solution 1M. The solution was extracted three times with DCM, the combined organic layers were washed with water, NaHCO<sub>3</sub> solution 1M, brine and dried over MgSO<sub>4</sub>. The solution was filtered and concentrated *in vacuo* to afford **9** (3.93 g, 77%). Next step was done without further purification.

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm, J Hz): 4.24 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 0.28 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

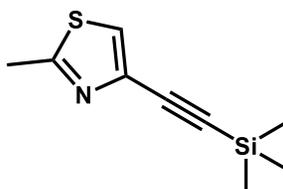
LC-MS (ESI) m/z = 175.0, 177.0 [M+H]<sup>+</sup>

**Molecular formula:** C<sub>7</sub>H<sub>11</sub>ClOSi

**Molecular weight:** 174.70 g/mol

**Aspect:** yellow oil

## 2-Methyl-4-[(trimethylsilyl)ethynyl]-1,3-thiazole (10)

**Procedure:**

**9** (1.0 eq., 3.93 g, 22.50 mmol) was dissolved in DMF (20 mL), then thioacetamide (1.3 eq., 2.20 g, 29.24 mmol) was added in one portion. The mixture was stirred at room temperature overnight. Mixture was dissolved in EtOAc and washed with water and brine. The solution was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated *in vacuo* to afford **10** (2.80 g, 64%). Next step was done without further purification.

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz): 7.32 (s, 1H, H<sub>7</sub>), 2.70, (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.28 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

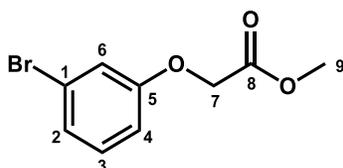
LC-MS (ESI)  $m/z$  = 196.0 [M+H]<sup>+</sup>

**Molecular formula:** C<sub>9</sub>H<sub>13</sub>NSSi

**Molecular weight:** 195.05 g/mol

**Aspect:** brown oil

### Methyl 2-(3-bromophenoxy)acetate (**11**)



#### Procedure:

To a solution of 3-bromophenol (1.0 eq., 5.00 g, 28.90 mmol) in acetone (20 mL) were added K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3.0 eq., 11.98 g, 86.70 mmol) and methyl bromoacetate (0.8 eq., 2.23 mL, 23.12 mmol). The solution was stirred at reflux overnight. Mixture was cooled to room temperature and hydrolyzed with water. The aqueous layer was extracted three times with EtOAc. The solution was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated *in vacuo* to give a yellow oil. The crude product was taken up in PE and put into freezer overnight. The solution was filtered to afford **11** (3.62 g, 48%).

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz): 7.15-7.13 (m, 2H, H<sub>2</sub> and H<sub>3</sub>), 7.09-7.07 (m, 1H, H<sub>6</sub>), 6.88-6.84 (m, 1H, H<sub>4</sub>), 4.63 (s, 2H, H<sub>7</sub>), 3.83 (s, 3H, H<sub>9</sub>).

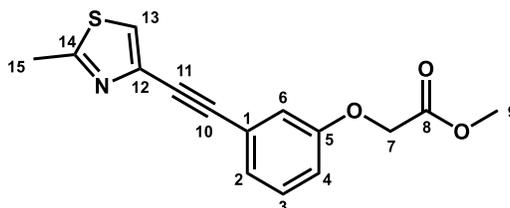
LC-MS (ESI)  $m/z$  = 245.1, 247.1 [M+H]<sup>+</sup>

**Molecular formula:** C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>BrO<sub>3</sub>

**Molecular weight:** 245.07 g/mol

**Melting point:** 79-81 °C

**Aspect:** white solid

Ethyl 2-{3-[2-(2-methyl-1,3-thiazol-4-yl)ethynyl]phenoxy}acetate (**12**)**Procedure:**

To a solution of **10** (1.0 eq., 1.00 g, 5.12 mmol) in DMF (10 mL) were added CuI (0.1 eq., 97.0 mg, 0.51 mmol), Et<sub>3</sub>N (1.5 eq., 1.06 mL, 7.68 mmol) and **11** (1.1 eq., 1.45 g, 5.91 mmol). The solution was degassed with nitrogen for 5 minutes and then bis(triphenylphosphine)palladium dichloride (0.05 eq., 180.02 mg, 0.26 mmol) was added. TBAF (1.1 eq., 1.66 mL, 5.63 mmol) was added dropwise and then the solution was stirred and heated at 85 °C for 1 hour. The mixture was cooled to room temperature and hydrolyzed with water. Aqueous layer was extracted three times with EtOAc. Combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated *in vacuo* to give a brown oil. The crude product was purified by flash chromatography (cyclohexane/EtOAc (7/3)) to afford **12** (695.5 mg, 45%).

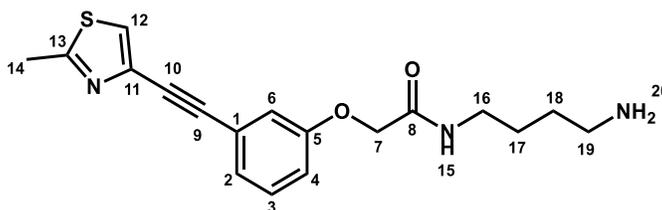
<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm, J Hz): 7.42 (s, 1H, H<sub>13</sub>), 7.32-7.22 (m, 2H, H<sub>2</sub> and H<sub>3</sub>), 7.12-7.06 (m, 1H, H<sub>6</sub>), 6.99-6.94 (m, 1H, H<sub>4</sub>), 4.66 (s, 2H, H<sub>7</sub>), 3.84 (s, 3H, H<sub>9</sub>), 2.83 (s, 3H, H<sub>15</sub>).

LC-MS (ESI) m/z = 288.2 [M+H]<sup>+</sup>

**Molecular formula:** C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>3</sub>S

**Molecular weight:** 287.06 g/mol

**Aspect:** yellow oil

Methyl 2-{3-[2-(2-methyl-1,3-thiazol-4-yl)ethynyl]phenoxy}acetate (**13**)**Procedure:**

**12** (1.0 eq., 300.0 mg, 1.04 mmol) was added to a solution of putrescine and methanol (10 mL, 1:9, v/v) and the mixture was stirred at room temperature overnight. The solvent was concentrated *in vacuo*. The

product was dissolved in ethyl acetate and washed three times with water. The organic layer was dried over  $\text{MgSO}_4$ , filtered and concentrated *in vacuo* to afford **13** (300.1 mg, 84%).

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz): 8.15 (t, 1H,  $J = 5.7$  Hz,  $\text{H}_{15}$ ), 7.91 (s, 1H,  $\text{H}_{12}$ ), 7.35 (t, 1H,  $J = 7.9$  Hz), 7.18-7.02 (m, 3H), 4.52 (s, 2H,  $\text{H}_7$ ), 3.12 (quadruplet, 2H,  $\text{H}_{16}$ ,  $J = 6.7$  Hz), 2.68 (s, 3H,  $\text{H}_{14}$ ), 1.75 (m, 1H), 1.51-1.23 (m, 7H).

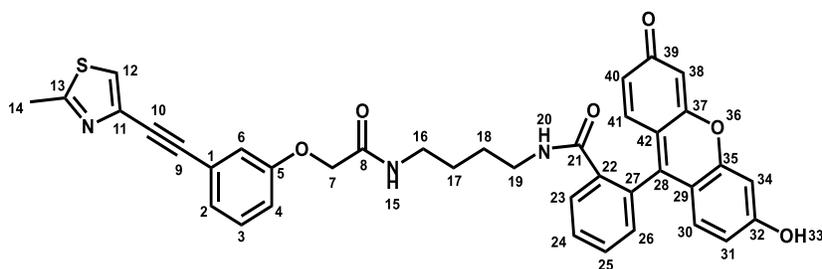
LC-MS (ESI)  $m/z = 344.1$   $[\text{M}+\text{H}]^+$

Molecular formula:  $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$

Molecular weight: 343.13 g/mol

Aspect: yellow oil

**N-(4-{{2-(6-hydroxy-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)phenyl}formamido}butyl)-2-{3-[2-(2-methyl-1,3-thiazol-4-yl)ethynyl]phenoxy}acetamide (14)**



**Procedure:**

Fluorescein (1.0 eq., 290.3 mg, 0.87 mmol) was dissolved in DCM. The solution was cooled to  $0^\circ\text{C}$  and then  $\text{Et}_3\text{N}$  (3.2 eq., 0.39 mL, 2.80 mmol) was added dropwise. The solution was stirred at room temperature for 30 min. EDCI (2.0 eq., 271.2 mg, 1.75 mmol) and HOBT (2.0 eq, 236.1 mg, 1.75 mmol) were added at  $0^\circ\text{C}$  and the solution was stirred for 30 min. N-(4-aminobutyl)-2-{3-[2-(2-methyl-1,3-thiazol-4-yl)ethynyl]phenoxy}acetamide (1.0 eq., 300.0 mg, 0.87 mmol) was added and the solution was stirred at  $0^\circ\text{C}$  for 1 hour and at room temperature for 3 days. The solution was hydrolyzed with a HCl solution (1M) and aqueous phase was extracted with DCM 3 times. Then, the organic layer was washed with a  $\text{NaHCO}_3$  solution (1M). The organic layer was dried over  $\text{MgSO}_4$ , filtered and concentrated *in vacuo* to give an orange oil. The product was purified by flash chromatography (DCM/MeOH: 9.7/0.3 to 9.5/0.5) to afford **14** (55.2 mg, 10%).

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz): 9.94 (s, 1H,  $\text{H}_{33}$ ), 8.01-7.94 (m, 1H), 7.89 (s, 1H,  $\text{H}_{12}$ ), 7.83-7.76 (m, 1H), 7.57-7.48 (m, 2H), 7.39-7.31 (m, 1H), 7.17-7.08 (m, 2H), 7.06-6.99 (m, 2H), 6.60 (d, 2H,  $J = 2.4$  Hz), 6.47 (dd, 2H,  $J = 2.5$  Hz and  $J = 8.6$  Hz), 6.36 (d, 2H,  $J = 8.7$  Hz), 5.76 (s, 1H,  $\text{H}_{38}$ ), 4.44 (s, 2H,  $\text{H}_7$ ), 2.97 (t, 2H,  $J = 7.1$  Hz), 2.87 (q, 2H,  $\text{H}_{16}$ ,  $J = 6.5$  Hz), 2.67 (s,  $\text{H}_{14}$ ), 1.25-1.12 (m, 3H), 1.03-0.89 (m, 3H).

**<sup>13</sup>C-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, J Hz):** 167.5 (C<sub>8</sub> and C<sub>39</sub>), 167.3 (C<sub>21</sub>), 166.3 (C), 159.2 (C), 158.2 (C), 153.0 (C), 152.5 (C), 135.8 (C), 133.3 (CH), 131.0 (C), 130.4 (C), 129.4 (CH), 129.0 (2 CH), 124.9 (CH), 124.6 (CH), 124.0 (CH), 123.1 (CH), 122.8 (2 CH), 117.4 (CH), 116.6 (C), 112.8 (CH), 110.0 (2 C), 102.7 (CH), 88.3 (C<sub>10</sub>), 84.6 (C<sub>9</sub>), 67.4 (C<sub>7</sub>), 65.4 (CH), 64.2 (C), 55.4 (CH), 39.6 (C<sub>16</sub> or C<sub>19</sub>), 38.2 (C<sub>16</sub> or C<sub>19</sub>), 27.0 (C<sub>17</sub> or C<sub>18</sub>), 25.7 (C<sub>17</sub> or C<sub>18</sub>), 19.2 (C<sub>14</sub>).

**LC-MS (ESI) m/z = 658.4 [M+H]<sup>+</sup>**

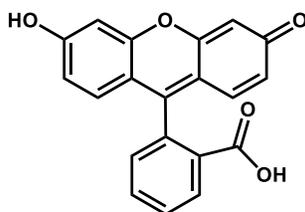
**UPLC:** C18 column: t<sub>R</sub> = 2.0 min, purity > 99.0 %

**Molecular formula:** C<sub>38</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>S

**Molecular weight:** 657.19 g/mol

**Aspect:** orange oil

### Fluorescein (15)



#### Procedure:

Resorcinol (2.0 eq., 2.97 g, 27.00 mmol) and phthalic anhydride (1.0 eq., 2.00 g, 13.50 mmol) were added in methane sulfonic acid (20 mL). The solution was cooled to room temperature and hydrolyzed with 7 volumes of ice water. The solution was filtered and the solid was dried in oven to afford **15** (4.35 g, 98%).

**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, J Hz):** 10.15 (s, 2H, OH), 7.99 (m, 1H), 7.83-7.68 (m, 2H), 7.27 (d, 1H, J = 8.0 Hz), 6.69 (m, 2H), 6.55 (m, 4H).

**LC-MS (ESI) m/z = 333.2 [M+H]<sup>+</sup>**

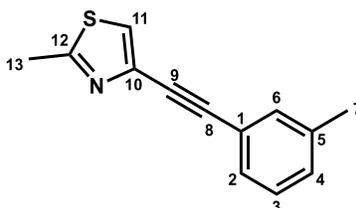
**Molecular formula:** C<sub>20</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub>

**Molecular weight:** 332.07 g/mol

**Melting point:** 314 °C

**Aspect:** red/orange powder

## 2-Methyl-4-[2-(3-methylphenyl)ethynyl]-1,3-thiazole (16)

**Procedure:**

The same procedure as described for compound **12** was used starting from **10** (1.0 eq., 200.0 mg, 1.02 mmol), CuI (0.1 eq., 19.5 mg, 0.10 mmol), Et<sub>3</sub>N (1.5 eq., 0.21 mL, 1.54 mmol), 3-bromotoluene (1.1 eq., 0.14 mL, 1.13 mmol), bis(triphenylphosphine)palladium dichloride (0.05 eq., 36.4 mg, 0.05 mmol) and TBAF (1.1 eq., 0.33 mL, 1.13 mmol) in DMF (5 mL). The crude product was purified by flash chromatography (cyclohexane/EtOAc (7/3)) to afford **16** (700.0 mg, 45%).

<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, J Hz): 7.89 (s, 1H, H<sub>11</sub>), 7.38-7.24 (m, 4H, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>), 2.67 (s, 3H, H<sub>7</sub>), 2.33 (s, 3H, H<sub>13</sub>).

<sup>13</sup>C-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, J Hz): 166.2 (C<sub>12</sub>), 138.7 (C<sub>5</sub>), 135.9 (CH), 132.2 (CH), 130.4 (CH), 129.1 (CH), 128.9 (CH), 124.7 (C<sub>10</sub>), 121.9 (C<sub>1</sub>), 88.6 (C<sub>9</sub>), 84.3 (C<sub>8</sub>), 21.2 (C<sub>7</sub>), 19.2 (C<sub>13</sub>).

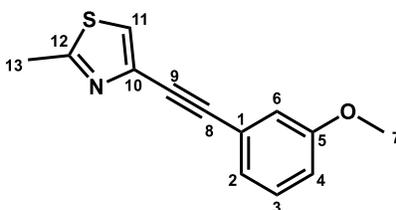
LC-MS (ESI) m/z = 214.2 [M+H]<sup>+</sup>

**Molecular formula:** C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>NS

**Molecular weight:** 213.06 g/mol

**Aspect:** yellow oil

## 4-[2-(3-Methoxyphenyl)ethynyl]-2-methyl-1,3-thiazole (17)

**Procedure:**

The same procedure as described for compound **12** was used starting from **10** (1.0 eq., 200.0 mg, 1.02 mmol), CuI (0.1 eq., 19.5 mg, 0.10 mmol), Et<sub>3</sub>N (1.5 eq., 0.21 mL, 1.54 mmol), 3-methoxyphenylbromide (1.1 eq., 0.14 mL, 1.13 mmol), bis(triphenylphosphine)palladium dichloride (0.05 eq., 36.4 mg, 0.05 mmol) and TBAF (1.1 eq., 0.33 mL, 1.13 mmol) in DMF (5 mL). The crude product was purified by flash chromatography (cyclohexane/EtOAc (7/3)) to afford **17** (82.1 mg, 35%).

**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, J Hz):** 7.91 (s, 1H, H<sub>11</sub>), 7.38-7.32 (m, 1H), 7.14-7.09 (m, 2H), 7.04-7.00 (m, 1H), 3.79 (s, 3H, H<sub>7</sub>), 2.68 (s, 3H, H<sub>13</sub>).

**<sup>13</sup>C-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, J Hz):** 166.2 (C<sub>12</sub>), 159.7 (C<sub>5</sub>), 135.8 (CH), 130.4 (C<sub>10</sub>), 124.9 (CH), 123.2 (C<sub>1</sub>), 116.5 (2 CH), 116.1 (CH), 88.4 (C<sub>9</sub>), 84.4 (C<sub>8</sub>), 55.7 (C<sub>7</sub>), 19.2 (C<sub>13</sub>).

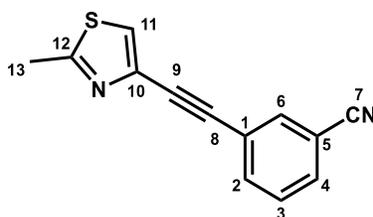
**LC-MS (ESI) m/z = 230.4 [M+H]<sup>+</sup>**

**Molecular formula:** C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>NOS

**Molecular weight:** 229.06 g/mol

**Aspect:** white powder

### 3-[2-(2-Methyl-1,3-thiazol-4-yl)ethynyl]benzonitrile (**18**)



#### Procedure:

The same procedure as described for compound **12** was used starting from **10** (1.0 eq., 200.0 mg, 1.02 mmol), CuI (0.1 eq., 19.5 mg, 0.10 mmol), Et<sub>3</sub>N (1.5 eq., 0.21 mL, 1.54 mmol), 3-bromobenzonitrile (1.1 eq., 204.98 mg, 1.13 mmol), bis(triphenylphosphine)palladium dichloride (0.05 eq., 36.4 mg, 0.05 mmol) and TBAF (1.1 eq., 0.33 mL, 1.13 mmol) in DMF (5 mL). The crude product was purified by flash chromatography (cyclohexane/EtOAc (7/3)) to afford **18** (92.0 mg, 42%).

**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, J Hz):** 7.08-7.06 (m, 1H), 7.99 (s, 1H, H<sub>10</sub>), 7.93-7.88 (m, 2H), 7.68-7.63 (m, 1H), 2.69 (s, 3H, H<sub>12</sub>).

**<sup>13</sup>C-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, J Hz):** 166.5 (C<sub>12</sub>), 136.4 (CH), 135.1 (CH), 133.1 (CH), 130.7 (2 CH), 126.0 (C<sub>10</sub>), 123.5 (C<sub>1</sub>), 118.4 (C<sub>5</sub>), 112.7 (C<sub>7</sub>), 86.4 (C<sub>8</sub> and C<sub>9</sub>), 19.2 (C<sub>13</sub>).

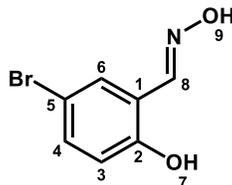
**LC-MS (ESI) m/z = 225.1 [M+H]<sup>+</sup>**

**Molecular formula:** C<sub>13</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>S

**Molecular weight:** 224.04 g/mol

**Aspect:** yellow powder

## 2. Synthesis of benzofuranes

**(E)-5-Bromo-2-hydroxybenzaldehyde oxime (19)****Procedure:**

To a solution of 5-bromo-2-hydroxybenzaldehyde (1.0 eq., 20.12 g, 99.49 mmol) in EtOH (120 mL) were added hydroxylamine hydrochloride (1.2 eq., 8.34 g, 119.39 mmol) and  $K_2CO_3$  (1.0 eq., 13.85 g, 99.49 mmol). The solution was stirred and heated at reflux for 2 hours. Then, the mixture was cooled to room temperature and hydrolyzed with water. The solid was filtered and washed with water and PE. The solid was recrystallized from toluene/cyclohexane (1/1) to afford **19** (16.12 g, 80%).

$^1H$ -RMN ( $CDCl_3$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz): 9.86 (s, 1H, H<sub>9</sub>), 8.17 (s, 1H, H<sub>7</sub>), 7.64 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 7.40 (dd, 1H, H<sub>4</sub>,  $J = 2.6$  Hz and  $J = 8.7$  Hz), 7.31 (d, 1H, H<sub>6</sub>,  $J = 2.6$  Hz), 6.90 (d, 1H, H<sub>3</sub>,  $J = 8.7$  Hz).

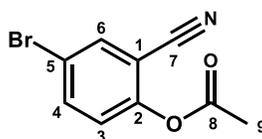
LC-MS (ESI)  $m/z = 216.2, 218.2 [M+H]^+$

**Molecular formula:**  $C_7H_6BrNO_2$

**Molecular weight:** 216.03 g/mol

**Melting point:** 128-130 °C

**Aspect:** white solid

**4-Bromo-2-cyanophenyl acetate (20)****Procedure:**

A solution of **19** (1.0 eq., 12.21 g, 55.55 mmol) in acetic anhydride (40 mL) was stirred and heated at reflux for 4 hours. Then, the solution was cooled to room temperature and solvent was concentrated *in vacuo*. The crude product was hydrolyzed with water. The solid was filtered and washed with water and PE. The solid was recrystallized from toluene to afford **20** (12.00 g, 99%).

$^1H$ -RMN ( $CDCl_3$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz): 7.80 (d, 1H, H<sub>6</sub>,  $J = 2.5$  Hz), 7.74 (dd, 1H, H<sub>4</sub>,  $J = 2.5$  Hz and  $J = 8.7$  Hz), 7.21 (d, 1H, H<sub>3</sub>,  $J = 8.7$  Hz), 2.41 (s, 3H, H<sub>9</sub>).

LC-MS (ESI)  $m/z = 240.1, 242.2 [M+H]^+$

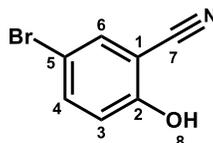
**Molecular formula:** C<sub>9</sub>H<sub>6</sub>BrNO<sub>2</sub>

**Molecular weight:** 240.06 g/mol

**Melting point:** 62-64 °C

**Aspect:** white solid

### 5-Bromo-2-hydroxybenzonitrile (**21**)



#### Procedure:

To a solution of **20** (1.0 eq., 13.21 g, 54.99 mmol) in water (60 mL), was added NaOH (2.0 eq., 4.40 g, 109.97 mmol). The solution was stirred and heated at 60 °C until complete dissolution of **20**. The mixture was cooled to room temperature, hydrolyzed with water and acidified with a 6M HCl solution up to acid pH. The solid was filtered and washed with water and PE. The solid was recrystallized from toluene to afford **21** (9.25 g, 85%).

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm, J Hz): 7.62 (d, 1H, H<sub>6</sub>, J = 2.5 Hz), 7.57 (dd, 1H, H<sub>4</sub>, J = 2.5 Hz and J = 8.9 Hz), 6.91 (d, 1H, H<sub>3</sub>, J = 8.9 Hz), 4.78 (s, 1H, H<sub>8</sub>).

LC-MS (ESI) m/z = 198.2, 200.2 [M+H]<sup>+</sup>

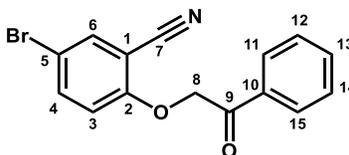
**Molecular formula:** C<sub>7</sub>H<sub>4</sub>BrNO

**Molecular weight:** 198.02 g/mol

**Melting point:** 156-159 °C

**Aspect:** white solid

### 5-Bromo-2-(2-oxo-2-phenylethoxy)benzonitrile (**22**)



#### Procedure:

To a solution of **21** (1.0 eq., 1.98 g, 10.00 mmol) in acetone (100 mL) were added 2-bromoacetophenone (1.1 eq., 2.19 g, 11.00 mmol) and K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.0 eq., 1.38 g, 10.00 mmol). The solution was stirred and heated at room temperature for 4 hours. Then, the mixture was hydrolyzed with water. The solid was filtered and washed with water and PE. The solid was recrystallized from toluene to afford **22** (2.53 g, 80%).

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm, J Hz): 8.01 (m, 2H), 7.71 (m, 2H), 7.60 (m, 3H), 6.73 (d, 1H, H<sub>3</sub>, J = 8.7 Hz), 5.46 (s, 2H, H<sub>8</sub>).

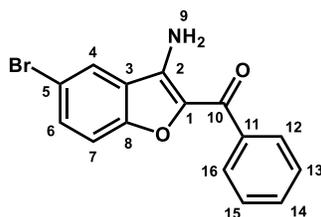
**Molecular formula:** C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>BrNO<sub>2</sub>

**Molecular weight:** 316.15 g/mol

**Melting point:** 146-147 °C

**Aspect:** white solid

### 3-Amino-2-benzoyl-5-bromobenzofurane (**23**)



#### Procedures:

- To a solution of **22** (1.0 eq., 1.98 g, 10.00 mmol) in acetone (100 mL) was added K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2.0 eq., 2.76 g, 20.00 mmol). The solution was stirred and heated at reflux for 16 hours. The mixture was cooled to room temperature, hydrolyzed with water and acidified with a 6M HCl solution up to acid pH. The aqueous layer was extracted three times with EtOAc. Combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, discolored with charcoal, filtered and concentrated *in vacuo*. The solid was taken up in PE and filtered. The solid was recrystallized from toluene to afford **23** (2.69 g, 85%).
- To a solution of **21** (1.0 eq., 9.36 g, 47.00 mmol) in DMF (100 mL) were added 2-bromoacetophenone (1.1 eq., 10.35 g, 52.00 mmol) and K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3.0 eq., 19.60 g, 140.00 mmol). The solution was stirred and heated at 80 °C for 2 hours. The mixture was cooled to room temperature, hydrolyzed with water and acidified with a 6M HCl solution up to acid pH. The aqueous layer was extracted three times with EtOAc. Combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, discolored with charcoal, filtered and concentrated *in vacuo*. The solid was taken up in PE and filtered. The solid was recrystallized from toluene to afford **23** (11.96 g, 80%).

**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm, J Hz):** 8.24 (m, 2H), 7.79 (d, 1H, H<sub>4</sub>, J = 1.9 Hz), 7.58 (m, 4H), 7.36 (d, 1H, H<sub>7</sub>, J = 8.8 Hz), 5.98 (s, 2H, H<sub>9</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 181.5 (C<sub>10</sub>), 153.1 (C<sub>8</sub>), 142.5 (C<sub>1</sub>), 138.0 (C<sub>2</sub>), 134.6 (C<sub>11</sub>), 133.1 (C<sub>14</sub>), 132.2 (C<sub>6</sub>), 129.1 (C<sub>12</sub> and C<sub>16</sub>), 128.9 (C<sub>13</sub> and C<sub>15</sub>), 125.1 (C<sub>4</sub>), 123.3 (C<sub>3</sub>), 115.0 (C<sub>7</sub>), 114.7 (C<sub>5</sub>).

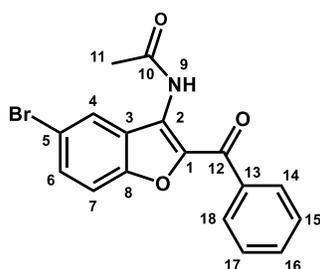
**LC-MS (ESI) m/z =** 316.3, 318.3 [M+H]<sup>+</sup>

**Molecular formula:** C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>BrNO<sub>2</sub>

**Molecular weight:** 316.15 g/mol

**Melting point:** 187-188 °C

**Aspect:** yellow solid

***N*-(2-Benzoyl-5-bromo-1-benzofuran-3-yl)acetamide (24)****Procedure:**

To a solution of **23** (1.0 eq., 4.28 g, 13.54 mmol) in DCM (80 mL), were added pyridine (1.5 eq., 1.64 mL, 20.28 mmol) and acetyl chloride (3.0 eq., 2.90 mL, 40.61 mmol). The solution was stirred and heated at reflux for 2 hours. The mixture was cooled to room temperature, hydrolyzed with water and acidified with a 6M HCl solution up to acid pH. The aqueous layer was extracted three times with DCM. Combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, discolored with charcoal, filtered and concentrated *in vacuo*. The solid was taken up in PE and filtered. The solid was recrystallized from EtOH to afford **24** (3.87 g, 80%).

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm, J Hz): 10.66 (s, 1H, H<sub>9</sub>), 8.75 (d, 1H, H<sub>4</sub>, J = 1.9 Hz), 8.22 (m, 2H), 7.62 (m, 4H), 7.40 (d, 1H, H<sub>7</sub>, J = 8.2 Hz), 2.38 (s, 3H, H<sub>11</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 184.8 (C<sub>10</sub>), 168.8 (C<sub>12</sub>), 152.5 (C<sub>8</sub>), 141.4 (C<sub>1</sub>), 137.1 (C<sub>2</sub>), 133.6 (C<sub>16</sub>), 131.9 (C<sub>6</sub>), 129.6 (C<sub>14</sub> and C<sub>18</sub>), 129.0 (C<sub>15</sub> and C<sub>17</sub>), 126.9 (C<sub>4</sub>), 126.7 (C<sub>13</sub>), 125.1 (C<sub>3</sub>), 115.9 (C<sub>5</sub>), 115.1 (C<sub>7</sub>), 23.5 (C<sub>11</sub>).

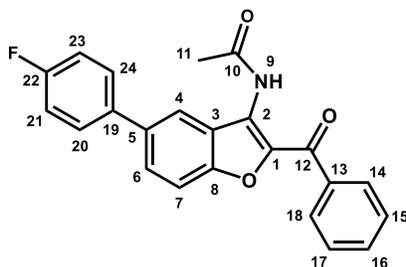
LC-MS (ESI) m/z = 358.1, 360.1 [M+H]<sup>+</sup>

**Molecular formula:** C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>BrNO<sub>3</sub>

**Molecular weight:** 358.19 g/mol

**Melting point:** 151-152 °C

**Aspect:** yellow solid

***N*-[2-Benzoyl-5-(4-fluorophenyl)-1-benzofuran-3-yl]acetamide (25)****Procedure:**

To a sealed tube were added **24** (1.0 eq., 1.00 g, 2.79 mmol), 4-fluorophenylboronic acid (2.25 eq., 878.9 mg, 6.28 mmol), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (4.5 eq., 4.12 g, 12.56 mmol), TBAB (0.1 eq., 90.0 mg, 0.28 mmol) in dioxane (20 mL) and water (5 mL). The solution was degassed with nitrogen during 5 minutes and

tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (0.04 eq., 129.5 mg, 0.11 mmol) was added. The solution was stirred and heated in an oil bath at 100 °C overnight. The mixture was cooled to room temperature, hydrolyzed with water and acidified with a 6M HCl solution up to acid pH. The aqueous layer was extracted three times with EtOAc. Combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, discolored with charcoal, filtered and concentrated *in vacuo*. The solid was taken up in PE and filtered to afford **25** (677.5 mg, 65%).

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm, J Hz): 10.76 (s, 1H, H<sub>9</sub>), 8.75 (d, 1H, H<sub>4</sub>, J = 1.9 Hz), 8.26 (m, 2H), 7.75 (dd, 1H, H<sub>6</sub>, J = 1.9 Hz and J = 8.8 Hz), 7.62 (m, 6H), 7.16 (m, 2H), 2.41 (s, 3H, H<sub>11</sub>).

LC-MS (ESI) m/z = 374.2 [M+H]<sup>+</sup>

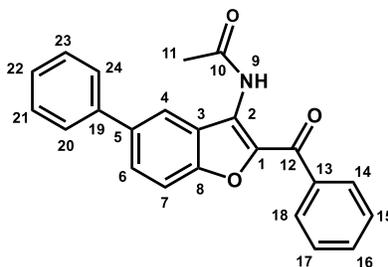
**Molecular formula:** C<sub>23</sub>H<sub>16</sub>FNO<sub>3</sub>

**Molecular weight:** 373.38 g/mol

**Melting point:** 170-171 °C

**Aspect:** yellow solid

***N*-(2-Benzoyl-5-phenyl-1-benzofuran-3-yl)acetamide (26)**



**Procedure:**

The same procedure as described for compound **25** was used starting from **24** (1.0 eq., 1.00 g, 2.79 mmol), phenylboronic acid (2.25 eq., 765.9 mg, 6.28 mmol), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (4.5 eq., 4.10 g, 12.56 mmol), TBAB (0.1 eq., 90.0 mg, 0.28 mmol) in dioxane (20 mL) and water (5 mL). The solution was degassed with nitrogen during 5 minutes and tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (0.04 eq., 130.0 mg, 0.11 mmol) was added to afford **26** (644.9 mg, 65%).

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm, J Hz): 10.76 (s, 1H, H<sub>9</sub>), 8.81 (d, 1H, H<sub>4</sub>, J = 1.8 Hz), 8.27 (m, 2H), 7.9 (dd, 1H, H<sub>6</sub>, J = 1.8 Hz and J = 8.8 Hz), 7.60 (m, 6H), 7.48 (m, 2H), 7.39 (m, 1H), 2.41 (s, 3H, H<sub>11</sub>).

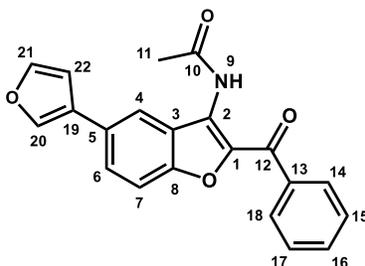
LC-MS (ESI) m/z = 355.9 [M+H]<sup>+</sup>

**Molecular formula:** C<sub>23</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>3</sub>

**Molecular weight:** 355.12 g/mol

**Melting point:** 170-175 °C

**Aspect:** yellow solid

**N-[2-Benzoyl-5-(furan-3-yl)-1-benzofuran-3-yl]acetamide (27)****Procedure:**

The same procedure as described for compound **25** was used starting from **24** (1.0 eq., 1.50 g, 4.19 mmol), 3-furanboronic acid (2.0 eq., 937.1 mg, 8.38 mmol),  $K_2CO_3$  (2.0 eq., 1.16 g, 8.38 mmol), triphenylphosphine (0.04 eq., 43.9 mg, 0.17 mmol) in dioxane (20 mL) and water (5 mL). The solution was degassed with nitrogen during 5 minutes and palladium acetate (0.04 eq., 37.6 mg, 0.17 mmol) was added to afford **27** (800.1 mg, 55%).

$^1H$ -RMN ( $CDCl_3$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz): 10.76 (s, 1H,  $H_9$ ), 8.70 (d, 1H,  $H_4$ ,  $J = 1.8$  Hz), 8.25 (m, 2H), 7.81 (m, 1H), 7.60 (m, 6H), 6.83 (m, 1H), 2.41 (s, 3H,  $H_{11}$ ).

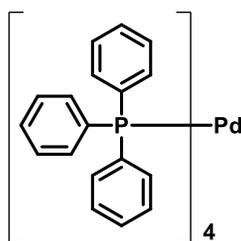
LC-MS (ESI)  $m/z = 346.1$  [ $M+H$ ] $^+$

**Molecular formula:**  $C_{21}H_{15}NO_4$

**Molecular weight:** 345.10 g/mol

**Melting point:** 177-179 °C

**Aspect:** yellow solid

**Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (28)****Procedure:**

$PdCl_2$  (0.80 g, 4.51 mmol) and  $PPh_3$  (5.90 g, 22.55 mmol) were added to a round bottom flask under argon and DMSO (60mL) was added using a syringe. The solution was stirred and heated at 150°C for 1 hour, then cooled to 130°C. When all was soluble at 130°C, hydrazine monohydrate (1.30 mL, 26.16 mmol) was added. The flask was covered with aluminum and the solution was cooled to room temperature. The yellow solid was filtered under a stream of argon and washed with ethanol and then with diethyl ether to afford **28**.

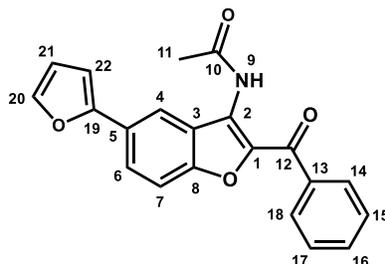
**Molecular formula:** PdP<sub>4</sub>C<sub>72</sub>H<sub>60</sub>

**Molecular weight:** 1155.59 g/mol

**Melting point:** 115 °C

**Aspect:** yellow solid

***N*-[2-Benzoyl-5-(furan-2-yl)-1-benzofuran-3-yl]acetamide (29)**



**Procedure:**

To a sealed tube were added **24** (1.0 eq., 1.00 g, 2.79 mmol) and tributyl(furan-2-yl)stannane (1.1 eq., 1.09 g, 3.07 mmol) in dioxane (10 mL). The solution was degassed with nitrogen during 5 minutes and tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (0.04 eq., 129.5 mg, 0.11 mmol) was added. The solution was stirred and heated in an oil bath at 100 °C overnight. The mixture was cooled to room temperature, hydrolyzed with water and acidified with a 6M HCl solution up to acid pH. The aqueous layer was extracted three times with EtOAc. Combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, discolored with charcoal, filtered and concentrated *in vacuo*. The solid was taken up in PE and filtered to afford **29** (376.1 mg, 39%).

<sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm, J Hz): 10.74 (s, 1H, H<sub>9</sub>), 8.88 (d, 1H, H<sub>7</sub>, J = 1.7 Hz), 8.25 (m, 2H), 7.90 (dd, 1H, H<sub>6</sub>, J = 1.8 Hz and J = 8.9 Hz), 7.60 (m, 5H), 6.74 (dd, 1H, H<sub>22</sub>, J = 0.7 Hz and J = 3.4 Hz), 6.51 (dd, 1H, H<sub>21</sub>, J = 1.8 Hz and J = 3.3 Hz), 2.41 (s, 3H, H<sub>11</sub>).

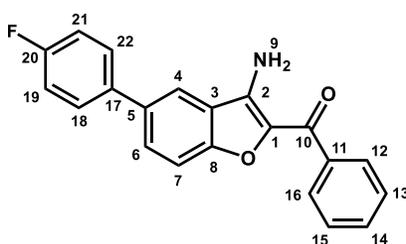
**LC-MS (ESI)** m/z = 346.2 [M+H]<sup>+</sup>

**Molecular formula:** C<sub>21</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>4</sub>

**Molecular weight:** 345.10 g/mol

**Melting point:** 192-193 °C

**Aspect:** yellow solid

**3-Amino-2-benzoyl-5-(4-fluorophenyl)benzofurane (30)****Procedure:**

To a solution of **25** (1.0 eq., 400.0 mg, 1.07 mmol) in MeOH (10 mL) was added NaOH (2.5 eq., 107.2 mg, 2.68 mmol) dissolved in 3 mL of water. The solution was stirred and heated at 60 °C for 12 hours. The mixture was cooled to room temperature, filtered and solvent was concentrated *in vacuo*. Water was added to dissolve salts and solid was filtered. The solid was recrystallized from EtOH to afford **30** (173.9 mg, 49%).

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm, J Hz): 8.28 (m, 2H), 7.74 (m, 2H), 7.58 (m, 6H), 7.18 (t, 2H, H<sub>7</sub>, J = 8.7 Hz), 6.07 (s, 2H, H<sub>9</sub>).

<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm, J Hz): 181.2 (C<sub>10</sub>), 160.6 (C<sub>20</sub> (d, J = 244.2 Hz)), 153.9 (C<sub>8</sub>), 143.9 (C<sub>1</sub>), 138.3 (C<sub>2</sub>), 136.8 (C<sub>11</sub> and C<sub>17</sub>), 134.6 (C<sub>18</sub> and C<sub>22</sub> (d, J = 8.2 Hz)), 134.2 (C<sub>14</sub>), 129.4 (C<sub>12</sub> and C<sub>16</sub>), 129.1 (C<sub>13</sub> and C<sub>15</sub>), 128.8 (C<sub>3</sub>), 121.8 (C<sub>6</sub>), 120.5 (C<sub>4</sub>), 116.2 (C<sub>19</sub> and C<sub>21</sub> (d, J = 24.6 Hz)), 113.2 (C<sub>7</sub>).

LC-MS (ESI) m/z = 331.9 [M+H]<sup>+</sup>

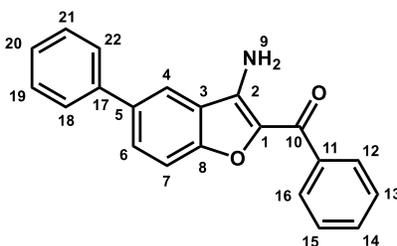
UPLC: C18 column: t<sub>R</sub> = 3.5 min, purity = 95.4 %

**Molecular formula:** C<sub>21</sub>H<sub>14</sub>FNO<sub>2</sub>

**Molecular weight:** 331.10 g/mol

**Melting point:** 171-173 °C

**Aspect:** yellow solid

**3-Amino-2-benzoyl-5-phenyl-1-benzofurane (31)****Procedure:**

The same procedure as described for compound **30** was used starting from **26** (1.0 eq., 305.0 mg, 0.86 mmol) in MeOH (10 mL). NaOH (2.5 eq., 85.8 mg, 2.15 mmol) dissolved in 3 mL of water was added to the solution to afford **31** (161.3 mg, 60%).

**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm, J Hz):** 8.28 (dd, 2H, H<sub>6</sub>, *J* = 1.8 Hz and *J* = 7.7 Hz), 7.82 (d, 1H, H<sub>4</sub>, *J* = 1.4 Hz), 7.78 (dd, 1H, *J* = 1.8 Hz and *J* = 8.7 Hz), 7.57 (m, 9H), 6.08 (s, 2H, H<sub>9</sub>).

**<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm, J Hz):** 182.7 (C<sub>10</sub>), 154.2 (C<sub>8</sub>), 142.3 (C<sub>1</sub>), 140.6 (C<sub>17</sub>), 137.4 (C<sub>2</sub>), 136.3 (C<sub>11</sub>), 135.9 (C<sub>5</sub>), 131.9 (2 CH), 130.1 (CH), 129.8 (2 CH), 129.3 (CH), 128.9 (CH), 128.3 (CH), 127.3 (C<sub>3</sub>), 127.1 (2 CH), 121.3 (C<sub>6</sub>), 118.6 (C<sub>4</sub>), 112.9 (C<sub>7</sub>).

**LC-MS (ESI) m/z = 314.0 [M+H]<sup>+</sup>**

**UPLC:** C18 column: t<sub>R</sub> = 3.4 min, purity > 99.0 %

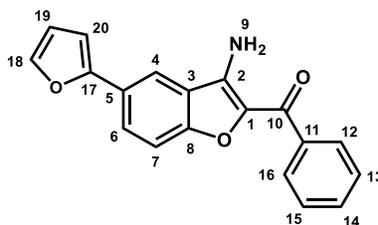
**Molecular formula:** C<sub>21</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>2</sub>

**Molecular weight:** 313.11 g/mol

**Melting point:** 135-137 °C

**Aspect:** yellow solid

### 3-Amino-2-benzoyl-5-(furan-3-yl)-1-benzofurane (32)



#### Procedure:

The same procedure as described for compound **30** was used starting from **29** (1.0 eq., 300.0 mg, 0.87 mmol) in MeOH (10 mL). NaOH (2.5 eq., 86.2 mg, 2.17 mmol) dissolved in 3 mL of water was added to the solution to afford **32** (170.0 mg, 60%).

**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm, J Hz):** 8.43 (d, 1H, H<sub>4</sub>, *J* = 1.5 Hz), 8.12 (m, 2H), 7.93 (dd, 1H, H<sub>6</sub>, *J* = 1.9 Hz and *J* = 8.8 Hz), 7.80 (m, 1H), 7.60 (m, 4H), 7.50 (s, 2H, H<sub>9</sub>), 6.91 (m, 1H, H<sub>22</sub>), 6.63 (dd, 1H, H<sub>21</sub>, *J* = 1.8 Hz and *J* = 3.3 Hz).

**<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm, J Hz):** 181.3 (C<sub>10</sub>), 153.7 (C<sub>8</sub>), 153.4 (C<sub>17</sub>), 143.8 (C<sub>18</sub>), 143.3 (C<sub>1</sub>), 138.2 (C<sub>2</sub>), 134.5 (C<sub>11</sub>), 132.1 (C<sub>14</sub>), 129.0 (C<sub>12</sub> and C<sub>16</sub>), 128.8 (C<sub>13</sub> and C<sub>15</sub>), 126.9 (C<sub>5</sub>), 125.6 (C<sub>3</sub>), 121.7 (C<sub>6</sub>), 117.2 (C<sub>4</sub>), 113.4 (C<sub>7</sub>), 112.6 (C<sub>19</sub>), 105.8 (C<sub>20</sub>).

**LC-MS (ESI) m/z = 304.1 [M+H]<sup>+</sup>**

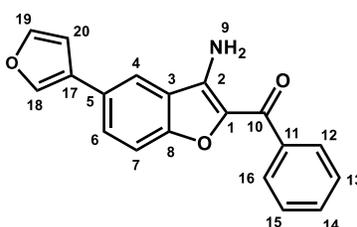
**UPLC:** C18 column: t<sub>R</sub> = 2.4 min, purity = 95.9 %

**Molecular formula:** C<sub>19</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>3</sub>

**Molecular weight:** 303.09 g/mol

**Melting point:** 126-128 °C

**Aspect:** yellow solid

**3-Amino-2-benzoyl-5-(furan-2-yl)-1-benzofurane (33)****Procedure:**

The same procedure as described for compound **30** was used starting from **27** (1.0 eq., 800.0 mg, 2.32 mmol) in MeOH (10 mL). NaOH (2.5 eq., 231.6 mg, 5.79 mmol) dissolved in 3 mL of water was added to the solution to afford **33** (456.7 mg, 65%).

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm, J Hz): 8.27 (m, 2H), 7.64 (M, 8H), 6.76 (m, 1H), 6.06 (s, 2H, H<sub>9</sub>).

<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm, J Hz): 153.9 (C<sub>10</sub>), 143.9 (C<sub>8</sub>), 142.2 (C<sub>19</sub>), 138.36 (C<sub>1</sub>), 137.4 (C<sub>2</sub>), 135.8 (C<sub>11</sub>), 132.0 (C<sub>18</sub>), 131.5 (C<sub>5</sub>), 129.3 (C<sub>14</sub>), 128.5 (C<sub>12</sub> and C<sub>16</sub>), 128.3 (C<sub>17</sub>), 127.3 (C<sub>13</sub> and C<sub>15</sub>), 126.0 (C<sub>3</sub>), 121.3 (C<sub>6</sub>), 117.8 (C<sub>4</sub>), 113.0 (C<sub>7</sub>), 109.0 (C<sub>20</sub>).

LC-MS (ESI) m/z = 304.0 [M+H]<sup>+</sup>

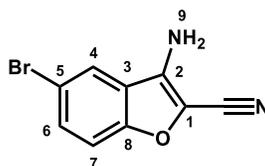
UPLC: C18 column: t<sub>R</sub> = 3.2 min, purity > 99.0 %

**Molecular formula:** C<sub>19</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>3</sub>

**Molecular weight:** 303.32 g/mol

**Melting point:** 153-155 °C

**Aspect:** yellow solid

**3-Amino-5-bromo-1-benzofuran-2-carbonitrile (34)****Procedure:**

To a solution of **21** (1.0 eq., 3.00 g, 15.15 mmol) in DMF (100 mL) were added bromoacetonitrile (1.1 eq., 1.16 mL, 16.67 mmol) and K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (5.0 eq., 10.47 g, 75.75 mmol). The solution was stirred and heated at 80 °C for 2 hours. The mixture was cooled to room temperature, hydrolyzed with water and acidified with a 6M HCl solution up to acid pH. The solid was filtered and washed with PE to afford **34** (2.45 g, 68%).

<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, J Hz): 8.17 (d, 1H, H<sub>4</sub>, J = 1.9 Hz), 7.65 (dd, 1H, H<sub>6</sub>, J = 2.1 Hz and J = 8.8 Hz), 7.47 (d, 1H, H<sub>7</sub>, J = 8.9 Hz), 6.72 (s, 2H, H<sub>9</sub>).

