



**HAL**  
open science

# Identification de nouvelles structures inhibitrices de kinases : conception synthèse et évaluation biologique

Olfa Gloulou

► **To cite this version:**

Olfa Gloulou. Identification de nouvelles structures inhibitrices de kinases : conception synthèse et évaluation biologique. Chimie thérapeutique. Université René Descartes - Paris V; Université du Centre (Monastir, Tunisie). Faculté de Pharmacie, 2013. Français. NNT : 2013PA05P637 . tel-01132397

**HAL Id: tel-01132397**

**<https://theses.hal.science/tel-01132397>**

Submitted on 17 Mar 2015

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

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



## Université Paris Descartes et Université de Monastir

UFR faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques Paris Descartes

Faculté de pharmacie de Monastir

Ecole Doctorale Médicament Toxicologie Chimie et Environnement

### **T H E S E**

Pour l'obtention du titre de

**Docteur en Sciences**

*Université Paris Descartes – Université de Monastir*

*Présentée par :*

**Olfa GLOULOU ep LANDOLSI**

## **Identification de nouvelles structures inhibitrices de kinases : conception synthèse et évaluation biologique**

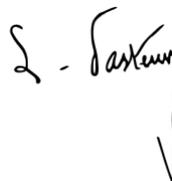
*Thèse en cotutelle dirigée par : Pr H. Galons et Pr R. Sellami*

*Soutenue le Vendredi 15 Novembre 2013 devant le jury composé de :*

<b>Rapporteur :</b>	Nadia Walchshofer	Professeur Université de Lyon 1
<b>Rapporteur :</b>	Christian Cavé	Professeur Université de Paris Sud Chatenay Malabry
<b>Examineur:</b>	Souad Sfar	Professeur Université de Monastir
<b>Encadreur :</b>	Ridha Sellami	Professeur Université de Monastir
<b>Encadreur :</b>	Hervé Galons	Professeur Université de Paris Descartes

**« Dans les champs de l'observation, le hasard ne favorise que les esprits préparés »**

*L. Pasteur: Discours prononcé à Douai, le 7 décembre 1854*



*Cette citation m'as toujours fait rêver de la recherche scientifique, ce monde fascinant qui nous tiraille entre la réussite tantôt et l'échec parfois.*

*Faire de la chimie pharmaceutique exige un mot d'ordre « **persévérance** », et certe beaucoup de temps derrière. Concilier entre mon activité d'enseignante de praticien hospitalier et de doctorante n'était guère facile. J'avais en permanence ce sentiment de ne pas faire assez! Parfois de la culpabilité et même des doutes, est ce que j'ai choisi la bonne carrière ?*

*Tant de fois j'aurai aimé me consacrer à mes recherches, faire que de la chimie, des réactions des colonnes et interpréter des RMN. C'était tellement agréable d'imaginer et de voir mes produits dans les pics des spectres RMN.*

*D'autres fois la tâche d'enseignante m'absorbait et je souhaiterais plus de temps pour préparer mes cours, pour encadrer ces futurs pharmaciens remplis d'élan et de rêves « devenir l'Homme du médicament ».*

*Je demande pardon auprès des patients du CHU Farhat Hached de Sousse, si je n'ai pas pu être présente tout les jours, si je n'ai pas pu optimiser au mieux leurs traitements. Car j'étais ailleurs pour d'autres obligations : pour mes recherches et mes étudiants.*

*J'espère, à travers mes travaux de thèse pouvoir contribuer à la recherche pharmaceutique. J'espère que ce modeste travail constituera une brique dans l'édifice de la recherche scientifique.*

*Sans votre soutien ce travail ne sera pas accompli !*

*Je remercie mes encadreurs : Pr. Galons qui m'a accueilli dans son laboratoire et m'a fait partager sa rigueur et sa passion pour la chimie, Pr. Sellami pour son soutien son encouragement et ses conseils, je remercie Pr. Garbay qui m'a facilité l'inscription au sein de l'école doctorale médicament.*