LC-MS (ESI) m/z = 235.1, 237.1 [M-H]<sup>-</sup>

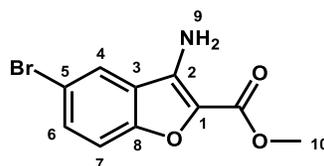
**Molecular formula:** C<sub>9</sub>H<sub>5</sub>BrN<sub>2</sub>O

**Molecular weight:** 237.06 g/mol

**Melting point:** 171-173 °C

**Aspect:** brown solid

### Methyl 3-amino-5-bromo-1-benzofuran-2-carboxylate (**35**)



#### Procedure:

The same procedure as described for compound **34** was used starting from **21** (1.0 eq., 3.00 g, 15.15 mmol), methyl bromoacetate (1.1 eq., 1.58 mL, 16.67 mmol) and K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (5.00 eq., 10.47 g, 75.75 mmol) in DMF (100 mL) to afford **35** (2.60 g, 64%).

**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, *J* Hz):** 8.22 (d, 1H, H<sub>4</sub>, *J* = 2.0 Hz), 7.60 (dd, 1H, H<sub>6</sub>, *J* = 2.1 Hz and *J* = 8.8 Hz), 7.47 (d, 1H, H<sub>7</sub>, *J* = 8.8 Hz), 6.41 (s, 2H, H<sub>9</sub>), 3.81 (s, 3H, H<sub>10</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z* =** 270.0, 272.0 [M+H]<sup>+</sup>

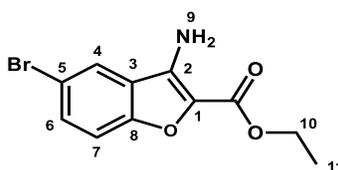
**Molecular formula:** C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>BrNO<sub>3</sub>

**Molecular weight:** 270.08 g/mol

**Melting point:** 159-161 °C

**Aspect:** yellow solid

### Ethyl 3-amino-5-bromo-1-benzofuran-2-carboxylate (**36**)



#### Procedure:

The same procedure as described for compound **34** was used starting from **21** (1.0 eq., 3.00 g, 15.15 mmol), ethyl bromoacetate (1.1 eq., 1.85 mL, 16.67 mmol) and K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (5.0 eq., 10.47 g, 75.75 mmol) in DMF (100 mL) to afford **36** (2.71 g, 63%).

**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, *J* Hz):** 8.22 (d, 1H, H<sub>4</sub>, *J* = 2.0 Hz), 7.62 (dd, 1H, H<sub>6</sub>, *J* = 2.0 Hz and *J* = 8.9 Hz), 7.49 (d, 1H, H<sub>7</sub>, *J* = 8.9 Hz), 6.36 (s, 2H, H<sub>9</sub>), 4.30 (q, 2H, H<sub>10</sub>, *J* = 7.0 Hz), 1.29 (t, 3H, H<sub>11</sub>, *J* = 6.9 Hz).

**LC-MS (ESI) *m/z* =** 284.1, 286.1 [M+H]<sup>+</sup>

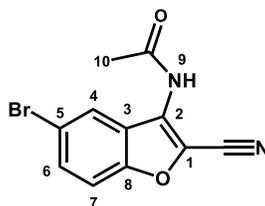
**Molecular formula:** C<sub>11</sub>H<sub>10</sub>BrNO<sub>3</sub>

**Molecular weight:** 284.11 g/mol

**Melting point:** 147-149 °C

**Aspect:** yellow solid

***N*-(5-Bromo-2-cyano-1-benzofuran-3-yl)acetamide (38)**



**Procedure:**

The same procedure as described for compound **24** was used starting from **34** (1.0 eq., 700.0 mg, 2.95 mmol), pyridine (1.5 eq., 0.36 mL, 4.43 mmol) and acetyl chloride (3.0 eq., 0.63 mL, 8.86 mmol) in dichloromethane (100 mL) to afford **38** (494.5 mg, 60%).

<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, *J* Hz): 8.29 (d, 1H, H<sub>4</sub>, *J* = 1.8 Hz), 7.76 (dd, 1H, H<sub>6</sub>, *J* = 1.8 Hz and *J* = 8.9 Hz), 7.67 (d, 1H, H<sub>7</sub>, *J* = 8.9 Hz), 2.21 (s, 3H, H<sub>10</sub>).

LC-MS (ESI) *m/z* = 277.0, 279.0 [M-H]<sup>-</sup>

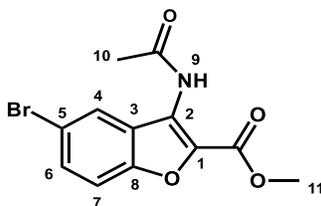
**Molecular formula:** C<sub>11</sub>H<sub>7</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

**Molecular weight:** 279.09 g/mol

**Melting point:** 194-196 °C

**Aspect:** white solid

**Methyl 5-bromo-3-acetamido-1-benzofuran-2-carboxylate (39)**



**Procedure:**

The same procedure as described for compound **24** was used starting from **35** (1.0 eq., 600.0 mg, 2.20 mmol), pyridine (1.5 eq., 0.27 mL, 3.33 mmol) and acetyl chloride (3.0 eq., 0.48 mL, 6.66 mmol) in dichloromethane (100 mL) to afford **39** (300.0 mg, 43%).

<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, *J* Hz): 10.05 (s, 1H, H<sub>9</sub>), 8.00-7.95 (m, 1H), 7.68 (m, 2H), 3.89 (s, 3H, H<sub>11</sub>), 2.18 (s, 3H, H<sub>10</sub>).

LC-MS (ESI)  $m/z = 312.0, 314.0 [M+H]^+$

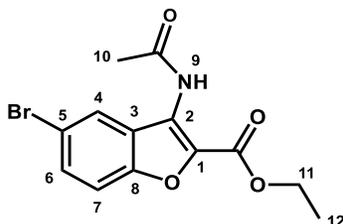
Molecular formula:  $C_{12}H_{10}BrNO_4$

Molecular weight: 312.12 g/mol

Melting point: 187-189 °C

Aspect: white solid

#### Ethyl 5-bromo-3-acetamido-1-benzofuran-2-carboxylate (40)



#### Procedure:

The same procedure as described for compound **24** was used starting from **36** (1.0 eq., 400.0 mg, 1.41 mmol), pyridine (1.5 eq., 0.17 mL, 2.11 mmol) and acetyl chloride (3.0 eq., 0.30 mL, 4.22 mmol) in dichloromethane (100 mL) to afford **40** (290.0 mg, 63%).

$^1\text{H-RMN}$  (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz): 10.02 (s, 1H,  $H_9$ ), 7.98 (m, 1H), 7.68 (m, 2H), 4.35 (q, 2H,  $H_{11}$ ,  $J = 7.0$  Hz), 2.17 (s, 3H,  $H_{10}$ ), 1.34 (t, 3H,  $H_{12}$ ,  $J = 7.0$  Hz).

LC-MS (ESI)  $m/z = 326.0, 328.0 [M+H]^+$

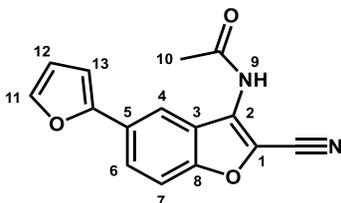
Molecular formula:  $C_{13}H_{12}BrNO_4$

Molecular weight: 326.15 g/mol

Melting point: 195-200°C

Aspect: white solid

#### *N*-[2-Cyano-5-(furan-2-yl)-1-benzofuran-3-yl]acetamide (41)



#### Procedure:

The same procedure as described for compound **29** was used starting from **38** (1.0 eq., 450.0 mg, 1.61 mmol), tributyl(furan-2-yl)stannane (1.1 eq., 0.56 mL, 1.77 mmol) and triphenylphosphine (0.04 eq., 16.3

mg, 0.064 mmol) in dioxane (50 mL). The solution was degassed with nitrogen during 5 minutes and palladium acetate (0.04 eq., 14.5 mg, 0.064 mmol) was added. The solid was taken up in diethyl ether and filtered to afford **41** (193.1 mg, 45%).

**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, *J* Hz):** 10.85 (s, 1H, H<sub>9</sub>), 8.38 (d, 1H, H<sub>4</sub>, *J* = 1.5 Hz), 7.95 (dd, 1H, H<sub>6</sub>, *J* = 1.8 Hz and *J* = 8.9 Hz), 7.82 (m, 1H, H<sub>11</sub>), 7.71 (dd, 1H, H<sub>7</sub>, *J* = 0.5 Hz and *J* = 8.8 Hz), 6.98 (dd, 1H, H<sub>13</sub>, *J* = 0.7 Hz and *J* = 3.7 Hz), 6.65 (dd, 1H, H<sub>12</sub>, *J* = 1.8 Hz and *J* = 3.4 Hz), 2.24 (s, 3H, H<sub>10</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** = 265.1 [M-H]<sup>-</sup>

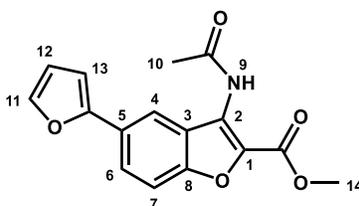
**Molecular formula:** C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

**Molecular weight:** 266.07 g/mol

**Melting point:** 158-160 °C

**Aspect:** yellow solid

#### Methyl 3-acetamido-5-(furan-2-yl)-1-benzofuran-2-carboxylate (**42**)



#### Procedure:

The same procedure as described for compound **29** was used starting from **39** (1.0 eq., 1.00 g, 3.20 mmol), tributyl(furan-2-yl)stannane (1.1 eq., 1.11 mL, 3.52 mmol) and triphenylphosphine (0.04 eq., 34.0 mg, 0.13 mmol) in dioxane (50 mL). The solution was degassed with nitrogen during 5 minutes and palladium acetate (0.04 eq., 29.1 mg, 0.13 mmol) was added. The solid was taken up in diethyl ether and filtered to afford **42** (400.0 mg, 42%).

**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, *J* Hz):** 10.04 (s, 1H, H<sub>9</sub>), 8.06 (d, 1H, H<sub>4</sub>, *J* = 1.6 Hz), 7.91 (dd, 1H, H<sub>6</sub>, *J* = 1.9 Hz and *J* = 8.8 Hz), 7.77 (m, 1H, H<sub>11</sub>), 7.72 (dd, 1H, H<sub>7</sub>, *J* = 0.5 Hz and *J* = 8.8 Hz), 6.97 (dd, 1H, H<sub>13</sub>, *J* = 0.6 Hz and *J* = 3.4 Hz), 6.62 (dd, 1H, H<sub>12</sub>, *J* = 1.8 Hz and *J* = 3.4 Hz), 3.89 (s, 3H, H<sub>14</sub>), 2.20 (s, 3H, H<sub>10</sub>).

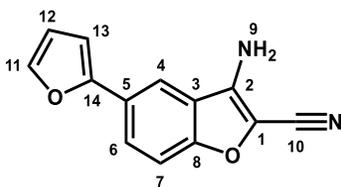
**LC-MS (ESI) *m/z*** = 300.2 [M+H]<sup>+</sup>

**Molecular formula:** C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>5</sub>

**Molecular weight:** 299.28 g/mol

**Melting point:** 153-155 °C

**Aspect:** yellow solid

**3-Amino-5-(furan-2-yl)-1-benzofuran-2-carbonitrile (43)****Procedure:**

The same procedure as described for compound **29** was used starting from **34** (1.0 eq., 400.0 mg, 1.69 mmol), tributyl(furan-2-yl)stannane (1.1 eq., 0.80 mL, 2.53 mmol) and triphenylphosphine (0.1 eq., 44.3 mg, 0.17 mmol) in dioxane (20 mL). The solution was degassed with nitrogen during 5 minutes and palladium acetate (0.1 eq., 37.9 mg, 0.17 mmol) was added. The crude product was purified using flash chromatography (cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 7/3) to afford **43** (100.1 mg, 26%).

**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, *J* Hz):** 8.25 (d, 1H, H<sub>4</sub>, *J* = 1.5 Hz), 7.86 (dd, 1H, H<sub>6</sub>, *J* = 1.8 Hz and *J* = 8.7 Hz), 7.77 (m, 1H, H<sub>11</sub>), 7.52 (d, 1H, H<sub>7</sub>, *J* = 8.9 Hz), 6.89 (m, 1H, H<sub>13</sub>), 6.72 (s, 2H, H<sub>9</sub>), 6.62 (dd, 1H, H<sub>12</sub>, *J* = 1.9 Hz and *J* = 3.4 Hz).

**<sup>13</sup>C-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, *J* Hz):** 153.9 (C<sub>8</sub>), 153.2 (C<sub>14</sub>), 143.3 (C<sub>2</sub>), 142.9 (C<sub>11</sub>), 126.0, 125.8, 121.9, 116.4 (C<sub>6</sub>), 114.7 (C<sub>4</sub>), 112.9 (C<sub>12</sub>), 112.6 (C<sub>7</sub>), 107.5 (C<sub>10</sub>), 105.9 (C<sub>13</sub>).

**LC-MS (ESI) m/z = 223.1 [M-H]<sup>-</sup>**

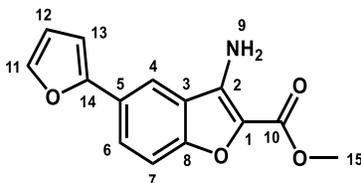
**UPLC:** C18 column: t<sub>R</sub> = 2.1 min, purity > 99.0 %

**Molecular formula:** C<sub>13</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

**Molecular weight:** 224.06 g/mol

**Melting point:** 139-142 °C

**Aspect:** yellow solid

**Methyl 3-amino-5-(furan-2-yl)-1-benzofuran-2-carboxylate (44)****Procedure:**

The same procedure as described for compound **29** was used starting from **35** (1.0 eq., 400.0 mg, 1.48 mmol), tributyl(furan-2-yl)stannane (1.5 eq., 0.71 mL, 2.22 mmol) and triphenylphosphine (0.1 eq., 38.9 mg, 0.15 mmol) in dioxane (20 mL). The solution was degassed with nitrogen during 5 minutes and palladium acetate (0.1 eq., 33.3 mg, 0.15 mmol) was added. Crude product was purified using flash chromatography (cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 7/3) to afford **44** (150.1 mg, 39%).

**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, *J* Hz):** 8.33 (d, 1H, H<sub>4</sub>, *J* = 1.5 Hz), 7.84 (dd, 1H, H<sub>6</sub>, *J* = 1.9 Hz and *J* = 8.8 Hz), 7.77 (m, 1H, H<sub>11</sub>), 7.52 (dd, 1H, H<sub>7</sub>, *J* = 0.4 Hz and *J* = 8.8 Hz), 6.85 (dd, 1H, H<sub>13</sub>, *J* = 0.6 Hz and *J* = 3.4 Hz), 6.61 (dd, 1H, H<sub>12</sub>, *J* = 1.8 Hz and *J* = 3.3 Hz), 6.43 (s, 2H, H<sub>9</sub>), 3.82 (s, 3H, H<sub>15</sub>).

**<sup>13</sup>C-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, *J* Hz):** 161.3 (C<sub>10</sub>), 153.5 (C<sub>8</sub>), 153.3 (C<sub>14</sub>), 143.1 (C<sub>11</sub>), 140.1 (C<sub>2</sub>), 125.6 (C<sub>5</sub>), 125.47 (C<sub>3</sub>), 124.2 (C<sub>1</sub>), 122.6 (C<sub>6</sub>), 116.9 (C<sub>4</sub>), 113.0 (C<sub>12</sub>), 112.6 (C<sub>7</sub>), 105.6 (C<sub>13</sub>), 51.3 (C<sub>15</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** = 258.2 [M+H]<sup>+</sup>

**UPLC:** C18 column: *t<sub>R</sub>* = 2.1 min, purity > 99.0 %

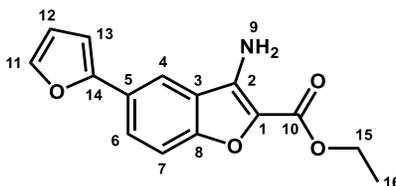
**Molecular formula:** C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>4</sub>

**Molecular weight:** 257.07 g/mol

**Melting point:** 202-204 °C

**Aspect:** white solid

**Ethyl 3-amino-5-(furan-2-yl)-1-benzofuran-2-carboxylate (45)**



**Procedure:**

The same procedure as described for compound **29** was used starting from **36** (1.0 eq., 400.0 mg, 1.48 mmol), tributyl(furan-2-yl)stannane (1.5 eq., 0.71 mL, 2.22 mmol) and triphenylphosphine (0.1 eq., 38.9 mg, 0.15 mmol) in dioxane (20 mL). The solution was degassed with nitrogen during 5 minutes and palladium acetate (0.1 eq., 33.3 mg, 0.15 mmol) was added. The crude product was purified using flash chromatography (cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 7/3) to afford **45** (165.2 mg, 36%).

**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, *J* Hz):** 8.32 (d, 1H, H<sub>4</sub>, *J* = 1.4 Hz), 7.85 (dd, 1H, H<sub>6</sub>, *J* = 1.8 Hz and *J* = 8.8 Hz), 7.77 (m, 1H, H<sub>11</sub>), 7.55 (d, 1H, H<sub>7</sub>, *J* = 8.8 Hz), 6.86 (d, 1H, H<sub>13</sub>, *J* = 3.3 Hz), 6.62 (dd, 1H, H<sub>12</sub>, *J* = 1.8 Hz and *J* = 3.3 Hz), 6.40 (s, 2H, H<sub>9</sub>), 4.33 (q, 2H, H<sub>15</sub>, *J* = 7.1 Hz), 1.30 (t, 3H, H<sub>16</sub>, *J* = 7.2 Hz).

**<sup>13</sup>C-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, *J* Hz):** 160.9 (C<sub>10</sub>), 153.5 (C<sub>8</sub>), 153.2 (C<sub>14</sub>), 143.1 (C<sub>11</sub>), 140.1 (C<sub>2</sub>), 125.6 (C<sub>5</sub>), 125.4 (C<sub>3</sub>), 124.2 (C<sub>1</sub>), 122.6 (C<sub>6</sub>), 116.8 (C<sub>4</sub>), 113.0 (C<sub>12</sub>), 112.6 (C<sub>7</sub>), 105.6 (C<sub>13</sub>), 60.0 (C<sub>15</sub>), 15.0 (C<sub>16</sub>).

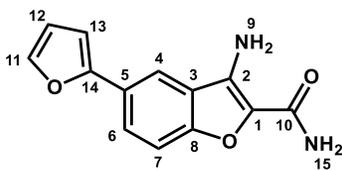
**LC-MS (ESI) *m/z*** = 272.2 [M+H]<sup>+</sup>

**UPLC:** C18 column: *t<sub>R</sub>* = 2.2 min, purity = 98.6 %

**Molecular formula:** C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>4</sub>

**Molecular weight:** 271.27 g/mol

**Aspect:** slightly yellow solid

**3-Amino-5-(furan-2-yl)-1-benzofuran-2-carboxamide (46)****Procedure:**

The same procedure as described for compound **29** was used starting from **37** (1.0 eq., 400.0 mg, 1.48 mmol), tributyl(furan-2-yl)stannane (1.5 eq., 0.71 mL, 2.22 mmol) and triphenylphosphine (0.1 eq., 38.9 mg, 0.15 mmol) in dioxane (20 mL). The solution was degassed with nitrogen during 5 minutes and palladium acetate (0.1 eq., 33.3 mg, 0.15 mmol) was added. The crude product was purified using flash chromatography (cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 7/3) to afford **46** (137.2 mg, 33%).

**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, *J* Hz):** 8.33 (d, 1H, H<sub>4</sub>, *J* = 1.5 Hz), 7.83 (dd, 1H, H<sub>6</sub>, *J* = 1.9 Hz and *J* = 8.8 Hz), 7.77 (m, 1H, H<sub>11</sub>), 7.52 (dd, 1H, H<sub>7</sub>, *J* = 0.4 Hz and *J* = 8.8 Hz), 6.87 (dd, 1H, H<sub>13</sub>, *J* = 0.6 Hz and *J* = 3.4 Hz), 6.62 (dd, 1H, H<sub>12</sub>, *J* = 1.8 Hz and *J* = 3.3 Hz), 6.93 (s, 2H, H<sub>16</sub>), 5.82 (s, 2H, H<sub>9</sub>).

**<sup>13</sup>C-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, *J* Hz):** 161.0 (C<sub>10</sub>), 153.6 (C<sub>8</sub>), 153.2 (C<sub>14</sub>), 143.1 (C<sub>11</sub>), 140.1 (C<sub>2</sub>), 125.6 (C<sub>5</sub>), 125.4 (C<sub>3</sub>), 124.2 (C<sub>1</sub>), 122.6 (C<sub>6</sub>), 116.8 (C<sub>4</sub>), 113.0 (C<sub>12</sub>), 112.6 (C<sub>7</sub>), 105.6 (C<sub>13</sub>).

**LC-MS (ESI) m/z = 243.2 [M+H]<sup>+</sup>**

**UPLC:** C18 column: t<sub>R</sub> = 2.1 min, purity > 99.0 %

**Molecular formula:** C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

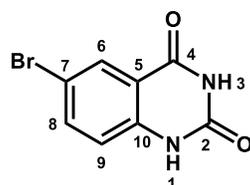
**Molecular weight:** 242.07 g/mol

**Aspect:** slightly yellow solid

### 3. Synthesis of quinazolines

The synthesis of the compound **5** was carried out according to protocols described in the thesis of Raphaël Bolteau.<sup>168</sup>

#### 6-Bromoquinazoline-2,4-(1*H*,3*H*)-dione (**47a**)



#### Procedure:

To a round bottom flask were added commercial 2-amino-5-bromobenzoic acid (1.0 eq., 10.00 g, 46.29 mmol) and urea (10.0 eq., 27.80 g, 462.89 mmol). The mixture was stirred and heated at 160 °C for 16 hours. Solid was cooled to 50 °C and a 1M NaOH solution was added to dissolve the solid. The solution was filtered, filtrate was acidified with a 6M HCl solution up to acid pH and filtered again. The solid was washed with MeOH to afford **47a** (8.90 g, 80%).

<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, *J* Hz): 11.44 (s, 1H, H<sub>1</sub>), 11.27 (s, 1H, H<sub>3</sub>), 7.95 (d, 1H, H<sub>6</sub>, *J* = 2.3 Hz), 7.80 (dd, 1H, H<sub>8</sub>, *J* = 2.3 Hz and *J* = 8.7 Hz), 7.13 (d, 1H, H<sub>9</sub>, *J* = 8.7 Hz).

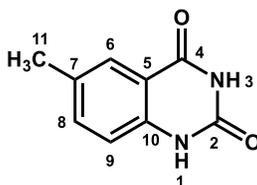
LC-MS (ESI) *m/z* = 239.0, 241.0 [M-H]<sup>-</sup>

**Molecular formula:** C<sub>8</sub>H<sub>5</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

**Molecular weight:** 241.04 g/mol

**Melting point:** >300 °C

**Aspect:** slightly yellow solid

**6-Methylquinazoline-2,4-(1H,3H)-dione (47b)****Procedure:**

The same procedure as described for compound **47a** was used starting from commercial 2-amino-5-methylbenzoic acid (1.0 eq., 10.00 g, 33.10 mmol) and urea (10.0 eq., 20.00 g, 330.80 mmol) to afford **47b** (8.50 g, 73%).

**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, *J* Hz):** 11.19 (m, 2H, H<sub>1</sub> and H<sub>3</sub>), 7.68 (d, 1H, H<sub>6</sub>, *J* = 1.5 Hz), 7.43 (dd, 1H, H<sub>8</sub>, *J* = 2.1 Hz and *J* = 8.3 Hz), 7.10 (d, 1H, H<sub>9</sub>, *J* = 8.3 Hz), 2.33 (s, 3H, H<sub>11</sub>).

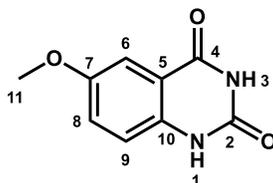
**LC-MS (ESI) *m/z* = 175.2 [M-H]<sup>-</sup>**

**Molecular formula:** C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

**Molecular weight:** 176.18 g/mol

**Melting point:** >300 °C

**Aspect:** white solid

**6-Methoxyquinazoline-2,4-(1H,3H)-dione (47c)****Procedure:**

The same procedure as described for compound **47a** was used starting from commercial 2-amino-5-methoxybenzoic acid (1.0 eq., 5.00 g, 29.91 mmol) and urea (10.0 eq., 17.96 g, 299.10 mmol) to afford **47c** (5.10 g, 89%).

**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, *J* Hz):** 11.15 (m, 2H, H<sub>1</sub> and H<sub>3</sub>), 7.32 (d, 1H, H<sub>6</sub>, *J* = 2.9 Hz), 7.27 (dd, 1H, H<sub>8</sub>, *J* = 2.9 Hz and *J* = 8.9 Hz), 7.13 (d, 1H, H<sub>9</sub>, *J* = 8.8 Hz), 3.78 (s, 3H, H<sub>11</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z* = 239.0, 241.0 [M-H]<sup>-</sup>**

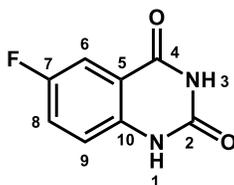
**Molecular formula:** C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

**Molecular weight:** 192.17 g/mol

**Melting point:** >300 °C

**Aspect:** slightly yellow solid

**6-Fluoroquinazoline-2,4-(1*H*,3*H*)-dione (47d)**



**Procedure:**

The same procedure as described for compound **47a** was used starting from commercial 2-amino-5-fluorobenzoic acid (1.0 eq., 10.00 g, 64.46 mmol) and urea (10.0 eq., 38.71 g, 644.63 mmol) to afford **47d** (8.90 g, 77%).

**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, *J* Hz):** 11.30 (m, 2H, H<sub>1</sub> and H<sub>3</sub>), 7.56 (m, 2H, H<sub>6</sub> and H<sub>9</sub>), 7.20 (dd, 1H, H<sub>8</sub>, *J* = 4.4 Hz and *J* = 8.8 Hz).

**LC-MS (ESI) *m/z* = 178.9 [M-H]<sup>-</sup>**

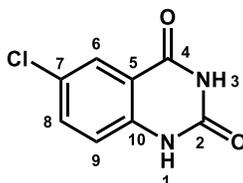
**Molecular formula:** C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

**Molecular weight:** 180.14 g/mol

**Melting point:** >300 °C

**Aspect:** slightly yellow solid

**6-Chloroquinazoline-2,4-(1*H*,3*H*)-dione (47e)**



**Procedure:**

The same procedure as described for compound **47a** was used starting from commercial 2-amino-5-chlorobenzoic acid (1.0 eq., 10.00 g, 58.28 mmol) and urea (10.0 eq., 35.00 g, 582.82 mmol) to afford **47e** (10.00 g, 87%).

**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, *J* Hz):** 11.28 (m, 2H, H<sub>1</sub> and H<sub>3</sub>), 7.79 (d, 1H, H<sub>6</sub>, *J* = 2.5 Hz), 7.67 (dd, 1H, H<sub>8</sub>, *J* = 2.5 Hz and *J* = 8.7 Hz), 7.19 (d, 1H, H<sub>9</sub>, *J* = 8.8 Hz).

LC-MS (ESI)  $m/z = 196.1, 198.1$  [M-H]<sup>-</sup>

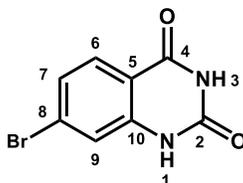
Molecular formula: C<sub>8</sub>H<sub>5</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Molecular weight: 196.59 g/mol

Melting point: >300 °C

Aspect: yellow solid

**7-Bromoquinazoline-2,4-(1H,3H)-dione (47f)**



**Procedure:**

The same procedure as described for compound **47a** was used starting from commercial 2-amino-4-bromobenzoic acid (1.0 eq., 10.00 g, 46.29 mmol) and urea (10.0 eq., 27.80 g, 462.89 mmol) to afford **47f** (9.10 g, 82%).

<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, *J* Hz): 11.40 (s, 1H, H<sub>1</sub>), 11.25 (s, 1H, H<sub>3</sub>), 7.74 (d, 1H, H<sub>6</sub>, *J* = 8.4 Hz), 7.31 (d, 1H, H<sub>9</sub>, *J* = 1.9 Hz), 7.21 (dd, 1H, H<sub>7</sub>, *J* = 1.9 Hz and *J* = 8.4 Hz).

LC-MS (ESI)  $m/z = 239.0, 241.0$  [M-H]<sup>-</sup>

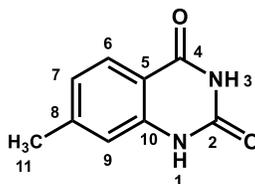
Molecular formula: C<sub>8</sub>H<sub>5</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Molecular weight: 241.04 g/mol

Melting point: >300 °C

Aspect: slightly yellow solid

**7-Methylquinazoline-2,4-(1H,3H)-dione (47g)**



**Procedure:**

The same procedure as described for compound **47a** was used starting from commercial 2-amino-4-methylbenzoic acid (1.0 eq., 5.00 g, 33.10 mmol) and urea (10.0 eq., 20.00 g, 330.84 mmol) to afford **47g** (5.00 g, 86%).

$^1\text{H-RMN}$  (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz): 11.33-11.29 (m, 2H,  $H_1$  and  $H_3$ ), 7.68 (d, 1H,  $H_9$ ,  $J = 1.9$  Hz), 7.43 (dd, 1H,  $H_7$ ,  $J = 2.2$  Hz and  $J = 8.3$  Hz), 7.10 (d, 1H,  $H_6$ ,  $J = 8.3$  Hz), 2.31 (s, 3H,  $H_{11}$ ).

LC-MS (ESI)  $m/z = 175.2$   $[\text{M-H}]^-$

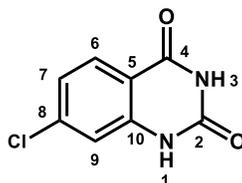
Molecular formula:  $\text{C}_9\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2$

Molecular weight: 176.18 g/mol

Melting point:  $>300$  °C

Aspect: white solid

### 7-Chloroquinazoline-2,4-(1H,3H)-dione (47h)



#### Procedure:

The same procedure as described for compound **47a** was used starting from commercial 2-amino-4-chlorobenzoic acid (1.0 eq., 10.00 g, 58.28 mmol) and urea (10.0 eq., 35.00 g, 582.82 mmol) to afford **47h** (10.00 g, 87%).

$^1\text{H-RMN}$  (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz): 11.41 (s, 1H,  $H_1$ ), 11.26 (s, 1H,  $H_3$ ), 7.87 (d, 1H,  $H_6$ ,  $J = 8.4$  Hz), 7.21 (dd, 1H,  $H_7$ ,  $J = 1.9$  Hz and  $J = 8.7$  Hz), 7.17 (d, 1H,  $H_9$ ,  $J = 1.6$  Hz).

LC-MS (ESI)  $m/z = 196.1, 198.1$   $[\text{M-H}]^-$

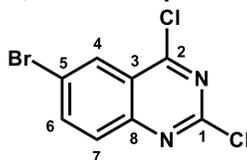
Molecular formula:  $\text{C}_8\text{H}_5\text{ClN}_2\text{O}_2$

Molecular weight: 196.59 g/mol

Melting point:  $>300$  °C

Aspect: white solid

### 6-Bromo-2,4-dichloroquinazoline (48a)



#### Procedure:

**47a** (1.0 eq., 5.00 g, 20.74 mmol) was added in  $\text{POCl}_3$  (10.0 eq., 19.33 mL, 207.43 mmol). The solution was stirred and heated at reflux overnight. The mixture was cooled to room temperature and concentrated *in*

*vacuo*. The residue was dissolved in chloroform and the solution was stirred for 5 minutes. Ice was added and the aqueous layer was extracted three times with chloroform. Combined organic layers were dried over  $\text{MgSO}_4$ , discolored with charcoal, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified using flash chromatography (cyclohexane/acetone: 10/0 to 9.5/0.5) to afford **48a** (2.36 g, 41%).

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz): 8.45 (d, 1H,  $\text{H}_4$ ,  $J = 2.3$  Hz), 8.08 (dd, 1H,  $\text{H}_6$ ,  $J = 2.2$  Hz and  $J = 9.0$  Hz), 7.91 (d, 1H,  $\text{H}_7$ ,  $J = 8.9$  Hz).

**LC-MS (ESI)**  $m/z$  found: 277.1, 279.1, 281.1  $[\text{M}+\text{H}]^+$

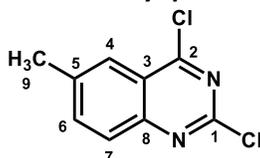
**Molecular formula:**  $\text{C}_8\text{H}_3\text{BrCl}_2\text{N}_2$

**Molecular weight:** 277.93 g/mol

**Melting point:** 153 °C

**Aspect:** white solid

#### 2,4-Dichloro-6-methylquinazoline (48b)



#### Procedure:

The same procedure as described for compound **48a** was used starting from **47b** (1.0 eq., 5.00 g, 28.38 mmol) in  $\text{POCl}_3$  (10.0 eq., 26.45 mL, 283.80 mmol). The crude product was purified using flash chromatography (cyclohexane/acetone: 10/0 to 9.5/0.5) to afford **48b** (2.40 g, 40%).

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz): 8.05 (m, 1H,  $\text{H}_4$ ), 8.02 (dd, 1H,  $\text{H}_6$ ,  $J = 1.8$  Hz and  $J = 8.7$  Hz), 7.94 (d, 1H,  $\text{H}_7$ ,  $J = 8.6$  Hz), 2.54 (s, 3H,  $\text{H}_9$ ).

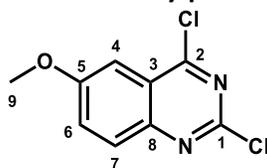
**LC-MS (ESI)**  $m/z = 213.1, 215.1$   $[\text{M}+\text{H}]^+$

**Molecular formula:**  $\text{C}_9\text{H}_6\text{Cl}_2\text{N}_2$

**Molecular weight:** 213.06 g/mol

**Melting point:** 135-140 °C

**Aspect:** white solid

**2,4-Dichloro-6-methoxyquinazoline (48c)****Procedure:**

The same procedure as described for compound **48a** was used starting from **47c** (1.0 eq., 4.00 g, 20.81 mmol) in POCl<sub>3</sub> (10.0 eq., 19.40 mL, 208.14 mmol). The crude product was purified using flash chromatography (cyclohexane/acetone: 10/0 to 9.5/0.5) to afford **48c** (850.0 mg, 18%).

<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, *J* Hz): 7.98 (d, 1H, H<sub>7</sub>, *J* = 9.3 Hz), 7.80 (dd, 1H, H<sub>6</sub>, *J* = 2.9 Hz and *J* = 9.2 Hz), 7.47 (d, 1H, H<sub>4</sub>, *J* = 2.9 Hz), 3.99 (s, 3H, H<sub>9</sub>).

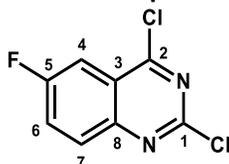
LC-MS (ESI) *m/z* = 229.2, 231.2 [M+H]<sup>+</sup>

**Molecular formula:** C<sub>9</sub>H<sub>6</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O

**Molecular weight:** 229.06 g/mol

**Melting point:** 170-171 °C

**Aspect:** yellow solid

**2,4-Dichloro-6-fluoroquinazoline (48d)****Procedure:**

The same procedure as described for compound **48a** was used starting from **47d** (1.0 eq., 5.00 g, 27.76 mmol) in POCl<sub>3</sub> (10.0 eq., 24.25 mL, 260.18 mmol). The crude product was purified using flash chromatography (cyclohexane/acetone: 10/0 to 9.5/0.5) to afford **48d** (2.40 g, 40%).

<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, *J* Hz): 8.04 (m, 1H, H<sub>7</sub>), 7.68 (m, 2H, H<sub>4</sub> and H<sub>6</sub>).

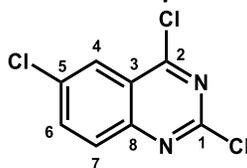
LC-MS (ESI) *m/z* = 217.2, 219.2 [M+H]<sup>+</sup>

**Molecular formula:** C<sub>8</sub>H<sub>3</sub>Cl<sub>2</sub>FN<sub>2</sub>

**Molecular weight:** 217.02 g/mol

**Melting point:** 136-137 °C

**Aspect:** yellow solid

**2,4-Dichloro-6-chloroquinazoline (48e)****Procedure:**

The same procedure as described for compound **48a** was used starting from **47e** (1.0 eq., 5.00 g, 25.43 mmol) in POCl<sub>3</sub> (10.0 eq., 23.71 mL, 254.34 mmol). The crude product was purified using flash chromatography (cyclohexane/acetone: 10/0 to 9.5/0.5) to afford **48e** (1.70 g, 29%).

<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, *J* Hz): 8.15 (m, 1H, H<sub>7</sub>), 8.08 (m, 2H, H<sub>4</sub> and H<sub>6</sub>).

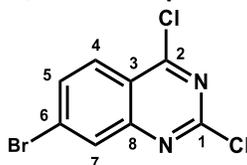
LC-MS (ESI) *m/z* = 233.3, 235.2 [M+H]<sup>+</sup>

**Molecular formula:** C<sub>8</sub>H<sub>3</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>2</sub>

**Molecular weight:** 233.48 g/mol

**Melting point:** 126-128 °C

**Aspect:** yellow solid

**7-Bromo-2,4-dichloroquinazoline (48f)****Procedure:**

The same procedure as described for compound **48a** was used starting from **47f** in POCl<sub>3</sub> (10.0 eq., 19.33 mL, 207.43 mmol). The crude product was purified using flash chromatography (cyclohexane/acetone: 10/0 to 9.5/0.5) to afford **48f** (2.00 g, 35%).

<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, *J* Hz): 8.36 (d, 1H, H<sub>7</sub>, *J* = 1.9 Hz), 8.23 (d, 1H, H<sub>4</sub>, *J* = 8.9 Hz), 8.05 (dd, 1H, H<sub>5</sub>, *J* = 1.9 Hz and *J* = 8.9 Hz).

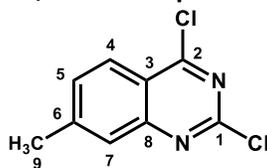
LC-MS (ESI) *m/z* found: 277.1, 279.1, 281.1 [M+H]<sup>+</sup>

**Molecular formula:** C<sub>8</sub>H<sub>3</sub>BrCl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>

**Molecular weight:** 277.93 g/mol

**Melting point:** 189-191 °C

**Aspect:** white solid

**7-Methyl-2,4-dichloroquinazoline (48g)****Procedure:**

The same procedure as described for compound **48a** was used starting from **47g** (1.0 eq., 5.00 g, 28.38 mmol) in POCl<sub>3</sub> (10.0 eq., 26.45 mL, 283.80 mmol). The crude product was purified using flash chromatography (cyclohexane/acetone: 10/0 to 9.5/0.5) to afford **48g** (3.27 g, 54%).

<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, *J* Hz): 8.15 (d, 1H, H<sub>4</sub>, *J* = 8.5 Hz), 7.80-7.77 (m, 1H), 7.60-7.55 (m, 1H), 2.64 (s, 3H, H<sub>9</sub>).

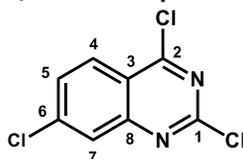
LC-MS (ESI) *m/z* found: 213.1, 215.1 [M+H]<sup>+</sup>

**Molecular formula:** C<sub>9</sub>H<sub>6</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>

**Molecular weight:** 213.06 g/mol

**Melting point:** 142 °C

**Aspect:** white solid

**7-Chloro-2,4-dichloroquinazoline (48h)****Procedure:**

The same procedure as described for compound **48a** was used starting from **47h** (1.0 eq., 5.00 g, 25.43 mmol) in POCl<sub>3</sub> (10.0 eq., 23.71 mL, 254.34 mmol). The crude product was purified using flash chromatography (cyclohexane/acetone: 10/0 to 9.5/0.5) to afford **48h** (1.35 g, 23%).

<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, *J* Hz): 7.86 (d, 1H, H<sub>4</sub>, *J* = 8.5 Hz), 7.25 (d, 1H, H<sub>7</sub>, *J* = 2.0 Hz), 7.47 (dd, 1H, H<sub>5</sub>, *J* = 2.0 Hz and *J* = 8.6 Hz).

LC-MS (ESI) *m/z* found: 232.9, 234.9 [M+H]<sup>+</sup>

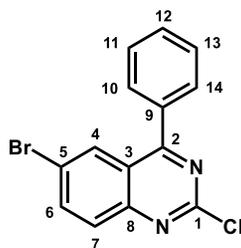
**Molecular formula:** C<sub>8</sub>H<sub>3</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>2</sub>

**Molecular weight:** 233.48 g/mol

**Melting point:** 130-132 °C

**Aspect:** yellow solid

**6-Bromo-2-chloro-4-phenylquinazoline (49a)**



**Procedure:**

To a solution of **48a** (1.0 eq., 1.50 g, 5.42 mmol) in dioxane (10 mL) and water (2.5 mL) were added phenylboronic acid (1.0 eq., 660.2 mg, 5.44 mmol),  $K_2CO_3$  (2.0 eq., 1.49 g, 10.79 mmol) and triphenylphosphine (0.04 eq., 57.0 mg, 0.22 mmol). The solution was degassed with nitrogen during 5 minutes and palladium acetate (0.02 eq., 24.0 mg, 0.11 mmol) was added. The solution was stirred and heated in an oil bath at 90 °C overnight. The mixture was cooled to room temperature and hydrolyzed with water. The aqueous layer was extracted three times with EtOAc. Combined organic layers were dried over  $MgSO_4$ , discolored with charcoal, filtered and concentrated *in vacuo*. The solid was taken up in PE, filtered and washed with MeOH to afford **49a** (810.7 mg, 47%).

$^1H$ -RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$  ppm, *J* Hz): 8.25 (dd, 1H, H<sub>6</sub>, *J* = 2.2 Hz et *J* = 9.0 Hz), 8.17 (d, 1H, H<sub>4</sub>, *J* = 1.9 Hz), 8.02 (d, 1H, H<sub>7</sub>, *J* = 9.0 Hz), 7.82 (m, 2H, H<sub>10</sub> and H<sub>14</sub>), 6.67 (m, 3H, H<sub>11</sub>, H<sub>12</sub> and H<sub>13</sub>).

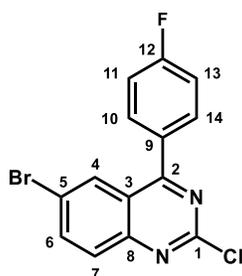
LC-MS (ESI) *m/z* = 319.2, 321.2, 322.2 [M+H]<sup>+</sup>

**Molecular formula:** C<sub>14</sub>H<sub>8</sub>BrClN<sub>2</sub>

**Molecular weight:** 319.59 g/mol

**Melting point:** 160-162 °C

**Aspect:** white solid

**6-Bromo-2-chloro-4-(4-fluorophenyl)quinazoline (49b)****Procedure:**

The same procedure as described for compound **49a** was used starting from **48a** (1.0 eq., 400.0 mg, 1.44 mmol), 4-fluorophenylboronic acid (1.0 eq., 201.4 mg, 1.44 mmol),  $K_2CO_3$  (2.0 eq., 397.8 mg, 2.88 mmol), triphenylphosphine (0.04 eq., 15.1 mg, 0.06 mmol) in dioxane (10 mL) and water (2.5 mL). The solution was degassed with nitrogen during 5 minutes and palladium acetate (0.02 eq., 24.0 mg, 0.11 mmol) was added. The solid was filtered to afford **49b** (213.7 mg, 35%).

$^1H$ -RMN ( $CDCl_3$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz): 8.26 (d, 1H,  $H_4$ ,  $J = 1.8$  Hz), 8.04 (dd, 1H,  $H_6$ ,  $J = 1.9$  Hz et  $J = 9.0$  Hz), 7.95 (d, 1H,  $H_7$ ,  $J = 9.0$  Hz), 7.83 (m, 2H,  $H_{10}$  and  $H_{14}$ ), 7.32 (m, 2H,  $H_{11}$  and  $H_{13}$ ).

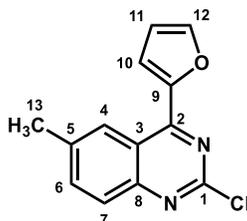
LC-MS (ESI)  $m/z = 339.2, 341.2, 343.2$   $[M+H]^+$

**Molecular formula:**  $C_{14}H_7BrFCIN_2$

**Molecular weight:** 337.58 g/mol

**Melting point:** 197-198 °C

**Aspect:** white solid

**2-Chloro-4-(furan-2-yl)-6-methylquinazoline (49c)****Procedure:**

To a solution of **48b** (1.0 eq., 1.00 g, 4.69 mmol) in dioxane (10 mL) were added tributyl(furan-2-yl)stannane (1.0 eq., 1.48 mL, 4.69 mmol) and triphenylphosphine (0.04 eq., 49.0 mg, 0.19 mmol). The solution was degassed with nitrogen during 5 minutes and palladium acetate (0.02 eq., 21.0 mg, 0.09 mmol) was added. The solution was stirred and heated in an oil bath at 40 °C overnight. The mixture was cooled to room temperature and hydrolyzed with water. The aqueous layer was extracted three times with EtOAc. Combined organic layers were dried over  $MgSO_4$ , discolored with charcoal, filtered and

concentrated *in vacuo* to give a yellow oil. The crude product was taken up in PE and filtered to afford **49c** (840.5 mg, 73%).

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm, J Hz): 8.59 (m, 1H, H<sub>4</sub>), 8.23 (dd, 1H, H<sub>12</sub>, J = 0.6 Hz and J = 1.7 Hz), 7.90 (dd, 1H, H<sub>6</sub>, J = 1.9 Hz and J = 8.8 Hz), 7.85 (d, 1H, H<sub>7</sub>, J = 8.6 Hz), 7.71 (dd, 1H, H<sub>10</sub>, J = 0.6 Hz and J = 3.7 Hz), 6.88 (dd, 1H, H<sub>11</sub>, J = 1.7 Hz and J = 3.7 Hz), 2.56 (s, 3H, H<sub>13</sub>).

LC-MS (ESI) m/z = 245.1, 247.1 [M+H]<sup>+</sup>

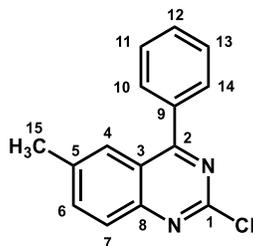
**Molecular formula:** C<sub>13</sub>H<sub>9</sub>ClN<sub>2</sub>O

**Molecular weight:** 244.68 g/mol

**Melting point:** 73 °C

**Aspect:** yellow solid

### 2-Chloro-6-methyl-4-phenylquinazoline (49d)



#### Procedure:

The same procedure as described for compound **49a** was used starting from **48b** (1.0 eq., 400.0 mg, 1.88 mmol), phenylboronic acid (1.2 eq., 274.7 mg, 2.25 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2.0 eq., 518.93 mg, 3.75 mmol), triphenylphosphine (0.04 eq., 19.7 mg, 0.08 mmol) in dioxane (40 mL) and water (10 mL). The solution was degassed with nitrogen during 5 minutes and palladium acetate (0.02 eq., 8.43 mg, 0.04 mmol) was added. The solid was filtered to afford **49d** (300.0 mg, 63%).

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm, J Hz): 7.81 (m, 5H), 7.65 (m, 2H), 6.50 (m, 1H), 2.48 (s, 3H, H<sub>15</sub>).

LC-MS (ESI) m/z = 255.2, 257.2 [M+H]<sup>+</sup>

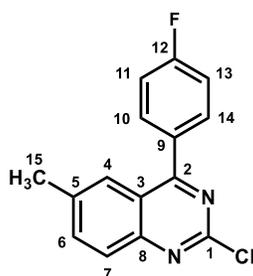
**Molecular formula:** C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>ClN<sub>2</sub>

**Molecular weight:** 254.72 g/mol

**Melting point:** 154-155 °C

**Aspect:** white solid

## 2-Chloro-4-(4-fluorophenyl)-6-methylquinazoline (49e)

**Procedure:**

The same procedure as described for compound **49a** was used starting from **48b** (1.0 eq., 1.38 g, 6.48 mmol), 4-fluorophenylboronic acid (1.0 eq., 906.3 mg, 6.48 mmol),  $K_2CO_3$  (2.0 eq., 1.79 g, 12.95 mmol), triphenylphosphine (0.04 eq., 67.9 mg, 0.26 mmol) in dioxane (40 mL) and water (10 mL). The solution was degassed with nitrogen during 5 minutes and palladium acetate (0.02 eq., 29.1 mg, 0.13 mmol) was added. The solid was filtered to afford **49e** (1.20 g, 68%).

$^1H$ -RMN ( $CDCl_3$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz): 7.97 (d, 1H,  $H_7$ ,  $J = 8.7$  Hz), 7.82 (m, 4H), 7.30 (m, 2H), 2.55 (s, 3H,  $H_{15}$ ).

LC-MS (ESI)  $m/z = 273.1, 275.1 [M+H]^+$

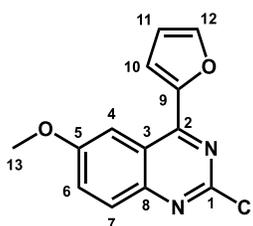
**Molecular formula:**  $C_{15}H_{10}ClFN_2$

**Molecular weight:** 272.71 g/mol

**Melting point:** 161-163 °C

**Aspect:** white solid

## 2-Chloro-4-(furan-2-yl)-6-methoxyquinazoline (49f)

**Procedure:**

The same procedure as described for compound **49c** was used starting from **48c** (1.0 eq., 500.0 mg, 2.18 mmol), tributyl(furan-2-yl)stannane (1.0 eq., 1.48 mL, 4.69 mmol) and triphenylphosphine (0.04 eq., 23.0 mg, 0.09 mmol) in dioxane (10 mL). The solution was degassed with nitrogen during 5 minutes and palladium acetate (0.02 eq., 9.8 mg, 0.04 mmol) was added. The solution was stirred and heated in an oil bath at 40 °C overnight. The crude product was taken up in PE and filtered to afford **49f** (470.1 mg, 83%).

**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm, J Hz):** 8.22 (m, 1H, H<sub>4</sub>), 7.91 (dd, 1H, H<sub>12</sub>, *J* = 0.6 Hz and *J* = 1.7 Hz), 7.83 (dd, 1H, H<sub>6</sub>, *J* = 1.9 Hz and *J* = 8.8 Hz), 7.66 (d, 1H, H<sub>7</sub>, *J* = 8.6 Hz), 7.56 (dd, 1H, H<sub>10</sub>, *J* = 0.6 Hz and *J* = 3.7 Hz), 6.73 (dd, 1H, H<sub>11</sub>, *J* = 1.7 Hz and *J* = 3.7 Hz), 4.02 (s, 3H, H<sub>13</sub>).

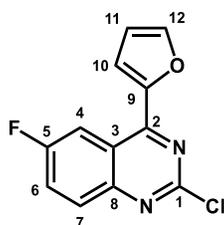
**LC-MS (ESI) m/z =** 261.2, 263.1 [M+H]<sup>+</sup>

**Molecular formula:** C<sub>13</sub>H<sub>9</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

**Molecular weight:** 260.68 g/mol

**Aspect:** green solid

**2-Chloro-4-(furan-2-yl)-6-fluoroquinazoline (49g)**



**Procedure:**

The same procedure as described for compound **49c** was used starting from **48d** (1.0 eq., 400.0 mg, 1.84 mmol), tributyl(furan-2-yl)stannane (1.0 eq., 0.52 mL, 1.84 mmol) and triphenylphosphine (0.04 eq., 19.4 mg, 0.07 mmol) in dioxane (10 mL). The solution was degassed with nitrogen during 5 minutes and palladium acetate (0.02 eq., 8.3 mg, 0.04 mmol) was added. The solution was stirred and heated in an oil bath at 40 °C overnight. The crude product was taken up in PE and filtered to afford **49g** (248.6 mg, 54%).

**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm, J Hz):** 8.64 (dd, 1H, H<sub>6</sub>, *J* = 2.9 Hz and *J* = 9.8 Hz), 8.02 (dd, 1H, H<sub>7</sub>, *J* = 5.4 Hz and *J* = 9.4 Hz), 7.85 (dd, 1H, H<sub>12</sub>, *J* = 0.9 Hz and *J* = 1.8 Hz), 7.72 (m, 2H, H<sub>4</sub> and H<sub>10</sub>), 6.74 (dd, 1H, H<sub>11</sub>, *J* = 1.6 Hz and *J* = 3.6 Hz).

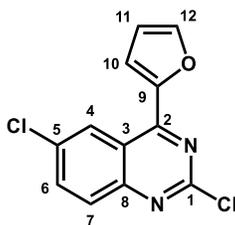
**LC-MS (ESI) m/z =** 249.2, 251.2 [M+H]<sup>+</sup>

**Molecular formula:** C<sub>12</sub>H<sub>6</sub>ClFN<sub>2</sub>O

**Molecular weight:** 248.64 g/mol

**Aspect:** yellow solid

## 2-Chloro-4-(furan-2-yl)-6-chloroquinazoline (49h)

**Procedure:**

The same procedure as described for compound **49c** was used starting from **48e** (1.0 eq., 500.0 mg, 2.14 mmol), tributyl(furan-2-yl)stannane (1.0 eq., 0.67 mL, 2.14 mmol) and triphenylphosphine (0.04 eq., 22.5 mg, 0.09 mmol) in dioxane (10 mL). The solution was degassed with nitrogen during 5 minutes and palladium acetate (0.02 eq., 9.6 mg, 0.04 mmol) was added. The solution was stirred and heated in an oil bath at 40 °C overnight. The crude product was taken up in PE and filtered to afford **49h** (250.0 mg, 44%).

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm, J Hz): 8.98 (dd, 1H, H<sub>4</sub>, J = 0.5 Hz and J = 2.2 Hz), 7.93 (dd, 1H, H<sub>7</sub>, J = 0.5 Hz and J = 9.1 Hz), 7.87 (m, 2H, H<sub>6</sub> and H<sub>12</sub>), 7.74 (dd, 1H, H<sub>10</sub>, J = 0.8 Hz and J = 3.6 Hz), 6.74 (dd, 1H, H<sub>11</sub>, J = 1.8 Hz and J = 3.7 Hz).

LC-MS (ESI) m/z = 265.1, 267.1 [M+H]<sup>+</sup>

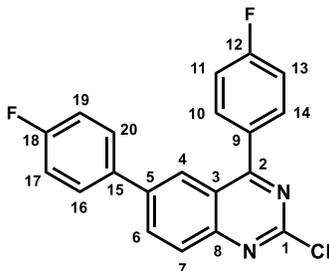
**Molecular formula:** C<sub>12</sub>H<sub>6</sub>ClFN<sub>2</sub>O

**Molecular weight:** 248.64 g/mol

**Melting point:** 209-211 °C

**Aspect:** yellow solid

## 2-Chloro-4,6-bis(4-fluorophenyl)quinazoline (49i)

**Procedure:**

The same procedure as described for compound **49a** was used starting from **48a** (1.0 eq., 1.00 g, 3.59 mmol), 4-fluorophenylboronic acid (1.2 eq., 604.0 mg, 4.32 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2.0 eq., 990.0 mg, 7.20 mmol), triphenylphosphine (0.04 eq., 38.0 mg, 0.14 mmol) in dioxane (12 mL) and water (3 mL). The solution was degassed with nitrogen during 5 minutes and palladium acetate (0.02 eq., 16.0 mg, 0.07 mmol) was added. The solid was filtered to afford **49i** (787.0 mg, 62%).

$^1\text{H NMR}$  (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz): 7.34 (m, 2H), 7.49 (m, 2H), 7.81 (m, 2H), 7.97 (m, 2H), 8.12 (d, 1H,  $H_7$ ,  $J = 8.8$  Hz), 8.18 (d, 1H,  $H_4$ ,  $J = 1.7$  Hz), 8.40 (dd, 1H,  $H_6$ ,  $J = 2.1$  et 8.8 Hz).

LC-MS (ESI)  $m/z = 353.2, 355.2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$

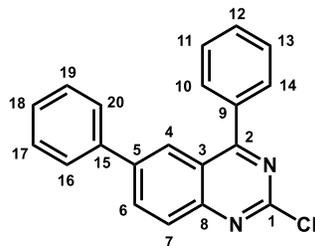
Molecular formula:  $\text{C}_{20}\text{H}_{11}\text{ClF}_2\text{N}_2$

Molecular weight: 352.77 g/mol

Melting point: 185 °C

Aspect: yellow solid

### 2-Chloro-4,6-diphenylquinazoline (49j)



#### Procedure:

The same procedure as described for compound **49a** was used starting from **48a** (1.0 eq., 400.0 mg, 1.44 mmol), phenylboronic acid (2.0 eq., 351.0 mg, 2.88 mmol),  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (2.0 eq., 397.9 mg, 2.88 mmol), triphenylphosphine (0.04 eq., 15.1 mg, 0.06 mmol) in dioxane (12 mL) and water (3 mL). The solution was degassed with nitrogen during 5 minutes and palladium acetate (0.02 eq., 4.8 mg, 0.03 mmol) was added. The solid was filtered to afford **49j** (212.0 mg, 62%).

$^1\text{H NMR}$  (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz): 8.32 (m, 2H), 8.24 (m, 1H), 7.89-7.86 (m, 2H), 7.65-7.62 (m, 5H), 7.54-7.44 (m, 4H).

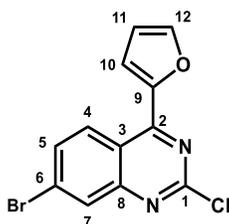
LC-MS (ESI)  $m/z = 317.3, 319.3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$

Molecular formula:  $\text{C}_{20}\text{H}_{13}\text{ClN}_2$

Molecular weight: 316.79 g/mol

Melting point: 168-170 °C

Aspect: yellow solid

**7-Bromo-2-chloro-4-(2-furan)quinazoline (49k)****Procedure:**

The same procedure as described for compound **49a** was used starting from **48f** (1.0 eq., 600.0 mg, 2.16 mmol), 2-furanboronic acid (1.0 eq., 241.5 mg, 2.16 mmol),  $K_2CO_3$  (2.0 eq., 596.7 mg, 4.32 mmol), triphenylphosphine (0.04 eq., 22.6 mg, 0.09 mmol) in dioxane (10 mL) and water (2.5 mL). The solution was degassed with nitrogen during 5 minutes and palladium acetate (0.02 eq., 9.7 mg, 0.04 mmol) was added. The crude product was purified using flash chromatography (cyclohexane/EtOAc (7/3)) to afford **49k** (194.0 mg, 29%).

$^1H$ -RMN ( $CDCl_3$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz): 9.14 (d, 1H,  $H_7$ ,  $J = 2.1$  Hz), 8.00 (dd, 1H,  $H_5$ ,  $J = 2.1$  Hz et  $J = 9.0$  Hz), 7.89 (m, 2H,  $H_4$  and  $H_{12}$ ), 7.75 (dd, 1H,  $H_{10}$ ,  $J = 0.8$  Hz et  $J = 3.6$  Hz) , 6.74 (dd, 1H,  $H_{11}$ ,  $J = 1.6$  Hz et  $J = 3.6$  Hz).

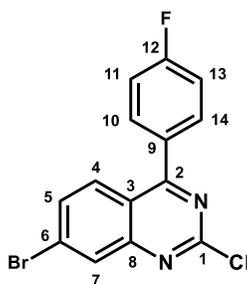
LC-MS (ESI)  $m/z = 309.0, 311.0, 312.9$   $[M+H]^+$

**Molecular formula:**  $C_{12}H_6BrClN_2O$

**Molecular weight:** 309.55 g/mol

**Melting point:** 129-131 °C

**Aspect:** yellow solid

**7-Bromo-2-chloro-4-(4-fluorophenyl)quinazoline (49l)****Procedure:**

The same procedure as described for compound **49a** was used starting from **48f** (1.0 eq., 2.00 g, 7.20 mmol), 4-fluorophenylboronic acid (1.0 eq., 1.11 g, 7.92 mmol),  $K_2CO_3$  (2.0 eq., 1.99 g, 14.39 mmol), triphenylphosphine (0.04 eq., 75.0 mg, 0.29 mmol) in dioxane (10 mL) and water (2.5 mL). The solution was degassed with nitrogen during 5 minutes and palladium acetate (0.02 eq., 32.0 mg, 0.14 mmol) was

added. The crude product was purified by flash chromatography (cyclohexane/EtOAc (7/3)) **49l** (851.0 mg, 35%).

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm, J Hz): 8.29 (d, 1H, H<sub>7</sub>, J = 1.7 Hz), 8.10 (dd, 1H, H<sub>5</sub>, J = 1.9 Hz et J = 9.1 Hz), 7.95 (d, 1H, H<sub>4</sub>, J = 9.0 Hz), 7.82 (m, 2H, H<sub>10</sub> and H<sub>14</sub>), 7.29 (m, 2H, H<sub>11</sub> and H<sub>13</sub>).

LC-MS (ESI) m/z = 339.2, 341.2, 343.2 [M+H]<sup>+</sup>

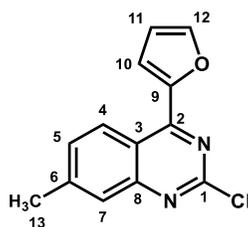
**Molecular formula:** C<sub>14</sub>H<sub>7</sub>BrFCIN<sub>2</sub>

**Molecular weight:** 337.58 g/mol

**Melting point:** 197-198 °C

**Aspect:** white solid

### 2-Chloro-4-(furan-2-yl)-7-methylquinazoline (49m)



#### Procedure:

The same procedure as described for compound **49c** was used starting from **48g** (1.0 eq., 250.0 mg, 1.17 mmol), tributyl(furan-2-yl)stannane (1.0 eq., 0.37 mL, 1.17 mmol) and triphenylphosphine (0.04 eq., 12.3 mg, 0.05 mmol) in dioxane (10 mL). The solution was degassed with nitrogen during 5 minutes and palladium acetate (0.02 eq., 5.3 mg, 0.02 mmol) was added. The solution was stirred and heated in an oil bath at 40 °C overnight. The crude product was taken up in PE and filtered to afford **49m** (140.0 mg, 50%).

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm, J Hz): 8.82 (d, 1H, H<sub>4</sub>, J = 8.7 Hz), 7.83 (m, 1H), 7.76 (m, 1H), 7.67 (d, 1H, H<sub>10</sub>, J = 3.7 Hz), 7.52 (dd, 1H, H<sub>5</sub>, J = 1.4 Hz and J = 8.7 Hz), 6.72 (dd, 1H, H<sub>11</sub>, J = 1.5 Hz and J = 3.5 Hz), 2.62 (s, 3H, H<sub>13</sub>).

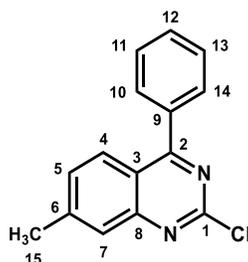
LC-MS (ESI) m/z = 245.2, 247.2 [M+H]<sup>+</sup>

**Molecular formula:** C<sub>13</sub>H<sub>9</sub>ClN<sub>2</sub>O

**Molecular weight:** 244.68 g/mol

**Melting point:** 184-186 °C

**Aspect:** yellow solid

**2-Chloro-4-phenyl-7-methylquinazoline (49n)****Procedure:**

The same procedure as described for compound **49a** was used starting from **48g** (1.0 eq., 300.0 mg, 1.41 mmol), phenylboronic acid (1.1 eq., 217 mg, 1.55 mmol),  $K_2CO_3$  (2.0 eq., 389.0 mg, 2.82 mmol), triphenylphosphine (0.04 eq., 15.0 mg, 0.06 mmol) in dioxane (12 mL) and water (3 mL). The solution was degassed with nitrogen during 5 minutes and palladium acetate (0.02 eq., 6.0 mg, 0.03 mmol) was added. The crude product was purified by flash chromatography (cyclohexane/EtOAc (4/6)) **49n** (300.0 mg, 78%).

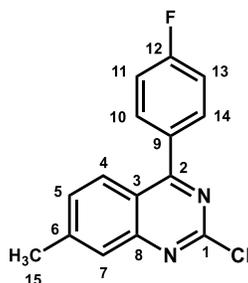
$^1H$ -RMN ( $CDCl_3$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz): 8.00 (d, 1H,  $H_4$ ,  $J = 8.6$  Hz), 7.86-7.79 (m, 3H), 7.50-7.45 (m, 1H), 7.34-7.25 (m, 2H), 2.64 (s, 3H,  $H_{15}$ ).

LC-MS (ESI)  $m/z = 254.0, 256.0$   $[M+H]^+$

**Molecular formula:**  $C_{15}H_{11}ClN_2$

**Molecular weight:** 254.72 g/mol

**Aspect:** white solid

**2-Chloro-4-(4-fluorophenyl)-7-methylquinazoline (49o)****Procedure:**

The same procedure as described for compound **49a** was used starting from **48g** (1.0 eq., 300.0 mg, 1.41 mmol), 4-fluorophenylboronic acid (1.1 eq., 217 mg, 1.55 mmol),  $K_2CO_3$  (2.0 eq., 389.0 mg, 2.82 mmol), triphenylphosphine (0.04 eq., 15.0 mg, 0.06 mmol) in dioxane (12 mL) and water (3 mL). The solution was degassed with nitrogen during 5 minutes and palladium acetate (0.02 eq., 6.0 mg, 0.03 mmol) was added. The crude product was purified by flash chromatography (cyclohexane/EtOAc (4/6)) **49o** (300.0 mg, 78%).

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz): 8.00 (d, 1H,  $H_4$ ,  $J = 8.6$  Hz), 7.86-7.79 (m, 3H), 7.50-7.45 (m, 1H), 7.34-7.25 (m, 2H), 2.64 (s, 3H,  $H_{15}$ ).

**LC-MS (ESI)**  $m/z = 273.2, 275.2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$

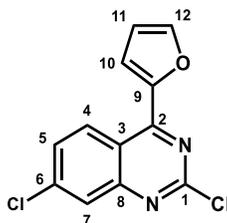
**Molecular formula:**  $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{ClFN}_2$

**Molecular weight:** 272.71 g/mol

**Melting point:** 141 °C

**Aspect:** white solid

**2-Chloro-4-(furan-2-yl)-7-chloroquinazoline (49p)**



**Procedure:**

The same procedure as described for compound **49c** was used starting from **48h** (1.0 eq., 400.0 mg, 1.71 mmol), tributyl(furan-2-yl)stannane (1.0 eq., 0.54 mL, 1.71 mmol) and triphenylphosphine (0.04 eq., 18.0 mg, 0.07 mmol) in dioxane (10 mL). The solution was degassed with nitrogen during 5 minutes and palladium acetate (0.02 eq., 7.7 mg, 0.03 mmol) was added. The solution was stirred and heated in an oil bath at 40 °C overnight. The crude product was taken up in PE and filtered to afford **49p** (200.0 mg, 44%).

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz): 8.92 (d, 1H,  $H_4$ ,  $J = 9.2$  Hz), 7.96 (d, 1H,  $H_7$ ,  $J = 2.2$  Hz), 7.85 (m, 1H,  $H_{12}$ ), 7.74 (d, 1H,  $H_{10}$ ,  $J = 3.8$  Hz), 7.64 (dd, 1H,  $H_5$ ,  $J = 2.2$  Hz and  $J = 9.2$  Hz), 6.73 (dd, 1H,  $H_{11}$ ,  $J = 1.8$  Hz and  $J = 3.6$  Hz).

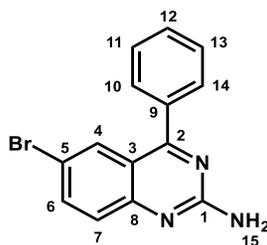
**LC-MS (ESI)**  $m/z = 265.0, 267.0$   $[\text{M}+\text{H}]^+$

**Molecular formula:**  $\text{C}_{12}\text{H}_6\text{ClN}_2\text{O}$

**Molecular weight:** 265.09 g/mol

**Melting point:** 133-135 °C

**Aspect:** yellow solid

**2-Amino-6-bromo-4-phenylquinazoline (50a)****Procedure:**

To a sealed tube was added a solution of **49a** (1.0 eq., 270.0 mg, 0.84 mmol) in MeOH. The solution was degassed with ammonia during 5 minutes then stirred and heated at 100 °C in an oil bath overnight. The solution was cooled to room temperature and the solid was filtered to afford **50a** (50.2 mg, 20%).

**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, *J* Hz):** 7.81 (dd, 1H, H<sub>6</sub>, *J* = 2.2 Hz and *J* = 8.9 Hz), 7.75 (d, 1H, H<sub>4</sub>, *J* = 2.2 Hz), 7.68 (m, 2H, H<sub>10</sub> and H<sub>14</sub>), 7.60 (m, 3H, H<sub>11</sub>, H<sub>12</sub> and H<sub>13</sub>), 7.46 (d, 1H, H<sub>7</sub>, *J* = 8.9 Hz), 7.09 (s, 2H, H<sub>15</sub>).

**<sup>13</sup>C-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, *J* Hz):** 169.2 (C<sub>1</sub>), 160.9 (C<sub>2</sub>), 152.5 (C<sub>8</sub>), 137.0 (C<sub>6</sub>), 136.9 (C<sub>9</sub>), 130.4 (C<sub>12</sub>), 129.7 (C<sub>4</sub>), 129.1 (C<sub>11</sub> and C<sub>13</sub>), 129.0 (C<sub>7</sub>), 128.2 (C<sub>10</sub> and C<sub>14</sub>), 119.0 (C<sub>5</sub>), 114.0 (C<sub>3</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z* =** 299.9, 301.9 [M+H]<sup>+</sup>

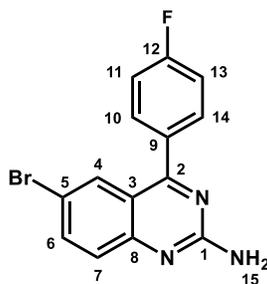
**UPLC:** C18 column: *t<sub>R</sub>* = 2.8 min, purity = 96.2 %

**Molecular formula:** C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>BrN<sub>3</sub>

**Molecular weight:** 300.16 g/mol

**Melting point:** 204-207 °C

**Aspect:** yellow solid

**2-Amino-6-bromo-4-(4-fluorophenyl)quinazoline (50b)****Procedure:**

The same procedure as described for compound **50a** was used starting from **49b** (1.0 eq., 200.0 mg, 0.59 mmol) in MeOH. The crude product was purified using flash chromatography (cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 5/5) to afford **50b** (28.0 mg, 15%).

**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, J Hz):** 7.81 (m, 5H, H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>7</sub>, H<sub>10</sub> and H<sub>14</sub>), 7.44 (m, 2H, H<sub>11</sub> and H<sub>13</sub>), 7.17 (s, 2H, H<sub>15</sub>).

**<sup>13</sup>C-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, J Hz):** 168.4 (C<sub>12</sub> (d, J = 243.2 Hz)), 161.9 (C<sub>1</sub>), 160.5 (C<sub>2</sub>), 152.0 (C<sub>8</sub>), 137.2 (C<sub>6</sub>), 133.2 (C<sub>9</sub> (d, J = 3.0 Hz)), 132.3 (C<sub>10</sub> and C<sub>14</sub> (d, J = 8.3 Hz)), 129.1 (C<sub>4</sub>), 127.84 (C<sub>7</sub>), 119.0 (C<sub>5</sub>), 116.01 (C<sub>11</sub> and C<sub>13</sub> (d, J = 21.8 Hz)), 114.3 (C<sub>3</sub>).

**LC-MS (ESI) m/z =** 317.9, 319.9 [M+H]<sup>+</sup>

**UPLC:** C18 column: t<sub>R</sub> = 2.9 min, purity = 94.8 %

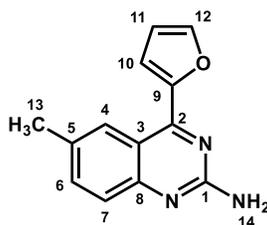
**Molecular formula:** C<sub>14</sub>H<sub>9</sub>FBrN<sub>3</sub>

**Molecular weight:** 318.15 g/mol

**Melting point:** 200-205 °C

**Aspect:** yellow solid

#### 4-(furan-2-yl)-6-methylquinazolin-2-amine (50c)



#### Procedure:

To a solution of **49c** (1.0 eq., 300.0 mg, 1.23 mmol) were added DIPEA (2.5 eq., 0.53 mL, 3.06 mmol) and 4-methoxybenzylamine (2.0 eq., 0.32 mL, 2.45 mmol) in dioxane. The mixture was stirred and heated at reflux overnight. The solution was cooled to room temperature and hydrolyzed with water. The aqueous layer was extracted three times with EtOAc. Combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated *in vacuo*. This intermediate was not isolated and the next step was carried out without any further purification. The crude product was dissolved in TFA (10 mL) and the mixture was stirred at room temperature for 72h. A saturated aqueous solution of sodium bicarbonate was added up to basic pH. Aqueous layer was extracted three times with EtOAc. Combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by flash chromatography (DCM/MeOH (9/1)) to afford **50c** (30.0 mg, 38%).

**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, J Hz):** 8.25 (m, 1H), 8.09 (m, 1H), 7.56 (dd, 1H, H<sub>6</sub>, J = 2.1 Hz and J = 8.8 Hz), 7.42-7.38 (m, 2H), 6.80 (dd, 1H, H<sub>11</sub>, J = 1.9 Hz and J = 3.5 Hz), 6.71 (s, 2H, H<sub>14</sub>), 2.43 (s, 3H, H<sub>13</sub>).

**<sup>13</sup>C-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, J Hz):** 165.0 (C<sub>1</sub>), 160.7 (C<sub>9</sub>), 157.6 (C<sub>2</sub>), 157.2 (C<sub>8</sub>), 151.4 (C<sub>12</sub>), 141.0 (C<sub>6</sub>), 136.7 (C<sub>5</sub>), 130.6 (C<sub>4</sub>), 130.1 (C<sub>3</sub>), 120.7 (C<sub>7</sub>), 120.4 (C<sub>11</sub>), 117.5 (C<sub>10</sub>), 26.3 (C<sub>13</sub>).

**LC-MS (ESI) m/z =** 226.2 [M+H]<sup>+</sup>

**UPLC:** C18 column: t<sub>R</sub> = 1.8 min, purity = 95.5 %

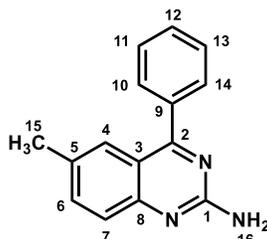
**Molecular formula:** C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>O

**Molecular weight:** 225.25 g/mol

**Melting point:** 157-159 °C

**Aspect:** yellow solid

**2-Amino-4-phenyl-6-methylquinazoline (50d)**



**Procedure:**

The same procedure as described for compound **50c** was used starting from compound **49d** (1.0 eq., 200.0 mg, 0.79 mmol), DIPEA (2.5 eq., 0.34 mL, 1.96 mmol) and 4-methoxybenzylamine (2.0 eq., 0.21 mL, 1.57 mmol) in dioxane. The crude product was purified by flash chromatography (DCM/MeOH (9/1)) to afford **50d** (27.0 mg, 41%).

**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, J Hz):** 7.81 (m, 1H), 7.76 (m, 2H), 7.65 (m, 5H), 2.39 (s, 3H, H<sub>15</sub>).

**<sup>13</sup>C-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, J Hz):** 174.5 (C<sub>1</sub>), 159.3 (C<sub>2</sub>), 155.8 (C<sub>8</sub>), 138.6 (C<sub>6</sub>), 136.1 (C<sub>5</sub>), 134.9 (C<sub>9</sub>), 131.5 (C<sub>4</sub>), 130.1 (C<sub>11</sub> and C<sub>13</sub>), 129.1 (C<sub>12</sub>), 127.8 (C<sub>10</sub> and C<sub>14</sub>), 119.4 (C<sub>7</sub>), 117.1 (C<sub>3</sub>), 21.2 (C<sub>15</sub>).

**LC-MS (ESI) m/z = 236.3 [M+H]<sup>+</sup>**

**UPLC:** C18 column: t<sub>R</sub> = 1.9 min, purity > 99.0 %

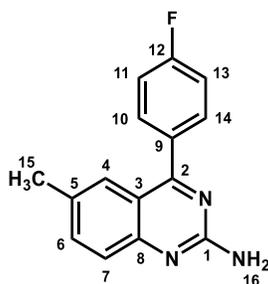
**Molecular formula:** C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>

**Molecular weight:** 235.29 g/mol

**Melting point:** 190-192 °C

**Aspect:** yellow solid

## 2-Amino-4-(4-fluorophenyl)-6-methylquinazoline (50e)

**Procedure:**

The same procedure as described for compound **50a** was used starting from **49e** (1.0 eq., 450.0 mg, 1.65 mmol) in MeOH. The crude product was purified using flash chromatography (cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 5/5) to afford **50e** (37.4 mg, 10%).

**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, *J* Hz):** 7.70 (m, 2H), 7.53 (m, 1H), 7.44 (m, 4H), 6.78 (s, 2H, H<sub>16</sub>), 3.07 (s, 3H, H<sub>15</sub>).

**<sup>13</sup>C-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, *J* Hz):** 168.1 (C<sub>12</sub> (d, *J* = 236.3 Hz)), 161.7 (C<sub>1</sub>), 160.3 (C<sub>2</sub>), 152.2 (C<sub>8</sub>), 136.2, 134.1 (C<sub>9</sub> (d, *J* = 3.4 Hz)), 132.1, 131.6, 125.8 (C<sub>10</sub> and C<sub>14</sub> (d, *J* = 8.2 Hz)), 117.6 (C<sub>3</sub>), 115.2 (C<sub>11</sub> and C<sub>13</sub> (d, *J* = 21.1 Hz)), 21.3 (CH<sub>3</sub>).

**LC-MS (ESI) m/z = 254.0 [M+H]<sup>+</sup>**

**UPLC:** C18 column: t<sub>R</sub> = 2.6 min, purity = 95.2 %

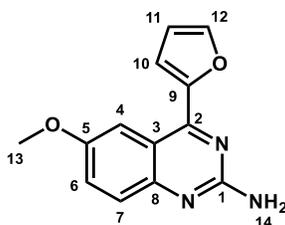
**Molecular formula:** C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>FN<sub>3</sub>

**Molecular weight:** 253.28 g/mol

**Melting point:** 180-182 °C

**Aspect:** yellow solid

## 4-(Furan-2-yl)-6-methoxyquinazolin-2-amine (50f)

**Procedure:**

The same procedure as described for compound **50c** was used starting from **49f** (1.0 eq., 200.0 mg, 0.77 mmol), DIPEA (2.5 eq., 0.33 mL, 1.92 mmol) and 4-methoxybenzylamine (2.0 eq., 0.20 mL, 1.53 mmol) in dioxane. The crude product was purified by flash chromatography (DCM/MeOH (9/1)) to afford **50f** (45.0 mg, 56%).

**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, J Hz):** 8.09 (dd, 1H, H<sub>12</sub>, *J* = 0.8 Hz and *J* = 1.8 Hz), 7.83 (m, 1H), 7.43 (m, 3H), 6.80 (dd, 1H, H<sub>11</sub>, *J* = 1.8 Hz and *J* = 3.5 Hz), 6.62 (s, 2H, H<sub>14</sub>), 3.86 (s, 3H, H<sub>13</sub>).

**<sup>13</sup>C-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, J Hz):** 159.8 (C<sub>1</sub>), 155.2 (C<sub>9</sub>), 154.8 (C<sub>5</sub>), 152.5 (C<sub>2</sub>), 150.4 (C<sub>8</sub>), 146.6 (C<sub>12</sub>), 127.6 (C<sub>7</sub>), 126.4 (C<sub>6</sub>), 116.1 (C<sub>3</sub>), 115.5 (C<sub>11</sub>), 112.8 (C<sub>10</sub>), 104.9 (C<sub>4</sub>), 55.8 (C<sub>13</sub>).

**LC-MS (ESI) m/z = 242.2 [M+H]<sup>+</sup>**

**UPLC:** C18 column: t<sub>R</sub> = 1.7 min, purity > 99.0 %

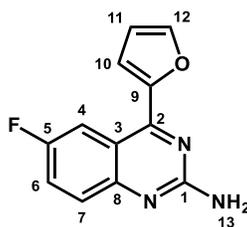
**Molecular formula:** C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>

**Molecular weight:** 241.25 g/mol

**Melting point:** 169-171 °C

**Aspect:** yellow solid

### 6-Fluoro-4-(furan-2-yl)quinazolin-2-amine (50g)



#### Procedure:

The same procedure as described for compound **50c** was used starting from **49g** (1.0 eq., 200.0 mg, 0.80 mmol), DIPEA (2.5 eq., 0.35 mL, 2.01 mmol) and 4-methoxybenzylamine (2.0 eq., 0.21 mL, 1.61 mmol) in dioxane. The crude product was purified by flash chromatography (DCM/MeOH (9/1)) to afford **50g** (45.0 mg, 46%).

**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, J Hz):** 8.23 (dd, 1H, H<sub>6</sub>, *J* = 2.9 Hz and *J* = 10.4 Hz), 8.11 (m, 1H), 7.69-7.62 (m, 1H), 7.54 (m, 1H), 7.46 (m, 1H), 6.82 (m, 1H), 6.80 (s, 2H, H<sub>13</sub>).

**<sup>13</sup>C-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, J Hz):** 160.5 (C<sub>1</sub>), 159.0 (C<sub>5</sub> (d, *J* = 238.5 Hz)), 156.1 (C<sub>8</sub> (d, *J* = 5.3 Hz)), 152.4 (C<sub>9</sub>), 151.7, 147.1, 128.5 (C<sub>7</sub> (d, *J* = 8.3 Hz)), 124.1 (C<sub>6</sub> (d, *J* = 25.5 Hz)), 115.9 (C<sub>3</sub> (d, *J* = 9.1 Hz)), 112.9, 110.3 (C<sub>4</sub> (d, *J* = 24.0 Hz)).

**LC-MS (ESI) m/z = 230.2 [M+H]<sup>+</sup>**

**UPLC:** C18 column: t<sub>R</sub> = 1.8 min, purity > 99.0 %

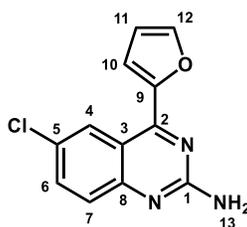
**Molecular formula:** C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>N<sub>3</sub>O

**Molecular weight:** 229.25 g/mol

**Melting point:** 181-183 °C

**Aspect:** yellow solid

## 6-Chloro-4-(furan-2-yl)quinazolin-2-amine (50h)

**Procedure:**

The same procedure as described for compound **50c** was used starting from **49h** (1.0 eq., 250.0 mg, 0.94 mmol), DIPEA (2.5 eq., 0.41 mL, 2.36 mmol) and 4-methoxybenzylamine (2.0 eq., 0.25 mL, 1.89 mmol) in dioxane. The crude product was purified by flash chromatography (DCM/MeOH (9/1)) to afford **50h** (45.0 mg, 46%).

**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, *J* Hz):** 8.51 (d, 1H, H<sub>4</sub>, *J* = 2.3 Hz), 8.15 (dd, 1H, H<sub>12</sub>, *J* = 0.8 Hz and *J* = 1.8 Hz), 7.73 (dd, 1H, H<sub>6</sub>, *J* = 2.5 Hz and *J* = 9.2 Hz), 7.47 (m, 2H, H<sub>7</sub> and H<sub>10</sub>), 6.97 (s, 2H, H<sub>13</sub>), 6.82 (dd, 1H, H<sub>11</sub>, *J* = 1.8 Hz and *J* = 3.5 Hz).

**<sup>13</sup>C-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, *J* Hz):** 160.8 (C<sub>1</sub>), 155.8 (C<sub>9</sub>), 153.1 (C<sub>2</sub>), 152.4 (C<sub>8</sub>), 147.4 (C<sub>12</sub>), 134.5 (C<sub>5</sub>), 128.8 (C<sub>6</sub>), 126.5 (C<sub>7</sub>), 125.6 (C<sub>4</sub>), 116.3 (C<sub>3</sub>), 116.2 (C<sub>11</sub>), 113.0 (C<sub>10</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z* = 246.2 [M+H]<sup>+</sup>**

**UPLC:** C18 column: *t<sub>R</sub>* = 1.9 min, purity > 99.0 %

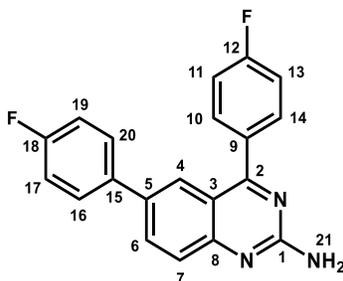
**Molecular formula:** C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>ClN<sub>3</sub>O

**Molecular weight:** 245.67 g/mol

**Melting point:** 184-186 °C

**Aspect:** yellow solid

## 4,6-Di(4-fluorophenyl)quinazolin-2-amine (50i)

**Procedure:**

The same procedure as described for compound **50a** was used starting from **49i** (1.0 eq., 200.0 mg, 0.59 mmol) in MeOH. The solid was filtered to afford **50i** (12.0 mg, 46%).

**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, J Hz):** 8.30-8.15 (m, 2H), 8.08-7.82 (m, 3H), 7.77-7.60 (m, 4H), 7.59-7.38 (m, 4H).

**<sup>13</sup>C-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, J Hz):** 169.0 (C<sub>1</sub>), 165.1 (C<sub>12</sub> (d, J = 245.3 Hz)), 163.8 (C<sub>18</sub> (d, J = 237.4 Hz)), 160.6 (C<sub>2</sub>), 153.2 (C<sub>8</sub>), 136.6 (C<sub>15</sub> (d, J = 3.1 Hz)), 133.8 (C<sub>9</sub> (d, J = 2.9 Hz)), 133.3 (C<sub>5</sub> and C<sub>6</sub>), 132.3 (C<sub>16</sub> and C<sub>20</sub> (d, J = 8.3 Hz)), 129.1 (C<sub>10</sub> and C<sub>14</sub> (d, J = 7.5 Hz)), 126.5 (C<sub>4</sub>), 124.6 (C<sub>7</sub>), 117.8 (C<sub>3</sub>), 116.4-115.8 (C<sub>11</sub>, C<sub>13</sub>, C<sub>17</sub> and C<sub>19</sub> (d, J = 21.0 Hz and d, J = 21.8 Hz)).

**LC-MS (ESI) m/z = 333.1 [M+H]<sup>+</sup>**

**UPLC:** C18 column: t<sub>R</sub> = 2.3 min, purity > 99.0 %

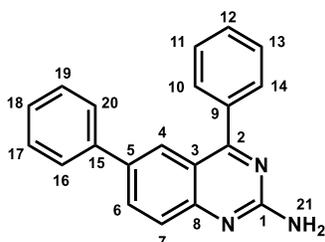
**Molecular formula:** C<sub>20</sub>H<sub>13</sub>F<sub>2</sub>N<sub>3</sub>

**Molecular weight:** 333.34 g/mol

**Melting point:** 239-241 °C

**Aspect:** white solid

#### 4,6-Diphenylquinazolin-2-amine (50j)



#### Procedure:

The same procedure as described for compound **50a** was used starting from **49j** (1.0 eq., 40.0 mg, 0.59 mmol) in MeOH. The solid was filtered to afford **50j** (12.0 mg, 32%).

**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, J Hz):** 8.30-8.15 (m, 2H), 8.08-8.02 (m, 1H), 7.96-7.83 (m, 2H), 7.77-7.61 (m, 4H), 7.59-7.40 (m, 4H).

**<sup>13</sup>C-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, J Hz):** 160.0 (C<sub>1</sub>), 155.2 (C<sub>2</sub>), 147.4 (C<sub>8</sub>), 141.5 (C), 134.8 (C<sub>15</sub>), 134.2 (C), 132.1 (2 CH), 130.2 (CH), 129.7 (2 CH), 129.2 (2 CH), 128.5 (2 CH), 127.8 (CH), 127.5 (CH), 126.4 (CH), 125.5 (C<sub>7</sub>), 120.7 (C<sub>3</sub>).

**LC-MS (ESI) m/z = 298.1 [M+H]<sup>+</sup>**

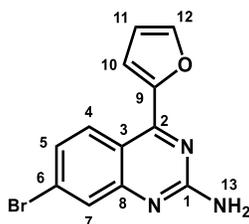
**UPLC:** C18 column: t<sub>R</sub> = 3.0 min, purity = 96.2 %

**Molecular formula:** C<sub>20</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>

**Molecular weight:** 297.36 g/mol

**Melting point:** 214-216 °C

**Aspect:** yellow solid

**7-bromo-4-(furan-2-yl)quinazolin-2-amine (50k)****Procedure:**

The same procedure as described for compound **50a** was used starting from **49k** (1.0 eq., 200.0 mg, 0.65 mmol) in MeOH. The crude product was purified using flash chromatography (cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 5/5) to afford **50k** (29.0 mg, 21%).

**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm, J Hz):** 7.97 (d, 1H, H<sub>7</sub>, J = 2.1 Hz), 7.80 (dd, 1H, H<sub>5</sub>, J = 2.0 Hz and J = 9.0 Hz), 7.74-7.71 (m, 1H), 7.57 (d, 1H, H<sub>4</sub>, J = 8.9 Hz), 7.32-7.29 (m, 2H), 5.53 (s, 2H, H<sub>13</sub>).

**<sup>13</sup>C-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, J Hz):** 169.1 (C<sub>1</sub>), 165.1 (C<sub>9</sub>), 163.0 (C<sub>2</sub>), 159.2 (C<sub>8</sub>), 140.8 (C<sub>12</sub>), 132.1 (C<sub>4</sub>), 131.6 (C<sub>7</sub>), 129.3 (C<sub>5</sub>), 127.4 (C<sub>6</sub>), 119.4 (C<sub>3</sub>), 116.3 (C<sub>11</sub>), 116.1 (C<sub>10</sub>).

**LC-MS (ESI) m/z =** 290.1, 292.1 [M+H]<sup>+</sup>

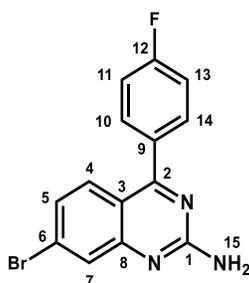
**UPLC:** C18 column: t<sub>R</sub> = 2.9 min, purity = 95.0 %

**Molecular formula:** C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>BrN<sub>3</sub>O

**Molecular weight:** 290.12 g/mol

**Melting point:** 193-195 °C

**Aspect:** yellow solid

**2-Amino-7-bromo-4-(4-fluorophenyl)quinazoline (50l)****Procedure:**

The same procedure as described for compound **50a** was used starting from **49l** (1.0 eq., 200.0 mg, 0.59 mmol) in MeOH. The crude product was purified using flash chromatography (cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 5/5) to afford **50l** (35.0 mg, 13%).

**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm, J Hz):** 7.97 (d, 1H, H<sub>7</sub>, J = 2.1 Hz), 7.80 (dd, 1H, H<sub>5</sub>, J = 2.0 Hz and J = 9.0 Hz), 7.74-7.71 (m, 2H, H<sub>10</sub> and H<sub>14</sub>), 7.57 (d, 1H, H<sub>4</sub>, J = 8.9 Hz), 7.32-7.29 (m, 2H, H<sub>11</sub> and H<sub>13</sub>), 5.53 (s, 2H, H<sub>15</sub>).

**<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm, J Hz):** 169.1 (C<sub>12</sub> (d, J = 239.4 Hz)), 165.1 (C<sub>1</sub>), 163.0 (C<sub>2</sub>), 159.2 (C<sub>8</sub>), 137.6 (C<sub>9</sub> (d, J = 3.4 Hz)), 132.6 (C<sub>10</sub> and C<sub>14</sub> (d, J = 8.5 Hz)), 132.1 (C<sub>4</sub>), 131.6 (C<sub>7</sub>), 129.3 (C<sub>5</sub>), 127.4 (C<sub>6</sub>), 119.4 (C<sub>3</sub>), 116.3 (C<sub>11</sub> and C<sub>13</sub> (d, J = 21.2 Hz)).

**LC-MS (ESI) m/z = 317.9, 319.9 [M+H]<sup>+</sup>**

**UPLC:** C18 column: t<sub>R</sub> = 2.1 min, purity > 99.0 %

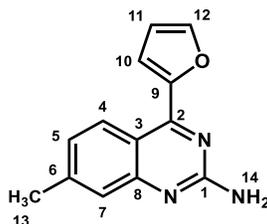
**Molecular formula:** C<sub>14</sub>H<sub>9</sub>FBrN<sub>3</sub>

**Molecular weight:** 318.15 g/mol

**Melting point:** 211-213 °C

**Aspect:** yellow solid

#### 4-(furan-2-yl)-7-methylquinazolin-2-amine (50m)



#### Procedure:

The same procedure as described for compound **50c** was used starting from **49m** (1.0 eq., 200.0 mg, 0.82 mmol), DIPEA (2.5 eq., 0.36 mL, 2.04 mmol) and 4-methoxybenzylamine (2.0 eq., 0.21 mL, 1.63 mmol) in dioxane. The crude product was purified by flash chromatography (DCM/MeOH (9/1)) to afford **50m** (21.0 mg, 13%).

**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, J Hz):** 8.38 (d, 1H, H<sub>4</sub>, J = 8.8 Hz), 8.07 (m, 1H), 7.39 (dd, 1H, H<sub>10</sub>, J = 0.7 Hz and J = 3.5 Hz), 7.27 (m, 1H), 7.10 (dd, 1H, H<sub>5</sub>, J = 1.5 Hz and J = 8.7 Hz), 6.79 (dd, 1H, H<sub>11</sub>, J = 1.7 Hz and J = 3.5 Hz), 6.74 (s, 2H, H<sub>14</sub>), 2.43 (s, 3H, H<sub>13</sub>).

**<sup>13</sup>C-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, J Hz):** 160.7 (C<sub>1</sub>), 156.2 (C<sub>9</sub>), 154.7 (C<sub>2</sub>), 152.6 (C<sub>8</sub>), 146.7 (C<sub>6</sub>), 144.4 (C<sub>12</sub>), 126.5 (C<sub>5</sub>), 125.1 (C<sub>4</sub>), 125.0 (C<sub>7</sub>), 115.6 (C<sub>3</sub>), 114.2 (C<sub>11</sub>), 112.8 (C<sub>10</sub>), 22.0 (C<sub>13</sub>).

**LC-MS (ESI) m/z = 226.3 [M+H]<sup>+</sup>**

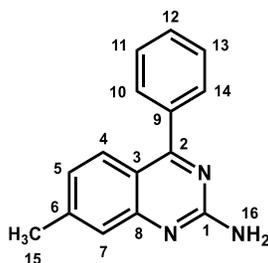
**UPLC:** C18 column: t<sub>R</sub> = 1.8 min, purity = 97.4 %

**Molecular formula:** C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>O

**Molecular weight:** 225.25 g/mol

**Melting point:** 235-237 °C

**Aspect:** yellow solid

**2-Amino-4-phenyl-7-methylquinazoline (50n)****Procedure:**

The same procedure as described for compound **50a** was used starting from **49n** (1.0 eq., 200.0 mg, 0.73 mmol) in MeOH. The crude product was purified using flash chromatography (cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 4/6) to afford **50n** (121 mg, 65%).