*J'exprime ma reconnaissance à toutes les personnes qui m'ont aidé à effectuer mes stages au sein du laboratoire de Chimie Organique Paris Descartes : Pr. Galons, Pr. Sellami, Pr. Sfar, Dr. Ben Youssef, Pr. Kallel, Mr. Elloumi, Pr. Chouchane, Pr. Farhat, mes collègues au département de chimie thérapeutique et mes collègues au CHU Farhat Hached de Sousse.*

*Je suis reconnaissante à toute l'équipe du laboratoire de Chimie Organique Paris Descartes, l'équipe du laboratoire de développement des médicaments Monastir et l'équipe de Manros Roscoff : Dr. Meijer, chère Nessimi (Dr. Oumata), l'équipe de Bio, Youssef, bouthayna, Jaqueline...*

*Je tiens également à exprimer toute ma reconnaissance à mes deux rapporteurs, Pr. Walchshofer et Pr. Cavé.*

*Egalement, je remercie Mme la Doyenne, Pr. Sfar qui a accepté de siéger dans mon jury, malgré ses nombreuses obligations professionnelles.*

*J'exprime ma gratitude à toute ma famille et ma belle famille en particulier « baba Amor » et « omni Radhia », ainsi que mes amis : merci à vous tous pour votre soutien et votre amour.*

*Je dédie mon travail à la mémoire de ma chère grande mère, que dieu la couvre de sa sainte miséricorde.*

*Je dédie également ce travail à mon ange gardien, à ma mère qui m'a toujours poussé vers l'avant, qui était toujours présente, dieu la préserve inshallah.*

*Enfin, je dédie ma thèse à mon cher Anis, qui m'a soutenu et encouragé pour avancer et réussir, tu as donné un sens à ma vie ! J'espère beaucoup de bonheur et de prospérité pour notre petite famille.*

*Je ne trouve pas les mots ! Comment te dire mon adorable bébé ! Cette thèse, ainsi que mon travail me prive parfois d'être à tes côtés de te prendre dans mes bras et de partager avec toi des moments de quiétude et de bonheur ! Cette thèse je te l'offre, tu es ma raison de vivre mon fils Omar !*

# SOMMAIRE

---

<b>I. INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>II. CHAPITRE I: LES KINASES CYCLINES DEPENDANTES ET LEURS INHIBITEURS ACTUELLEMENT EN COURS D'ESSAIS CLINIQUES .....</b>	<b>4</b>
LES PRINCIPALES ETAPES DE LA DECOUVERTE DE <i>LA R- ROSCOVITINE... UN CDKI</i> .....	5
LES KINASES CYCLINES DEPENDANTES ET LEURS INHIBITEURS ACTUELLEMENT EN COURS D'ESSAIS CLINIQUES.....	7
1. <i>Introduction</i> .....	7
2. <i>Rôle des CDKs</i> .....	8
3. <i>Régulations des CDKs</i> .....	10
4. <i>Principales pathologies dans lesquelles les CDKs sont des cibles potentielles pour des inhibiteurs.</i> .....	12
5. <i>Les inhibiteurs de CDKs</i> .....	13
5.1. Les structures des CDKI décrites dans la littérature .....	13
5.1.2. Molécules sortantes des essais cliniques .....	16
5.1.3. Les nouvelles structures dérivées ou non de la (R)- roscovitine .....	17
5.2. Cibles et sélectivité des CDKIs .....	19
5.2.1. La (R)-Roscovitine (Seliciclib, CYC202) .....	19
5.2.2. Le Flavopiridol (Alvociclib).....	20
5.2.3. Le Dinaciclib (SCH727965) .....	20
5.2.4. Le SNS-032 .....	20
5.2.5. Le PD0332991 (Palbociclib) .....	21
5.2.6. L'AT7519 .....	22
5.2.7. Le P276-00 .....	22
5.2.8. Le BAY 1000394.....	22
5.2.9. Le PHA-848125.....	22
5.2.10. Le P1446A-05.....	23
5.2.11. Nouvelles structures .....	23
5.3. Les CDKI et essais cliniques.....	26
5.3.1. Les essais cliniques.....	26
5.3.2. CDKI en essai clinique .....	27
5.3.2.1. Le Flavopiridol.....	27
5.3.2.2. La Roscovitine .....	28
5.3.2.3. Le P276-00.....	29
5.3.2.4. La SCH 727965 (Dinaciclib) .....	30
5.3.2.5. L'AT7519 .....	31
5.3.2.6. Le PHA-848125 .....	32