**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm, J Hz):** 7.76-7.69 (m, 3H), 7.47-7.44 (m, 1H), 7.27-7.22 (m, 2H), 7.09 (dd, 1H, H<sub>5</sub>, J = 1.4 Hz and J = 8.5 Hz), 5.22 (s, 2H, H<sub>16</sub>), 2.53 (s, 3H, H<sub>15</sub>).

**<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm, J Hz):** 170.2 (C<sub>1</sub>), 159.7 (C<sub>2</sub>), 153.5 (C<sub>8</sub>), 145.0 (C<sub>6</sub>), 137.4 (C<sub>9</sub>), 129.7 (C<sub>11</sub> and C<sub>13</sub>), 129.5 (C<sub>12</sub>), 128.5 (C<sub>10</sub> and C<sub>14</sub>), 127.2 (C<sub>5</sub>), 125.3 (C<sub>4</sub>), 125.0 (C<sub>7</sub>), 116.8 (C<sub>3</sub>), 22.1 (C<sub>15</sub>).

**LC-MS (ESI) m/z = 236.3 [M+H]<sup>+</sup>**

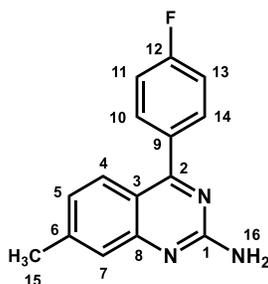
**UPLC:** C18 column: t<sub>R</sub> = 1.8 min, purity > 99.0 %

**Molecular formula:** C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>

**Molecular weight:** 235.29 g/mol

**Melting point:** 160-162 °C

**Aspect:** white solid

**2-Amino-4-(4-fluorophenyl)-7-methylquinazoline (50o)****Procedure:**

The same procedure as described for compound **50a** was used starting from **49o** (1.0 eq., 200.0 mg, 0.73 mmol) in MeOH. The crude product was purified using flash chromatography (cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 4/6) to afford **50o** (121.0 mg, 65%).

**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm, J Hz):** 7.76-7.69 (m, 3H), 7.47-7.44 (m, 1H), 7.27-7.22 (m, 2H), 7.09 (dd, H<sub>5</sub>, 1H, J = 1.4 Hz and J = 8.5 Hz), 5.22 (s, 2H, H<sub>16</sub>), 2.53 (s, 3H, H<sub>15</sub>).

**<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm, J Hz):** 169.0 (C<sub>1</sub>), 165.4 (C<sub>12</sub> (d, J = 249.2 Hz)), 159.6 (C<sub>2</sub>), 153.5 (C<sub>8</sub>), 145.1 (C<sub>6</sub>), 133.5 (C<sub>9</sub> (d, J = 3.8 Hz)), 131.6 (C<sub>10</sub> and C<sub>14</sub> (d, J = 8.4 Hz)), 126.9 (C<sub>4</sub>), 125.5 (C<sub>4</sub>), 125.1 (C<sub>7</sub>), 116.7 (C<sub>3</sub>), 115.8 (C<sub>11</sub> and C<sub>13</sub> (d, J = 21.8 Hz)), 22.1 (C<sub>15</sub>).

**LC-MS (ESI) m/z = 254.0 [M+H]<sup>+</sup>**

**UPLC:** C18 column: t<sub>R</sub> = 2.0 min, purity > 99.0 %

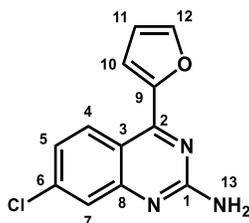
**Molecular formula:** C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>FN<sub>3</sub>

**Molecular weight:** 253.28 g/mol

**Melting point:** 161 °C

**Aspect:** white solid

### 7-Chloro-4-(furan-2-yl)quinazolin-2-amine (50p)



#### Procedure:

The same procedure as described for compound **50c** was used starting from **49p** (1.0 eq., 200.0 mg, 0.75 mmol), DIPEA (2.5 eq., 0.33 mL, 1.89 mmol) and 4-methoxybenzylamine (2.0 eq., 0.20 mL, 1.51 mmol) in dioxane. The crude product was purified by flash chromatography (DCM/MeOH (9/1)) to afford **50p** (45.0 mg, 46%).

**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, J Hz):** 8.53 (d, 1H, H<sub>4</sub>, J = 9.1 Hz), 8.11 (dd, 1H, H<sub>12</sub>, J = 0.8 Hz and J = 1.7 Hz), 7.48 (d, 1H, H<sub>7</sub>, J = 2.1 Hz), 7.45 (dd, 1H, H<sub>10</sub>, J = 0.8 Hz and J = 3.6 Hz), 7.28 (dd, 1H, H<sub>5</sub>, J = 2.2 Hz and J = 9.0 Hz), 7.03 (s, 2H, H<sub>13</sub>), 6.82 (dd, 1H, H<sub>11</sub>, J = 1.8 Hz and J = 3.5 Hz).

**<sup>13</sup>C-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, J Hz):** 161.2 (C<sub>1</sub>), 156.7 (C<sub>9</sub>), 155.2 (C<sub>2</sub>), 152.2 (C<sub>8</sub>), 147.2 (C<sub>6</sub>), 138.9 (C<sub>12</sub>), 129.0 (C<sub>4</sub>), 124.5 (C<sub>7</sub>), 123.2 (C<sub>5</sub>), 116.3 (C<sub>3</sub>), 114.6 (C<sub>11</sub>), 113.0 (C<sub>10</sub>).

**LC-MS (ESI) m/z = 246.2 [M+H]<sup>+</sup>**

**UPLC:** C18 column: t<sub>R</sub> = 1.9 min, purity > 99.0 %

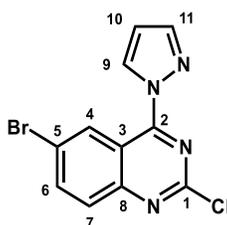
**Molecular formula:** C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>ClN<sub>3</sub>O

**Molecular weight:** 245.67 g/mol

**Melting point:** 181-183 °C

**Aspect:** yellow solid

## 6-Bromo-2-chloro-4-(1H-pyrazol-1-yl)quinazoline (51)

**Procedure:**

To a solution of **48a** (1.0 eq., 400.0 mg, 1.44 mmol) in dioxane were added  $K_2CO_3$  (2.0 eq., 397.8 mg, 2.88 mmol) and 1H-pyrazole (1.2 eq., 117.6 mg, 1.73 mmol). The solution was stirred and heated at 60 °C overnight. The solution was cooled to room temperature and solid was filtered. The solution was cooled to room temperature and hydrolyzed with water. The solid was filtered and washed with PE to afford **51** (350.0 mg, 79%).

$^1H$ -RMN ( $CDCl_3$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz): 9.88 (d, 1H,  $H_4$ ,  $J = 2.1$  Hz), 8.84 (dd, 1H,  $H_{11}$ ,  $J = 0.4$  Hz and  $J = 2.8$  Hz), 8.08-7.97 (m, 2H,  $H_6$  and  $H_9$ ), 7.86 (d, 1H,  $H_7$ ,  $J = 9.0$  Hz), 6.62 (dd, 1H,  $H_{10}$ ,  $J = 1.6$  Hz and  $J = 2.8$  Hz).

LC-MS (ESI)  $m/z = 308.9, 310.9, 312.9 [M+H]^+$

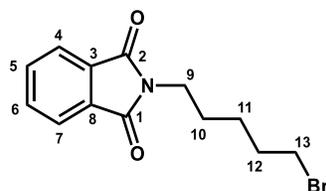
**Molecular formula:**  $C_{11}H_6BrClN_4$

**Molecular weight:** 309.55 g/mol

**Aspect:** white solid

The synthesis of compounds **55a-u** and **56a-b** was carried out according to protocols described in the thesis of Romain Duroux.<sup>167</sup>

## 2-(5-Bromopentyl)-2,3-dihydro-1H-isoindole-1,3-dione (52b)

**Procedure:**

To a round bottom flask was added potassium phthalimide (1.0 eq., 10.00 g, 53.99 mmol) in acetone. Then, 1,5-dibromopentane (5.0 eq., 36.95 mL, 269.94 mmol) was slowly added and the solution was stirred and heated at reflux overnight. The solution was cooled to room temperature and filtrated. The filtrate was concentrated *in vacuo*. The crude product was taken up in PE at 0°C and the solution was stirred overnight. The solution was filtered to afford **52b** (6.41 g, 40%).

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm, J Hz): 7.89-7.85 (m, 2H), 7.74-7.68 (m, 2H), 3.69 (t, 2H, H<sub>9</sub>, J = 7.0 Hz), 3.38 (t, 2H, H<sub>13</sub>, J = 7.2 Hz), 1.74 (m, 4H, H<sub>10</sub> and H<sub>12</sub>), 1.45-1.35 (m, 2H, H<sub>11</sub>).

LC-MS (ESI) m/z = 297.2 [M+H]<sup>+</sup>

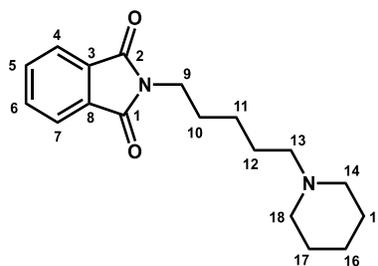
Molecular formula: C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>BrNO<sub>2</sub>

Molecular weight: 296.16 g/mol

Melting point: 60-62 °C

Aspect: white solid

### 2-[5-(Piperidin-1-yl)pentyl]-2,3-dihydro-1H-isoindole-1,3-dione (53b)



#### Procedure:

To a round bottom flask were added **52b** (1.0 eq., 1.70 g, 5.74 mmol), piperidine (1.2 eq., 0.68 mL, 6.89 mmol) and Et<sub>3</sub>N (1.2 eq., 0.96 mL, 6.89 mmol) in acetonitrile. The solution was stirred and heated at reflux overnight. The solution was cooled to room temperature, hydrolyzed with water and acidified with a HCl solution 1M up to pH acid. The aqueous phase was extracted with EtOAc. The aqueous layer was alkalinized with a NaOH solution 0.5M. The aqueous phase was extracted with EtOAc three times. The solution was dried with MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated *in vacuo* to give a brown oil. The product was taken up in PE and the solution was filtered to afford **53b** (1.30 g, 79%).

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm, J Hz): 7.85-7.82 (m, 2H), 7.73-7.69 (m, 2H), 3.68 (t, 2H, H<sub>9</sub>, J = 6.9 Hz), 2.38-2.27 (m, 6H), 1.69 (m, 2H), 1.64-1.51 (m, 4H), 1.44-1.31 (m, 6H).

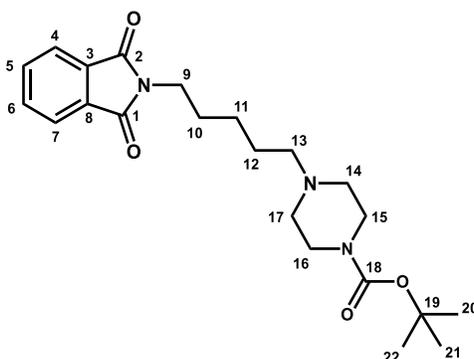
LC-MS (ESI) m/z = 301.1 [M+H]<sup>+</sup>

Molecular formula: C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Molecular weight: 300.40 g/mol

Melting point: 72-76 °C

Aspect: white solid

Tert-butyl 4-[5-(1,3-dioxo-2,3-dihydro-1H-isoindol-2-yl)pentyl]piperazine-1-carboxylate (**53f**)**Procedure:**

The same procedure as described for compound **53b** was used starting from **52b** (1.0 eq., 4.00 g, 13.51 mmol), 1-boc piperazine (1.2 eq., 3.10 g, 16.20 mmol) and Et<sub>3</sub>N (1.5 eq., 2.82 mL, 20.26 mmol) in acetonitrile. The crude product was purified by flash chromatography (cyclohexane/EtOAc (5/5)) to afford **53f** (3.0 g, 55%).

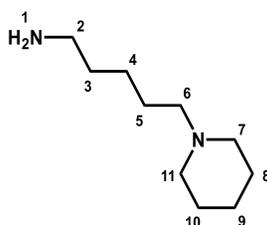
<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm, J Hz): 7.89-7.82 (m, 2H), 7.76-7.69 (m, 2H), 3.70 (t, 2H, H<sub>9</sub>, J = 7.2 Hz), 3.45 (m, 4H), 2.39 (m, 6H), 1.76-1.66 (m, 2H), 1.60-1.55 (m, 2H), 1.47 (s, 9H, H<sub>20</sub>, H<sub>21</sub> and H<sub>22</sub>), 1.40-1.37 (m, 2H).

LC-MS (ESI) m/z = 402.4 [M+H]<sup>+</sup>

**Molecular formula:** C<sub>22</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

**Molecular weight:** 401.51 g/mol

**Aspect:** white solid

**5-(Piperidin-1-yl)pentan-1-amine (54b)****Procedure:**

To a round bottom flask were added **53b** (1.0 eq., 1.00 g, 3.33 mmol) and hydrazine hydrate (2.5 eq., 0.26 mL, 8.32 mmol) in EtOH. The solution was stirred and heated at reflux for 3 hours. The solution was cooled to room temperature and then phthalhydrazide was filtered off. The filtrate was concentrated *in vacuo*, suspended in chloroform and phthalhydrazide was filtered again. The filtrate was washed with water, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated *in vacuo* to afford **54b** (459.1 mg, 81%).

**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm, J Hz):** 2.66 (t, 2H, H<sub>6</sub>, J = 6.9 Hz), 2.34 (m, 4H), 2.25 (t, 2H, H<sub>2</sub>, J = 7.1 Hz), 1.59-1.48 (m, 6H), 1.45-1.39 (m, 6H), 1.33-1.26 (m, 2H).

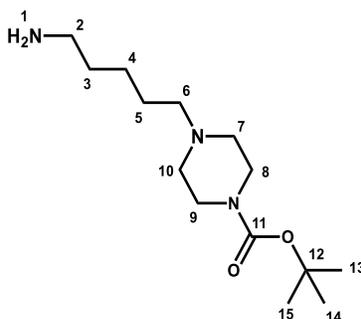
**LC-MS (ESI) m/z = 171.3 [M+H]<sup>+</sup>**

**Molecular formula:** C<sub>10</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>

**Molecular weight:** 170.30 g/mol

**Aspect:** yellow oil

**Tert-butyl 4-(5-aminopentyl)piperazine-1-carboxylate (54f)**



**Procedure:**

The same procedure as described for compound **54b** was used starting from **53f** (1.0 eq., 1.50 g, 3.74 mmol) and hydrazine hydrate (2.5 eq., 0.29 mL, 9.34 mmol) in EtOH to afford **54f** (730.0 mg, 72%).

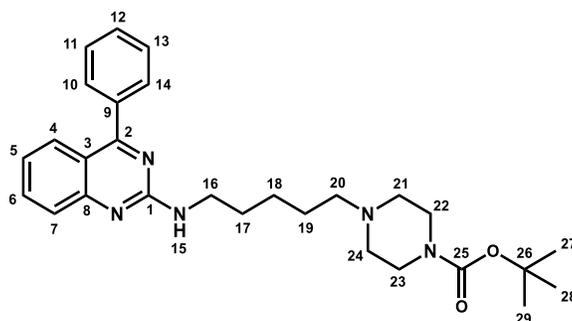
**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm, J Hz):** 3.70 (t, 4H, H<sub>7</sub> and H<sub>10</sub>, J = 5.1 Hz), 2.71 (t, 2H, H<sub>6</sub>, J = 6.6 Hz), 2.39-2.30 (m, 6H), 1.97 (m, 3H), 1.59-1.48 (m, 3H), 1.46 (s, 9H, H<sub>13</sub>, H<sub>14</sub> and H<sub>15</sub>), 1.36-1.31 (m, 2H).

**LC-MS (ESI) m/z = 272.2 [M+H]<sup>+</sup>**

**Molecular formula:** C<sub>14</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>

**Molecular weight:** 271.41 g/mol

**Aspect:** yellow oil

Tert-butyl 4-{5-[(4-phenylquinazolin-2-yl)amino]pentyl}piperazine-1-carboxylate (**55m**)**Procedure:**

To a sealed tube were added 2-chloro-4-phenylquinazoline (1.0 eq., 100.0 mg, 0.42 mmol), **54f** (1.1 eq., 124.0 mg, 0.46 mmol) and DIPEA (3.0 eq., 0.22 mL, 1.25 mmol) in dioxane (3 mL). The solution was heated and stirred at 90 °C overnight. The mixture was cooled to room temperature and hydrolyzed with water. The aqueous layer was extracted three times with EtOAc. Combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated *in vacuo* to afford a yellow oil. The crude product was purified using flash chromatography (DCM/MeOH: 10/0 to 9.5/0.5) to afford **55m** (81.0 mg, 41%).

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm, J Hz): 7.79 (d, 1H, H<sub>7</sub>, J = 8.3 Hz), 7.70-7.65 (m, 4H, H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>10</sub> and H<sub>14</sub>), 7.54-7.52 (m + t, 3H, H<sub>5</sub>, H<sub>11</sub> and H<sub>13</sub>, J = 3.2 Hz), 7.15 (quintuplet, 1H, H<sub>12</sub>, J = 4.1 Hz), 5.30 (m, 1H, H<sub>15</sub>), 3.59 (quadruplet, 2H, H<sub>16</sub>, J = 6.6 Hz), 3.42 (t, 4H, H<sub>22</sub> and H<sub>23</sub>, J = 5.0 Hz), 2.38-2.32 (m, 6H, H<sub>20</sub>, H<sub>21</sub> and H<sub>24</sub>), 1.75-1.68 (m, 2H, H<sub>17</sub>), 1.59-1.45 (m, 13H, H<sub>18</sub>, H<sub>19</sub> and H<sub>27</sub>-H<sub>29</sub>).

<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm, J Hz): 170.1 (C<sub>1</sub>), 159.2 (C<sub>2</sub>), 154.9 (C<sub>25</sub>), 153.5 (C<sub>8</sub>), 137.6 (C<sub>9</sub>), 133.8 (C<sub>6</sub>), 129.8 (C<sub>5</sub>), 129.6 (C<sub>10</sub> and C<sub>14</sub>), 128.6 (C<sub>11</sub> and C<sub>13</sub>), 127.6 (C<sub>7</sub>), 126.2 (C<sub>4</sub>), 122.3 (C<sub>12</sub>), 118.6 (C<sub>3</sub>), 79.7 (C<sub>26</sub>), 58.7 (C<sub>20</sub>), 53.2 (C<sub>21</sub> and C<sub>24</sub>), 41.5 (C<sub>16</sub>, C<sub>22</sub> and C<sub>23</sub>), 29.7 (C<sub>17</sub>), 28.6 (C<sub>27</sub>, C<sub>28</sub> and C<sub>29</sub>), 26.7 (C<sub>19</sub>), 25.0 (C<sub>18</sub>).

LC-MS (ESI) m/z = 476.4 [M+H]<sup>+</sup>

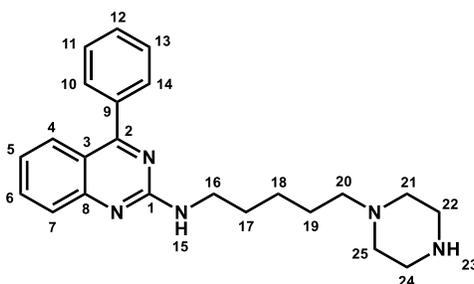
UPLC: C18 column: t<sub>R</sub> = 2.2 min, purity = 96.0 %

Molecular formula: C<sub>28</sub>H<sub>37</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>

Molecular weight: 475.29 g/mol

Aspect: orange oil

## 4-Phenyl-N-[5-(piperazin-1-yl)pentyl]quinazolin-2-amine (55n)

**Procedure:**

To a solution of **55m** (1.0 eq., 330.0 mg, 0.69 mmol) in DCM was added HCl (12.0 eq., 2.21 mL, 8.83 mmol). The solution was stirred at room temperature overnight. The mixture was concentrated *in vacuo*. The crude product was purified using flash chromatography (DCM/MeOH (NH<sub>3</sub> sat.): 9.5/0.5 to 9/1) to afford **55n** (222.0 mg, 85%).

**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm, J Hz):** 7.78 (d, 1H, H<sub>7</sub>, *J* = 8.5 Hz), 7.70-7.64 (m, 4H, H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>10</sub> and H<sub>14</sub>), 7.52 (t, 3H, H<sub>5</sub>, H<sub>11</sub>, H<sub>13</sub>, *J* = 3.2 Hz), 7.14 (quintuplet, 1H, H<sub>12</sub>, *J* = 4.1 Hz), 5.32 (t, 1H, H<sub>15</sub>, *J* = 5.4 Hz), 3.58 (quadruplet, 2H, H<sub>16</sub>, *J* = 6.6 Hz), 2.90 (t, 4H, H<sub>22</sub>, H<sub>24</sub>, *J* = 4.9 Hz), 2.45-2.33 (m + t, 7H, H<sub>20</sub>, H<sub>21</sub>, H<sub>23</sub> and H<sub>25</sub>, *J* = 7.5 Hz), 1.70 (quintuplet, 2H, H<sub>17</sub>, *J* = 7.2 Hz), 1.59-1.42 (m, 4H, H<sub>18</sub> and H<sub>19</sub>).

**<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm, J Hz):** 170.1 (C<sub>1</sub>), 159.2 (C<sub>2</sub>), 153.5 (C<sub>8</sub>), 137.6 (C<sub>9</sub>), 133.8 (C<sub>6</sub>), 129.7 (C<sub>5</sub>), 129.6 (C<sub>10</sub> and C<sub>14</sub>), 128.6 (C<sub>11</sub> and C<sub>13</sub>), 127.6 (C<sub>7</sub>), 126.2 (C<sub>4</sub>), 122.3 (C<sub>12</sub>), 118.6 (C<sub>3</sub>), 59.3 (C<sub>20</sub>), 54.5 (C<sub>21</sub> and C<sub>25</sub>), 46.1 (C<sub>22</sub> and C<sub>24</sub>), 41.5 (C<sub>16</sub>), 29.7 (C<sub>17</sub>), 26.5 (C<sub>19</sub>), 25.1 (C<sub>18</sub>).

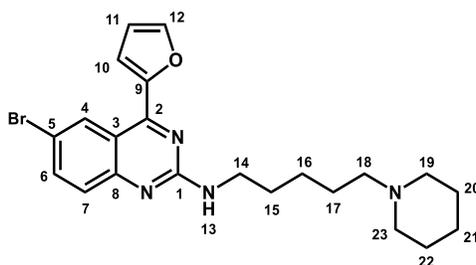
**LC-MS (ESI) m/z = 376.4 [M+H]<sup>+</sup>**

**UPLC:** C18 column: t<sub>R</sub> = 2.1 min, purity > 99.0 %

**Molecular formula:** C<sub>23</sub>H<sub>29</sub>N<sub>5</sub>

**Molecular weight:** 375.24 g/mol

**Aspect:** orange oil

**6-bromo-4-(furan-2-yl)-N-[5-(piperidin-1-yl)pentyl]quinazolin-2-amine (55v)****Procedure:**

The same procedure as described for compound **55m** was used starting from 6-bromo-2-chloro-4-(furan-2-yl)quinazoline (1.0 eq., 152.0 mg, 0.49 mmol), **54b** (1.2 eq., 100.0 mg, 0.59 mmol) and DIPEA (3.0 eq., 0.26 mL, 1.47 mmol) in DMF (3 mL). The crude product was purified using flash chromatography (DCM/MeOH: 10/0 to 9.5/0.5) to afford **55v** (85.0 mg, 39%).

**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, *J* Hz):** 8.77 (d, 1H, H<sub>4</sub>, *J* = 2.2 Hz), 7.79 (dd, 1H, H<sub>12</sub>, *J* = 0.8 Hz and *J* = 1.7 Hz), 7.72 (dd, 1H, H<sub>6</sub>, *J* = 2.2 Hz and *J* = 9.0 Hz), 7.48 (d, 1H, H<sub>7</sub>, *J* = 9.0 Hz), 7.44 (d, 1H, H<sub>10</sub>, *J* = 3.3 Hz), 6.67 (dd, 1H, H<sub>11</sub>, *J* = 1.7 Hz and *J* = 3.4 Hz), 5.37 (t, 1H, H<sub>13</sub>, *J* = 5.6 Hz), 5.37 (t, 2H, H<sub>14</sub>, *J* = 6.2 Hz), 2.90-2.84 (m, 3H), 1.99-1.94 (m, 5H), 1.77-1.70 (m, 4H), 1.55-1.44 (m, 4H), 1.27-1.22 (m, 2H).

**<sup>13</sup>C-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, *J* Hz):** 159.1 (C<sub>1</sub>), 155.8 (C<sub>9</sub>), 152.8 (C<sub>2</sub>), 145.8 (C<sub>8</sub>), 136.9 (C<sub>12</sub>), 129.1 (C<sub>6</sub>), 128.0 (C<sub>4</sub>), 117.7 (C<sub>7</sub>), 115.8 (C<sub>5</sub>), 115.5 (C<sub>3</sub> and C<sub>11</sub>), 112.3 (C<sub>10</sub>), 57.5 (C<sub>19</sub> and C<sub>23</sub>), 53.3 (C<sub>18</sub>), 41.0 (C<sub>14</sub>), 29.1 (C<sub>15</sub>), 24.3 (C<sub>17</sub>), 23.5 (C<sub>16</sub>), 22.8 (C<sub>21</sub>), 22.4 (C<sub>20</sub> and C<sub>22</sub>).

**LC-MS (ESI) m/z = 443.3, 445.3 [M+H]<sup>+</sup>**

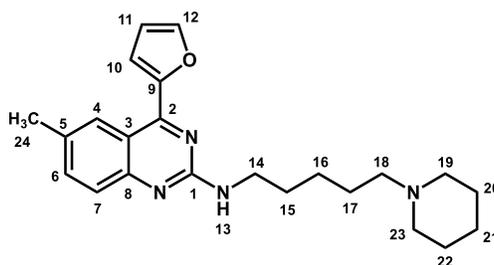
**UPLC:** C18 column: t<sub>R</sub> = 2.2 min, purity = 96.4 %

**Molecular formula:** C<sub>22</sub>H<sub>27</sub>BrN<sub>4</sub>O

**Molecular weight:** 443.39 g/mol

**Aspect:** yellow oil

## 4-(furan-2-yl)-6-methyl-N-[5-(piperidin-1-yl)pentyl]quinazolin-2-amine (55w)

**Procedure:**

The same procedure as described for compound **55m** was used starting from **49c** (1.0 eq., 70.0 mg, 0.29 mmol), **54b** (1.5 eq., 73.0 mg, 0.43 mmol) and DIPEA (3.0 eq., 0.15 mL, 0.86 mmol) in DMF (3 mL). The crude product was purified using flash chromatography (acetone, 100%) to afford **55w** (80.0 mg, 74%).

**<sup>1</sup>H-RMN ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, δ ppm, J Hz):** 8.40 (s, 1H, H<sub>10</sub>), 7.94 (dd, 1H, H<sub>12</sub>, *J* = 0.8 Hz and *J* = 1.7 Hz), 7.55-7.39 (multiplet, 3H, H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub> and H<sub>7</sub>), 6.72 (dd, 1H, H<sub>11</sub>, *J* = 1.7 Hz and *J* = 3.5 Hz), 6.31 (s, 1H, H<sub>13</sub>), 3.54 (td, 2H, H<sub>14</sub>, *J* = 6.1 Hz and *J* = 6.8 Hz), 2.44 (d, 3H, H<sub>24</sub>, *J* = 0.8 Hz), 2.31-2.23 (m + t, 6H, H<sub>18</sub>, H<sub>19</sub> and H<sub>23</sub>, *J* = 7.0 Hz), 1.71 (quintuplet, 2H, H<sub>15</sub>, *J* = 7.0 Hz), 1.56-1.38 (m, 10H, H<sub>16</sub>, H<sub>17</sub>, H<sub>20</sub>-H<sub>22</sub>).

**<sup>13</sup>C-RMN ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, δ ppm, J Hz):** 160.1 (C<sub>1</sub>), 156.5 (C<sub>9</sub>), 153.9 (C<sub>2</sub> and C<sub>8</sub>), 146.4 (C<sub>12</sub>), 136.2 (C<sub>6</sub>), 132.5 (C<sub>5</sub>), 127.0 (C<sub>4</sub>), 126.2 (C<sub>7</sub>), 117.1 (C<sub>3</sub>), 115.5 (C<sub>11</sub>), 112.8 (C<sub>10</sub>), 59.9 (C<sub>18</sub>), 55.4 (C<sub>19</sub> and C<sub>23</sub>), 41.9 (C<sub>14</sub>), 27.5 (C<sub>15</sub> and C<sub>17</sub>), 26.9 (C<sub>20</sub> and C<sub>22</sub>), 25.6 (C<sub>16</sub>), 25.4 (C<sub>21</sub>), 21.5 (C<sub>24</sub>).

**LC-MS (ESI) m/z = 379.4 [M+H]<sup>+</sup>**

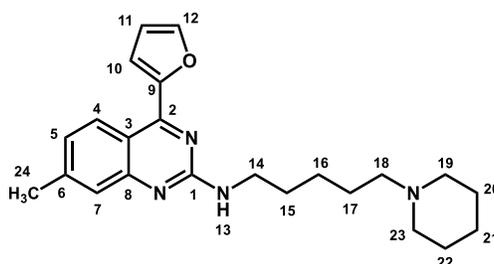
**UPLC:** C18 column: t<sub>R</sub> = 2.4 min, purity > 99.0 %

**Molecular formula:** C<sub>23</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub>O

**Molecular weight:** 378.52 g/mol

**Aspect:** yellow oil

## 4-(furan-2-yl)-7-methyl-N-[5-(piperidin-1-yl)pentyl]quinazolin-2-amine (55x)

**Procedure:**

The same procedure as described for compound **55m** was used starting from **49m** (1.0 eq., 95.0 mg, 0.39 mmol), **54b** (1.2 eq., 79.3 mg, 0.47 mmol) and DIPEA (3.0 eq., 0.20 mL, 1.16 mmol) in DMF (3 mL). The

crude product was purified using flash chromatography (DCM/MeOH: 10/0 to 9.5/0.5) to afford **55x** (20.0 mg, 14%).

**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm, J Hz):** 8.43 (d, 1H, H<sub>4</sub>, J = 8.6 Hz), 7.73 (d, 1H, H<sub>7</sub>, J = 1.5 Hz), 7.42 (m, 1H, H<sub>12</sub>), 7.34 (d, 1H, H<sub>10</sub>, J = 3.4 Hz), 7.07 (dd, 1H, H<sub>5</sub>, J = 1.7 Hz and J = 8.7 Hz), 6.36 (dd, 1H, H<sub>11</sub>, J = 1.8 Hz and J = 3.4 Hz), 5.26 (t, 1H, H<sub>15</sub>, J = 5.8 Hz), 3.55 (q, 2H, H<sub>14</sub>, J = 6.8 Hz), 2.40 (m, 9H), 1.65 (m, 9H), 1.44 (m, 5H).

**<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm, J Hz):** 159.2 (C<sub>1</sub>), 156.4 (C<sub>9</sub>), 154.2 (C<sub>2</sub>), 145.2 (C<sub>6</sub> and C<sub>8</sub>), 144.5 (C<sub>12</sub>), 126.5 (C<sub>5</sub>), 125.3 (C<sub>4</sub>), 124.9 (C<sub>7</sub>), 115.2 (C<sub>3</sub>), 114.9 (C<sub>11</sub>), 112.1 (C<sub>10</sub>), 58.0 (C<sub>18</sub>), 53.6 (C<sub>19</sub> and C<sub>23</sub>), 41.1 (C<sub>14</sub>), 29.3 (C<sub>15</sub>), 24.5 (C<sub>17</sub>), 24.3 (C<sub>20</sub> and C<sub>22</sub>), 23.6 (C<sub>16</sub>), 22.9 (C<sub>21</sub>), 22.0 (C<sub>24</sub>).

**LC-MS (ESI) m/z = 379.4 [M+H]<sup>+</sup>**

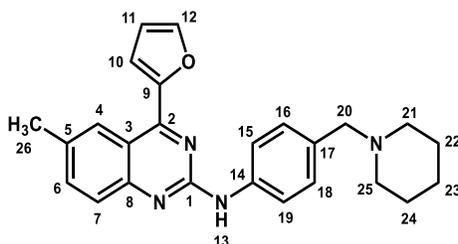
**UPLC:** C18 column: t<sub>R</sub> = 2.4 min, purity = 95.1 %

**Molecular formula:** C<sub>23</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub>O

**Molecular weight:** 378.52 g/mol

**Aspect:** yellow oil

#### 4-(furan-2-yl)-6-methyl-N-{4-[(piperidin-1-yl)methyl]phenyl}quinazolin-2-amine (**56c**)



#### Procedure:

To a sealed tube were added **49c** (1.0 eq., 80.0 mg, 0.33 mmol), 4-(piperidylmethyl)aniline (1.0 eq., 62.2 mg, 0.33 mmol), BINAP (0.05 eq., 10.2 mg, 0.02 mmol) and Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3.0 eq., 135.6 mg, 0.98 mmol) in dioxane (3 mL). The solution was degassed for 5 minutes with nitrogen and palladium acetate (0.05 eq., 3.67 mg, 0.02 mmol) was added. The solution was stirred and heated at 80 °C overnight. The mixture was cooled to room temperature and hydrolyzed with water. The aqueous layer was extracted three times with EtOAc. Combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified using flash chromatography (cyclohexane/acetone (1/9)) to afford **56c** (25.0 mg, 19%).

**<sup>1</sup>H-RMN ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, δ ppm, J Hz):** 8.71 (s, 1H, H<sub>13</sub>), 8.52 (m, 1H, H<sub>12</sub>), 8.03 (m, 3H, H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub> and H<sub>7</sub>), 7.66 (m, 2H, H<sub>15</sub> and H<sub>19</sub>), 7.50 (dd, 1H, H<sub>10</sub>, J = 0.8 Hz and J = 3.5 Hz), 7.30 (m, 2H, H<sub>16</sub> and H<sub>18</sub>), 6.79 (dd, 1H, H<sub>11</sub>, J = 1.8 Hz and J = 3.5 Hz), 3.43 (s, 2H, H<sub>20</sub>), 2.51 (s, 3H, H<sub>26</sub>), 2.38 (m, 4H, H<sub>21</sub> and H<sub>25</sub>), 1.56 (m, 4H, H<sub>22</sub> and H<sub>24</sub>), 1.43 (m, 2H, H<sub>23</sub>).

**$^{13}\text{C}$ -RMN ( $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz):** 157.3 ( $\text{C}_1$ ), 156.5 ( $\text{C}_9$ ), 154.1 ( $\text{C}_2$ ), 153.1 ( $\text{C}_8$ ), 146.9 ( $\text{C}_{12}$ ), 140.7 ( $\text{C}_{14}$ ), 136.7 ( $\text{C}_6$ ), 134.3 ( $\text{C}_5$ ), 132.9 ( $\text{C}_4$ ), 129.9 ( $\text{C}_{16}$  and  $\text{C}_{18}$ ), 127.5 ( $\text{C}_{17}$ ), 126.3 ( $\text{C}_7$ ), 119.3 ( $\text{C}_{15}$ ), 119.2 ( $\text{C}_{19}$ ), 117.8 ( $\text{C}_3$ ), 116.2 ( $\text{C}_{11}$ ), 113.1 ( $\text{C}_{10}$ ), 63.9 ( $\text{C}_{20}$ ), 55.1 ( $\text{C}_{21}$  and  $\text{C}_{25}$ ), 26.9 ( $\text{C}_{22}$  and  $\text{C}_{24}$ ), 25.3 ( $\text{C}_{23}$ ), 21.6 ( $\text{C}_{26}$ ).

**LC-MS (ESI)  $m/z$  = 399.4  $[\text{M}+\text{H}]^+$**

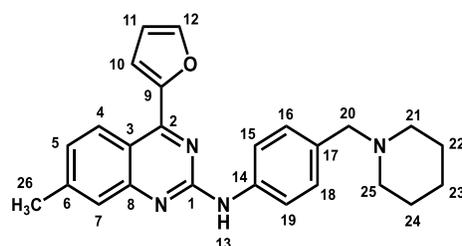
**UPLC:** C18 column:  $t_R$  = 2.3 min, purity > 99.0 %

**Molecular formula:**  $\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}$

**Molecular weight:** 398.51 g/mol

**Aspect:** yellow oil

#### 4-(furan-2-yl)-7-methyl-*N*-{4-[(piperidin-1-yl)methyl]phenyl}quinazolin-2-amine (56d)



#### Procedure:

The same procedure as described for compound **56c** was used starting from **49m** (1.0 eq., 150.0 mg, 0.61 mmol), 4-(piperidylmethyl)aniline (0.9 eq., 105.0 mg, 0.55 mmol), BINAP (0.05 eq., 19.1 mg, 0.03 mmol) and  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (3.0 eq., 254.2 mg, 1.84 mmol) in dioxane (3 mL). The solution was degassed for 5 minutes with nitrogen and palladium acetate (0.05 eq., 6.9 mg, 0.03 mmol) was added. The crude product was purified using flash chromatography (water/ACN/formic acid (0.01%)) to afford **56d** (30.0 mg, 12%).

**$^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz):** 8.56 (d, 1H,  $\text{H}_4$ ,  $J$  = 8.8 Hz), 8.44 (s, 1H,  $\text{H}_{13}$ ), 8.00 (m, 2H), 7.90 (d, 1H,  $\text{H}_7$ ,  $J$  = 1.2 Hz), 7.51 (d, 1H,  $\text{H}_{10}$ ,  $J$  = 3.6 Hz), 7.45 (m, 3H), 7.20 (dd, 1H,  $\text{H}_5$ ,  $J$  = 1.5 Hz and  $J$  = 8.8 Hz), 6.73 (dd, 1H,  $\text{H}_{10}$ ,  $J$  = 1.8 Hz and  $J$  = 3.6 Hz), 4.24 (s, 2H,  $\text{H}_{20}$ ), 3.20 (m, 4H,  $\text{H}_{21}$  and  $\text{H}_{25}$ ), 2.48 (s, 3H,  $\text{H}_{26}$ ), 1.80 (m, 6H,  $\text{H}_{22}$ - $\text{H}_{24}$ ).

**$^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz):** 156.3 ( $\text{C}_1$ ), 155.9 ( $\text{C}_9$ ), 153.3 ( $\text{C}_2$ ), 153.1 ( $\text{C}_8$ ), 145.9 ( $\text{C}_6$ ), 144.9 ( $\text{C}_{12}$ ), 142.4 ( $\text{C}_{14}$ ), 131.5 ( $\text{C}_{16}$  and  $\text{C}_{18}$ ), 126.3 ( $\text{C}_{17}$ ), 126.1 ( $\text{C}_5$ ), 125.2 ( $\text{C}_4$ ), 121.4 ( $\text{C}_7$ ), 118.7 ( $\text{C}_{15}$  and  $\text{C}_{19}$ ), 115.6 ( $\text{C}_3$ ), 115.0 ( $\text{C}_{11}$ ), 111.9 ( $\text{C}_{10}$ ), 60.1 ( $\text{C}_{20}$ ), 52.2 ( $\text{C}_{21}$  and  $\text{C}_{25}$ ), 22.7 ( $\text{C}_{22}$  and  $\text{C}_{24}$ ), 21.4 ( $\text{C}_{23}$ ), 20.7 ( $\text{C}_{26}$ ).

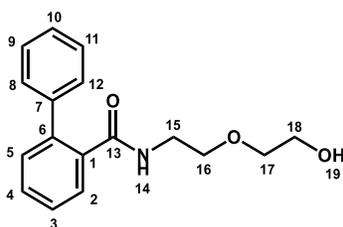
**LC-MS (ESI)  $m/z$  = 399.4  $[\text{M}+\text{H}]^+$**

**UPLC:** C18 column:  $t_R$  = 2.2 min, purity > 99.0 %

**Molecular formula:**  $\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}$

**Molecular weight:** 398.51 g/mol

**Aspect:** yellow oil

**N-[2-(2-hydroxyethoxy)ethyl]-[1,1'-biphenyl]-2-carboxamide (57)****Procedure:**

To a round bottom flask was added 2-biphenylcarboxylic acid (1.0 eq., 1.00 g, 5.05 mmol) in DCM. The solution was cooled to 0 °C and then Et<sub>3</sub>N (2.2 eq., 1.54 mL, 11.01 mmol) was added dropwise. The mixture was stirred at room temperature for 30 min. HOBt (1.2 eq., 0.82 g, 6.05 mmol) and EDCI (1.2 eq., 0.94 g, 6.05 mmol) were added at 0 °C and the solution was stirred at 0°C for 30 min. Then, 2-(2-aminoethoxy)ethanol (1.0 eq., 0.51 mL, 5.05 mmol) was added and the solution was stirred at 0 °C for 1h and at room temperature overnight. The solution was hydrolyzed with a HCl solution 1M and the aqueous layer was extracted three times with DCM. The organic layer was washed with NaHCO<sub>3</sub> solution 1M, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated *in vacuo* to afford **57** (930.0 mg, 65%).

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm, J Hz): 7.71 (dd, 1H, J = 7.4 Hz and J = 9.1 Hz), 7.50-7.37 (m, 8H), 5.71 (s, 1H, H<sub>14</sub>), 3.58 (m, 2H, H<sub>16</sub>), 3.40-3.26 (m, 6H, H<sub>15</sub>, H<sub>17</sub> and H<sub>18</sub>).

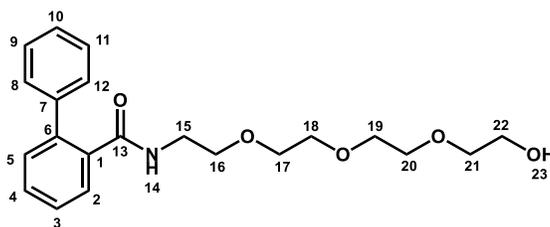
<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm, J Hz): 169.6 (C<sub>13</sub>), 140.3 (C<sub>7</sub>), 139.4 (C<sub>4</sub>), 135.6 (C<sub>1</sub> and C<sub>6</sub>), 130.2 (C<sub>9</sub> and C<sub>11</sub>), 128.8 (C<sub>10</sub>), 128.6 (C<sub>2</sub> and C<sub>3</sub>), 127.7 (C<sub>8</sub> and C<sub>12</sub>), 127.6 (C<sub>5</sub>), 71.9 (C<sub>16</sub>), 69.3 (C<sub>17</sub>), 61.6 (C<sub>18</sub>), 39.5 (C<sub>15</sub>).

LC-MS (ESI) m/z = 286.3 [M+H]<sup>+</sup>

**Molecular formula:** C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>3</sub>

**Molecular weight:** 285.34 g/mol

**Aspect:** yellow oil

**N-(2-{2-[2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy]ethoxy}ethyl)-[1,1'-biphenyl]-2-carboxamide (58)****Procedure:**

The same procedure as described for compound **57** was used starting from 2-biphenylcarboxylic acid (1.0 eq., 1.00 g, 5.05 mmol), Et<sub>3</sub>N (2.2 eq., 1.54 mL, 11.01 mmol), HOBt (1.2 eq., 0.82 g, 6.05 mmol), EDCI (1.2

eq., 0.94 g, 6.05 mmol) and 2-{2-[2-(2-aminoethoxy)ethoxy]ethoxy}ethanol (1.0 eq., 0.89 mL, 5.05 mmol) to afford **58** (1.10 g, 56%).

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm, J Hz): 7.64-7.61 (m, 1H), 7.50-7.35 (m, 8H), 6.75 (s, 1H, H<sub>14</sub>), 3.63-3.61 (m, 2H), 3.59-3.53 (m, 4H), 3.52-3.48 (m, 2H), 3.43-3.38 (m, 6H), 3.29 (m, 2H, H<sub>15</sub>).

<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm, J Hz): 170.0 (C<sub>13</sub>), 140.5 (C<sub>7</sub>), 139.6 (C<sub>4</sub>), 136.5 (C<sub>1</sub> and C<sub>6</sub>), 130.0 (C<sub>9</sub> and C<sub>11</sub>), 129.7 (CH), 128.8 (CH), 128.4 (C<sub>8</sub> and C<sub>12</sub>), 127.5 (CH), 127.3 (C<sub>5</sub>), 72.4 (C<sub>20</sub>), 70.5 (C<sub>18</sub> and C<sub>19</sub>), 70.0 (C<sub>16</sub> and C<sub>21</sub>), 69.8 (C<sub>17</sub>), 61.3 (C<sub>22</sub>), 39.5 (C<sub>15</sub>).

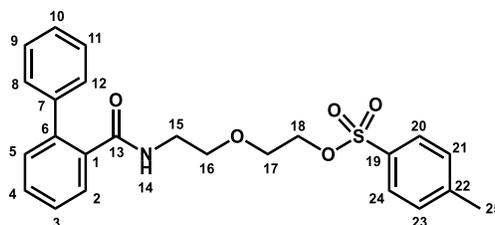
LC-MS (ESI) m/z = 374.3 [M+H]<sup>+</sup>

Molecular formula: C<sub>21</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>5</sub>

Molecular weight: 373.45 g/mol

Aspect: yellow oil

### 2-[2-({[1,1'-biphenyl]-2-yl}formamido)ethoxy]ethyl 4-methylbenzene-1-sulfonate (**59**)



#### Procedure:

To a round bottom flask were added **57** (1.0 eq., 0.93 g, 3.26 mmol) and Et<sub>3</sub>N (3.0 eq., 1.36 mL, 9.78 mmol) in DCM. Then, tosyl chloride (1.5 eq., 0.93 g, 4.89 mmol) dissolved in DCM was added dropwise. The solution was stirred at room temperature overnight. The solution was hydrolyzed with a HCl solution 1M and the aqueous layer was extracted with DCM. The organic layer was washed with NaHCO<sub>3</sub> solution 1M and brine. Combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated *in vacuo* to give an orange oil. The crude product was purified by flash chromatography (cyclohexane/acetone (8/2)) to afford **59** (1.3 g, 91%).

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm, J Hz): 7.75-7.68 (m, 3H), 7.54-7.43 (m, 8H), 7.29-7.26 (m, 2H), 5.58 (s, 1H, H<sub>14</sub>), 4.02 (m, 2H, H<sub>17</sub>), 3.37-3.28 (m, 4H, H<sub>16</sub> and H<sub>18</sub>), 3.15 (t, 2H, H<sub>15</sub>, J = 5.2 Hz), 2.41 (s, 3H, H<sub>25</sub>).

<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm, J Hz): 169.5 (C<sub>13</sub>), 144.9 (C<sub>19</sub>), 140.3 (C<sub>22</sub>), 139.5 (C<sub>7</sub>), 135.7 (C<sub>4</sub>), 132.3 (C), 130.2 (C), 130.1 (C<sub>25</sub> and C<sub>27</sub>), 129.8 (C<sub>24</sub> and C<sub>28</sub>), 128.8 (C<sub>9</sub> and C<sub>11</sub>), 128.7 (C<sub>2</sub> and C<sub>3</sub>), 128.5 (C<sub>8</sub> and C<sub>12</sub>), 127.9 (C<sub>10</sub>), 127.6 (C<sub>5</sub>), 69.4 (C<sub>16</sub>), 68.9 (C<sub>17</sub>), 68.1 (C<sub>18</sub>), 39.2 (C<sub>15</sub>), 21.6 (C<sub>25</sub>).

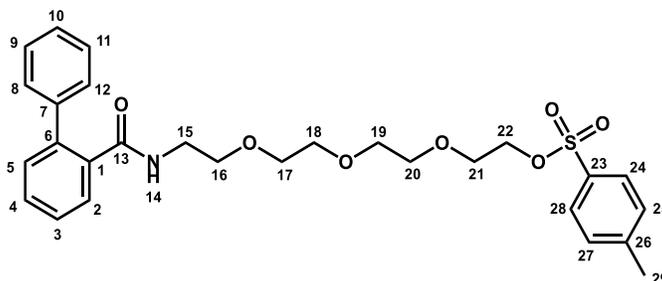
LC-MS (ESI) m/z = 440.3 [M+H]<sup>+</sup>

Molecular formula: C<sub>24</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>5</sub>S

Molecular weight: 439.53 g/mol

**Aspect:** orange oil

**2-(2-{2-[2-({[1,1'-biphenyl]-2-yl}formamido)ethoxy]ethoxy}ethoxy)ethyl 4-methylbenzene-1-sulfonate  
(60)**



**Procedure:**

The same procedure as described for compound **59** was used starting from **58** (1.0 eq., 1.06 g, 2.84 mmol), Et<sub>3</sub>N (3.0 eq., 1.18 mL, 8.52 mmol) and tosyl chloride (1.5 eq., 0.81 g, 4.26 mmol) in DCM. The crude product was purified by flash chromatography (cyclohexane/acetone (8/2)) to afford **60** (1.3 g, 87%).

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm, J Hz): 7.80 (m, 2H), 7.65 (m, 1H), 7.51-7.36 (m, 10H), 5.87 (s, 1H, H<sub>14</sub>), 4.12 (m, 2H), 3.65-3.61 (m, 2H), 3.50-3.47 (m, 2H), 3.41-3.33 (m, 4H), 3.28-3.25 (m, 2H), 2.46 (s, 3H, H<sub>29</sub>), 1.81 (m, 2H, H<sub>15</sub>).

<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm, J Hz): 169.7 (C<sub>13</sub>), 144.8 (C<sub>23</sub>), 140.3 (C<sub>26</sub>), 139.5 (C<sub>7</sub>), 135.9 (C<sub>4</sub>), 132.3 (C), 130.2 (C), 130.0 (C<sub>25</sub> and C<sub>27</sub>), 129.8 (C<sub>24</sub> and C<sub>28</sub>), 128.8 (C<sub>9</sub> and C<sub>11</sub>), 128.6 (C<sub>2</sub> and C<sub>3</sub>), 128.0 (C<sub>8</sub> and C<sub>12</sub>), 127.7 (C<sub>10</sub>), 127.5 (C<sub>5</sub>), 70.7 (C<sub>20</sub>), 70.4 (C<sub>18</sub> and C<sub>19</sub>), 70.1 (C<sub>16</sub>), 69.4 (C<sub>17</sub>), 69.2 (C<sub>21</sub>), 68.7 (C<sub>22</sub>), 39.5 (C<sub>15</sub>), 21.7 (C<sub>29</sub>).

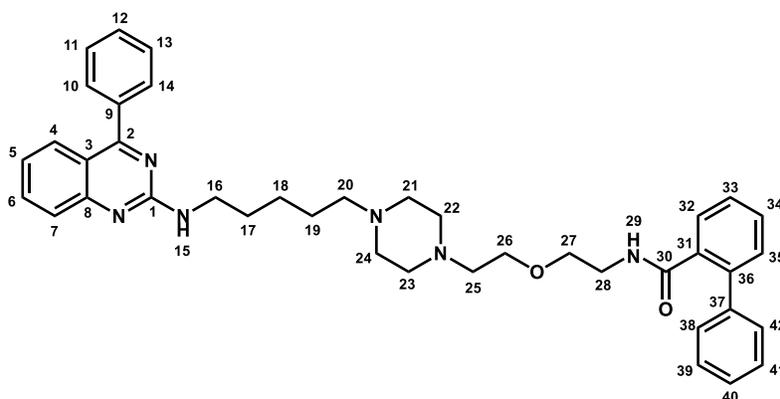
**LC-MS (ESI)** m/z = 528.3 [M+H]<sup>+</sup>

**Molecular formula:** C<sub>28</sub>H<sub>33</sub>NO<sub>7</sub>S

**Molecular weight:** 527.63 g/mol

**Aspect:** orange oil

***N*-{2-[2-(4-{5-[(4-phenylquinazolin-2-yl)amino]pentyl)piperazin-1-yl]ethoxy]ethyl}-[1,1'-biphenyl]-2-carboxamide (61)**



**Procedure:**

To a solution of **55n** (1.0 eq., 50.0 mg, 0.13 mmol) and DIPEA (3.0 eq., 0.07 mL, 0.40 mmol) in toluene was added **59** (1.4 eq., 81.9 mg, 0.19 mmol). The solution was stirred at 110 °C in a sealed tube for 6 hours. **59** (0.5 eq., 29.3 mg, 0.07 mmol) was added afterwards to push the reaction to completion. The reaction was stirred at reflux for 2 hours. The mixture was cooled to room temperature and concentrated *in vacuo*. The crude product was solubilized in saturated K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solution and extracted three times with DCM. The organic layers were combined, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by flash chromatography (DCM/MeOH (NH<sub>3</sub> sat.): 10/0 to 9.5/0.5) to afford **61** (35.0 mg, 29%).

**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm, J Hz):** 7.78 (d, 1H, H<sub>7</sub>, J = 8.3 Hz), 7.70-7.64 (m, 5H, H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>10</sub>, H<sub>14</sub>, and H<sub>32</sub>), 7.53 (t, 3H, H<sub>5</sub>, H<sub>11</sub>, H<sub>13</sub>, J = 3.2 Hz), 7.48-7.33 (m, 8H, H<sub>33</sub>-H<sub>36</sub> and H<sub>38</sub>-H<sub>42</sub>), 7.14 (quintuplet, 1H, H<sub>12</sub>, J = 4.1 Hz), 5.88 (m, 1H, H<sub>29</sub>), 5.30 (m, 1H, H<sub>15</sub>), 3.58 (quadruplet, 2H, H<sub>16</sub>, J = 6.6 Hz), 3.40-3.29 (m, 4H, H<sub>26</sub> and H<sub>27</sub>), 3.22 (t, 2H, H<sub>28</sub>, J = 4.9 Hz), 2.52-2.25 (m, 12H, H<sub>20</sub>-H<sub>25</sub>), 1.70 (quintuplet, 2H, H<sub>17</sub>, J = 7.3 Hz), 1.58-1.39 (m, 4H, H<sub>18</sub> and H<sub>19</sub>).

**<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm, J Hz):** 170.1 (C<sub>1</sub>), 169.7 (C<sub>30</sub>), 159.2 (C<sub>2</sub>), 153.6 (C<sub>8</sub>), 140.4 (C<sub>37</sub>), 139.5 (C<sub>34</sub>), 137.6 (C<sub>9</sub>), 136.2 (C<sub>31</sub>), 133.8 (C<sub>6</sub>), 130.3 (C<sub>36</sub>), 130.1 (C<sub>32</sub>), 129.8 (C<sub>5</sub>), 129.6 (C<sub>10</sub> and C<sub>14</sub>), 128.8 (C<sub>39</sub> and C<sub>41</sub>), 128.7 (C<sub>35</sub>), 128.6 (C<sub>11</sub> and C<sub>13</sub>), 128.6 (C<sub>38</sub> and C<sub>142</sub>), 127.8 (C<sub>33</sub>), 127.7 (C<sub>40</sub>), 127.6 (C<sub>7</sub>), 126.2 (C<sub>4</sub>), 122.3 (C<sub>12</sub>), 118.6 (C<sub>3</sub>), 69.1 (C<sub>27</sub>), 68.3 (C<sub>26</sub>), 58.7 (C<sub>20</sub>), 57.8 (C<sub>25</sub>), 53.7 (C<sub>21</sub> and C<sub>24</sub>), 53.1 (C<sub>22</sub> and C<sub>23</sub>), 41.6 (C<sub>16</sub>), 39.5 (C<sub>28</sub>), 29.7 (C<sub>17</sub>), 26.7 (C<sub>19</sub>), 25.1 (C<sub>18</sub>).

**LC-MS (ESI) m/z = 643.5 [M+H]<sup>+</sup>**

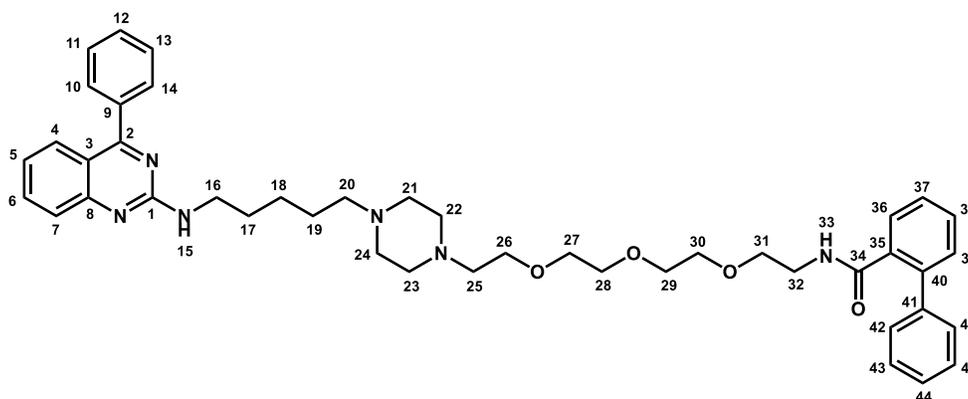
**UPLC:** C18 column: t<sub>R</sub> = 2.4 min, purity > 99.0 %

**Molecular formula:** C<sub>40</sub>H<sub>46</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>

**Molecular weight:** 642.85 g/mol

**Aspect:** yellow oil

***N*-(2-(2-(2-(2-(4-{5-[(4-phenylquinazolin-2-yl)amino]pentyl)piperazin-1-yl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-[1,1'-biphenyl]-2-carboxamide (62)**



**Procedure:**

The same procedure as described for compound **61** was used starting from **55n** (1.0 eq., 50.0 mg, 0.13 mmol), DIPEA (3.0 eq., 0.07 mL, 0.40 mmol) and **60** (2.0 eq., 140.5 mg, 0.27 mmol) in toluene. The crude product was purified by flash chromatography (DCM/MeOH (NH<sub>3</sub> sat.): 10/0 to 9.5/0.5) to afford **62** (53.0 mg, 54%).

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm, *J* Hz): 7.78 (d, 1H, H<sub>7</sub>, *J* = 8.3 Hz), 7.70-7.64 (m, 6H, H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>10</sub>, H<sub>14</sub>, and H<sub>31</sub>), 7.53-7.52 (m + t, 3H, H<sub>5</sub>, H<sub>11</sub> and H<sub>13</sub>), 7.48-7.34 (m, 8H, H<sub>36</sub>-H<sub>39</sub> and H<sub>42</sub>-H<sub>46</sub>), 7.14 (quintuplet, 1H, H<sub>12</sub>, *J* = 4.1 Hz), 5.99 (m, 1H, H<sub>33</sub>), 5.29 (t, 1H, H<sub>15</sub>, *J* = 5.4 Hz), 3.61-3.46 (m, 10H, H<sub>16</sub>, H<sub>27</sub>-H<sub>30</sub>), 3.41-3.32 (m, 4H, H<sub>26</sub> and H<sub>31</sub>), 3.26 (t, 2H, H<sub>39</sub>, *J* = 5.1 Hz), 2.56-2.31 (m, 12H, H<sub>20</sub>-H<sub>25</sub>), 1.69 (quintuplet, 2H, H<sub>23</sub>, *J* = 7.3 Hz), 1.60-1.41 (m, 4H, H<sub>18</sub> and H<sub>19</sub>).

<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm, *J* Hz): 170.1 (C<sub>1</sub>), 169.7 (C<sub>34</sub>), 159.2 (C<sub>2</sub>), 153.5 (C<sub>8</sub>), 140.5 (C<sub>41</sub>), 139.6 (C<sub>38</sub>), 137.6 (C<sub>9</sub>), 136.2 (C<sub>35</sub>), 132.3-132.0 (imp), 130.3 (C<sub>6</sub>), 130.1 (C<sub>36</sub>), 129.7 (C<sub>5</sub>), 129.6 (C<sub>10</sub> and C<sub>14</sub>), 128.9 (C<sub>43</sub> and C<sub>45</sub>), 128.7 (C<sub>39</sub>), 128.6 (C<sub>11</sub> and C<sub>13</sub>), 128.5 (C<sub>42</sub> and C<sub>46</sub>), 127.7 (C<sub>37</sub>), 127.6 (C<sub>44</sub>), 127.6 (C<sub>7</sub>), 126.2 (C<sub>4</sub>), 122.3 (C<sub>12</sub>), 118.6 (C<sub>3</sub>), 70.6-70.2 (C<sub>27</sub>, C<sub>28</sub>, C<sub>29</sub> and C<sub>30</sub>), 69.5 (C<sub>31</sub>), 68.9 (C<sub>26</sub>), 58.7 (C<sub>20</sub>), 57.8 (C<sub>25</sub>), 53.6 (C<sub>21</sub> and C<sub>24</sub>), 53.2 (C<sub>22</sub> and C<sub>23</sub>), 41.5 (C<sub>16</sub>), 39.6 (C<sub>32</sub>), 29.7 (C<sub>17</sub>), 26.7 (C<sub>19</sub>), 25.1 (C<sub>18</sub>).

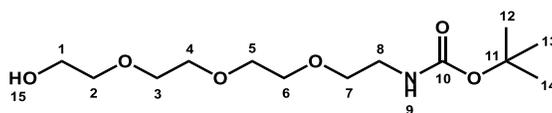
**LC-MS (ESI) m/z = 731.6 [M+H]<sup>+</sup>**

**UPLC:** C18 column: t<sub>R</sub> = 2.2 min, purity = 95.4 %

**Molecular formula:** C<sub>44</sub>H<sub>54</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>

**Molecular weight:** 730.95 g/mol

**Aspect:** yellow oil

Tert-butyl *N*-(2-(2-(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)carbamate (**63**)**Procedure:**

To a solution of 2-(2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethan-1-ol (1.0 eq, 500.0 mg, 2.59 mmol) in DCM were added Et<sub>3</sub>N (3.0 eq., 1.08 mL, 7.76 mmol) and Boc<sub>2</sub>O (1.1 eq., 0.65 mL, 2.85 mmol). The solution was stirred at room temperature overnight. Then, the mixture was concentrated *in vacuo*. The crude product was dissolved in NaOH 2.5M solution and extracted three times with DCM. The organic layers were combined, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by flash chromatography (DCM/MeOH: 10/0 to 9.5/0.5) to afford **63** (560.0 mg, 74%).

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm, J Hz): 5.62 (s, 1H, H<sub>9</sub>), 3.75-3.60 (m, 12H, H<sub>1</sub>-H<sub>6</sub>), 3.53 (t, 2H, H<sub>7</sub>, J = 5.0 Hz), 3.32 (q, 2H, H<sub>8</sub>, J = 5.0 Hz), 3.03 (s, 1H, H<sub>15</sub>), 1.43 (s, 9H, H<sub>12</sub>-H<sub>14</sub>).

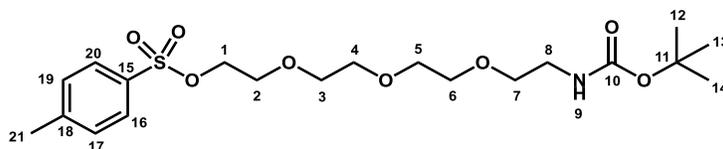
<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm, J Hz): 156.3 (C<sub>10</sub>), 79.1 (C<sub>11</sub>), 72.7 (C<sub>2</sub>), 70.7-70.2 (C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>), 61.8 (C<sub>1</sub>), 40.5 (C<sub>8</sub>), 28.5 (C<sub>12</sub>, C<sub>13</sub> and C<sub>14</sub>)

LC-MS (ESI) m/z = 294.3 [M+H]<sup>+</sup>

**Molecular formula:** C<sub>13</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>6</sub>

**Molecular weight:** 293.36 g/mol

**Aspect:** yellow oil

Tert-butyl *N*-(2-(2-(2-(2-[(4-methylbenzenesulfonyl)oxy]ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)carbamate (**64**)**Procedure:**

To a solution of **63** (1.0 eq, 560.0 mg, 1.91 mmol) in DCM were added Et<sub>3</sub>N (3.0 eq., 0.80 mL, 5.73 mmol) and DMAP (0.2 eq., 46.6 mg, 0.38 mmol). Then, tosyl chloride (1.5 eq., 545.9 mg, 2.86 mmol) was added. The solution was stirred at room temperature overnight. Then, the mixture was concentrated *in vacuo*. The crude product was dissolved in NaHCO<sub>3</sub> aq. 5% solution and extracted three times with DCM. The organic layers were combined, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by flash chromatography (DCM/MeOH: 10/0 to 9.8/0.2) to afford **64** (609.0 mg, 71%).

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm, J Hz): 7.80 (d, 2H, H<sub>16</sub>, H<sub>20</sub>, J = 8.3 Hz), 7.34 (d, 2H, H<sub>17</sub>, H<sub>19</sub>, J = 8.0 Hz), 4.16 (t, 2H, H<sub>1</sub>, J = 4.9 Hz), 3.69 (t, 2H, H<sub>2</sub>, J = 4.9 Hz), 3.61-3.57 (m, 8H, H<sub>3</sub>-H<sub>6</sub>), 3.52 (t, 2H, H<sub>7</sub>, J = 5.2 Hz), 3.29 (q, 2H, H<sub>8</sub>, J = 5.2 Hz), 2.44 (s, 3H, H<sub>21</sub>), 1.44 (s, 9H, H<sub>12</sub>-H<sub>14</sub>).

**$^{13}\text{C}$ -RMN (CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz):** 156.0 (C<sub>10</sub>), 144.8 (C<sub>15</sub>), 133.0 (C<sub>18</sub>), 129.8 (C<sub>17</sub> and C<sub>19</sub>), 128.0 (C<sub>16</sub> and C<sub>20</sub>), 79.1 (C<sub>11</sub>), 70.8 (C<sub>6</sub>), 70.6 - 70.5 (C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> and C<sub>5</sub>), 70.2 (C<sub>7</sub>), 69.2 (C<sub>2</sub>), 68.7 (C<sub>1</sub>), 40.4 (C<sub>8</sub>), 28.4 (C<sub>12</sub>, C<sub>13</sub> and C<sub>14</sub>), 21.7 (C<sub>21</sub>).

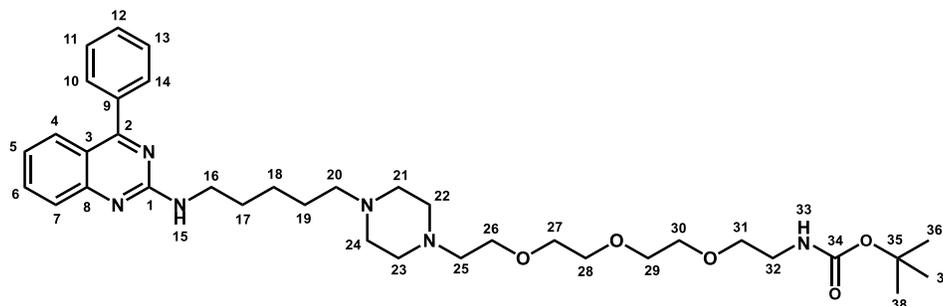
**LC-MS (ESI)  $m/z$  = 448.3 [M+H]<sup>+</sup>**

**Molecular formula:** C<sub>20</sub>H<sub>33</sub>NO<sub>8</sub>S

**Molecular weight:** 447.19 g/mol

**Aspect:** yellow oil

**Tert-butyl N-[2-(2-{2-[2-(4-{5-[(4-phenylquinazolin-2-yl)amino]pentyl}piperazin-1-yl)ethoxy]ethoxy}ethoxy)ethyl]carbamate (65)**



**Procedure:**

To a solution of **55n** (1.0 eq, 420.0 mg, 1.12 mmol) and Et<sub>3</sub>N (3.0 eq., 0.47 mL, 3.36 mmol) in DMF were added **64** (1.2 eq., 600.7 mg, 1.34 mmol) and K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3.0 eq., 463.7 mg, 3.36 mmol). The solution was stirred at 90 °C overnight. Then, the mixture was concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by flash chromatography (DCM/MeOH: 9.8/0.2 to 9/1) to afford **65** (311.0 mg, 43%).

**$^1\text{H}$ -RMN (CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz):** 7.78 (dt, 1H, H<sub>7</sub>,  $J$  = 1.0, 8.4 Hz), 7.70-7.64 (m, 4H, H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>10</sub> and H<sub>14</sub>), 7.55-7.51 (m, 3H, H<sub>5</sub>, H<sub>11</sub> and H<sub>13</sub>), 7.14 (quintuplet, 1H, H<sub>12</sub>,  $J$  = 4.0 Hz), 5.29 (t, 1H, H<sub>15</sub>,  $J$  = 5.8 Hz), 5.14 (s, 1H, H<sub>33</sub>), 3.65-3.51 (m + t, 14H, H<sub>16</sub> and H<sub>26</sub>-H<sub>31</sub>), 3.30 (quadruplet, 2H, H<sub>32</sub>,  $J$  = 5.0 Hz), 2.63-2.34 (m + t, 12H, H<sub>20</sub>-H<sub>25</sub>), 1.70 (quintuplet, 2H, H<sub>17</sub>,  $J$  = 7.0 Hz), 1.63-1.52 (m, 2H, H<sub>18</sub>), 1.49-1.44 (m, 11H, H<sub>19</sub> and H<sub>36</sub>-H<sub>38</sub>).

**$^{13}\text{C}$ -RMN (CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz):** 170.1 (C<sub>1</sub>), 159.2 (C<sub>2</sub>), 156.1 (C<sub>34</sub>), 153.6 (C<sub>8</sub>), 137.6 (C<sub>9</sub>), 133.8 (C<sub>6</sub>), 129.8 (C<sub>5</sub>), 129.6 (C<sub>10</sub> and C<sub>14</sub>), 128.6 (C<sub>11</sub> and C<sub>13</sub>), 127.6 (C<sub>7</sub>), 126.2 (C<sub>4</sub>), 122.3 (C<sub>12</sub>), 118.6 (C<sub>3</sub>), 79.2 (C<sub>35</sub>), 70.7-70.4 (C<sub>27</sub>, C<sub>28</sub>, C<sub>29</sub> and C<sub>30</sub>), 69.0 (C<sub>31</sub>), 58.7 (C<sub>20</sub>), 57.8 (C<sub>25</sub>), 53.6 (C<sub>21</sub> and C<sub>24</sub>), 53.2 (C<sub>22</sub> and C<sub>23</sub>), 41.5 (C<sub>16</sub>), 40.5 (C<sub>32</sub>), 29.7 (C<sub>17</sub>), 28.6 (C<sub>36</sub>, C<sub>37</sub> and C<sub>38</sub>), 26.6 (C<sub>19</sub>), 25.1 (C<sub>18</sub>).

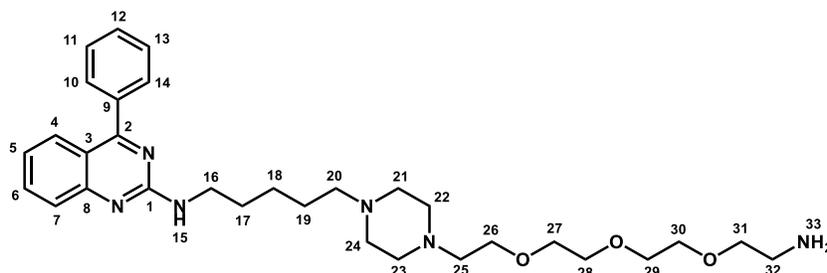
**LC-MS (ESI)  $m/z$  = 651.5 [M+H]<sup>+</sup>**

**Molecular formula:** C<sub>36</sub>H<sub>54</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>

**Molecular weight:** 650.87 g/mol

Aspect: yellow oil

***N*-(5-[4-[2-(2-[2-(2-aminoethoxy)ethoxy]ethoxy)ethyl]piperazin-1-yl]pentyl)-4-phenylquinazolin-2-amine (66)**



**Procedure:**

To a solution of **65** (1.0 eq, 310.0 mg, 0.48 mmol) in DCM was added HCl (12.0 eq., 1.43 mL, 5.72 mmol). The solution was stirred at room temperature for 4 hours. Then, the mixture was concentrated *in vacuo*. The crude product was solubilized in DCM and washed with saturated K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solution. The aqueous layer was extracted three times with DCM. The organic layers were combined, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by flash chromatography (DCM/MeOH (NH<sub>3</sub> sat.): 9.5/0.5 to 9/1) to afford **66** (200.0 mg, 76%).

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm, J Hz): 7.78 (d, 1H, H<sub>7</sub>, J = 8.2 Hz), 7.70-7.63 (m, 4H, H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>10</sub> and H<sub>14</sub>), 7.54-7.51 (m, 3H, H<sub>5</sub>, H<sub>11</sub> and H<sub>13</sub>), 7.14 (quintuplet, 1H, H<sub>12</sub>, J = 4.0 Hz), 5.30 (t, 1H, H<sub>15</sub>, J = 5.7 Hz), 3.67-3.51 (m, 14H, H<sub>16</sub> and H<sub>26</sub>-H<sub>31</sub>), 2.87 (t, 2H, H<sub>32</sub>, J = 5.2 Hz), 2.60-2.30 (2t + m, 12H, H<sub>20</sub>-H<sub>25</sub>), 2.07 (s, 2H, H<sub>33</sub>), 1.69 (quintuplet, 2H, H<sub>17</sub>, J = 7.2 Hz), 1.58-1.41 (m, 4H, H<sub>18</sub> and H<sub>19</sub>).

<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm, J Hz): 170.0 (C<sub>1</sub>), 159.2 (C<sub>2</sub>), 153.5 (C<sub>8</sub>), 137.6 (C<sub>9</sub>), 133.7 (C<sub>6</sub>), 129.7 (C<sub>5</sub>), 129.6 (C<sub>10</sub> and C<sub>14</sub>), 128.5 (C<sub>11</sub> and C<sub>13</sub>), 127.6 (C<sub>7</sub>), 126.2 (C<sub>4</sub>), 122.3 (C<sub>12</sub>), 118.5 (C<sub>3</sub>), 73.4 (C<sub>26</sub>), 70.7-70.4 (C<sub>27</sub>, C<sub>28</sub>, C<sub>29</sub> and C<sub>30</sub>), 68.9 (C<sub>31</sub>), 58.7 (C<sub>20</sub>), 57.9 (C<sub>25</sub>), 53.7 (C<sub>21</sub> and C<sub>24</sub>), 53.2 (C<sub>22</sub> and C<sub>23</sub>), 41.9 (C<sub>32</sub>), 41.5 (C<sub>16</sub>), 29.6 (C<sub>17</sub>), 26.7 (C<sub>19</sub>), 25.1 (C<sub>18</sub>).

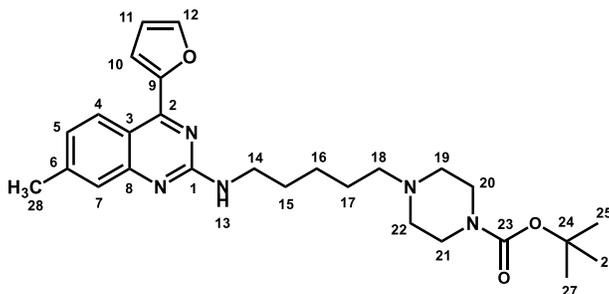
LC-MS (ESI) m/z = 551.5 [M+H]<sup>+</sup>

**Molecular formula:** C<sub>31</sub>H<sub>46</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>

**Molecular weight:** 550.75 g/mol

Aspect: yellow oil

## Tert-butyl 4-(5-([4-(furan-2-yl)-7-methylquinazolin-2-yl]pentyl)piperazine-1-carboxylate (68)

**Procedure:**

The same procedure as described for compound **55m** was used starting from **49m** (1.0 eq., 490.0 mg, 2.00 mmol), **54f** (1.2 eq., 652.2 mg, 2.4 mmol) and DIPEA (3.0 eq., 1.05 mL, 2.40 mmol) in dioxane (3 mL). The crude product was purified using flash chromatography (cyclohexane/acetone (8.5/1.5)) to afford **68** (450.0 mg, 47%).

**<sup>1</sup>H-RMN ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, δ ppm, J Hz):** 8.50 (d, 1H, H<sub>12</sub>, J = 8.6 Hz), 7.94 (q, 1H, H<sub>7</sub>, J = 0.8 Hz), 7.39-7.34 (m, 2H, H<sub>4</sub> and H<sub>5</sub>), 7.09 (dd, 1H, H<sub>10</sub>, J = 1.6 Hz and J = 8.7 Hz), 6.72 (dd, 1H, H<sub>11</sub>, J = 1.7 Hz and J = 3.4 Hz), 6.36 (s, 1H, H<sub>13</sub>), 3.55 (q, 2H, H<sub>14</sub>, J = 6.5 Hz), 3.34 (m, 4H, H<sub>20</sub> and H<sub>21</sub>), 2.45 (s, 3H, H<sub>28</sub>), 2.34-2.29 (m, 6H, H<sub>18</sub>, H<sub>19</sub> and H<sub>22</sub>), 1.72 (quintuplet, 2H, H<sub>15</sub>, J = 7.1 Hz), 1.59-1.40 (m + s, 13H, H<sub>16</sub>, H<sub>17</sub> and H<sub>25</sub>-H<sub>27</sub>).

**<sup>13</sup>C-RMN ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, δ ppm, J Hz):** 160.5 (C<sub>1</sub>), 156.6 (C<sub>9</sub>), 155.0 (C<sub>2</sub> and C<sub>23</sub>), 146.5 (C<sub>6</sub> and C<sub>8</sub>), 144.8 (C<sub>12</sub>), 127.3 (C<sub>5</sub>), 126.2 (C<sub>4</sub>), 125.2 (C<sub>7</sub>), 115.4 (C<sub>3</sub>), 115.3 (C<sub>11</sub>), 112.8 (C<sub>10</sub>), 79.4 (C<sub>24</sub>), 59.1 (C<sub>20</sub> and C<sub>21</sub>), 53.9 (C<sub>19</sub> and C<sub>22</sub>), 41.8 (C<sub>14</sub>), 28.6 (C<sub>15</sub>, C<sub>25</sub>, C<sub>26</sub> and C<sub>27</sub>), 27.2 (C<sub>17</sub>), 25.4 (C<sub>16</sub>), 21.9 (C<sub>28</sub>).

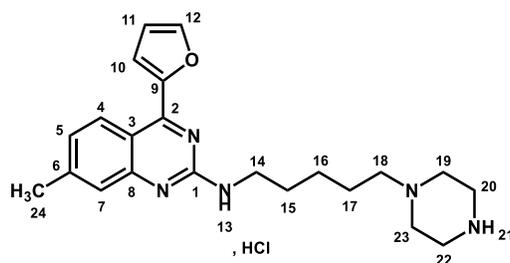
**LC-MS (ESI) m/z = 480.4 [M+H]<sup>+</sup>**

**Molecular formula:** C<sub>27</sub>H<sub>37</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>

**Molecular weight:** 479.63 g/mol

**Aspect:** yellow oil

## 4-(5-((4-furan-2-yl)-7-methylquinazolin-2-yl)amino)pentyl)piperazin-1-ium chloride (69)

**Procedure:**

To a solution of **68** (1.0 eq., 450.0 mg, 0.94 mmol) in diethyl ether was added diethyl ether saturated with HCl. The mixture was stirred at room temperature for 2 hours. The supernatant was then removed and filtered, and the resulting solid was dried under reduced pressure to afford **69** (400.0 mg, 100%).

**<sup>1</sup>H-RMN ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, δ ppm, J Hz):** 8.50 (d, 1H, H<sub>12</sub>, J = 8.7 Hz), 7.93 (q, 1H, H<sub>7</sub>, J = 0.8 Hz), 7.43-7.31 (m, 2H, H<sub>4</sub> and H<sub>5</sub>), 7.08 (dd, 1H, H<sub>10</sub>, J = 1.7 Hz and J = 8.7 Hz), 6.72 (dd, 1H, H<sub>11</sub>, J = 1.74 Hz and J = 3.5 Hz), 3.53 (t, 2H, H<sub>14</sub>, J = 7.0 Hz), 2.86-2.69 (m + t, 4H, H<sub>19</sub> and H<sub>23</sub>), 2.44 (s, 3H, H<sub>24</sub>), 2.40-2.23 (m, 6H, H<sub>18</sub>, H<sub>20</sub> and H<sub>22</sub>), 1.71 (quintuplet, 2H, H<sub>15</sub>, J = 7.0 Hz), 1.58-1.39 (m, 4H, H<sub>16</sub> and H<sub>17</sub>).

**<sup>13</sup>C-RMN ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, δ ppm, J Hz):** 160.5 (C<sub>1</sub>), 156.6 (C<sub>9</sub>), 155.6 (C<sub>2</sub>), 146.5 (C<sub>6</sub> and C<sub>8</sub>), 144.8 (C<sub>12</sub>), 127.3 (C<sub>5</sub>), 126.2 (C<sub>4</sub>), 125.2 (C<sub>7</sub>), 115.4 (C<sub>3</sub>), 115.3 (C<sub>11</sub>), 112.8 (C<sub>10</sub>), 59.9 (C<sub>18</sub>), 55.6 (C<sub>20</sub> and C<sub>22</sub>), 46.8 (C<sub>19</sub> and C<sub>23</sub>), 41.8 (C<sub>14</sub>), 27.3 (C<sub>17</sub>), 25.5 (C<sub>16</sub>), 21.9 (C<sub>24</sub>).

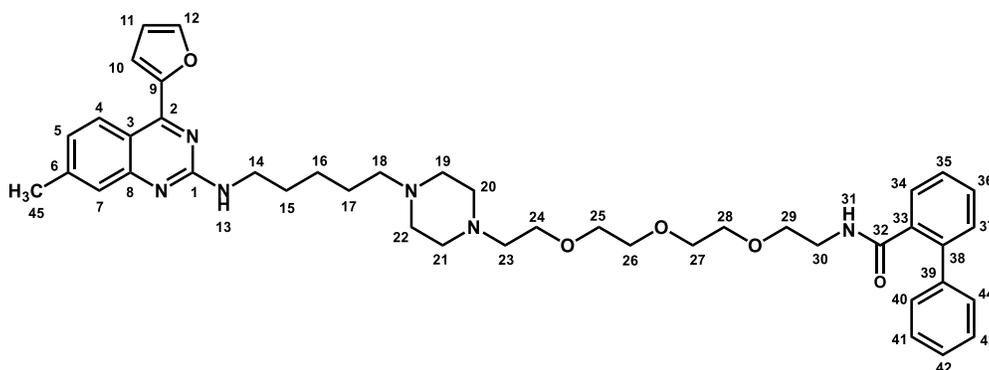
**LC-MS (ESI) m/z = 380.4 [M+H]<sup>+</sup>**

**Molecular formula:** C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>ClN<sub>5</sub>O

**Molecular weight:** 415.96 g/mol

**Aspect:** yellow powder

***N*-(2-(2-(2-(2-(4-{5-[(4-furan-2-yl)-7-methylquinazolin-2-yl]amino]pentyl]piperazin-1-yl)ethoxy)ethoxy)ethyl)-[1,1'-biphenyl]-2-carboxamide (70)**



**Procedure:**

The same procedure as described for compound **61** was used starting from **69** (1.0 eq., 50.0 mg, 0.12 mmol), DIPEA (3.0 eq., 0.06 mL, 0.36 mmol) and **60** (2.0 eq., 126.8 mg, 0.24 mmol) in toluene. The crude product was purified by flash chromatography (DCM/MeOH (NH<sub>3</sub> sat.): 10/0 to 9.5/0.5) to afford **70** (26.0 mg, 29%).

**<sup>1</sup>H-RMN ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, δ ppm, J Hz):** 8.51 (d, 1H, H<sub>12</sub>, *J* = 8.6 Hz), 7.94 (quadruplet, 1H, H<sub>7</sub>, *J* = 0.8 Hz), 7.53-7.32 (m, 11H, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>34</sub>-H<sub>37</sub> and H<sub>40</sub>-H<sub>44</sub>), 7.09 (dd, 1H, H<sub>10</sub>, *J* = 1.6 Hz and *J* = 8.6 Hz), 6.96 (s, 1H, H<sub>31</sub>), 6.72 (dd, 1H, H<sub>11</sub>, *J* = 1.8 Hz and *J* = 3.5 Hz), 6.34 (s, 1H, H<sub>13</sub>), 3.57-3.41 (m, 12H, H<sub>14</sub>, H<sub>25</sub>-H<sub>29</sub>), 3.38-3.30 (m, 4H, H<sub>24</sub> and H<sub>30</sub>), 2.44-2.26 (m, 15H, H<sub>18</sub>-H<sub>23</sub> and H<sub>45</sub>), 1.71 (quintuplet, 2H, H<sub>15</sub>, *J* = 7.1 Hz), 1.57-1.42 (m, 4H, H<sub>16</sub> and H<sub>17</sub>).

**<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm, J Hz):** 169.9 (C<sub>32</sub>), 160.6 (C<sub>1</sub>), 156.7 (C<sub>9</sub>), 155.7 (C<sub>2</sub>), 154.6 (C<sub>8</sub>), 146.5 (C<sub>6</sub>), 144.9 (C<sub>12</sub>), 141.6 (C<sub>39</sub>), 140.5 (C<sub>36</sub>), 138.3 (C<sub>33</sub>), 130.8 (C<sub>38</sub>), 130.3 (C<sub>35</sub>), 129.5 (C<sub>41</sub> and C<sub>43</sub>), 129.1 (C<sub>40</sub> and C<sub>44</sub>), 128.9 (C<sub>34</sub>), 128.2 (C<sub>42</sub>), 127.9 (C<sub>37</sub>), 127.3 (C<sub>5</sub>), 126.3 (C<sub>4</sub>), 125.2 (C<sub>7</sub>), 115.5 (C<sub>3</sub>), 115.3 (C<sub>11</sub>), 112.8 (C<sub>10</sub>), 71.3-70.9 (C<sub>26</sub>, C<sub>27</sub>, C<sub>28</sub> and C<sub>29</sub>), 70.0 (C<sub>25</sub>), 69.9 (C<sub>24</sub>), 59.1 (C<sub>20</sub> and C<sub>21</sub>), 58.6 (C<sub>19</sub> and C<sub>22</sub>), 54.6 (C<sub>18</sub>), 54.1 (C<sub>30</sub>), 41.9 (CH<sub>2</sub>), 40.1 (CH<sub>2</sub>), 27.4 (C<sub>15</sub>), 25.9 (C<sub>17</sub>), 25.5 (C<sub>16</sub>), 21.9 (C<sub>45</sub>).

**LC-MS (ESI) m/z = 735.6 [M+H]<sup>+</sup>**

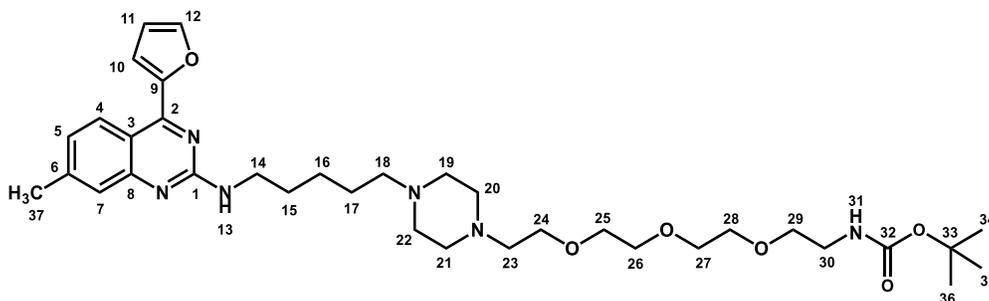
**UPLC:** C18 column: t<sub>R</sub> = 2.0 min, purity > 99.0 %

**Molecular formula:** C<sub>43</sub>H<sub>54</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>

**Molecular weight:** 734.94 g/mol

**Aspect:** yellow oil

**Tert-butyl *N*-[2-(2-{2-[2-(4-{5-[(4-(furan-2-yl)-7-methylquinazolin-2-yl)amino]pentyl]piperazin-1-yl)ethoxy]ethoxy}ethoxy)ethyl]carbamate (71)**



**Procedure:**

The same procedure as described for compound **65** starting from **69** (1.0 eq, 150.0 mg, 0.36 mmol) and Et<sub>3</sub>N (3.0 eq., 0.15 mL, 1.08 mmol) in DMF were added **64** (1.2 eq., 193.7 mg, 0.43 mmol) and K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3.0 eq., 149.5 mg, 1.08 mmol). The crude product was purified by flash chromatography (acetone/MeOH (9/1)) to afford **71** (120.0 mg, 51%).

**<sup>1</sup>H-RMN ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, δ ppm, J Hz):** 8.50 (d, 1H, H<sub>12</sub>, *J* = 8.5 Hz), 7.94 (q, 1H, H<sub>7</sub>, *J* = 0.8 Hz), 7.45-7.30 (m, 2H, H<sub>4</sub> and H<sub>5</sub>), 7.09 (dd, 1H, H<sub>10</sub>, *J* = 1.6 Hz and *J* = 8.6 Hz), 6.72 (dd, 1H, H<sub>11</sub>, *J* = 1.8 Hz and *J* = 3.5 Hz), 6.38 (s, 1H, H<sub>13</sub>), 5.98 (s, 1H, H<sub>31</sub>), 3.61-3.48 (m, 14H, H<sub>14</sub> and H<sub>24</sub>-H<sub>29</sub>), 3.22 (quadruplet, 2H, H<sub>30</sub>, *J* = 5.7 Hz), 2.64-2.38 (m + s, 15H, H<sub>18</sub>, H<sub>19</sub>-H<sub>22</sub>, H<sub>23</sub> and H<sub>37</sub>), 1.72 (quintuplet, 2H, H<sub>15</sub>, *J* = 7.2 Hz), 1.61 (quintuplet, 2H, H<sub>16</sub>, *J* = 7.5 Hz), 1.50-1.36 (m + s, 11H, H<sub>17</sub> and H<sub>34</sub>-H<sub>36</sub>).

**<sup>13</sup>C-RMN ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, δ ppm, J Hz):** 160.5 (C<sub>1</sub>), 156.6 (C<sub>9</sub>), 155.6 (C<sub>2</sub>), 154.6 (C<sub>32</sub>), 146.5 (C<sub>6</sub> and C<sub>8</sub>), 144.8 (C<sub>12</sub>), 127.3 (C<sub>5</sub>), 126.3 (C<sub>4</sub>), 125.2 (C<sub>7</sub>), 115.5 (C<sub>3</sub>), 115.2 (C<sub>11</sub>), 112.8 (C<sub>10</sub>), 78.6 (C<sub>33</sub>), 71.2-70.9 (C<sub>25</sub>, C<sub>26</sub>, C<sub>27</sub> and C<sub>28</sub>), 70.7 (C<sub>29</sub>), 69.7 (C<sub>24</sub>), 58.7 (C<sub>20</sub> and C<sub>21</sub>), 58.3 (C<sub>19</sub> and C<sub>22</sub>), 53.8 (C<sub>18</sub>), 53.6 (C<sub>23</sub>), 41.6 (C<sub>14</sub>), 40.9 (C<sub>30</sub>), 28.7 (C<sub>34</sub>, C<sub>35</sub> and C<sub>36</sub>), 26.8 (C<sub>15</sub> and C<sub>17</sub>), 25.4 (C<sub>16</sub>), 21.9 (C<sub>37</sub>).

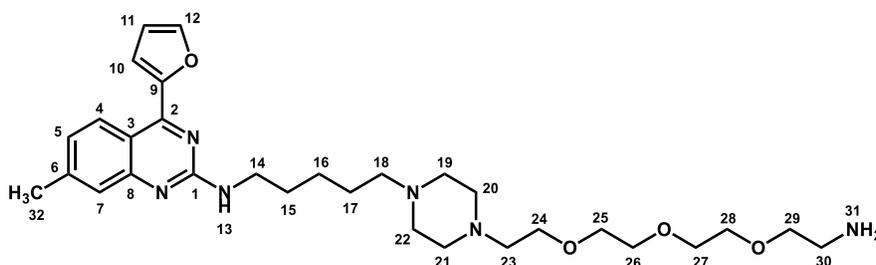
**LC-MS (ESI) *m/z* = 655.6 [M+H]<sup>+</sup>**

**Molecular formula:** C<sub>35</sub>H<sub>54</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub>

**Molecular weight:** 654.85 g/mol

**Aspect:** yellow oil

**N-(5-[4-[2-(2-{2-[2-aminoethoxy]ethoxy}ethoxy)ethyl]piperazin-1-yl]pentyl)-4-(furan-2-yl)-7-methylquinazolin-2-amine (72)**



**Procedure:**

To a solution of **71** (1.0 eq, 115.0 mg, 0.18 mmol) in diethyl ether was added diethyl ether saturated with HCl. The mixture was stirred at room temperature for 4 hours. The solution was concentrated *in vacuo*. The crude product was washed three times with diethyl ether saturated with HCl, then dried. The solid was then solubilized in a HCl 1 M solution then washed three times with EtOAc. The aqueous layer was basified with a NaOH 2.5 M solution and the aqueous layer was extracted three times with EtOAc. The organic layers were combined, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo* to afford **72** (80.0 mg, 82%).

**<sup>1</sup>H-RMN ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, δ ppm, J Hz):** 8.50 (d, 1H, H<sub>12</sub>, J = 8.6 Hz), 7.94 (quadruplet, 1H, H<sub>7</sub>, J = 0.8 Hz), 7.40-7.33 (m, 2H, H<sub>4</sub> and H<sub>5</sub>), 7.89 (dd, 1H, H<sub>10</sub>, J = 1.6 Hz and J = 8.6 Hz), 6.72 (quadruplet, 1H, H<sub>11</sub>, J = 1.7 Hz), 6.35 (s, 1H, H<sub>13</sub>), 3.65-3.48 (m + t, 14H, H<sub>14</sub> and H<sub>24</sub>-H<sub>29</sub>), 3.34 (t, 2H, H<sub>30</sub>, J = 6.2 Hz), 2.50-2.28 (m + t, 15H, H<sub>18</sub>-H<sub>23</sub> and H<sub>32</sub>), 1.92-1.90 (m, 2H, H<sub>31</sub>), 1.72 (quintuplet, 2H, H<sub>15</sub>, J = 7.1 Hz), 1.58-1.40 (m, 4H, H<sub>16</sub> and H<sub>17</sub>).  
**<sup>13</sup>C-RMN ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, δ ppm, J Hz):** 160.1 (C<sub>1</sub>), 156.6 (C<sub>9</sub>), 155.6 (C<sub>2</sub>), 146.5 (C<sub>6</sub> and C<sub>8</sub>), 144.8 (C<sub>12</sub>), 127.2 (C<sub>5</sub>), 126.3 (C<sub>4</sub>), 125.2 (C<sub>7</sub>), 115.4 (C<sub>3</sub>), 115.3 (C<sub>11</sub>), 112.8 (C<sub>10</sub>), 72.2 (C<sub>29</sub>), 71.2-71.1 (C<sub>25</sub>, C<sub>26</sub>, C<sub>27</sub>, and C<sub>28</sub>), 69.9 (C<sub>24</sub>), 59.1 (C<sub>20</sub> and C<sub>21</sub>), 58.6 (C<sub>19</sub> and C<sub>22</sub>), 54.5 (C<sub>18</sub>), 54.1 (C<sub>23</sub>), 52.0 (C<sub>30</sub>), 41.7 (C<sub>14</sub>), 27.3 (C<sub>15</sub> and C<sub>17</sub>), 25.5 (C<sub>16</sub>), 21.9 (C<sub>32</sub>).

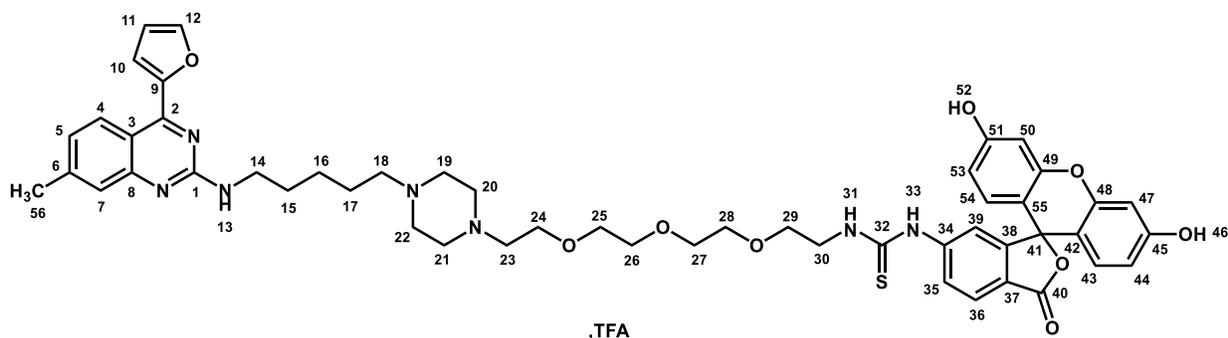
**LC-MS (ESI) m/z = 555.4 [M+H]<sup>+</sup>**

**Molecular formula:** C<sub>30</sub>H<sub>46</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>

**Molecular weight:** 554.74 g/mol

**Aspect:** yellow oil

**N-(5-[4-[2-(2-{2-[2-aminoethoxy]ethoxy}ethoxy)ethyl]piperazin-1-yl]pentyl)-4-(furan-2-yl)-7-methylquinazolin-2-amine (73)**



**Procedure:**

To a solution of **72** (1.0 eq, 70.0 mg, 0.13 mmol) in DMF was added FITC (1.0 eq., 49.1 mg, 0.13 mmol). The mixture was stirred at room temperature overnight. The solution was concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by flash chromatography (water/ACN/TFA (0.1%)) to afford **73** (47.0 mg, 35%).

**<sup>1</sup>H-RMN (DMF-*d*<sub>7</sub>), δ ppm, J Hz):** 10.67 (s, 1H, H<sub>33</sub>), 10.09 (s, 1H), 8.79 (s, 1H), 8.66-8.59 (m, 2H), 8.38 (s, 1H), 8.03-7.94 (m, 2H), 7.62-7.27 (m, 4H), 6.98 (s, 1H, H<sub>11</sub>), 6.79-6.76 (m, 2H, H<sub>46</sub> and H<sub>52</sub>), 6.72-6.64 (m, 4H), 3.85-3.43 (m, 25H), 3.31 (s, 2H, H<sub>23</sub>), 3.20 (t, 2H, H<sub>18</sub>, J = 7.6 Hz), 2.56 (s, 3H, H<sub>9</sub>), 1.86-1.76 (m, 4H), 1.56-1.54 (m, 2H, H<sub>15</sub>).

**<sup>13</sup>C-RMN (DMF-*d*<sub>7</sub>), δ ppm, J Hz):** 182.6 (C<sub>32</sub>), 169.9 (C<sub>40</sub>), 161.2 (CO (TFA)), 160.8 (C<sub>1</sub>), 154.9 (C<sub>9</sub>), 153.5, 153.4 (C<sub>2</sub>), 151.2, 150.3, 148.6, 144.2, 143.3, 130.2, 129.3, 128.2, 125.2, 122.6, 119.6, 117.8 (CF<sub>3</sub> (TFA)), 117.4, 115.7, 114.7, 113.7, 111.5 (C<sub>10</sub>), 103.5, 84.5 (C<sub>41</sub>), 71.2-71.1 (C<sub>25</sub>, C<sub>26</sub>, C<sub>27</sub> and C<sub>28</sub>), 69.8 (C<sub>29</sub>), 67.1 (C<sub>24</sub>), 57.2 (C<sub>20</sub> and C<sub>21</sub>), 56.9 (C<sub>18</sub> and C<sub>23</sub>), 50.9 (C<sub>22</sub>), 50.6 (C<sub>19</sub>), 45.1 (C<sub>30</sub>), 42.1 (C<sub>14</sub>), 28.8 (C<sub>15</sub> and C<sub>17</sub>), 24.7 (C<sub>16</sub>), 22.5 (C<sub>56</sub>).

**LC-MS (ESI) m/z = 944.4 [M+H]<sup>+</sup>**

**UPLC:** C18 column: t<sub>R</sub> = 1.9 min, purity > 99.0 %

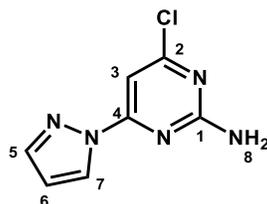
**Molecular formula:** C<sub>51</sub>H<sub>57</sub>N<sub>7</sub>O<sub>9</sub>S

**Molecular weight:** 944.12 g/mol

**Aspect:** yellow oil

4. Synthesis of 2-aminopyrimidines A<sub>2A</sub>R/mGluR<sub>5</sub>

The synthesis of compounds **8**, **77**, **78** and **79** was carried out according to protocols from the thesis of Raphaël Bolteau.<sup>168</sup>

4-Chloro-6-(1H-pyrazol-1-yl)pyrimidin-2-amine (**74**)**Procedure:**

To a solution of commercial 2-amino-4,6-dichloropyrimidine (1.0 eq., 5.00 g, 30.49 mmol) in DMF (20 mL) were added K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2.0 eq., 8.43 g, 60.98 mmol) and 1H-pyrazole (1.5 eq., 3.11 g, 45.73 mmol). The solution was stirred and heated at 80 °C overnight. The mixture was cooled to room temperature, hydrolyzed with water and acidified with a 6 M HCl solution up to acid pH. The solid was filtered and washed with PE to afford **74** (2.50 g, 42%).

<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, J Hz): 7.47-7.44 (d, 1H, H<sub>7</sub>, J = 2.6 Hz), 7.92-7.87 (m, 1H), 7.41 (s, 2H, H<sub>8</sub>), 7.02 (s, 1H, H<sub>3</sub>), 6.64-6.60 (m, 1H).

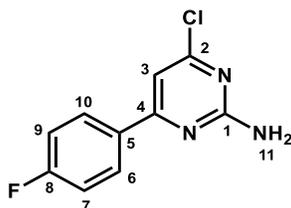
LC-MS (ESI) m/z = 196.1, 198.1 [M+H]<sup>+</sup>

**Molecular formula:** C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>ClN<sub>5</sub>

**Molecular weight:** 195.03 g/mol

**Melting point:** 212-215 °C

**Aspect:** yellow solid

4-Chloro-6-(4-fluorophenyl)pyrimidin-2-amine (**75**)**Procedure:**

To a round bottom flask were added 2-amino-4,6-dichloropyrimidine (1.0 eq., 3.00 g, 18.29 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2.0 eq., 5.05 g, 36.59 mmol), 4-fluorophenylboronic acid (1.1 eq., 2.82 g, 20.12 mmol) and

triphenylphosphine (0.1 eq., 0.48 g, 1.83 mmol) in dioxane (16 mL) and water (4 mL). The solution was degassed with nitrogen during 5 minutes and palladium acetate (0.1 eq., 0.41 g, 1.83 mmol) was added. The solution was stirred and heated at 90 °C for 1 hour. The solution was cooled to room temperature and hydrolyzed with water. The aqueous layer was extracted 3 times with EtOAc. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub>, discolored with charcoal and filtered. The solution was concentrated *in vacuo* to give a yellow powder. The crude product was purified by flash chromatography (cyclohexane/EtOAc (7.5/2.5)) to afford **75** (1.30 g, 32%).

<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, J Hz): 8.20-8.13 (m, 2H, H<sub>6</sub> and H<sub>10</sub>), 7.41-7.30 (m, 2H, H<sub>7</sub> and H<sub>9</sub>), 7.27 (s, 1H, H<sub>3</sub>), 7.19 (s, 2H, H<sub>11</sub>).

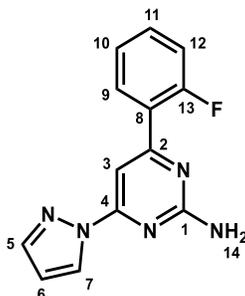
LC-MS (ESI) m/z = 224.1, 225.1 [M+H]<sup>+</sup>

**Molecular formula:** C<sub>10</sub>H<sub>7</sub>ClFN<sub>3</sub>

**Molecular weight:** 223.64 g/mol

**Aspect:** white solid

#### 4-(2-Fluorophenyl)-6-(1H-pyrazol-1-yl)pyrimidin-2-amine (76a)



#### Procedure:

To a sealed tube were added **74** (1.0 eq., 300.0 mg, 1.53 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2.0 eq., 423.9 mg, 3.06 mmol), 2-fluorophenylboronic acid (1.1 eq., 236.1 mg, 1.69 mmol) and triphenylphosphine (0.1 eq., 40.2 mg, 0.15 mmol) in THF (4 mL) and water (1 mL). The solution was degassed with nitrogen during 5 minutes and palladium acetate (0.1 eq., 34.4 mg, 0.15 mmol) was added. The solution was stirred and heated in an oil bath at 90 °C overnight. The mixture was cooled to room temperature and hydrolyzed with water. The aqueous layer was extracted three times with EtOAc. Combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, discolored with charcoal, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by flash chromatography (cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 7/3) to afford **76a** (65.0 mg, 17%).

<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, J Hz): 8.55-8.53 (m, 1H), 7.90-7.88 (m, 1H), 7.63-7.53 (m, 1H), 7.51-7.49 (d, 2H, J = 2.0 Hz), 7.42-7.34 (m, 2H), 7.08 (s, 2H, H<sub>14</sub>), 6.65-6.62 (dd, 1H, H<sub>6</sub>, J = 1.7 Hz and J = 2.6 Hz).

**<sup>13</sup>C-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, *J* Hz):** 165.4 (C<sub>4</sub>), 164.6 (C<sub>13</sub> (d, *J* = 252.3 Hz)), 163.9 (C<sub>2</sub>), 159.1 (C<sub>1</sub>), 143.6 (C<sub>5</sub>), 139.9 (C<sub>11</sub> (d, *J* = 7.3 Hz)), 131.4 (C<sub>9</sub> (d, *J* = 7.5 Hz)), 127.7 (C<sub>7</sub>), 123.4 (C<sub>10</sub> (d, *J* = 2.3 Hz)), 118.2 (C<sub>8</sub> (d, *J* = 21.1 Hz)), 114.0 (C<sub>12</sub> (d, *J* = 22.5 Hz)), 109.3 (C<sub>6</sub>), 93.2 (C<sub>3</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z* = 256.2 [M+H]<sup>+</sup>**

**UPLC:** C18 column: *t<sub>R</sub>* = 1.9 min, purity > 99.0 %

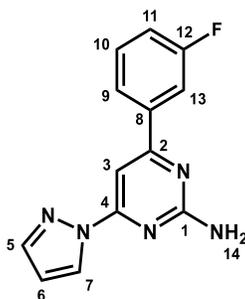
**Molecular formula:** C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>FN<sub>5</sub>

**Molecular weight:** 255.26 g/mol

**Melting point:** 132-134 °C

**Aspect:** white solid

#### 4-(3-Fluorophenyl)-6-(1H-pyrazol-1-yl)pyrimidin-2-amine (76b)



#### Procedure:

The same procedure as described for compound **76a** was used starting from **74** (1.0 eq., 300.0 mg, 1.53 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2.0 eq., 423.9 mg, 3.06 mmol), 3-fluorophenylboronic acid (1.1 eq., 236.1 mg, 1.69 mmol) and triphenylphosphine (0.1 eq., 40.2 mg, 0.15 mmol) in THF (4 mL) and water (1 mL). The solution was degassed with nitrogen during 5 minutes and palladium acetate (0.1 eq., 34.43 mg, 0.15 mmol) was added. The crude product was purified by flash chromatography (cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 7/3) to afford **76b** (90.0 mg, 26%).

**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, *J* Hz):** 8.55-8.53 (m, 1H), 7.98-7.91 (m, 3H), 7.57 (m, 2H), 7.42-7.34 (m, 1H), 7.08 (s, 2H, H<sub>14</sub>), 6.65-6.62 (dd, 1H, H<sub>6</sub>, *J* = 1.6 Hz and *J* = 2.6 Hz).

**<sup>13</sup>C-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, *J* Hz):** 165.4 (C<sub>4</sub>), 164.6 (C<sub>12</sub> (d, *J* = 249.8 Hz)), 163.9 (C<sub>2</sub>), 159.1 (C<sub>1</sub>), 143.6 (C<sub>5</sub>), 139.9 (C<sub>8</sub> (d, *J* = 7.5 Hz)), 131.4 (C<sub>10</sub> (d, *J* = 7.7 Hz)), 127.7 (C<sub>7</sub>), 123.4 (C<sub>9</sub> (d, *J* = 2.2 Hz)), 118.2 (C<sub>13</sub> (d, *J* = 20.8 Hz)), 114.0 (C<sub>11</sub> (d, *J* = 22.1 Hz)), 109.3 (C<sub>6</sub>), 93.2 (C<sub>3</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z* = 256.2 [M+H]<sup>+</sup>**

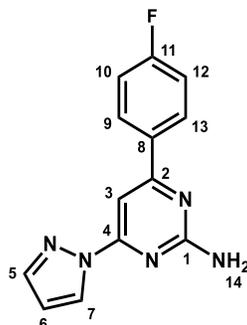
**UPLC:** C18 column: *t<sub>R</sub>* = 2.0 min, purity = 95.6 %

**Molecular formula:** C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>FN<sub>5</sub>

**Molecular weight:** 255.26 g/mol

**Aspect:** white solid

**4-(4-Fluorophenyl)-6-(1H-pyrazol-1-yl)pyrimidin-2-amine (76c)**



**Procedure:**

The same procedure as described for compound **76a** was used starting from **74** (1.0 eq., 300.0 mg, 1.53 mmol),  $K_2CO_3$  (2.0 eq., 423.9 mg, 3.06 mmol), 4-fluorophenylboronic acid (1.1 eq., 236.1 mg, 1.69 mmol) and triphenylphosphine (0.1 eq., 40.2 mg, 0.15 mmol) in THF (4 mL) and water (1 mL). The solution was degassed with nitrogen during 5 minutes and palladium acetate (0.1 eq., 34.43 mg, 0.15 mmol) was added. The crude product was purified by flash chromatography (cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 7/3) to afford **76c** (50.0 mg, 13%).

**$^1H$ -RMN (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz):** 8.55-8.53 (dd, 1H, H<sub>7</sub>,  $J = 0.6$  Hz and  $J = 2.7$  Hz), 8.22-8.15 (m, 2H), 7.91-7.89 (dd, 1H, H<sub>5</sub>,  $J = 0.6$  Hz and  $J = 1.6$  Hz), 7.53 (s, 1H, H<sub>3</sub>), 7.40-7.31 (m, 2H), 7.02 (s, 2H, H<sub>14</sub>), 6.64-6.61 (dd, 1H, H<sub>6</sub>,  $J = 1.7$  Hz and  $J = 2.7$  Hz).

**$^{13}C$ -RMN (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz):** 165.7 (C<sub>4</sub>), 163.9 (C<sub>2</sub>), 162.6 (C<sub>11</sub> (d,  $J = 234.8$  Hz)), 159.0 (C<sub>1</sub>), 143.5 (C<sub>5</sub>), 133.8 (C<sub>8</sub> (d,  $J = 2.8$  Hz)), 129.8 (C<sub>9</sub> and C<sub>13</sub> (d,  $J = 9.0$  Hz)), 127.6 (C<sub>7</sub>), 116.3 (C<sub>10</sub> and C<sub>12</sub> (d,  $J = 21.4$  Hz)), 109.2 (C<sub>6</sub>), 92.7 (C<sub>3</sub>).

**LC-MS (ESI)  $m/z = 256.2$  [M+H]<sup>+</sup>**

**UPLC:** C18 column:  $t_R = 2.0$  min, purity > 99.0 %

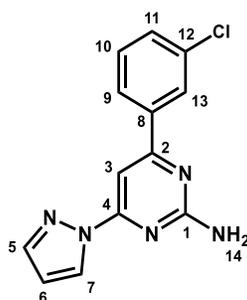
**Molecular formula:** C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>FN<sub>5</sub>

**Molecular weight:** 255.26 g/mol

**Melting point:** 180-182 °C

**Aspect:** white solid

## 4-(3-Chlorophenyl)-6-(1H-pyrazol-1-yl)pyrimidin-2-amine (76d)

**Procedure:**

The same procedure as described for compound **76a** was used starting from **74** (1.0 eq., 300.0 mg, 1.53 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2.0 eq., 423.9 mg, 3.06 mmol), 3-chlorophenylboronic acid (1.1 eq., 263.8 mg, 1.69 mmol) and triphenylphosphine (0.1 eq., 40.2 mg, 0.15 mmol) in THF (4 mL) and water (1 mL). The solution was degassed with nitrogen during 5 minutes and palladium acetate (0.1 eq., 34.4 mg, 0.15 mmol) was added. The crude product was purified by flash chromatography (cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 7/3) to afford **76d** (90.0 mg, 22%).

**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, J Hz):** 8.56-8.54 (dd, 1H, H<sub>7</sub>, *J* = 0.7 Hz and *J* = 2.7 Hz), 8.19-8.17 (m, 1H), 8.10-8.05 (td, 1H, H<sub>10</sub>, *J* = 1.6 Hz and *J* = 7.6 Hz), 7.92-7.90 (dd, 1H, H<sub>5</sub>, *J* = 0.7 Hz and *J* = 1.6 Hz), 7.64-7.52 (m, 3H), 7.10 (s, 2H, H<sub>14</sub>), 6.65-6.63 (dd, 1H, H<sub>6</sub>, *J* = 1.6 Hz and *J* = 2.7 Hz).

**<sup>13</sup>C-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, J Hz):** 165.2 (C<sub>4</sub>), 163.9 (C<sub>2</sub>), 159.1 (C<sub>1</sub>), 143.7 (C<sub>5</sub>), 139.4 (C<sub>12</sub>), 134.2 (C<sub>8</sub>), 131.2 (CH), 131.0 (CH), 127.7 (CH), 127.0 (CH), 126.0 (CH), 109.3 (C<sub>6</sub>), 93.2 (C<sub>3</sub>).

**LC-MS (ESI)** *m/z* = 272.2, 274.2 [M+H]<sup>+</sup>

**UPLC:** C18 column: *t<sub>R</sub>* = 2.2 min, purity > 99.0 %

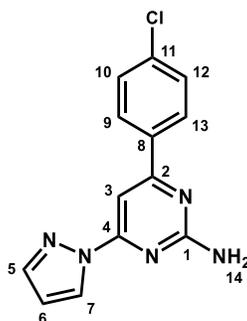
**Molecular formula:** C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>ClN<sub>5</sub>

**Molecular weight:** 271.06 g/mol

**Melting point:** 172-174 °C

**Aspect:** white solid

## 4-(4-Chlorophenyl)-6-(1H-pyrazol-1-yl)pyrimidin-2-amine (76e)

**Procedure:**

The same procedure as described for compound **76a** was used starting from **74** (1.0 eq., 300.0 mg, 1.53 mmol),  $K_2CO_3$  (2.0 eq., 423.9 mg, 3.06 mmol), 4-chlorophenylboronic acid (1.5 eq., 359.7 mg, 1.69 mmol) and triphenylphosphine (0.1 eq., 40.2 mg, 0.15 mmol) in THF (4 mL) and water (1 mL). The solution was degassed with nitrogen during 5 minutes and palladium acetate (0.1 eq., 34.4 mg, 0.15 mmol) was added. The crude product was purified by flash chromatography (cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 7/3) to afford **76e** (65.0 mg, 14%).

**$^1H$ -RMN (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz):** 8.56-8.54 (d, 1H,  $H_7$ ,  $J = 2.4$  Hz), 8.18-8.12 (m, 2H), 7.92-7.89 (m, 1H), 7.63-7.56 (m, 2H), 7.55 (s, 1H,  $H_3$ ), 7.04 (s, 2H,  $H_{14}$ ), 6.64-6.61 (dd, 1H,  $H_6$ ,  $J = 1.6$  Hz and  $J = 2.6$  Hz).

**$^{13}C$ -RMN (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz):** 165.5 ( $C_4$ ), 163.9 ( $C_2$ ), 159.1 ( $C_1$ ), 143.6 ( $C_5$ ), 136.1 ( $C_8$  and  $C_{11}$ ), 129.3 ( $C_9$ ,  $C_{10}$ ,  $C_{12}$  and  $C_{13}$ ), 127.7 ( $C_7$ ), 109.3 ( $C_6$ ), 92.9 ( $C_3$ ).

**LC-MS (ESI)  $m/z = 272.4, 274.4 [M+H]^+$**

**UPLC:** C18 column:  $t_R = 2.2$  min, purity = 97.1 %

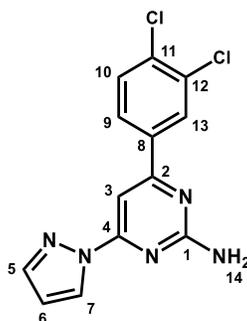
**Molecular formula:**  $C_{13}H_{10}ClN_5$

**Molecular weight:** 271.06 g/mol

**Melting point:** 191-193 °C

**Aspect:** white solid

## 4-(3,4-Dichlorophenyl)-6-(1H-pyrazol-1-yl)pyrimidin-2-amine (76f)

**Procedure:**

The same procedure as described for compound **76a** was used starting from **74** (1.0 eq., 300.0 mg, 1.53 mmol),  $K_2CO_3$  (2.0 eq., 423.9 mg, 3.06 mmol), 3,4-dichlorophenylboronic acid (1.1 eq., 321.9 mg, 1.69 mmol) and triphenylphosphine (0.1 eq., 40.2 mg, 0.15 mmol) in THF (4 mL) and water (1 mL). The solution was degassed with nitrogen during 5 minutes and palladium acetate (0.1 eq., 34.4 mg, 0.15 mmol) was added. The crude product was purified by flash chromatography (cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 7/3) to afford **76f** (52.0 mg, 11%).

**$^1H$ -RMN (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz):** 8.56-8.54 (dd, 1H,  $H_7$ ,  $J = 0.6$  Hz and  $J = 2.6$  Hz), 8.38-8.36 (d, 1H,  $H_{13}$ ,  $J = 2.1$  Hz), 8.14-8.09 (dd, 1H,  $H_{10}$ ,  $J = 2.1$  Hz and  $J = 8.5$  Hz), 7.93-7.90 (m, 1H,  $H_5$ ), 7.81-7.76 (d, 1H,  $H_9$ ,  $J = 8.5$  Hz), 7.60 (s, 1H,  $H_3$ ), 7.12 (s, 2H,  $H_{14}$ ), 6.65-6.62 (dd, 1H,  $H_6$ ,  $J = 1.6$  Hz and  $J = 2.6$  Hz).

**$^{13}C$ -RMN (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz):** 164.2 ( $C_4$ ), 163.9 ( $C_2$ ), 159.2 ( $C_1$ ), 143.7 ( $C_5$ ), 137.8 ( $C_{11}$ ), 133.8 ( $C_{12}$ ), 132.2 ( $C_8$ ), 131.5 (CH), 129.1 (CH), 127.7 (CH), 127.5 (CH), 109.3 ( $C_6$ ), 93.2 ( $C_3$ ).

**LC-MS (ESI)  $m/z$  = 306.1, 308.1  $[M+H]^+$**

**UPLC:** C18 column:  $t_R = 2.3$  min, purity = 98.4 %

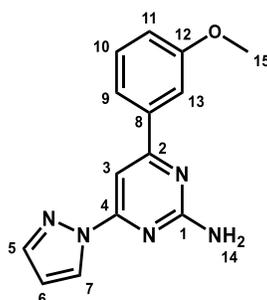
**Molecular formula:**  $C_{13}H_9Cl_2N_5$

**Molecular weight:** 305.02 g/mol

**Melting point:** 204-206 °C

**Aspect:** white solid

## 4-(3-Methoxyphenyl)-6-(1H-pyrazol-1-yl)pyrimidin-2-amine (76g)

**Procedure:**

The same procedure as described for compound **76a** was used starting from **74** (1.0 eq., 300.0 mg, 1.53 mmol),  $K_2CO_3$  (2.0 eq., 423.9 mg, 3.06 mmol), 3-methoxyphenylboronic acid (1.1 eq., 256.4 mg, 1.69 mmol) and triphenylphosphine (0.1 eq., 40.2 mg, 0.15 mmol) in THF (4 mL) and water (1 mL). The solution was degassed with nitrogen during 5 minutes and palladium acetate (0.1 eq., 34.4 mg, 0.15 mmol) was added. The crude product was purified by flash chromatography (cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 7/3) to afford **76g** (65.0 mg, 16%).

**$^1H$ -RMN (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz):** 8.55-8.53 (dd, 1H, H<sub>7</sub>,  $J = 0.7$  Hz and  $J = 2.7$  Hz), 7.91-7.89 (dd, 1H, H<sub>5</sub>,  $J = 0.7$  Hz and  $J = 1.6$  Hz), 7.70-7.62 (m, 2H), 7.53 (s, 1H, H<sub>3</sub>), 7.48-7.40 (t, 1H, H<sub>10</sub>,  $J = 8.1$  Hz), 7.14-7.09 (m, 1H), 7.02 (s, 2H, H<sub>14</sub>), 6.64-6.62 (dd, 1H, H<sub>6</sub>,  $J = 1.7$  Hz and  $J = 2.69$  Hz), 3.9 (s, 3H, H<sub>15</sub>).

**$^{13}C$ -RMN (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz):** 166.64 (C<sub>4</sub>), 163.85 (C<sub>2</sub>), 160.05 (C<sub>1</sub>), 158.93 (C<sub>12</sub>), 143.55 (C<sub>5</sub>), 138.83 (C<sub>8</sub>), 130.35 (C<sub>10</sub>), 127.63 (C<sub>7</sub>), 119.68 (C<sub>9</sub>), 117.09 (C<sub>11</sub>), 112.26 (C<sub>13</sub>), 109.18 (C<sub>6</sub>), 93.08 (C<sub>3</sub>), 55.72 (C<sub>15</sub>).

**LC-MS (ESI)  $m/z = 268.2$  [M+H]<sup>+</sup>**

**UPLC:** C18 column:  $t_R = 2.0$  min, purity > 99.0 %

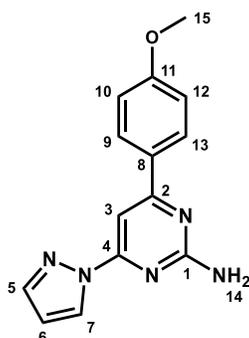
**Molecular formula:** C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>N<sub>5</sub>O

**Molecular weight:** 267.11 g/mol

**Melting point:** 131-133 °C

**Aspect:** white solid

## 4-(4-Methoxyphenyl)-6-(1H-pyrazol-1-yl)pyrimidin-2-amine (76h)

**Procedure:**

The same procedure as described for compound **76a** was used starting from **74** (1.0 eq., 300.0 mg, 1.53 mmol),  $K_2CO_3$  (2.0 eq., 423.9 mg, 3.06 mmol), 4-methoxyphenylboronic acid (1.1 eq., 256.4 mg, 1.69 mmol) and triphenylphosphine (0.1 eq., 40.2 mg, 0.15 mmol) in THF (4 mL) and water (1 mL). The solution was degassed with nitrogen during 5 minutes and palladium acetate (0.1 eq., 34.4 mg, 0.15 mmol) was added. The crude product was purified by flash chromatography (cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 7/3) to afford **76h** (105.0 mg, 26%).

**$^1H$ -RMN (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz):** 8.54-8.52 (dd, 1H,  $H_7$ ,  $J = 0.6$  Hz and  $J = 2.9$  Hz), 8.13-8.07 (m, 2H), 7.90-7.88 (dd, 1H,  $H_5$ ,  $J = 0.7$  Hz and  $J = 1.6$  Hz), 7.49 (s, 1H,  $H_3$ ), 7.11-7.04 (m, 2H), 6.92 (s, 2H,  $H_{14}$ ), 6.63-6.60 (dd, 1H,  $H_6$ ,  $J = 1.7$  Hz and  $J = 2.6$  Hz), 3.84 (s, 3H,  $H_{15}$ ).

**$^{13}C$ -RMN (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz):** 166.4 ( $C_4$ ), 163.2 ( $C_2$ ), 161.9 ( $C_1$ ), 158.8 ( $C_{11}$ ), 143.4 ( $C_5$ ), 129.5 ( $C_8$ ), 128.9 ( $C_9$  and  $C_{13}$ ), 127.6 ( $C_7$ ), 114.6 ( $C_{10}$  and  $C_{12}$ ), 109.0 ( $C_6$ ), 91.9 ( $C_3$ ), 55.8 ( $C_{15}$ ).

**LC-MS (ESI)  $m/z = 268.3$  [ $M+H$ ] $^+$**

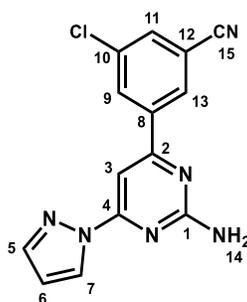
**UPLC:** C18 column:  $t_R = 1.9$  min, purity > 99.0 %

**Molecular formula:**  $C_{14}H_{13}N_5O$

**Molecular weight:** 267.11 g/mol

**Melting point:** 182-185 °C

**Aspect:** white solid

3-[2-Amino-6-(1H-pyrazol-1-yl)pyrimidin-4-yl]-5-chlorobenzonitrile (**76i**)**Procedure:**

The same procedure as described for compound **76a** was used starting from **74** (1.0 eq., 300.0 mg, 1.53 mmol),  $K_2CO_3$  (2.0 eq., 423.9 mg, 3.06 mmol), 3-chloro-5-cyanophenylboronic acid (1.1 eq., 306.0 mg, 1.69 mmol) and triphenylphosphine (0.1 eq., 40.2 mg, 0.15 mmol) in THF (4 mL) and water (1 mL). The solution was degassed with nitrogen during 5 minutes and palladium acetate (0.1 eq., 34.4 mg, 0.15 mmol) was added. The crude product was purified by flash chromatography (cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 7/3) to afford **76i** (65.0 mg, 14%).

**$^1H$ -RMN (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz):** 8.61-8.59 (m, 1H), 8.57-8.54 (dd, 1H,  $H_7$ ,  $J = 0.6$  Hz and  $J = 2.7$  Hz), 8.53-8.50 (m, 1H), 8.23-8.20 (m, 1H), 7.94-7.92 (dd, 1H,  $H_5$ ,  $J = 0.6$  Hz and  $J = 1.6$  Hz), 7.72 (s, 1H,  $H_3$ ), 7.18 (s, 2H,  $H_{14}$ ), 6.66-6.64 (dd, 1H,  $H_6$ ,  $J = 1.6$  Hz and  $J = 2.7$  Hz).

**$^{13}C$ -RMN (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz):** 163.8 ( $C_4$ ), 163.2 ( $C_2$ ), 159.4 ( $C_1$ ), 143.8 ( $C_5$ ), 140.3 ( $C_{10}$ ), 135.1 ( $C_8$ ), 134.0 ( $C_9$ ), 131.8 ( $C_{11}$ ), 130.0 ( $C_{13}$ ), 127.8 ( $C_7$ ), 117.7 ( $C_{15}$ ), 114.2 ( $C_{12}$ ), 109.5 ( $C_6$ ), 93.8 ( $C_3$ ).

**LC-MS (ESI)  $m/z$  =** 297.2, 299.2 [ $M+H$ ] $^+$

**UPLC:** C18 column:  $t_R$  = 2.1 min, purity > 99.0 %

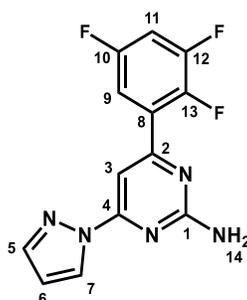
**Molecular formula:**  $C_{14}H_9ClN_6$

**Molecular weight:** 296.06 g/mol

**Melting point:** 169-172 °C

**Aspect:** white solid

## 4-(1H-pyrazol-1-yl)-6-(2,3,5-trifluorophenyl)pyrimidin-2-amine (76j)

**Procedure:**

The same procedure as described for compound **76a** was used starting from **74** (1.0 eq., 200.0 mg, 1.02 mmol),  $K_2CO_3$  (2.0 eq., 282.6 mg, 2.04 mmol), 2,3,5-trifluorophenylboronic acid (1.2 eq., 215.8 mg, 1.23 mmol) and triphenylphosphine (0.1 eq., 26.8 mg, 0.10 mmol) in THF (4 mL) and water (1 mL). The solution was degassed with nitrogen during 5 minutes and palladium acetate (0.1 eq., 22.9 mg, 0.10 mmol) was added. The crude product was purified by flash chromatography (cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 7/3) to afford **76j** (55.0 mg, 18%).

**$^1H$ -RMN (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz):** 8.55-8.53 (dd, 1H, H<sub>7</sub>,  $J = 0.6$  Hz and  $J = 2.7$  Hz), 7.92-7.90 (dd, 1H, H<sub>5</sub>,  $J = 0.6$  Hz and  $J = 1.5$  Hz), 7.80-7.63 (m, 2H), 7.53-7.51 (d, 1H,  $J = 2.0$  Hz), 7.18 (s, 2H, H<sub>14</sub>), 6.65-6.63 (dd, 1H, H<sub>6</sub>,  $J = 1.6$  Hz and  $J = 2.7$  Hz).

**$^{13}C$ -RMN (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz):** 163.7 (C<sub>4</sub>), 160.8 (C<sub>2</sub>), 158.9 (C<sub>1</sub>), 143.9, 127.7, 112.0, 111.6, 109.5, 108.2, 107.8 (CH), 97.1 (C<sub>3</sub>).

**LC-MS (ESI)  $m/z = 292.1$  [M+H]<sup>+</sup>**

**UPLC:** C18 column:  $t_R = 2.1$  min, purity > 99.0 %

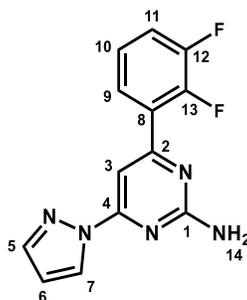
**Molecular formula:** C<sub>13</sub>H<sub>8</sub>F<sub>3</sub>N<sub>5</sub>

**Molecular weight:** 291.07 g/mol

**Melting point:** 168-170 °C

**Aspect:** white solid

## 4-(2,3-Difluorophenyl)-6-(1H-pyrazol-1-yl)pyrimidin-2-amine (76k)

**Procedure:**

The same procedure as described for compound **76a** was used starting from **74** (1.0 eq., 200.0 mg, 1.02 mmol),  $K_2CO_3$  (2.0 eq., 282.6 mg, 2.04 mmol), 3,4-difluorophenylboronic acid (1.2 eq., 193.7 mg, 1.23 mmol) and triphenylphosphine (0.1 eq., 26.8 mg, 0.10 mmol) in THF (4 mL) and water (1 mL). The solution was degassed with nitrogen during 5 minutes and palladium acetate (0.1 eq., 22.9 mg, 0.10 mmol) was added. The crude product was purified by flash chromatography (cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 7/3) to afford **76k** (65.0 mg, 16%).

**$^1H$ -RMN (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz):** 7.91-7.89 (m, 1H), 7.85-7.79 (m, 1H), 7.66-7.55 (m, 1H), 7.49-7.47 (d, 2H,  $H_7$ ,  $J = 2.2$  Hz), 7.41-7.32 (m, 2H), 7.14 (s, 2H,  $H_{14}$ ), 6.64-6.61 (dd, 1H,  $H_6$ ,  $J = 1.6$  Hz and  $J = 2.6$  Hz).

**$^{13}C$ -RMN (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz):** 163.8 ( $C_4$ ), 162.1 ( $C_2$  (d,  $J = 1.5$  Hz)), 158.7 ( $C_1$ ), 152.4 ( $C_{12}$  (dd,  $J = 244.5$  Hz)), 150.8 ( $C_{13}$  (dd,  $J = 251.3$  Hz)), 143.8 ( $C_5$ ), 127.9, 127.7, 125.8, 125.3, 119.4 ( $C_{11}$  (d,  $J = 17.3$  Hz)), 109.4 ( $C_6$ ), 96.9 ( $C_3$  (d,  $J = 9.8$  Hz)).

**LC-MS (ESI)  $m/z = 274.2$  [ $M+H$ ] $^+$**

**UPLC:** C18 column:  $t_R = 2.0$  min, purity > 99.0 %

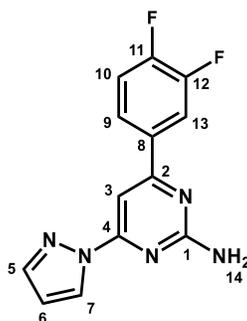
**Molecular formula:**  $C_{13}H_9F_2N_5$

**Molecular weight:** 273.08 g/mol

**Melting point:** 150-152 °C

**Aspect:** white solid

## 4-(3,4-Difluorophenyl)-6-(1H-pyrazol-1-yl)pyrimidin-2-amine (76l)

**Procedure:**

The same procedure as described for compound **76a** was used starting from **74** (1.0 eq., 200.0 mg, 1.02 mmol),  $K_2CO_3$  (2.0 eq., 282.61 mg, 2.04 mmol), 3,4-difluorophenylboronic acid (1.2 eq., 193.7 mg, 1.23 mmol) and triphenylphosphine (0.1 eq., 26.8 mg, 0.10 mmol) in THF (4 mL) and water (1 mL). The solution was degassed with nitrogen during 5 minutes and palladium acetate (0.1 eq., 22.9 mg, 0.10 mmol) was added. The crude product was purified by flash chromatography (cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 7/3) to afford **76l** (50.0 mg, 18%).

**$^1H$ -RMN (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz):** 8.55-8.53 (dd, 1H,  $H_7$ ,  $J = 0.6$  Hz and  $J = 2.6$  Hz), 8.20-8.11 (ddd, 1H,  $H_{10}$ ,  $J = 2.2$  Hz,  $J = 8.0$  Hz and  $J = 12.2$  Hz), 8.05-7.98 (m, 1H), 7.92-7.89 (m, 1H), 7.63-7.52 (m, 2H), 7.07 (s, 2H,  $H_{14}$ ), 6.64-6.61 (dd, 1H,  $H_6$ ,  $J = 1.7$  Hz and  $J = 2.7$  Hz).

**$^{13}C$ -RMN (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz):** 164.5 ( $C_4$ ), 163.8 ( $C_2$ ), 159.2 ( $C_1$ ), 153.3 ( $C_{12}$  (dd,  $J = 248.3$  Hz)), 149.9 ( $C_{11}$  (dd,  $J = 243.8$  Hz)), 143.6 ( $C_5$ ), 134.9 ( $C_8$  (dd,  $J = 3.8$  Hz and  $J = 6.0$  Hz)), 127.7 ( $C_7$ ), 124.5 ( $C_9$  (dd,  $J = 3.0$  Hz and  $J = 6.8$  Hz)), 118.4 ( $C_{13}$  (d,  $J = 17.3$  Hz)), 116.5 ( $C_{10}$  (d,  $J = 18.8$  Hz)), 109.3 ( $C_6$ ), 93.0 ( $C_3$ ).

**LC-MS (ESI)  $m/z = 274.3$  [ $M+H$ ] $^+$**

**UPLC:** C18 column:  $t_R = 2.1$  min, purity > 99.0 %

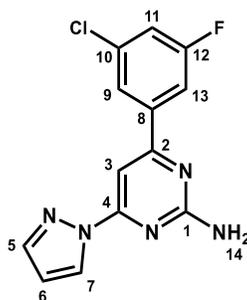
**Molecular formula:**  $C_{13}H_9F_2N_5$

**Molecular weight:** 273.08 g/mol

**Melting point:** 189-191 °C

**Aspect:** white solid

## 4-(3-Chloro-5-fluorophenyl)-6-(1H-pyrazol-1-yl)pyrimidin-2-amine (76m)

**Procedure:**

The same procedure as described for compound **76a** was used starting from **74** (1.0 eq., 200.0 mg, 1.02 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2.0 eq., 282.6 mg, 2.1 mmol), 3-chloro-5-fluorophenylboronic acid (1.1 eq., 196.1 mg, 1.12 mmol) and triphenylphosphine (0.1 eq., 26.8 mg, 0.10 mmol) in THF (4 mL) and water (1 mL). The solution was degassed with nitrogen during 5 minutes and palladium acetate (0.1 eq., 22.9 mg, 0.10 mmol) was added. The crude product was purified by flash chromatography (cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 7/3) to afford **76m** (47.0 mg, 15%).

<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, J Hz): 8.56-8.54 (dd, 1H, H<sub>7</sub>, J = 0.6 Hz and J = 2.6 Hz), 8.07-8.05 (m, 1H), 7.98-7.88 (m, 2H), 7.65-7.59 (m, 1H), 7.61 (s, 1H, H<sub>3</sub>), 7.13 (s, 2H, H<sub>14</sub>), 6.65-6.63 (dd, 1H, H<sub>6</sub>, J = 1.6 Hz and J = 2.7 Hz).

<sup>13</sup>C-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, J Hz): 164.6 (C<sub>12</sub> (d, J = 245.3 Hz)), 163.9 (C<sub>4</sub>), 163.8 (C<sub>2</sub>), 159.3 (C<sub>1</sub>), 143.7 (C<sub>5</sub>), 141.0 (C<sub>10</sub> (d, J = 9.0 Hz)), 134.9 (C<sub>8</sub> (d, J = 11.3 Hz)), 127.8 (C<sub>7</sub>), 123.5 (C<sub>9</sub> (d, J = 3.0 Hz)), 118.3 (C<sub>11</sub> (d, J = 24.8 Hz)), 113.0 (C<sub>13</sub> (d, J = 23.3 Hz)), 109.4 (C<sub>6</sub>), 93.6 (C<sub>3</sub>).

LC-MS (ESI) m/z = 290.2, 292.2 [M+H]<sup>+</sup>

UPLC: C18 column: t<sub>R</sub> = 2.3 min, purity = 95.7 %

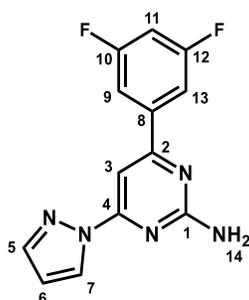
**Molecular formula:** C<sub>13</sub>H<sub>9</sub>ClFN<sub>5</sub>

**Molecular weight:** 289.05 g/mol

**Melting point:** 195-197 °C

**Aspect:** white solid

## 4-(3,5-Difluorophenyl)-6-(1H-pyrazol-1-yl)pyrimidin-2-amine (76n)

**Procedure:**

The same procedure as described for compound **76a** was used starting from **74** (1.0 eq., 200.0 mg, 1.02 mmol),  $K_2CO_3$  (2.0 eq., 282.6 mg, 2.04 mmol), 3,5-difluorophenylboronic acid (1.2 eq., 193.7 mg, 1.23 mmol) and triphenylphosphine (0.1 eq., 26.8 mg, 0.10 mmol) in THF (4 mL) and water (1 mL). The solution was degassed with nitrogen during 5 minutes and palladium acetate (0.1 eq., 22.9 mg, 0.10 mmol) was added. The crude product was purified by flash chromatography (cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 7/3) to afford **76n** (45.0 mg, 16%).

**$^1H$ -RMN (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz):** 8.20-8.11 (dd, 1H,  $H_7$ ,  $J = 0.7$  Hz and  $J = 2.7$  Hz), 7.92-7.91 (m, 1H), 7.89-7.80 (m, 2H), 7.61 (s, 1H,  $H_3$ ), 7.48-7.38 (m, 1H), 7.12 (s, 2H,  $H_{14}$ ), 6.65-6.62 (dd, 1H,  $H_6$ ,  $J = 1.6$  Hz and  $J = 2.7$  Hz).

**$^{13}C$ -RMN (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz):** 163.9 ( $C_{10}$  and  $C_{12}$  (d,  $J = 244.5$  Hz)), 164.1 ( $C_2$  (t,  $J = 3.0$  Hz)), 163.8 ( $C_4$ ), 159.3 ( $C_1$ ), 143.7 ( $C_5$ ), 141.1 ( $C_8$  (t,  $J = 3.4$  Hz)), 127.8 ( $C_7$ ), 110.5 ( $C_9$  and  $C_{13}$  (d,  $J = 9.0$  Hz)), 109.4 ( $C_6$ ), 106.5 ( $C_{11}$  (t,  $J = 25.5$  Hz)), 93.5 ( $C_3$ ).

**LC-MS (ESI)  $m/z = 274.2$   $[M+H]^+$**

**UPLC:** C18 column:  $t_R = 2.1$  min, purity > 99.0 %

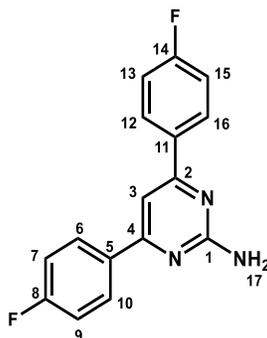
**Molecular formula:**  $C_{13}H_9F_2N_5$

**Molecular weight:** 273.08 g/mol

**Melting point:** 202-204 °C

**Aspect:** white solid

## 4,6-Bis(4-fluorophenyl)pyrimidin-2-amine (76o)

**Procedure:**

To a round bottom flask were added 2-amino-4,6-dichloropyrimidine (1.0 eq., 3.00 g, 18.29 mmol),  $K_2CO_3$  (2.0 eq., 5.05 g, 36.59 mmol), 4-fluorophenylboronic acid (1.1 eq., 2.82 g, 20.12 mmol) and triphenylphosphine (0.1 eq., 0.48 g, 1.83 mmol) in dioxane (16 mL) and water (4 mL). The solution was degassed with nitrogen during 5 minutes and palladium acetate (0.1 eq., 0.41 g, 1.83 mmol) was added. The solution was stirred and heated at 90 °C for 1 hour. The solution was cooled to room temperature and hydrolyzed with water. The aqueous layer was extracted three times with EtOAc. The organic layer was dried over  $MgSO_4$ , discolored with chacoal and filtered. The solution was concentrated *in vacuo* to give a yellow powder. The crude product was purified by flash chromatography (cyclohexane/EtOAc (7.5/2.5)) to afford **76o**.

$^1H$ -RMN (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz): 8.32-8.28 (m, 4H), 7.73 (s, 1H,  $H_3$ ), 7.39-7.33 (m, 4H), 6.79 (s, 2H,  $H_{17}$ ).

$^{13}C$ -RMN (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz): 165.7 ( $C_4$ ), 163.8 ( $C_8$  and  $C_{14}$ ), 162.0 ( $C_2$ ), 159.1 ( $C_1$ ), 133.4 ( $C_5$ ), 132.6 ( $C_{11}$ ), 129.8 ( $C_6$ ,  $C_{10}$ ,  $C_{12}$  and  $C_{16}$  (d,  $J = 7.5$  Hz)), 115.7 ( $C_7$ ,  $C_9$ ,  $C_{13}$  and  $C_{15}$  (d,  $J = 21.1$  Hz)), 99.2 ( $C_3$ ).

LC-MS (ESI)  $m/z = 284.3$  [ $M+H$ ] $^+$

UPLC: C18 column:  $t_R = 2.2$  min, purity > 99.0 %

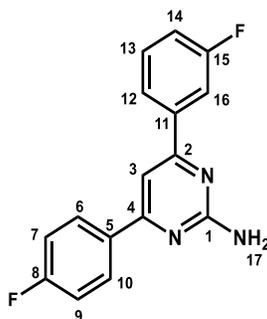
**Molecular formula:**  $C_{16}H_{11}F_2N_3$

**Molecular weight:** 283.28 g/mol

**Melting point:** 183-185°C

**Aspect:** white solid

## 4-(3-Fluorophenyl)-6-(4-fluorophenyl)pyrimidin-2-amine (76p)

**Procedure:**

To a round bottom flask were added **75** (1.0 eq., 250.0 mg, 1.12 mmol),  $K_2CO_3$  (2.0 eq., 309.0 mg, 2.24 mmol), 3-fluorophenylboronic acid (1.1 eq., 172.1 mg, 1.23 mmol) and triphenylphosphine (0.1 eq., 29.3 mg, 0.11 mmol) in THF (4 mL) and water (1 mL). The solution was degassed with nitrogen during 5 minutes and palladium acetate (0.1 eq., 25.1 mg, 0.11 mmol) was added. The solution was stirred and heated at 80 °C overnight. The solution was cooled to room temperature and hydrolyzed with water. The aqueous layer was extracted three times with EtOAc. The organic layer was dried over  $MgSO_4$ , discolored with chacoal and filtered. The solution was concentrated *in vacuo* to give a yellow powder. The crude product was purified by flash chromatography (cyclohexane/EtOAc (7/3)) to afford **76p** (125.0 mg, 39%).

**$^1H$ -RMN (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm, J Hz):** 8.34-8.30 (m, 2H), 8.12-8.03 (m, 2H), 7.79 (s, 1H, H<sub>3</sub>), 7.61-7.54 (m, 1H), 7.40-7.34 (m, 3H), 6.84 (s, 2H, H<sub>17</sub>).

**$^{13}C$ -RMN (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm, J Hz):** 165.8 (C<sub>8</sub> (d, J = 246.8 Hz)), 164.6 (C<sub>15</sub> (d, J = 241.5 Hz)), 164.5 (C<sub>2</sub>), 164.4 (C<sub>1</sub>), 163.9 (C<sub>4</sub>), 140.3 (C<sub>11</sub> (d, J = 7.5 Hz)), 134.1 (C<sub>5</sub> (d, J = 3.1 Hz)), 131.1 (C<sub>6</sub> and C<sub>10</sub> (d, J = 8.3 Hz)), 129.8 (C<sub>13</sub> (d, J = 8.3 Hz)), 123.5 (C<sub>12</sub> (d, J = 3.0 Hz)), 117.6 (C<sub>16</sub> (d, J = 21.0 Hz)), 116.8 (C<sub>7</sub> and C<sub>9</sub> (d, J = 21.8 Hz)), 114.1 (C<sub>14</sub> (d, J = 22.5 Hz)), 102.2 (C<sub>3</sub>).

**LC-MS (ESI) m/z = 284.3 [M+H]<sup>+</sup>**

**UPLC:** C18 column:  $t_R$  = 2.0 min, purity = 97.6 %

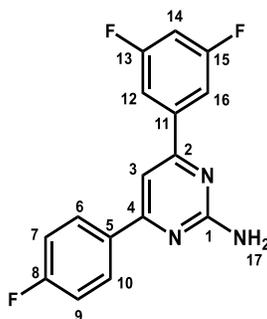
**Molecular formula:** C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>F<sub>2</sub>N<sub>3</sub>

**Molecular weight:** 283.28 g/mol

**Melting point:** 203-205 °C

**Aspect:** white solid

## 4-(3,5-difluorophenyl)-6-(4-fluorophenyl)pyrimidin-2-amine (76q)

**Procedure:**

The same procedure as described for compound **76p** was used starting from **75** (1.0 eq., 250.0 mg, 1.12 mmol),  $K_2CO_3$  (2.0 eq., 309.0 mg, 2.24 mmol), 3,5-difluorophenylboronic acid (1.2 eq., 211.8 mg, 1.34 mmol) and triphenylphosphine (0.1 eq., 29.3 mg, 0.11 mmol) in THF (4 mL) and water (1 mL). The solution was degassed with nitrogen during 5 minutes and palladium acetate (0.1 eq., 25.1 mg, 0.11 mmol) was added. The crude product was purified using flash chromatography (cyclohexane/EtOAc (7.0/3.0)) to afford **76q** (65.0 mg, 19%).

**$^1H$ -RMN (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz):** 8.36-8.31 (m, 2H), 8.01-7.97 (m, 2H), 7.84 (s, 1H,  $H_3$ ), 7.46-7.35 (m, 3H), 6.89 (s, 2H,  $H_{17}$ ).

**$^{13}C$ -RMN (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz):** 165.9 ( $C_{13}$  and  $C_{15}$  (d,  $J = 246.8$  Hz)), 164.9 ( $C_8$  (d,  $J = 244.5$  Hz)), 164.8-164.3 (3 C), 141.6 ( $C_{11}$ ), 133.9 ( $C_5$  (d,  $J = 3.7$  Hz)), 129.9 ( $C_6$  and  $C_{10}$  (d,  $J = 9.0$  Hz)), 116.1 ( $C_7$  and  $C_9$  (d,  $J = 21.0$  Hz)), 110.6 ( $C_{12}$  and  $C_{16}$  (d,  $J = 26.3$  Hz)), 106.2 ( $C_{14}$  (t,  $J = 18.4$  Hz)), 102.3 ( $C_3$ ).

**LC-MS (ESI)  $m/z = 302.1$  [ $M+H$ ] $^+$**

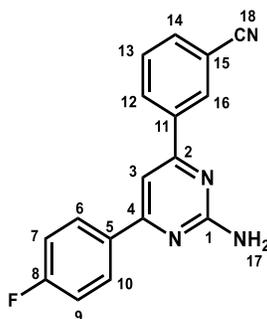
**UPLC:** C18 column:  $t_R = 2.3$  min, purity > 99.0 %

**Molecular formula:**  $C_{16}H_{10}F_3N_3$

**Molecular weight:** 301.27 g/mol

**Melting point:** 187-189°C

**Aspect:** white solid

**3-[2-Amino-6-(4-fluorophenyl)pyrimidin-4-yl]benzonitrile (76r)****Procedure:**

The same procedure as described for compound **76p** was used starting from **75** (1.0 eq., 250.0 mg, 1.12 mmol),  $K_2CO_3$  (2.0 eq., 309.0 mg, 2.24 mmol), 3-cyanophenylboronic acid (1.1 eq., 180.7 mg, 1.23 mmol) and triphenylphosphine (0.1 eq., 29.3 mg, 0.11 mmol) in THF (4 mL) and water (1 mL). The solution was degassed with nitrogen during 5 minutes and palladium acetate (0.1 eq., 25.1 mg, 0.11 mmol) was added. The crude product was purified using flash chromatography (cyclohexane/EtOAc (7.0/3.0)) to afford **76r** (73.0 mg, 22%).

**$^1H$ -RMN (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz):** 8.35-8.25 (m, 2H), 7.84-7.61 (m, 2H), 7.48-7.26 (m, 2H), 7.18 (s, 1H,  $H_3$ ), 7.09 (m, 2H), 6.77 (s, 2H,  $H_{17}$ ).

**$^{13}C$ -RMN (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz):** 165.2 ( $C_8$  (d,  $J = 242.8$  Hz)), 163.6-162.1 (3 C), 133.7, 132.2, 131.8, 131.4, 130.6 ( $C_6$  and  $C_{10}$  (d,  $J = 8.5$  Hz)), 130.5, 129.9, 118.8 ( $C_{18}$ ), 116.0 ( $C_7$  and  $C_9$  (d,  $J = 24.2$  Hz)), 113.2 ( $C_{15}$ ), 101.3 ( $C_3$ ).

**LC-MS (ESI)  $m/z = 292.2$  [ $M+H$ ] $^+$**

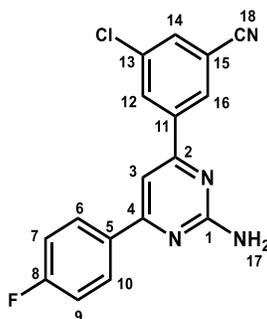
**UPLC:** C18 column:  $t_R = 2.2$  min, purity > 99.0 %

**Molecular formula:**  $C_{17}H_{11}FN_4$

**Molecular weight:** 290.3 g/mol

**Melting point:** 196-197°C

**Aspect:** white solid

3-[2-Amino-6-(4-fluorophenyl)pyrimidin-4-yl]-5-chlorobenzonitrile (**76s**)**Procedure:**

The same procedure as described for compound **76p** was used starting from **75** (1.0 eq., 300.0 mg, 1.34 mmol),  $K_2CO_3$  (2.0 eq., 370.8 mg, 2.68 mmol), 3-chloro-5-cyanophenylboronic acid (1.1 eq., 267.6 mg, 1.48 mmol) and triphenylphosphine (0.1 eq., 35.2 mg, 0.13 mmol) in THF (4 mL) and water (1 mL). The solution was degassed with nitrogen during 5 minutes and palladium acetate (0.1 eq., 30.1 mg, 0.13 mmol) was added. The crude product was purified by flash chromatography (cyclohexane/EtOAc (7.5/2.5)) to afford **76s** (72.0 mg, 18%).

$^1H$ -RMN (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz): 8.32-8.28 (m, 4H), 7.73 (s, 1H,  $H_3$ ), 7.39-7.33 (m, 4H), 6.79 (s, 2H,  $H_{17}$ ).

$^{13}C$ -RMN (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz): 166.6 ( $C_8$  (d,  $J = 249.1$  Hz)), 165.9-162.3 (3 C), 135.7, 135.2, 134.8, 131.5, 131.0 ( $C_6$  and  $C_{10}$  d,  $J = 8.2$  Hz), 127.2 ( $C_{16}$ ), 118.3 ( $C_{18}$ ), 115.8 ( $C_7$  and  $C_9$  (d,  $J = 21.6$  Hz)), 114.5 ( $C_{15}$ ), 101.3 ( $C_3$ ).

LC-MS (ESI)  $m/z = 325.1, 326.1$  [ $M+H$ ] $^+$

UPLC: C18 column:  $t_R = 2.2$  min, purity > 99.0 %

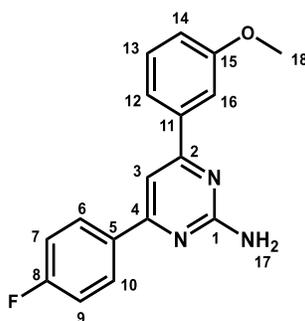
**Molecular formula:**  $C_{16}H_{11}F_2N_3$

**Molecular weight:** 324.74 g/mol

**Melting point:** 209-211°C

**Aspect:** white solid

## 4-(4-Fluorophenyl)-6-(3-methoxyphenyl)pyrimidin-2-amine (76t)

**Procedure:**

The same procedure as described for compound **76p** was used starting from **75** (1.0 eq., 250.0 mg, 1.12 mmol),  $K_2CO_3$  (2.0 eq., 309.0 mg, 2.24 mmol), 3-methoxyphenylboronic acid (1.1 eq., 186.8 mg, 1.23 mmol) and triphenylphosphine (0.1 eq., 29.3 mg, 0.11 mmol) in THF (4 mL) and water (1 mL). The solution was degassed with nitrogen during 5 minutes and palladium acetate (0.1 eq., 25.1 mg, 0.11 mmol) was added. The crude product was purified using flash chromatography (cyclohexane/EtOAc (7.0/3.0)) to afford **76t** (92.0 mg, 28%).

**$^1H$ -RMN (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz):** 8.35-8.25 (m, 2H), 7.84-7.61 (m, 2H), 7.48-7.26 (m, 2H), 7.18 (s, 1H, H<sub>3</sub>), 7.09 (m, 2H), 6.77 (s, 2H, H<sub>17</sub>), 3.77 (s, 3H, H<sub>18</sub>).

**$^{13}C$ -RMN (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz):** 165.7 (C<sub>8</sub> (d,  $J$  = 242.9 Hz)), 163.6 (C<sub>2</sub>), 162.9 (C<sub>1</sub>), 162.7 (C<sub>4</sub>), 161.1 (C<sub>15</sub>), 139.7 (C<sub>5</sub> (d,  $J$  = 2.9 Hz)), 131.4 (C<sub>11</sub>), 130.6 (C<sub>6</sub> and C<sub>10</sub> (d,  $J$  = 8.7 Hz)), 130.2 (CH), 119.8 (CH), 116.2 (C<sub>7</sub> and C<sub>9</sub> (d,  $J$  = 23.1 Hz)), 114.3 (CH), 113.6 (CH), 101.3 (C<sub>3</sub>), 55.8 (C<sub>18</sub>).

**LC-MS (ESI)  $m/z$  = 296.4 [M+H]<sup>+</sup>**

**UPLC:** C18 column:  $t_R$  = 2.0 min, purity = 95.2 %

**Molecular formula:** C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>FN<sub>3</sub>O

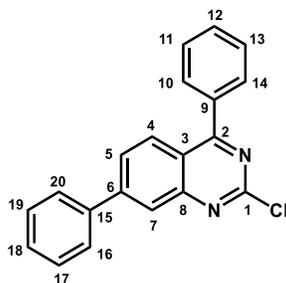
**Molecular weight:** 295.32 g/mol

**Melting point:** 231-232°C

**Aspect:** white solid

5. Synthesis of quinazolines A<sub>2</sub>A<sub>R</sub>/mGluR<sub>5</sub>

## 2-Chloro-4,7-diphenylquinazoline (80a)

**Procedure:**

The same procedure as described for compound **49a** was used starting from **48f** (1.0 eq., 300.0 mg, 1.08 mmol), phenylboronic acid (2.1 eq., 276.4 mg, 2.27 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2.0 eq., 298.4 mg, 2.16 mmol), triphenylphosphine (0.04 eq., 11.3 mg, 0.04 mmol) in dioxane (10 mL) and water (2.5 mL). The solution was degassed with nitrogen during 5 minutes and palladium acetate (0.02 eq., 4.9 mg, 0.02 mmol) was added. The crude product was taken up in diethyl ether and solid was filtered to afford **80a** (215.0 mg, 63%).

<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, J Hz): 8.35 (m, 2H), 8.21 (m, 1H), 7.89-7.86 (m, 2H), 7.69-7.66 (m, 3H), 7.61-7.58 (m, 2H), 7.51-7.42 (m, 4H).

LC-MS (ESI) m/z = 317.2, 319.2 [M+H]<sup>+</sup>

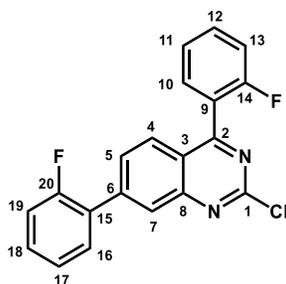
**Molecular formula:** C<sub>20</sub>H<sub>13</sub>ClN<sub>2</sub>

**Molecular weight:** 316.79 g/mol

**Melting point:** 201-203 °C

**Aspect:** white solid

## 2-Chloro-4,7-bis(2-fluorophenyl)quinazoline (80b)

**Procedure:**

The same procedure as described for compound **49a** was used starting from **48f** (1.0 eq., 300 mg, 1.08 mmol), 2-fluorophenylboronic acid (2.1 eq., 317.1 mg, 2.27 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2.0 eq., 298.4 mg, 2.16 mmol),

triphenylphosphine (0.04 eq., 11.3 mg, 0.04 mmol) in dioxane (10 mL) and water (2.5 mL). The solution was degassed with nitrogen during 5 minutes and palladium acetate (0.02 eq., 4.9 mg, 0.02 mmol) was added. The crude product was taken up in diethyl ether and solid was filtered to afford **80b** (186.0 mg, 49%).

<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, *J* Hz): 8.30 (d, 1H, H<sub>7</sub>, *J* = 8.7 Hz), 8.16 (d, 1 H, H<sub>5</sub>, *J* = 1.4 Hz), 7.98 (m, 1H), 7.81-7.76 (m, 4H), 7.52-7.49 (m, 2H), 7.30-7.28 (m, 2H).

LC-MS (ESI) *m/z* = 353.1, 355.1 [M+H]<sup>+</sup>

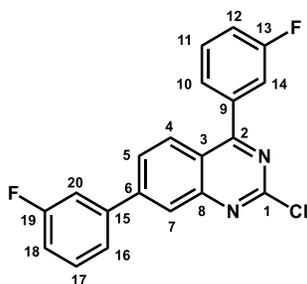
**Molecular formula:** C<sub>20</sub>H<sub>11</sub>ClF<sub>2</sub>N<sub>2</sub>

**Molecular weight:** 352.77 g/mol

**Melting point:** 151-153 °C

**Aspect:** white solid

### 2-Chloro-4,7-bis(3-fluorophenyl)quinazoline (80c)



#### Procedure:

The same procedure as described for compound **49a** was used starting from **48f** (1.0 eq., 300 mg, 1.08 mmol), 3-fluorophenylboronic acid (2.1 eq., 317.1 mg, 2.27 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2.0 eq., 298.4 mg, 2.16 mmol), triphenylphosphine (0.04 eq., 11.3 mg, 0.04 mmol) in dioxane (10 mL) and water (2.5 mL). The solution was degassed with nitrogen during 5 minutes and palladium acetate (0.02 eq., 4.9 mg, 0.02 mmol) was added. The crude product was taken up in diethyl ether and solid was filtered to afford **80c** (170.0 mg, 45%).

<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, *J* Hz): 8.35 (m, 1H), 8.12 (d, 1 H, H<sub>7</sub>, *J* = 8.8 Hz), 7.89-7.85 (m, 3H), 7.80-7.71 (m, 2H), 7.28-7.19 (m, 4H).

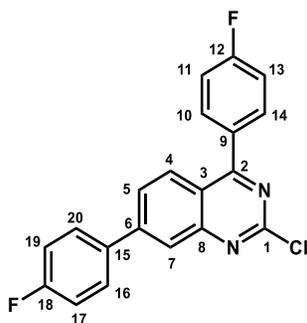
LC-MS (ESI) *m/z* = 353.1, 355.1 [M+H]<sup>+</sup>

**Molecular formula:** C<sub>20</sub>H<sub>11</sub>ClF<sub>2</sub>N<sub>2</sub>

**Molecular weight:** 352.77 g/mol

**Melting point:** 163-165 °C

**Aspect:** white solid

**2-Chloro-4,7-bis(4-fluorophenyl)quinazoline (80d)****Procedure:**

The same procedure as described for compound **49a** was used starting from **48f** (1.0 eq., 2.00 g, 7.20 mmol), 4-fluorophenylboronic acid (1.0 eq., 1.11 g, 7.92 mmol),  $K_2CO_3$  (2.0 eq., 1.99 g, 14.39 mmol), triphenylphosphine (0.04 eq., 75.0 mg, 0.29 mmol) in dioxane (10 mL) and water (2.5 mL). The solution was degassed with nitrogen during 5 minutes and palladium acetate (0.02 eq., 32.0 mg, 0.14 mmol) was added. The crude product was purified by flash chromatography (cyclohexane/EtOAc (7/3)) to afford **80d** (851.0 mg, 35%).

$^1H$ -RMN (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz): 8.21 (d, 1H,  $H_5$ ,  $J = 1.7$  Hz), 8.17 (d, 1 H,  $H_8$ ,  $J = 8.8$  Hz), 7.89-7.85 (m, 3H), 7.76-7.72 (m, 2H), 7.35-7.22 (m, 4H).

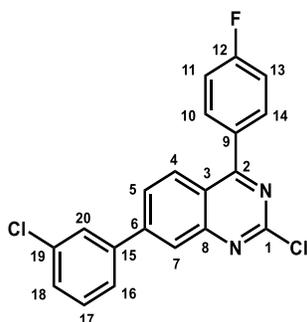
LC-MS (ESI)  $m/z = 353.2, 355.2$   $[M+H]^+$

**Molecular formula:**  $C_{20}H_{11}ClF_2N_2$

**Molecular weight:** 352.77 g/mol

**Melting point:** 187-189 °C

**Aspect:** white solid

**2-Chloro-7-(3-chlorophenyl)-4-(4-fluorophenyl)quinazoline (80e)****Procedure:**

The same procedure as described for compound **49a** was used starting from **48f** (1.0 eq., 350.0 mg, 1.04 mmol),  $K_2CO_3$  (2.0 eq., 286.6 mg, 2.07 mmol), 3-chlorophenylboronic acid (1.2 eq., 195.5 mg, 1.24 mmol)

and triphenylphosphine (0.04 eq., 10.9 mg, 0.04 mmol) in THF (4 mL) and water (1 mL). The solution was degassed with nitrogen during 5 minutes and palladium acetate (0.04 eq., 9.3 mg, 0.04 mmol) was added. The crude product was taken up in diethyl ether and solid was filtered to afford **80e** (270.0 mg, 71%).

<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, J Hz): 8.39 (m, 1H), 8.16 (m, 2H), 8.01 (m, 1H), 7.92 (m, 3H), 7.59-7.49 (m, 4H).

LC-MS (ESI) m/z = 369.0, 371.0 [M+H]<sup>+</sup>

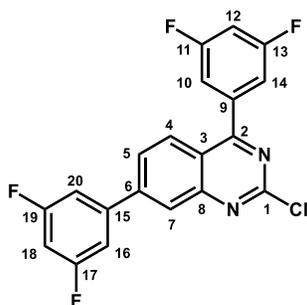
**Molecular formula:** C<sub>20</sub>H<sub>11</sub>Cl<sub>2</sub>FN<sub>2</sub>

**Molecular weight:** 369.22 g/mol

**Melting point:** 157-159 °C

**Aspect:** white solid

### 2-Chloro-4,7-bis(3,5-difluorophenyl)quinazoline (80f)



#### Procedure:

The same procedure as described for compound **49a** was used starting from **48f** (1.0 eq., 300 mg, 1.08 mmol), 3,5-difluorophenylboronic acid (2.1 eq., 357.9 mg, 2.27 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2.0 eq., 298.4 mg, 2.16 mmol), triphenylphosphine (0.04 eq., 11.3 mg, 0.04 mmol) in dioxane (10 mL) and water (2.5 mL). The solution was degassed with nitrogen during 5 minutes and palladium acetate (0.02 eq., 4.9 mg, 0.02 mmol) was added. The crude product was taken up in diethyl ether and solid was filtered to afford **80f** (214.0 mg, 51%).

<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, J Hz): 8.37 (m, 1H), 8.03 (m, 1H), 7.89-7.73 (m, 5H), 7.31-7.22 (m, 4H).

LC-MS (ESI) m/z = 389.2, 391.2 [M+H]<sup>+</sup>

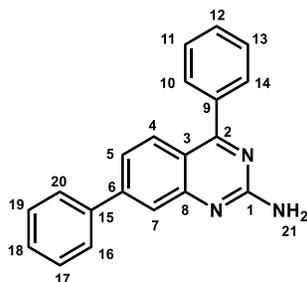
**Molecular formula:** C<sub>20</sub>H<sub>9</sub>ClF<sub>4</sub>N<sub>2</sub>

**Molecular weight:** 388.75 g/mol

**Melting point:** 172-174 °C

**Aspect:** white solid

## 4,7-Diphenylquinazolin-2-amine (81a)

**Procedure:**

The same procedure as described for compound **50c** was used starting from **80a** (1.0 eq., 150.0 mg, 0.47 mmol), DIPEA (2.5 eq., 0.20 mL, 1.18 mmol) and 4-methoxybenzylamine (2.0 eq., 0.12 mL, 0.95 mmol) in dioxane. The crude product was purified by flash chromatography (DCM/MeOH (9/1)) to afford **81a** (24.0 mg, 26%).

<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, J Hz): 8.32-8.14 (m, 2H), 8.08-8.02 (m, 1H), 7.96-7.83 (m, 2H), 7.77-7.61 (m, 4H), 7.59-7.40 (m, 4H).

<sup>13</sup>C-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, J Hz): 160.0 (C<sub>1</sub>), 155.6 (C<sub>2</sub>), 148.4 (C<sub>8</sub>), 141.5 (C<sub>6</sub>), 134.8 (C<sub>15</sub>), 134.2 (C<sub>9</sub>), 132.1 (2 CH), 130.2 (CH), 129.7 (2 CH), 129.2 (2 CH), 128.5 (2 CH), 127.8 (CH), 126.7 (C<sub>4</sub>), 124.5 (C<sub>7</sub>), 122.3 (C<sub>5</sub>), 118.6 (C<sub>3</sub>).

LC-MS (ESI) m/z = 298.1 [M+H]<sup>+</sup>

UPLC: C18 column: t<sub>R</sub> = 2.5 min, purity = 95.1 %

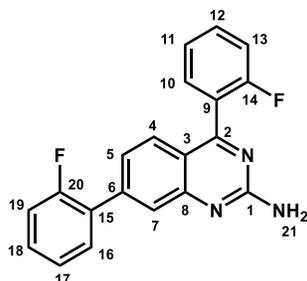
**Molecular formula:** C<sub>20</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>

**Molecular weight:** 297.36 g/mol

**Melting point:** 217-218 °C

**Aspect:** yellow solid

## 4,7-Di(2-fluorophenyl)quinazolin-2-amine (81b)

**Procedure:**

The same procedure as described for compound **50c** was used starting from **80b** (1.0 eq., 10.0 mg, 0.28 mmol) DIPEA (2.5 eq., 0.12 mL, 0.71 mmol) and 4-methoxybenzylamine (2.0 eq., 0.07 mL, 0.57 mmol) in

dioxane. The crude product was purified by flash chromatography (DCM/MeOH (9/1)) to afford **81b** (40.0 mg, 38%).

<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, *J* Hz): 7.88-7.75 (m, 5H), 7.72 (d, 1H, H<sub>7</sub>, *J* = 1.7 Hz), 7.50 (dd, 1H, H<sub>5</sub>, *J* = 1.9 Hz and *J* = 8.8 Hz), 7.46-7.33 (m, 4H), 6.95 (s, 2H, H<sub>21</sub>).

<sup>13</sup>C-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, *J* Hz): 165.2 (C<sub>1</sub>), 158.7 (C<sub>14</sub> and C<sub>20</sub> (d, *J* = 247.5 Hz)), 155.2 (C<sub>2</sub>), 149.0 (C<sub>8</sub>), 141.8 (C<sub>6</sub>), 139.6, 133.7, 131.5, 129.2, 129.0, 126.2, 124.4 (C<sub>11</sub> and C<sub>17</sub> (d, *J* = 2.6 Hz)), 123.9 (C<sub>9</sub>), 123.1 (C<sub>7</sub>), 120.7 (C<sub>5</sub>), 116.9 (C<sub>3</sub>), 114.7 (C<sub>13</sub> and C<sub>19</sub> (d, *J* = 21.1 Hz)).

LC-MS (ESI) *m/z* = 334.2 [M+H]<sup>+</sup>

UPLC: C18 column: *t<sub>R</sub>* = 2.4 min, purity > 99.0 %

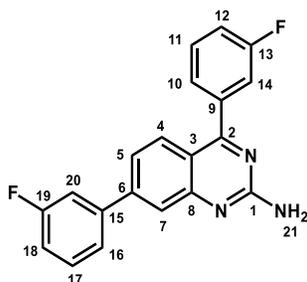
Molecular formula: C<sub>20</sub>H<sub>13</sub>F<sub>2</sub>N<sub>3</sub>

Molecular weight: 333.34 g/mol

Melting point: 167-169 °C

Aspect: white solid

#### 4,7-Di(3-fluorophenyl)quinazolin-2-amine (81c)



#### Procedure:

The same procedure as described for compound **50c** was used starting from **80c** (1.0 eq., 150.0 mg, 0.43 mmol) DIPEA (2.5 eq., 0.19 mL, 1.06 mmol) and 4-methoxybenzylamine (2.0 eq., 0.11 mL, 0.85 mmol) in dioxane. The crude product was purified by flash chromatography (DCM/MeOH (9/1)) to afford **81c** (34.0 mg, 36%).

<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, *J* Hz): 7.88-7.75 (m, 5H), 7.72 (d, 1H, H<sub>7</sub>, *J* = 1.7 Hz), 7.50 (dd, 1H, H<sub>5</sub>, *J* = 1.9 Hz and *J* = 8.8 Hz), 7.46-7.33 (m, 4H), 6.95 (s, 2H, H<sub>21</sub>).

<sup>13</sup>C-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, *J* Hz): 168.3 (C<sub>1</sub>), 164.8 (C<sub>13</sub> and C<sub>19</sub> (d, *J* = 245.5 Hz)), 156.4 (C<sub>2</sub>), 149.5 (C<sub>8</sub>), 143.2 (C<sub>15</sub>), 141.4 (C<sub>6</sub>), 139.6, 131.5, 130.9, 127.9, 126.0, 123.7, 117.1, 116.7, 116.4, 115.8, 114.3.

LC-MS (ESI) *m/z* = 334.2 [M+H]<sup>+</sup>

UPLC: C18 column: *t<sub>R</sub>* = 2.4 min, purity = 96.0 %

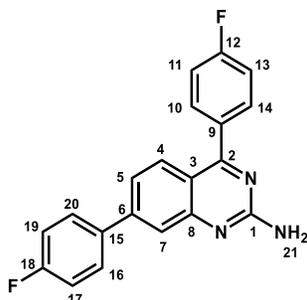
Molecular formula: C<sub>20</sub>H<sub>13</sub>F<sub>2</sub>N<sub>3</sub>

Molecular weight: 333.34 g/mol

**Melting point:** 187-188 °C

**Aspect:** white solid

**4,7-Di(4-fluorophenyl)quinazolin-2-amine (81d)**



**Procedure:**

The same procedure as described for compound **50c** was used starting from **80d** (1.0 eq., 150.0 mg, 0.43 mmol) DIPEA (2.5 eq., 0.19 mL, 1.06 mmol) and 4-methoxybenzylamine (2.0 eq., 0.11 mL, 0.85 mmol) in dioxane. The crude product was purified by flash chromatography (DCM/MeOH (9/1)) to afford **81d** (34.0 mg, 36%).

**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, *J* Hz):** 7.88-7.75 (m, 5H), 7.72 (d, 1H, H<sub>7</sub>, *J* = 1.7 Hz), 7.50 (dd, 1H, H<sub>5</sub>, *J* = 1.9 Hz and *J* = 8.8 Hz), 7.46-7.33 (m, 4H), 6.95 (s, 2H, H<sub>21</sub>).

**<sup>13</sup>C-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, *J* Hz):** 169.4 (C<sub>1</sub>), 165.5 (C<sub>12</sub> (d, *J* = 243.5 Hz)), 163.8 (C<sub>18</sub> (d, *J* = 237.4 Hz)), 160.6 (C<sub>2</sub>), 152.8 (C<sub>8</sub>), 136.6 (C<sub>15</sub> (d, *J* = 3.0 Hz)), 134.1 (C<sub>9</sub> (d, *J* = 3.5 Hz)), 133.3 (C<sub>4</sub> and C<sub>6</sub>), 132.6 (C<sub>16</sub> and C<sub>20</sub> (d, *J* = 8.3 Hz)), 130.5 (C<sub>10</sub> and C<sub>14</sub> (d, *J* = 7.5 Hz)), 125.3 (C<sub>7</sub>), 123.1 (C<sub>5</sub>), 117.4 (C<sub>3</sub>), 116.2 (C<sub>11</sub>, C<sub>13</sub>, C<sub>17</sub> and C<sub>19</sub> (d, *J* = 22.4 Hz and d, *J* = 21.6 Hz)).

**LC-MS (ESI) *m/z* = 334.1 [M+H]<sup>+</sup>**

**UPLC:** C18 column: *t<sub>R</sub>* = 2.4 min, purity = 97.2 %

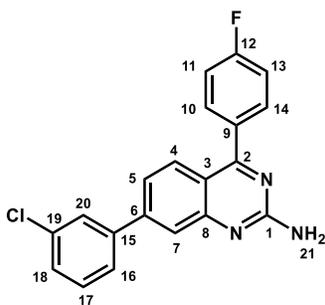
**Molecular formula:** C<sub>20</sub>H<sub>13</sub>F<sub>2</sub>N<sub>3</sub>

**Molecular weight:** 333.34 g/mol

**Melting point:** 265-271 °C

**Aspect:** white solid

## 7-(3-chlorophenyl)-4-(4-fluorophenyl)quinazolin-2-amine (81e)

**Procedure:**

The same procedure as described for compound **50c** was used starting from **80e** (1.0 eq., 100.0 mg, 0.27 mmol) DIPEA (2.5 eq., 0.12 mL, 0.68 mmol) and 4-methoxybenzylamine (2.0 eq., 0.07 mL, 0.54 mmol) in dioxane. The crude product was purified by flash chromatography (DCM/MeOH (9/1)) to afford **81e** (20.0 mg, 21%).

**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, *J* Hz):** 7.84 (m, 1H), 7.79-7.76 (m, 5H), 7.56-7.52 (m, 3H), 7.47-7.41 (m, 2H), 6.99 (s, 2H, NH<sub>2</sub>).

**<sup>13</sup>C-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, *J* Hz):** 168.6 (C<sub>1</sub>), 165.0 (C (d, *J* = 242.8 Hz)), 161.8 (C<sub>2</sub>), 154.1 (C<sub>8</sub>), 144.0 (C<sub>15</sub>), 141.8 (C<sub>6</sub>), 134.4, 133.8, 132.3, 131.4 (C<sub>10</sub> and C<sub>14</sub> (d, *J* = 8.3 Hz)), 128.8, 127.3, 126.4, 123.3 (C<sub>7</sub>), 121.6 (C<sub>5</sub>), 117.2 (C<sub>3</sub>), 116.0 (C<sub>11</sub> and C<sub>13</sub> (d, *J* = 21.2 Hz)).

**LC-MS (ESI) m/z = 350.1 [M+H]<sup>+</sup>**

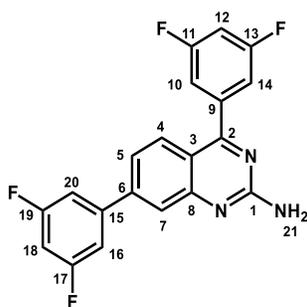
**UPLC:** C18 column: t<sub>R</sub> = 2.4 min, purity > 99.0 %

**Molecular formula:** C<sub>20</sub>H<sub>13</sub>ClFN<sub>3</sub>

**Molecular weight:** 349.78 g/mol

**Melting point:** 229-231 °C

**Aspect:** white solid

**4,7-Bis(3,5-difluorophenyl)quinazolin-2-amine (81f)****Procedure:**

The same procedure as described for compound **50c** was used starting from **80f** (1.0 eq., 150.0 mg, 0.39 mmol) DIPEA (2.5 eq., 0.17 mL, 0.96 mmol) and 4-methoxybenzylamine (2.0 eq., 0.10 mL, 0.77 mmol) in dioxane. The crude product was purified by flash chromatography (DCM/MeOH (9/1)) to afford **81f** (29.0 mg, 33%).

**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, J Hz):** 7.88-7.75 (m, 5H), 7.72 (d, 1H, H<sub>7</sub>, *J* = 1.7 Hz), 7.50 (dd, 1H, H<sub>5</sub>, *J* = 1.9 Hz and *J* = 8.8 Hz), 7.46-7.33 (m, 4H), 6.95 (s, 2H, H<sub>21</sub>).

**<sup>13</sup>C-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, J Hz):** 165.0 (C), 160.1 (C), 155.6 (C), 149.7 (C), 141.6 (C), 139.7 (CH), 136.2 (C), 144.3 (C), 142.1 (C), 139.6 (CH), 131.5 (CH), 130.9 (CH), 127.9 (C), 126.0 (CH), 123.7 (CH), 117.1 (CH), 126.3 (CH), 124.0 (CH), 122.0 (CH), 117.4 (C), 111.9 (2 CH), 111.5 (2 CH), 104.7 (CH), 103.6 (CH).

**LC-MS (ESI) m/z = 370.2 [M+H]<sup>+</sup>**

**UPLC:** C18 column: t<sub>R</sub> = 2.2 min, purity > 98.1 %

**Molecular formula:** C<sub>20</sub>H<sub>11</sub>F<sub>4</sub>N<sub>3</sub>

**Molecular weight:** 369.32 g/mol

**Melting point:** 251-253°C

**Aspect:** white solid

## II. Biology

### 1. Materials

Adenosine deaminase was purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) (Ref: 10102105001). ZM-241385 and CGS-21680 were purchased from MedChem Express (Sollentuna, Sweden, Ref: HY-19532 and HY-13201A). The synthesis of MRS7416 is described in the article by Duroux et al.<sup>88</sup>

### 2. Cell culture and membrane preparation

For cell culture and membrane preparation, we were inspired by the protocol described in the article by Kecskes et al.<sup>176</sup> HEK293T cells were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS, penicillin (100 µg/mL),

and streptomycin (100 U/mL) and incubated at 5% CO<sub>2</sub> and 37 °C. Cells were transfected with ADORA2A plasmid using LipoD293 transfection reagent (SigmaGen, Frederick, MD, USA). Then, 48 h after transfection, cells were lysed with 500 µL of lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM MgCl<sub>2</sub> supplemented with protease inhibitors) per 10 cm dish, transferred to a 15 mL conical tube, and incubated for 30 min on ice. The suspension was homogenized with a Branson sonifier with an output of 2 and duty cycle of 50% for 20 s and then was subcellular fractionated to recover the membrane-rich fraction. First, centrifugation at 750 RCF was performed to pellet the nuclei and cell debris, the resultant supernatant was centrifuged at 10,000 RCF for 10 min to pellet the microsomes, and finally the supernatant was centrifuged at 100,000 RCF for 1 h to precipitate the membranes. All the centrifugation steps were performed at 4 °C. The resultant pellet was resuspended in lysis buffer supplemented with 3 U/mL adenosine deaminase and homogenized by brief sonication. The suspension was divided into small aliquots to prevent several freeze–thaw cycles and stored at –80 °C until the binding experiments. The protein concentration was measured using the Bradford assay and adjusted to 9 mg/mL.

### 3. FP binding assay

Assays were performed in Greiner 384-well black clear-bottom plates. The binding buffer used contained 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, and 10 mM MgCl<sub>2</sub>. Competition assays were performed with 2 µL of MRS7416 (final concentration was 10 nM), 2 µL of competitor (final concentration 10 µM–0.1 nM), and 16 µL of A<sub>2A</sub>R membranes, diluted in buffer solution (final concentration 0.8 mg/mL) in the binding buffer for a total volume of 20 µL. The plate was incubated at 30 °C for 10 min. Fluorescence polarization was read on Clariostar Plus microplate reader (BMG Labtech, Offenburg, Germany) at  $\lambda_{ex}$  = 480 nm and  $\lambda_{em}$  = 520 nm. Data analysis was performed with GraphPad Prism Software, version 8.3.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA), and  $K_i$  values were calculated using the Cheng–Prusoff equation. The  $K_D$  ( $K_D$  = 2 nM) for A<sub>2A</sub>R membrane preparation was obtained by a kinetic on/off experiment. Displacement reference curves were performed with ZM-241385 in accordance with the literature. All compounds were tested in three independent experiments, in duplicate.

### 4. cAMP assay

cAMP assays were conducted using the Lance Ultra cAMP Detection kit (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) in 384-well plates. Stimulation buffer containing 1X Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), 5 mM HEPES (pH 7.4), 0.1% BSA stabilizer, and 0.5 mM IBMX was prepared. A cAMP standard curve was prepared at 4x the desired final concentration in stimulation buffer, and 10 µL was added to the assay plate. Serial dilutions of compounds were also prepared at 4x the desired final concentration (30 µM–10 nM) in stimulation buffer, and 2.5 µL was added to the assay plate. Following the instructions in the Lance Ultra cAMP Detection kit, a single concentration of the agonist CGS21680, corresponding to the EC<sub>80</sub>, was prepared at 4x the desired final concentration (4.5 µM) in stimulation buffer. Then, 2.5 µL of this solution was added to the assay plate. The cells were detached by versene action, prepared at a concentration of 5.10<sup>5</sup> cells per mL in stimulation buffer, and 5 µL was added to each well, except wells containing the cAMP standard curve. After incubating for 30 min at room temperature, Eu-cAMP tracer and uLIGHT-anticAMP working solutions were added per the manufacturer's instructions. After 1 h of incubation at room temperature,

the TR-FRET signal (ex 337 nm) was read on a Varioskan Lux multimode plate reader (Thermo Fisher Scientific, Asnières-sur-Seine, France). The TR-FRET signal (665 nm) was converted to fmol cAMP by interpolating from the standard cAMP curve. Fmol cAMP was plotted against the log of compound concentration, and data were fit to a three-parameter logistic curve to generate IC<sub>50</sub> values (GraphPad Prism, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). All compounds were tested in three independent experiments, in duplicate.

### III. Molecular docking

Molecular modelling studies were performed using AutoDock Vina software, using A<sub>2A</sub> receptor co-crystallized structure of compound **6** (PDB: 8DU3) as described in R. Bolteau et al.<sup>172</sup> Data analysis was performed with the UCSF ChimeraX software, version 1.6.1.

### IV. Solubility assay

For each product, 2 solutions were prepared. The first is a solution in DMSO at a concentration of 4 mg/mL. This solution is the reference solution (100% concentration). The second is an aqueous solution buffered to pH 7.4 (PBS: Phosphate Buffer Saline) at 4 mg/mL. These two solutions were stirred for 2 hours, then filtered with a 0.45 µm pore size filter. 10 µL of these solutions were diluted in 190 µL of methanol and analyzed by HPLC. Chromatographic analysis was performed using a Shimadzu CBM-20A high-performance liquid chromatography (HPLC) system (Shimadzu Corporation, Canby, Oregon, USA). The separation was carried out on a Kinetex C18 column (100 Å, 250 mm × 4.6 mm, 5 µm particle size). The mobile phase consisted of the following components: Phase A: Water with 1% trifluoroacetic acid (TFA), and Phase B: Acetonitrile with 1% TFA. A linear gradient was employed, starting with 100% Phase A and progressing to 0% Phase A over 30 minutes.

# Bibliographie

1. Fredriksson, R., Lagerström, M. C., Lundin, L.-G. & Schiöth, H. B. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol. Pharmacol.* **63**, 1256–1272 (2003).
2. Lefkowitz, R. J. Historical review: a brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **25**, 413–422 (2004).
3. Wu, E., Zhang, J., Zhang, J. & Zhu, S. Structural insights into gating mechanism and allosteric regulation of NMDA receptors. *Curr. Opin. Neurobiol.* **83**, 102806 (2023).
4. Weikum, E. R., Liu, X. & Ortlund, E. A. The nuclear receptor superfamily: A structural perspective. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **27**, 1876–1892 (2018).
5. Aggarwal, B. B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 745–756 (2003).
6. Edward Zhou, X., Melcher, K. & Eric Xu, H. Structural biology of G protein-coupled receptor signaling complexes. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **28**, 487–501 (2019).
7. Weis, W. I. & Kobilka, B. K. The Molecular Basis of G Protein-Coupled Receptor Activation. *Annu. Rev. Biochem.* **87**, 897–919 (2018).
8. Jiang, H., Galtes, D., Wang, J. & Rockman, H. A. G protein-coupled receptor signaling: transducers and effectors. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **323**, C731–C748 (2022).
9. Pavlos, N. J. & Friedman, P. A. GPCR Signaling and Trafficking: The Long and Short of It. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* **28**, 213–226 (2017).
10. Guidolin, D., Agnati, L. F., Marcoli, M., Borroto-Escuela, D. O. & Fuxe, K. G-protein-coupled receptor type A heteromers as an emerging therapeutic target. *Expert Opin. Ther. Targets* **19**, 265–283 (2015).
11. Jacobson, K. A. New paradigms in GPCR drug discovery. *Biochem. Pharmacol.* **98**, 541–555 (2015).

12. Regan, D. P. *et al.* The Angiotensin Receptor Blocker Losartan Suppresses Growth of Pulmonary Metastases via AT1R-Independent Inhibition of CCR2 Signaling and Monocyte Recruitment. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **202**, 3087–3102 (2019).
13. Borroto-Escuela, D. O. *et al.* Characterization of the A2AR-D2R interface: focus on the role of the C-terminal tail and the transmembrane helices. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **402**, 801–807 (2010).
14. Capote, L. A., Mendez Perez, R. & Lymporopoulos, A. GPCR signaling and cardiac function. *Eur. J. Pharmacol.* **763**, 143–148 (2015).
15. Cheng, L. *et al.* Structure, function and drug discovery of GPCR signaling. *Mol. Biomed.* **4**, 46 (2023).
16. Sriram, K. & Insel, P. A. G Protein-Coupled Receptors as Targets for Approved Drugs: How Many Targets and How Many Drugs? *Mol. Pharmacol.* **93**, 251–258 (2018).
17. Sebag, J. A. & Pantel, J. Ciblage thérapeutique des récepteurs couplés aux protéines G - La voie allostérique. *médecine/sciences* **28**, 845–851 (2012).
18. Gessi, S., Merighi, S., Varani, K. & Borea, P. A. Adenosine receptors in health and disease. *Adv. Pharmacol. San Diego Calif* **61**, 41–75 (2011).
19. Sheth, S., Brito, R., Mukherjea, D., Rybak, L. P. & Ramkumar, V. Adenosine receptors: expression, function and regulation. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 2024–2052 (2014).
20. Brundage, J. M. & Dunwiddie, T. V. Role of adenosine as a modulator of synaptic activity in the central nervous system. *Adv. Pharmacol. San Diego Calif* **39**, 353–391 (1997).
21. Cunha, R. A. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neurochem. Int.* **38**, 107–125 (2001).

22. Ferreira, J. M. & Paes-de-Carvalho, R. Long-term activation of adenosine A(2a) receptors blocks glutamate excitotoxicity in cultures of avian retinal neurons. *Brain Res.* **900**, 169–176 (2001).
23. de Mendonça, A. & Ribeiro, J. A. Adenosine and synaptic plasticity. *Drug Dev. Res.* **52**, 283–290 (2001).
24. Li, J. m *et al.* Adenosine A2a receptors increase arterial endothelial cell nitric oxide. *J. Surg. Res.* **80**, 357–364 (1998).
25. Latini, S. & Pedata, F. Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. *J. Neurochem.* **79**, 463–484 (2001).
26. Zimmermann, H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **362**, 299–309 (2000).
27. Fredholm, B. B., Ilzerman, A. P., Jacobson, K. A., Linden, J. & Müller, C. E. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors—An Update. *Pharmacol. Rev.* **63**, 1–34 (2011).
28. Jacobson, K. A. & Müller, C. E. Medicinal chemistry of adenosine, P2Y and P2X receptors. *Neuropharmacology* **104**, 31–49 (2016).
29. Burnstock, G. Introduction to Purinergic Signaling. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **2041**, 1–15 (2020).
30. Libert, F. *et al.* Selective Amplification And Cloning Of Four New Members Of The G Protein-coupled Receptor Family. *Science* **244**, 569–572 (1989).
31. Poulsen, S. A. & Quinn, R. J. Adenosine receptors: new opportunities for future drugs. *Bioorg. Med. Chem.* **6**, 619–641 (1998).
32. Borea, P. A. *et al.* The A3 adenosine receptor: history and perspectives. *Pharmacol. Rev.* **67**, 74–102 (2015).

33. Kolahdouzan, M. & Hamadeh, M. J. The neuroprotective effects of caffeine in neurodegenerative diseases. *CNS Neurosci. Ther.* **23**, 272–290 (2017).
34. Chandrasekaran, B., Samarneh, S., Jaber, A. M. Y., Kassab, G. & Agrawal, N. Therapeutic Potentials of A2B Adenosine Receptor Ligands: Current Status and Perspectives. *Curr. Pharm. Des.* **25**, 2741–2771 (2019).
35. Chen, J.-F., Eltzschig, H. K. & Fredholm, B. B. Adenosine receptors as drug targets--what are the challenges? *Nat. Rev. Drug Discov.* **12**, 265–286 (2013).
36. Jacobson, K. A. & Gao, Z.-G. Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**, 247–264 (2006).
37. Armentero, M. T. *et al.* Past, present and future of A2A adenosine receptor antagonists in the therapy of Parkinson's disease. *Pharmacol. Ther.* **132**, 280–299 (2011).
38. Popoli, P. *et al.* Functions, dysfunctions and possible therapeutic relevance of adenosine A2A receptors in Huntington's disease. *Prog. Neurobiol.* **81**, 331–348 (2007).
39. Dhalla, A. K., Shryock, J. C., Shreeniwas, R. & Belardinelli, L. Pharmacology and therapeutic applications of A1 adenosine receptor ligands. *Curr. Top. Med. Chem.* **3**, 369–385 (2003).
40. Ferreira-Silva, J., Aires, I. D., Boia, R., Ambrósio, A. F. & Santiago, A. R. Activation of Adenosine A3 Receptor Inhibits Microglia Reactivity Elicited by Elevated Pressure. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 7218 (2020).
41. Yu, F., Zhu, C., Xie, Q. & Wang, Y. Adenosine A<sub>2A</sub> Receptor Antagonists for Cancer Immunotherapy: Miniperspective. *J. Med. Chem.* **63**, 12196–12212 (2020).
42. Stone, T. W. Purines and neuroprotection. *Adv. Exp. Med. Biol.* **513**, 249–280 (2002).
43. Schiffmann, S. N., Fisone, G., Moresco, R., Cunha, R. A. & Ferré, S. Adenosine A2A receptors and basal ganglia physiology. *Prog. Neurobiol.* **83**, 277–292 (2007).

44. Zhao, W., Ma, L., Cai, C. & Gong, X. Caffeine Inhibits NLRP3 Inflammasome Activation by Suppressing MAPK/NF- $\kappa$ B and A2aR Signaling in LPS-Induced THP-1 Macrophages. *Int. J. Biol. Sci.* **15**, 1571–1581 (2019).
45. Ciruela, F., Vilardaga, J.-P. & Fernández-Dueñas, V. Lighting up multiprotein complexes: lessons from GPCR oligomerization. *Trends Biotechnol.* **28**, 407–415 (2010).
46. Cristóvão-Ferreira, S. *et al.* A1R–A2AR heteromers coupled to Gs and Gi/0 proteins modulate GABA transport into astrocytes. *Purinergic Signal.* **9**, 433 (2013).
47. Ferré, S., Fuxe, K., Fredholm, B. B., Morelli, M. & Popoli, P. Adenosine–dopamine receptor–receptor interactions as an integrative mechanism in the basal ganglia. *Trends Neurosci.* **20**, 482–487 (1997).
48. Ferré, S. *et al.* Synergistic interaction between adenosine A2A and glutamate mGlu5 receptors: implications for striatal neuronal function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 11940–11945 (2002).
49. Canals, M. *et al.* Adenosine A2A-dopamine D2 receptor-receptor heteromerization: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. *J. Biol. Chem.* **278**, 46741–46749 (2003).
50. Ferré, S. *et al.* Synergistic interaction between adenosine A2A and glutamate mGlu5 receptors: implications for striatal neuronal function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 11940–11945 (2002).
51. Flaten, V. *et al.* From epidemiology to pathophysiology: what about caffeine in Alzheimer’s disease? *Biochem. Soc. Trans.* **42**, 587–592 (2014).
52. Laurent, C. *et al.* Beneficial effects of caffeine in a transgenic model of Alzheimer’s disease-like tau pathology. *Neurobiol. Aging* **35**, 2079–2090 (2014).
53. Kalda, A., Yu, L., Oztas, E. & Chen, J.-F. Novel neuroprotection by caffeine and adenosine A2A receptor antagonists in animal models of Parkinson’s disease. *J. Neurol. Sci.* **248**, 9–15 (2006).

54. Ritchie, K. *et al.* The neuroprotective effects of caffeine: a prospective population study (the Three City Study). *Neurology* **69**, 536–545 (2007).
55. Gomez-Murcia, V. *et al.* Neuronal A2A receptor exacerbates synapse loss and memory deficits in APP/PS1 mice. *Brain* **147**, 2691–2705 (2024).
56. Tolosa, E., Garrido, A., Scholz, S. W. & Poewe, W. Challenges in the diagnosis of Parkinson’s disease. *Lancet Neurol.* **20**, 385–397 (2021).
57. Ray, B. *et al.* ‘Janus-Faced’  $\alpha$ -Synuclein: Role in Parkinson’s Disease. *Front. Cell Dev. Biol.* **9**, 673395 (2021).
58. Ascherio, A. *et al.* Prospective study of caffeine consumption and risk of Parkinson’s disease in men and women. *Ann. Neurol.* **50**, 56–63 (2001).
59. Yu, L. *et al.* Adenosine A2A receptor antagonists exert motor and neuroprotective effects by distinct cellular mechanisms. *Ann. Neurol.* **63**, 338–346 (2008).
60. Stocchi, F. *et al.* Randomized trial of pramipexole, given as monotherapy, in patients with early Parkinson disease. *Neurology* **88**, 2198–2206 (2017).
61. Armentero, M. T. *et al.* Past, present and future of A2A adenosine receptor antagonists in the therapy of Parkinson’s disease. *Pharmacol. Ther.* **132**, 280–299 (2011).
62. Update on Tozadenant Trial for Parkinson’s | Parkinson’s Foundation.  
<https://www.parkinson.org/about-us/news/update-on-tozadenant-trial>.
63. Nakamura, T. *et al.* Novel benzofuran derivative, medicinal composition containing the same, and uses of these. (2005).
64. LeWitt, P. A. *et al.* Adenosine A2A receptor antagonist istradefylline (KW-6002) reduces “off” time in Parkinson’s disease: A double-blind, randomized, multicenter clinical trial (6002-US-005). *Ann. Neurol.* **63**, 295–302 (2008).

65. Hippus, H. & Neundörfer, G. The discovery of Alzheimer's disease. *Dialogues Clin. Neurosci.* **5**, 101–108 (2003).
66. Barage, S. H. & Sonawane, K. D. Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. *Neuropeptides* **52**, 1–18 (2015).
67. Scheltens, P. *et al.* Alzheimer's disease. *Lancet Lond. Engl.* **397**, 1577–1590 (2021).
68. Sengoku, R. Aging and Alzheimer's disease pathology. *Neuropathology* **40**, 22–29 (2020).
69. What Happens to the Brain in Alzheimer's Disease? *National Institute on Aging*  
<https://www.nia.nih.gov/health/alzheimers-causes-and-risk-factors/what-happens-brain-alzheimers-disease> (2024).
70. Eskelinen, M. H., Ngandu, T., Tuomilehto, J., Soininen, H. & Kivipelto, M. Midlife coffee and tea drinking and the risk of late-life dementia: a population-based CAIDE study. *J. Alzheimers Dis. JAD* **16**, 85–91 (2009).
71. Kirkwood, J. M. *et al.* Next generation of immunotherapy for melanoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **26**, 3445–3455 (2008).
72. Marin-Acevedo, J. A. *et al.* Next generation of immune checkpoint therapy in cancer: new developments and challenges. *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol* **11**, 39 (2018).
73. Abril-Rodriguez, G. & Ribas, A. SnapShot: Immune Checkpoint Inhibitors. *Cancer Cell* **31**, 848-848.e1 (2017).
74. Sun, C., Wang, B. & Hao, S. Adenosine-A2A Receptor Pathway in Cancer Immunotherapy. *Front. Immunol.* **13**, 837230 (2022).
75. Beatty, J. *et al.* Azolopyrimidine for the Treatment of Cancer-Related Disorders. (2018).
76. Payne, A. *et al.* Abstract 1731: EXS21546, a non-CNS penetrant A2AR-selective antagonist for anti-cancer immunotherapy. *Cancer Res.* **81**, 1731 (2021).

77. Willingham, S. B. *et al.* A2AR Antagonism with CPI-444 Induces Antitumor Responses and Augments Efficacy to Anti-PD-(L)1 and Anti-CTLA-4 in Preclinical Models. *Cancer Immunol. Res.* **6**, 1136–1149 (2018).
78. Beckermann, K., Rini, B., Haas, N., George, D. & Jonasch, E. Phase 1b/2 trial of Ipilimumab, Nivolumab, and Ciforadenant (INC) (adenosine A2a receptor antagonist) in first-line advanced renal cell carcinoma. *The Oncologist* **28**, S13–S14 (2023).
79. Phase 1/1b Study to Evaluate the Safety and Tolerability of Ciforadenant Alone and in Combination With Atezolizumab in Advanced Cancers.  
<https://stanfordhealthcare.org/trials/p/NCT02655822.html>.
80. Choukèr, A. *et al.* Critical Role of Hypoxia and A2A Adenosine Receptors in Liver Tissue-Protecting Physiological Anti-Inflammatory Pathway. *Mol. Med.* **14**, 116–123 (2008).
81. Sitkovsky, M. *et al.* Adenosine A2A receptor antagonists: blockade of adenosinergic effects and T regulatory cells. *Br. J. Pharmacol.* **153**, S457–S464 (2008).
82. Reichmann, H. [Caffeine, Chocolate and Adenosine A2A Receptor Antagonists in the Treatment of Parkinson's Disease]. *Fortschr. Neurol. Psychiatr.* **91**, 256–261 (2023).
83. Ji, X. D., Stiles, G. L. & Jacobson, K. A. [(3)H]XAC (xanthine amine congener) is a radioligand for A(2)-adenosine receptors in rabbit striatum. *Neurochem. Int.* **18**, 207–213 (1991).
84. Müller, C. & Jacobson, K. A. Xanthines as Adenosine Receptor Antagonists. *Handb. Exp. Pharmacol.* 10.1007/978-3-642-13443-2\_6 (2011) doi:10.1007/978-3-642-13443-2\_6.
85. Pharmacological characterization of CGS 15943A: a novel nonxanthine adenosine antagonist. | Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.  
<https://jpet.aspetjournals.org/content/242/3/784/tab-article-info>.
86. Zocchi, C. *et al.* The non-xanthine heterocyclic compound SCH 58261 is a new potent and selective A2a adenosine receptor antagonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **276**, 398–404 (1996).

87. Varani, K., Gessi, S., Dionisotti, S., Ongini, E. & Borea, P. A. [3H]-SCH 58261 labelling of functional A<sub>2A</sub> adenosine receptors in human neutrophil membranes. *Br. J. Pharmacol.* **123**, 1723–1731 (1998).
88. Duroux, R. *et al.* Bitopic fluorescent antagonists of the A<sub>2A</sub> adenosine receptor based on pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidin-5-amine functionalized congeners. *MedChemComm* **8**, 1659–1667 (2017).
89. 7-Substituted 5-Amino-2-(2-furyl)pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidines as A<sub>2A</sub> Adenosine Receptor Antagonists: A Study on the Importance of Modifications at the Side Chain on the Activity and Solubility | Journal of Medicinal Chemistry.  
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jm010924c>.
90. Simola, N., Fenu, S., Baraldi, P. G., Tabrizi, M. A. & Morelli, M. Blockade of adenosine A<sub>2A</sub> receptors antagonizes parkinsonian tremor in the rat tacrine model by an action on specific striatal regions. *Exp. Neurol.* **189**, 182–188 (2004).
91. Houthuys, E. *et al.* Abstract 1683: A novel adenosine A<sub>2A</sub> receptor antagonist optimized for high potency in adenosine-rich tumor microenvironment boosts antitumor immunity. *Cancer Res.* **77**, 1683 (2017).
92. Pirson, R. *et al.* Abstract 4147: EOS100850, an A<sub>2A</sub> receptor antagonist with prolonged pharmacodynamic activity, mediates the generation of specific durable immune responses in a murine breast cancer model. *Cancer Res.* **79**, 4147 (2019).
93. Shook, B. C. *et al.* Methylene amine substituted arylindenopyrimidines as potent adenosine A<sub>2A</sub>/A<sub>1</sub> antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **20**, 2864–2867 (2010).
94. Atack, J. R. *et al.* JNJ-40255293, a novel adenosine A<sub>2A</sub>/A<sub>1</sub> antagonist with efficacy in preclinical models of Parkinson's disease. *ACS Chem. Neurosci.* **5**, 1005–1019 (2014).
95. Atack, J. R. *et al.* JNJ-40255293, a novel adenosine A<sub>2A</sub>/A<sub>1</sub> antagonist with efficacy in preclinical models of Parkinson's disease. *ACS Chem. Neurosci.* **5**, 1005–1019 (2014).

96. Caulkett, P. W. R. *et al.* Adenine isosteres with bridgehead nitrogen. Part 1. Two independent syntheses of the [1,2,4]triazolo[1,5-a][1,3,5]triazine ring system leading to a range of substituents in the 2, 5 and 7 positions. *J. Chem. Soc. Perkin 1* 801–808 (1995) doi:10.1039/P19950000801.
97. Ichikawa, S. *et al.* {1,2,4}triazolo{1,5-c}pyrimidine derivatives. (2002).
98. Gillespie, R. J. *et al.* Antagonists of the human adenosine A2A receptor. Part 3: Design and synthesis of pyrazolo[3,4-d]pyrimidines, pyrrolo[2,3-d]pyrimidines and 6-aryl purines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **18**, 2924–2929 (2008).
99. Study Details | A Clinical Trial to Find Out V81444's Side Effects and Blood Levels in Healthy Men | ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/study/NCT01634568>.
100. Aminomethyl substituted thieno[2,3-d]pyrimidines as adenosine A2A receptor antagonists - MedChemComm (RSC Publishing).  
<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2011/md/c1md00082a>.
101. US20080153820 Thieno(3,2-d)pyrimidines and furano(3,2-d)pyrimidines and their use as purinergic receptor antagonists.  
<https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=US42207630&docAn=12071577>.
102. Saku, O. *et al.* Synthetic studies on selective adenosine A2A receptor antagonists. Part II: synthesis and structure-activity relationships of novel benzofuran derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **20**, 3768–3771 (2010).
103. Renk, D. R. *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of Tozadenant analogues as adenosine A2A receptor ligands. *Eur. J. Med. Chem.* **214**, 113214 (2021).
104. Beavis, P. A. *et al.* Adenosine Receptor 2A Blockade Increases the Efficacy of Anti-PD-1 through Enhanced Antitumor T-cell Responses. *Cancer Immunol. Res.* **3**, 506–517 (2015).
105. Leleti, M. R., Miles, D. H., Powers, J. P., Rosen, B. R. & Sharif, E. U. Quinazoline-Pyrazole Derivatives for the Treatment of Cancer-Related Disorders. (2018).

106. Slee, D. H. *et al.* Identification of novel, water-soluble, 2-amino-N-pyrimidin-4-yl acetamides as A2A receptor antagonists with in vivo efficacy. *J. Med. Chem.* **51**, 400–406 (2008).
107. Camacho Gomez, J. A. & Castro-Palomino Laria, J. C. 4 - Aminopyrimidine Derivatives and Their as Adenosine A2a Receptor Antagonists. (2011).
108. Congreve, M. S., Andrews, S. P., Mason, J. S., Richardson, C. M. & Brown, G. A. 1,2,4-Triazine-4-Amine Derivatives. (2011).
109. Pinna, A. Adenosine A2A receptor antagonists in Parkinson's disease: progress in clinical trials from the newly approved istradefylline to drugs in early development and those already discontinued. *CNS Drugs* **28**, 455–474 (2014).
110. Phase I study of taminadenant (PBF509/NIR178), an adenosine 2A receptor antagonist, with or without spartalizumab, in patients with advanced non-small cell lung cancer - PMC.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9167697/>.
111. Alonso Gordo, T. *et al.* Phase 2 study (AARDVARC) of AZD4635 in combination with durvalumab and cabazitaxel in patients (pts) with progressive metastatic castrate-resistant prostate cancer (mCRPC). *J. Clin. Oncol.* **41**, 173–173 (2023).
112. Ohno, Y. *et al.* In Vitro Pharmacological Profile of KW-6356, a Novel Adenosine A2A Receptor Antagonist/Inverse Agonist. *Mol. Pharmacol.* **103**, 311–324 (2023).
113. Ohno, Y. *et al.* The adenosine A2A receptor antagonist/inverse agonist, KW-6356 enhances the anti-parkinsonian activity of L-DOPA with a low risk of dyskinesia in MPTP-treated common marmosets. *J. Pharmacol. Sci.* **152**, 193–199 (2023).
114. Effect of KW-6356, a novel adenosine A2A receptor antagonist/inverse agonist, on motor and non-motor symptoms in Parkinson's disease patients as an adjunct to levodopa therapy: Results of Phase 2b study. *MDS Abstracts* <https://www.mdsabstracts.org/abstract/effect-of-kw-6356-a-novel->

adenosine-a2a-receptor-antagonist-inverse-agonist-on-motor-and-non-motor-symptoms-in-parkinsons-disease-patients-as-an-adjunct-to-levodopa-therapy-results-of-phas/.

115. Brosnan, J. T. & Brosnan, M. E. Glutamate: a truly functional amino acid. *Amino Acids* **45**, 413–418 (2013).
116. Tapiero, H., Mathé, G., Couvreur, P. & Tew, K. D. II. Glutamine and glutamate. *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* **56**, 446–457 (2002).
117. Bak, L. K., Schousboe, A. & Waagepetersen, H. S. The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *J. Neurochem.* **98**, 641–653 (2006).
118. Suh, Y. H., Chang, K. & Roche, K. W. Metabotropic glutamate receptor trafficking. *Mol. Cell. Neurosci.* **91**, 10–24 (2018).
119. Niswender, C. M. & Conn, P. J. Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **50**, 295–322 (2010).
120. Houamed, K. M. *et al.* Cloning, expression, and gene structure of a G protein-coupled glutamate receptor from rat brain. *Science* **252**, 1318–1321 (1991).
121. Metabotropic glutamate receptors. *Neurology*  
<https://www.neurology.org/doi/10.1212/01.wnl.0000306315.03021.2a>.
122. Pilc, A., Chaki, S., Nowak, G. & Witkin, J. M. Mood disorders: regulation by metabotropic glutamate receptors. *Biochem. Pharmacol.* **75**, 997–1006 (2008).
123. Swanson, C. J. *et al.* Metabotropic glutamate receptors as novel targets for anxiety and stress disorders. *Nat. Rev. Drug Discov.* **4**, 131–144 (2005).
124. Conn, P. J., Lindsley, C. W. & Jones, C. K. Activation of metabotropic glutamate receptors as a novel approach for the treatment of schizophrenia. *Trends Pharmacol. Sci.* **30**, 25–31 (2009).

125. Ks, A.-E., S, S. & Ssg, F. The Role of Neuroglial Metabotropic Glutamate Receptors in Alzheimer's Disease. *Curr. Neuropharmacol.* **21**, (2023).
126. S, K. *et al.* The role of glutamate receptors in the regulation of the tumor microenvironment. *Front. Immunol.* **14**, (2023).
127. Yu, L. J., Wall, B. A., Wangari-Talbot, J. & Chen, S. Metabotropic glutamate receptors in cancer. *Neuropharmacology* **115**, 193–202 (2017).
128. Flajolet, M., Wang, H. & Greengard, P. mGluR5 : un récepteur à la croisée des chemins thérapeutiques ? *médecine/sciences* **26**, 678–680 (2010).
129. Sengmany, K. & Gregory, K. J. Metabotropic glutamate receptor subtype 5: molecular pharmacology, allosteric modulation and stimulus bias. *Br. J. Pharmacol.* **173**, 3001–3017 (2016).
130. Bruno, V. *et al.* The impact of metabotropic glutamate receptors into active neurodegenerative processes: A 'dark side' in the development of new symptomatic treatments for neurologic and psychiatric disorders. *Neuropharmacology* **115**, 180–192 (2017).
131. Conn, P. J., Battaglia, G., Marino, M. J. & Nicoletti, F. Metabotropic glutamate receptors in the basal ganglia motor circuit. *Nat. Rev. Neurosci.* **6**, 787–798 (2005).
132. Morin, N. *et al.* Chronic treatment with MPEP, an mGlu5 receptor antagonist, normalizes basal ganglia glutamate neurotransmission in L-DOPA-treated parkinsonian monkeys. *Neuropharmacology* **73**, 216–231 (2013).
133. Rascol, O. *et al.* Use of metabotropic glutamate 5-receptor antagonists for treatment of levodopa-induced dyskinesias. *Parkinsonism Relat. Disord.* **20**, 947–956 (2014).
134. Masilamoni, G. J. *et al.* Metabotropic glutamate receptor 5 antagonist protects dopaminergic and noradrenergic neurons from degeneration in MPTP-treated monkeys. *Brain J. Neurol.* **134**, 2057–2073 (2011).

135. Bruno, V. *et al.* Selective blockade of metabotropic glutamate receptor subtype 5 is neuroprotective. *Neuropharmacology* **39**, 2223–2230 (2000).
136. Shrivastava, A. N. *et al.*  $\beta$ -amyloid and ATP-induced diffusional trapping of astrocyte and neuronal metabotropic glutamate type-5 receptors. *Glia* **61**, 1673–1686 (2013).
137. Um, J. W. *et al.* Metabotropic glutamate receptor 5 is a coreceptor for Alzheimer  $A\beta$  oligomer bound to cellular prion protein. *Neuron* **79**, 887–902 (2013).
138. Overk, C. R. *et al.* Hippocampal neuronal cells that accumulate  $\alpha$ -synuclein fragments are more vulnerable to  $A\beta$  oligomer toxicity via mGluR5 – implications for dementia with Lewy bodies. *Mol. Neurodegener.* **9**, 18 (2014).
139. Arif, M., Kazim, S. F., Grundke-Iqbal, I., Garruto, R. M. & Iqbal, K. Tau pathology involves protein phosphatase 2A in Parkinsonism-dementia of Guam. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 1144–1149 (2014).
140. Frati, C. *et al.* Expression of functional mGlu5 metabotropic glutamate receptors in human melanocytes. *J. Cell. Physiol.* **183**, 364–372 (2000).
141. Park, S.-Y. *et al.* Clinical significance of metabotropic glutamate receptor 5 expression in oral squamous cell carcinoma. *Oncol. Rep.* **17**, 81–87 (2007).
142. Robert, S. M. & Sontheimer, H. Glutamate transporters in the biology of malignant gliomas. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **71**, 1839–1854 (2014).
143. Jesse, C. R., Savegnago, L., Rocha, J. B. T. & Nogueira, C. W. Neuroprotective effect caused by MPEP, an antagonist of metabotropic glutamate receptor mGluR5, on seizures induced by pilocarpine in 21-day-old rats. *Brain Res.* **1198**, 197–203 (2008).
144. Morin, N. *et al.* MPEP, an mGlu5 receptor antagonist, reduces the development of l-DOPA-induced motor complications in *de novo* parkinsonian monkeys: Biochemical correlates. *Neuropharmacology* **66**, 355–364 (2013).

145. Cosford, N. D. P. *et al.* 3-[(2-Methyl-1,3-thiazol-4-yl)ethynyl]-pyridine: A Potent and Highly Selective Metabotropic Glutamate Subtype 5 Receptor Antagonist with Anxiolytic Activity. *J. Med. Chem.* **46**, 204–206 (2003).
146. Bezard, E. *et al.* The mGluR5 negative allosteric modulator dipraglurant reduces dyskinesia in the MPTP macaque model. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* **29**, 1074–1079 (2014).
147. Tison, F. *et al.* A Phase 2A Trial of the Novel mGluR5-Negative Allosteric Modulator Dipraglurant for Levodopa-Induced Dyskinesia in Parkinson's Disease. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* **31**, 1373–1380 (2016).
148. Berg, D. *et al.* AFQ056 treatment of levodopa-induced dyskinesias: results of 2 randomized controlled trials. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* **26**, 1243–1250 (2011).
149. Grégoire, L. *et al.* The acute antiparkinsonian and antidyskinetic effect of AFQ056, a novel metabotropic glutamate receptor type 5 antagonist, in L-Dopa-treated parkinsonian monkeys. *Parkinsonism Relat. Disord.* **17**, 270–276 (2011).
150. Negida, A. *et al.* Mavoglurant (AFQ056) for the treatment of levodopa-induced dyskinesia in patients with Parkinson's disease: a meta-analysis. *Neurol. Sci. Off. J. Ital. Neurol. Soc. Ital. Soc. Clin. Neurophysiol.* **42**, 3135–3143 (2021).
151. Youssef, E. A. *et al.* Effect of the mGluR5-NAM Basimglurant on Behavior in Adolescents and Adults with Fragile X Syndrome in a Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial: FragXis Phase 2 Results. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* **43**, 503–512 (2018).
152. Quiroz, J. A. *et al.* Efficacy and Safety of Basimglurant as Adjunctive Therapy for Major Depression: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Psychiatry* **73**, 675–684 (2016).
153. Repositioning of Basimglurant (mGluR5 Antagonist) for the Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. <https://www.atsjournals.org/doi/epdf/10.1164/ajrccm->

conference.2024.209.1\_MeetingAbstracts.A2603?role=tab doi:10.1164/ajrccm-

conference.2024.209.1\_MeetingAbstracts.A2603.

154. Discovery and characterization of AZD9272 and AZD6538-Two novel mGluR5 negative allosteric modulators selected for clinical development - PubMed.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23046966/>.
155. Kalliomäki, J., Huizar, K., Kågedal, M., Hägglöf, B. & Schmelz, M. Evaluation of the effects of a metabotropic glutamate receptor 5-antagonist on electrically induced pain and central sensitization in healthy human volunteers. *Eur. J. Pain* **17**, 1465–1471 (2013).
156. Rohof, W. O. *et al.* The effects of a novel metabotropic glutamate receptor 5 antagonist (AZD2066) on transient lower oesophageal sphincter relaxations and reflux episodes in healthy volunteers. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **35**, 1231–1242 (2012).
157. Porter, R. H. P. *et al.* Fenobam: a clinically validated nonbenzodiazepine anxiolytic is a potent, selective, and noncompetitive mGlu5 receptor antagonist with inverse agonist activity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **315**, 711–721 (2005).
158. Rylander, D. *et al.* A mGluR5 antagonist under clinical development improves L-DOPA-induced dyskinesia in parkinsonian rats and monkeys. *Neurobiol. Dis.* **39**, 352–361 (2010).
159. Zhang, L. *et al.* Discovery and preclinical characterization of 1-methyl-3-(4-methylpyridin-3-yl)-6-(pyridin-2-ylmethoxy)-1H-pyrazolo-[3,4-b]pyrazine (PF470): a highly potent, selective, and efficacious metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) negative allosteric modulator. *J. Med. Chem.* **57**, 861–877 (2014).
160. Shah, F. *et al.* Mechanisms of Skin Toxicity Associated with Metabotropic Glutamate Receptor 5 Negative Allosteric Modulators. *Cell Chem. Biol.* **24**, 858-869.e5 (2017).

161. Burdi, D. F. *et al.* Design, synthesis, and structure-activity relationships of novel bicyclic azole-amines as negative allosteric modulators of metabotropic glutamate receptor 5. *J. Med. Chem.* **53**, 7107–7118 (2010).
162. Wieloch, T., Sjölund, C., Beirup, K., Ruscher, K. & Olsson, R. Negative allosteric modulators of MGLUR5 for use in the treatment of mature brain damages. (2021).
163. Discovery of VU0409106: A negative allosteric modulator of mGlu5 with activity in a mouse model of anxiety - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24074843/>.
164. Oliveira, T. P. D. *et al.* Negative Modulation of the Metabotropic Glutamate Receptor Type 5 as a Potential Therapeutic Strategy in Obesity and Binge-Like Eating Behavior. *Front. Neurosci.* **15**, 631311 (2021).
165. Christopher, J. A. *et al.* Fragment and Structure-Based Drug Discovery for a Class C GPCR: Discovery of the mGlu5 Negative Allosteric Modulator HTL14242 (3-Chloro-5-[6-(5-fluoropyridin-2-yl)pyrimidin-4-yl]benzotrile). *J. Med. Chem.* **58**, 6653–6664 (2015).
166. Christopher, J. A. *et al.* Fragment and Structure-Based Drug Discovery for a Class C GPCR: Discovery of the mGlu<sub>5</sub> Negative Allosteric Modulator HTL14242 (3-Chloro-5-[6-(5-fluoropyridin-2-yl)pyrimidin-4-yl]benzotrile). *J. Med. Chem.* **58**, 6653–6664 (2015).
167. Duroux, R. Conception, synthèse et évaluation d'antagonistes des récepteurs A2A.
168. Conception, synthèse et évaluation pharmacologique d'antagonistes des récepteurs A2A et de ligands duaux ciblant les récepteurs A2A et mGlu5 | Theses.fr. <https://theses.fr/2020LILUS006>.
169. Hodgson, R. A. *et al.* Characterization of the Potent and Highly Selective A2A Receptor Antagonists Preladenant and SCH 412348 [7-[2-[4-2,4-Difluorophenyl]-1-piperazinyl]ethyl]-2-(2-furanyl)-7H-pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidin-5-amine] in Rodent Models of Movement Disorders and Depression. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **330**, 294–303 (2009).

170. Gillespie, R. J. *et al.* Antagonists of the Human A2A Adenosine Receptor. 4. Design, Synthesis, and Preclinical Evaluation of 7-Aryltriazolo[4,5-d]pyrimidines. *J. Med. Chem.* **52**, 33–47 (2009).
171. Federico, S. *et al.* Synthesis and Biological Evaluation of a New Series of 1,2,4-Triazolo[1,5-a]-1,3,5-triazines as Human A2A Adenosine Receptor Antagonists with Improved Water Solubility. *J. Med. Chem.* **54**, 877–889 (2011).
172. Bolteau, R. *et al.* High ligand efficiency quinazoline compounds as novel A2A adenosine receptor antagonists. *Eur. J. Med. Chem.* **241**, 114620 (2022).
173. The Practice of Medicinal Chemistry: 9780124172050 - AbeBooks.  
<https://www.abebooks.fr/9780124172050/Practice-Medicinal-Chemistry-0124172059/plp>.
174. Hulme, E. C. & Trevethick, M. A. Ligand binding assays at equilibrium: validation and interpretation. *Br. J. Pharmacol.* **161**, 1219–1237 (2010).
175. Zwier, J. M. *et al.* A fluorescent ligand-binding alternative using Tag-lite® technology. *J. Biomol. Screen.* **15**, 1248–1259 (2010).
176. Kecskés, M., Kumar, T. S., Yoo, L., Gao, Z.-G. & Jacobson, K. A. Novel Alexa Fluor-488 labeled antagonist of the A2A adenosine receptor: Application to a fluorescence polarization-based receptor binding assay. *Biochem. Pharmacol.* **80**, 506–511 (2010).
177. Jacobson, O., Kiesewetter, D. O. & Chen, X. Fluorine-18 Radiochemistry, Labeling Strategies and Synthetic Routes. *Bioconjug. Chem.* **26**, 1–18 (2015).
178. Lucas, L. L. & Unterweger, M. P. Comprehensive Review and Critical Evaluation of the Half-Life of Tritium. *J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol.* **105**, 541–549 (2000).
179. Wolf, J. R. Review: Self-radiolysis of compounds containing tritium and carbon-14. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **64**, 286–335 (2021).
180. Huwiler, K. G., De Rosier, T., Hanson, B. & Vogel, K. W. A Fluorescence Anisotropy Assay for the Muscarinic M1 G-protein-Coupled Receptor. *ASSAY Drug Dev. Technol.* **8**, 351–361 (2010).

181. Cornelius, P. *et al.* Design, Synthesis, and Pharmacology of Fluorescently Labeled Analogs of Serotonin: Application to Screening of the 5-HT<sub>2C</sub> Receptor. *SLAS Discov.* **14**, 360–370 (2009).
182. Heine, P. *et al.* High-Throughput Fluorescence Polarization Assay to Identify Ligands Using Purified G Protein-Coupled Receptor. *SLAS Discov.* **24**, 915–927 (2019).
183. Hendrickson, O. D., Taranova, N. A., Zherdev, A. V., Dzantiev, B. B. & Eremin, S. A. Fluorescence Polarization-Based Bioassays: New Horizons. *Sensors* **20**, 7132 (2020).
184. Zhang, H., Wu, Q. & Berezin, M. Y. Fluorescence anisotropy (polarization): from drug screening to precision medicine. *Expert Opin. Drug Discov.* **10**, 1145–1161 (2015).
185. Park, S.-H. & Raines, R. T. Fluorescence polarization assay to quantify protein-protein interactions. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **261**, 161–166 (2004).
186. Cheng, Y. & Prusoff, W. H. Relationship between the inhibition constant (K<sub>1</sub>) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I<sub>50</sub>) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* **22**, 3099–3108 (1973).
187. Kielkopf, C. L., Bauer, W. & Urbatsch, I. L. Bradford Assay for Determining Protein Concentration. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2020**, 102269 (2020).
188. Iso, Y. *et al.* Synthesis and Structure–Activity Relationships of 3-[(2-Methyl-1,3-thiazol-4-yl)ethynyl]pyridine Analogues as Potent, Noncompetitive Metabotropic Glutamate Receptor Subtype 5 Antagonists; Search for Cocaine Medications. *J. Med. Chem.* **49**, 1080–1100 (2006).
189. Qian, M. *et al.* Synthesis toward Bivalent Ligands for the Dopamine D<sub>2</sub> and Metabotropic Glutamate 5 Receptors. *J. Med. Chem.* **61**, 8212–8225 (2018).
190. Grimm, J. B. & Lavis, L. D. Caveat fluorophore: an insiders’ guide to small-molecule fluorescent labels. *Nat. Methods* **19**, 149–158 (2022).

191. Anighoro, A. *et al.* Insights into the interaction of negative allosteric modulators with the metabotropic glutamate receptor 5: Discovery and computational modeling of a new series of ligands with nanomolar affinity. *Bioorg. Med. Chem.* **23**, 3040–3058 (2015).
192. US Patent Application for N-SUBSTITUTED 2-(6-HYDROXY-3-OXO-3H-XANTHENE-9-YL)BENZAMIDES AS PHOTOACTIVATORS IN DETERGENTS Patent Application (Application #20240263103 issued August 8, 2024) - Justia Patents Search.  
<https://patents.justia.com/patent/20240263103>.
193. Sun, W.-C., Gee, K. R., Klaubert, D. H. & Haugland, R. P. Synthesis of Fluorinated Fluoresceins. *J. Org. Chem.* **62**, 6469–6475 (1997).
194. Favre-Besse, F.-C. Modulateurs du transport vésiculaire du glutamate : développement d'outils pharmacologiques et de diagnostic pour la maladie d'Alzheimer. (Université René Descartes - Paris V, 2012).
195. Lau, C. L. *et al.* Adenosine A2A receptor agonist (regadenoson) in human lung transplantation. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* **39**, 563–570 (2020).
196. Guerrero, A. A2A Adenosine Receptor Agonists and their Potential Therapeutic Applications. An Update. *Curr. Med. Chem.* **25**, 3597–3612 (2018).
197. Kuzikov, M. & Kanke, R. Characterization of Compound Effects on PDE Activity Using the LANCE Ultra cAMP Kit and VICTOR Nivo Multimode Plate Reader. in (2017).
198. Lambert, S. G. *et al.* A preparative, spectroscopic and equilibrium study of some phenyl-2-thiazoline fluorophores for aluminium(III) detection. *New J. Chem.* **24**, 541–546 (2000).
199. Ouellette, R. J. & Rawn, J. D. 17 - Ethers and Epoxides. in *Organic Chemistry (Second Edition)* (eds. Ouellette, R. J. & Rawn, J. D.) 507–536 (Academic Press, 2018). doi:10.1016/B978-0-12-812838-1.50017-7.

200. Brel, A. K., Lisina, S. V., Budaeva, Yu. N. & Popov, S. S. Synthesis of 4-hydroxybenzamides and their salts. *Russ. J. Gen. Chem.* **85**, 2200–2202 (2015).
201. Coombs, G., Sak, M. H. & Miller, S. J. Peptide-Catalyzed Fragment Couplings that Form Axially Chiral Non-C2-Symmetric Biaryls. *Angew. Chem. Int. Ed.* **59**, 2875–2880 (2020).
202. Macharia, J. M. *et al.* The catalytic mechanism of the Suzuki-Miyaura reaction.
203. Monnereau, L. La réaction de Suzuki-Miyaura, version supramoléculaire.
204. Coulson, D. R., Satek, L. C. & Grim, S. O. Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0). in *Inorganic Syntheses* 121–124 (John Wiley & Sons, Ltd, 1972). doi:10.1002/9780470132449.ch23.
205. Etude des pKa et de la protodéboronation des acides furanneboroniques. *J. Heterocycl. Chem.* **13**, 1265–1272 (1976).
206. Alami, M., Hamze, A. & Provot, O. Hydrostannation of Alkynes. *ACS Catal.* **9**, 3437–3466 (2019).
207. Cordovilla, C., Bartolomé, C., Martínez-Ilarduya, J. M. & Espinet, P. The Stille Reaction, 38 Years Later. *ACS Catal.* **5**, 3040–3053 (2015).
208. Samrin, F., Sharma, A., Khan, I. A. & Puri, S. Synthesis and Antibacterial Activity of New Diaryldiamines. *J. Heterocycl. Chem.* **49**, 1391–1397 (2012).
209. Barbosa, M. L. de C. *et al.* Novel 2-chloro-4-anilino-quinazoline derivatives as EGFR and VEGFR-2 dual inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **71**, 1–14 (2014).
210. Ouellette, R. J. & Rawn, J. D. 5 - Aromatic Compounds. in *Principles of Organic Chemistry* (eds. Ouellette, R. J. & Rawn, J. D.) 133–162 (Elsevier, Boston, 2015). doi:10.1016/B978-0-12-802444-7.00005-7.
211. Verma, D. K., Dewangan, Y. & Verma, C. Chapter 1 - Organic reaction mechanism. in *Handbook of Organic Name Reactions* (eds. Verma, D. K., Dewangan, Y. & Verma, C.) 1–153 (Elsevier, 2023). doi:10.1016/B978-0-323-95948-3.00001-5.

212. Shukla, N. M., Malladi, S. S., Mutz, C. A., Balakrishna, R. & David, S. A. Structure–Activity Relationships in Human Toll-Like Receptor 7-Active Imidazoquinoline Analogues. *J. Med. Chem.* **53**, 4450–4465 (2010).
213. Achmatowicz, M. M. *et al.* Hydrolysis of Phosphoryl Trichloride (POCl<sub>3</sub>): Characterization, in Situ Detection, and Safe Quenching of Energetic Metastable Intermediates. *Org. Process Res. Dev.* **14**, 1490–1500 (2010).
214. Zhang, Z. *et al.* Synthesis, photophysical and optoelectronic properties of quinazoline-centered dyes and their applications in organic light-emitting diodes. *Dyes Pigments* **125**, 299–308 (2016).
215. Guo, J., Wang, M., Jiang, Y. & Zhang, X. Quinazoline derivatives, preparation methods and uses thereof. (2008).
216. Heredia, M. L., Fernández, M., de la Cuesta, E. & Avendaño, C. 1-Bromo-2,4-dihydro-1*H*-pyrazino[2,1-*b*]quinazoline-3,6-diones as  $\alpha$ -bromoglycine templates. *Tetrahedron Asymmetry* **12**, 411–418 (2001).
217. Vincent, J. *et al.* Small molecule inhibition of cGAS reduces interferon expression in primary macrophages from autoimmune mice. *Nat. Commun.* **8**, 750 (2017).
218. Okano, M. *et al.* Discovery and structure-activity relationships of 4-aminoquinazoline derivatives, a novel class of opioid receptor like-1 (ORL1) antagonists. *Bioorg. Med. Chem.* **17**, 119–132 (2009).
219. Bakavoli, M., Pordel, M., Rahimizadeh, M. & Jahandari, P. A New Leaving Group in Nucleophilic Aromatic Substitution Reactions (SNAr). *J. Chem. Res.* **2008**, 432–433 (2008).
220. Squarcialupi, L. *et al.* Exploring the 2- and 5-positions of the pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidin-7-amino scaffold to target human A1 and A2A adenosine receptors. *Bioorg. Med. Chem.* **24**, 2794–2808 (2016).
221. Ji Ram, V., Sethi, A., Nath, M. & Pratap, R. Chapter 5 - Five-Membered Heterocycles. in *The Chemistry of Heterocycles* (eds. Ji Ram, V., Sethi, A., Nath, M. & Pratap, R.) 149–478 (Elsevier, 2019). doi:10.1016/B978-0-08-101033-4.00005-X.

222. Schiltz, G. E. 6.13 Use of Carbonyl Derivatives for Heterocyclic Synthesis. in *Comprehensive Organic Synthesis (Second Edition)* (ed. Knochel, P.) 555–572 (Elsevier, Amsterdam, 2014).  
doi:10.1016/B978-0-08-097742-3.00621-2.
223. Taylor, J. B. & Triggle, D. J. *Comprehensive Medicinal Chemistry II*. (Elsevier, Amsterdam, 2007).
224. Patel, D. V. *et al.* Novel Multitarget Directed Triazinoindole Derivatives as Anti-Alzheimer Agents. *ACS Chem. Neurosci.* **10**, 3635–3661 (2019).
225. Han, J. *et al.* Chiral 6-aryl-furo[2,3-d]pyrimidin-4-amines as EGFR inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **119**, 278–299 (2016).
226. Jaakola, V.-P. & Ijzerman, A. P. The crystallographic structure of the human adenosine A2A receptor in a high-affinity antagonist-bound state: implications for GPCR drug screening and design. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **20**, 401–414 (2010).
227. de Lera Ruiz, M., Lim, Y.-H. & Zheng, J. Adenosine A2A receptor as a drug discovery target. *J. Med. Chem.* **57**, 3623–3650 (2014).
228. Ensing, B. *et al.* On the origin of the extremely different solubilities of polyethers in water. *Nat. Commun.* **10**, 2893 (2019).
229. Özdemir, C. & Güner, A. Solubility profiles of poly(ethylene glycol)/solvent systems, I: Qualitative comparison of solubility parameter approaches. *Eur. Polym. J.* **43**, 3068–3093 (2007).
230. Le Guern, F., Mussard, V., Gaucher, A., Rottman, M. & Prim, D. Fluorescein Derivatives as Fluorescent Probes for pH Monitoring along Recent Biological Applications. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 9217 (2020).
231. Henderson, B. J., Orac, C. M., Maciagiewicz, I., Bergmeier, S. C. & McKay, D. B. 3D-QSAR and 3D-QSSR models of negative allosteric modulators facilitate the design of a novel selective antagonist of human  $\alpha 4\beta 2$  neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **22**, 1797–1813 (2012).

232. Beeren, I. A. O. *et al.* Controlling tosylation versus chlorination during end group modification of PCL. *Eur. Polym. J.* **180**, 111576 (2022).
233. Chen, D., Liu, X., Yang, Y., Yang, H. & Lu, P. Systematic synergy modeling: understanding drug synergy from a systems biology perspective. *BMC Syst. Biol.* **9**, 56 (2015).
234. Ramsay, R. R., Popovic-Nikolic, M. R., Nikolic, K., Uliassi, E. & Bolognesi, M. L. A perspective on multi-target drug discovery and design for complex diseases. *Clin. Transl. Med.* **7**, 3 (2018).
235. Talevi, A. Multi-target pharmacology: possibilities and limitations of the “skeleton key approach” from a medicinal chemist perspective. *Front. Pharmacol.* **6**, 205 (2015).
236. A Perspective on Multi-target Drugs for Alzheimer’s Disease - PubMed.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32448557/>.
237. Emmitte, K. A. mGlu5 negative allosteric modulators: a patent review (2010-2012). *Expert Opin. Ther. Pat.* **23**, 393–408 (2013).
238. Nickols, H. H. *et al.* VU0477573: Partial Negative Allosteric Modulator of the Subtype 5 Metabotropic Glutamate Receptor with In Vivo Efficacy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **356**, 123–136 (2016).
239. Kato, T. *et al.* DSR-98776, a novel selective mGlu5 receptor negative allosteric modulator with potent antidepressant and antimanic activity. *Eur. J. Pharmacol.* **757**, 11–20 (2015).
240. Molecules | Free Full-Text | Novel Quinazoline Derivatives as Highly Effective A2A Adenosine Receptor Antagonists. <https://www.mdpi.com/1420-3049/29/16/3847>.
241. Novel Multitarget-Directed Ligands (MTDLs) with Acetylcholinesterase (AChE) Inhibitory and Serotonergic Subtype 4 Receptor (5-HT4R) Agonist Activities As Potential Agents against Alzheimer’s Disease: The Design of Donecopride | Journal of Medicinal Chemistry.  
<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jmedchem.5b00115>.
242. Ramalakshmi, N., R S, R. & C N, N. Multitarget Directed Ligand Approaches for Alzheimer’s Disease: A Comprehensive Review. *Mini Rev. Med. Chem.* **21**, 2361–2388 (2021).



## **Conception, synthèse et évaluation pharmacologique d'antagonistes des récepteurs A<sub>2A</sub> et de ligands duaux ciblant les récepteurs A<sub>2A</sub> et mGlu<sub>5</sub>.**

Les récepteurs couplés aux protéines G suscitent un intérêt thérapeutique en raison de leur implication dans une grande variété de processus physiologiques, ce qui en fait des cibles majeures pour de nombreux médicaments. Parmi eux, le récepteur à l'adénosine A<sub>2A</sub> (A<sub>2A</sub>R) a fait l'objet de nombreuses études ces dernières années. Une étude épidémiologique sur la caféine, un antagoniste du récepteur A<sub>2A</sub>, a révélé ses effets bénéfiques sur les fonctions cognitives chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer. D'autres antagonistes du récepteur A<sub>2A</sub> ont démontré des effets positifs sur la motricité dans la maladie de Parkinson, grâce à leurs propriétés neuroprotectrices. Plus récemment, des antagonistes A<sub>2A</sub>R ont également montré des effets antitumoraux. Bien que de nombreux antagonistes aient été développés, ces derniers manquent d'efficacité et ont de faibles propriétés pharmacocinétiques. Par ailleurs, le récepteur métabotropique du glutamate mGlu<sub>5</sub> (mGluR<sub>5</sub>) et ses modulateurs allostériques négatifs jouent un rôle crucial dans le développement des maladies neurodégénératives. L'hétérodimérisation de ce récepteur avec A<sub>2A</sub>R a montré un effet synergique : l'inhibition de mGluR<sub>5</sub> renforce le blocage de A<sub>2A</sub>R. Grâce à des études de modélisation moléculaire, deux familles d'antagonistes A<sub>2A</sub>R, les benzofuranes et les quinazolines, ont été développées. Les relations structure-affinité autour des quinazolines nous ont permis d'identifier de nouveaux composés solubles, affins pour A<sub>2A</sub>R et ayant un pouvoir antagoniste. De nouveaux ligands duaux A<sub>2A</sub>R/mGluR<sub>5</sub> de type quinazolines et 2-aminopyrimidines ont été développés.

## **Design, synthesis and pharmacological evaluation of A<sub>2A</sub> receptor antagonists and dual ligands targeting A<sub>2A</sub> and mGlu<sub>5</sub> receptors**

G protein-coupled receptors are of therapeutic interest due to their involvement in a wide variety of physiological processes, making them major targets for many drugs. Among them, the A<sub>2A</sub> adenosine receptor (A<sub>2A</sub>R) has been the subject of numerous studies in recent years. An epidemiological study of caffeine, an A<sub>2A</sub>R antagonist, revealed its beneficial effects on cognitive function in Alzheimer's patients. Other A<sub>2A</sub>R antagonists have also demonstrated positive effects on motor function in Parkinson's disease, thanks to their neuroprotective properties. More recently, A<sub>2A</sub>R antagonists have also shown anti-tumor effects. Although numerous antagonists have been developed, these lack efficacies and have poor pharmacokinetic properties. The metabotropic glutamate receptor mGlu<sub>5</sub> (mGluR<sub>5</sub>) and its negative allosteric modulators play a crucial role in the development of neurodegenerative diseases. Heterodimerization of this receptor with A<sub>2A</sub>R has shown a synergistic effect: inhibition of mGluR<sub>5</sub> enhances blockade of A<sub>2A</sub>R. Thanks to molecular modeling studies, two families of A<sub>2A</sub>R antagonists, benzofurans and quinazolines, have been developed. Structure-affinity relationships around quinazolines enabled us to identify new soluble compounds with A<sub>2A</sub>R affinity and antagonistic potency. New dual A<sub>2A</sub>R/mGluR<sub>5</sub> ligands such as quinazolines and 2-aminopyrimidines were developed.