5.3.2.7. BAY 1000394 et P1446A-05 .....	32
5.3.2.8. Le PD 0332991 (Palbociclib).....	32
5.3.2.9. La SNS-032.....	33
5.3.3. Principales indications des essais cliniques avec les CDKIs.....	34

### **III. CHAPITRE II: PREPARATION DE PURINES PORTEUSES D'UN GROUPEMENT HYDROXYBIARYLMETHYLAMINE EN POSITION 6..... 40**

PREPARATION DE PURINES PORTEUSES D'UN GROUPEMENT HYDROXYBIARYLMETHYLAMINE EN POSITION 6 .....	41
1. Conception des composés hydroxybiarylméthylamine .....	41
2. Rétrosynthèse .....	45
3. Synthèse des dérivés de roscovitine hydroxybiarylméthylamine .....	46
3.1. Synthèse du 2-(aminométhyl)-5-phényl-phénol.....	46
3.1.1. Obtention du 2-hydroxy-4-phényl-benzaldehyde.....	46
3.1.1.1. Première voie de synthèse du 2-hydroxy-4-phenyl-benzaldehyde .....	46
3.1.1.2. Deuxième voie de synthèse du 2-hydroxy-4-phényl-benzaldehyde .....	48
3.1.2. Synthèse du 2-(aminométhyl)-5-phényl-phénol.....	48
3.2. Synthèse du 2-(aminométhyl)-5-(3-thiényl)phénol.....	49
3.3. SN <sub>Ar</sub> par les dérivés méthylamine hydroxybiaryle en position 6.....	51
3.3.1. Préparation de la 2,6-dichloro-9- isopropylpurine 15 .....	51
3.3.2. SN <sub>Ar</sub> par le 2-(aminométhyl)-5-phényl-phénol .....	51
3.3.3. SN <sub>Ar</sub> par le 2-(aminométhyl)-5-(3-thiényl)phénol.....	52
3.4. SN <sub>Ar</sub> par les aminoalcools en position 2 .....	53
4. Evaluation biologique.....	53
4.1. Principe de la mesure de l'activité biologique .....	53
4.2. Résultats : .....	54
5. Conclusion et perspectives.....	56

### **IV. CHAPITRE III : PREPARATION DE THIENO[3,2-D] PYRIMIDINES ..... 58**

PREPARATION DE THIENO[3,2-D]PYRIMIDINES.....	59
1. Conception des dérivés thiéno[3,2-d]pyrimidines .....	59
2. Rétrosynthèse .....	61
3. Synthèses de composés thiéno[3,2-d]pyrimidine à partir du dérivé chloro-thiométhane .....	61
3.1. Synthèse des composés de structure générale VI.....	62
3.1.1. Synthèse de l'intermédiaire 2- carboxylate d'éthyle 3-aminothiophène .....	62
3.1.2. Synthèse du méthyl 3-amino-4-bromo-thiophene-2-carboxylate (26) .....	63
3.1.3. Synthèse du méthyl 3-amino-4-isopropényl-thiophène-2-carboxylate (27)..	63
3.2. Synthèse de composé de structure générale III .....	64
3.2.1. Synthèse des composés 4-chloro-2-méthylsulfanyl-thiéno[3,2-d]pyrimidine 30 (a-b-c) .....	64
3.2.1.1. Obtention du cycle thieno[3,2-d]pyrimidin-4-one .....	64
3.2.1.2. Fonctionnalisation du cycle thieno[3,2-d]pyrimidin-4-one .....	65

3.2.2. Etape de S <sub>N</sub> Ar de 4-chloro-2-methylsulfanyl-thieno[3,2-d]pyrimidine (33) en position 6 par différentes amines .....	66
3.3. Synthèse des produits finaux de structure I : .....	68
3.3.1. L'oxydation du thio-méthyle .....	68
3.3.2. Etape de S <sub>N</sub> Ar en position 2 par différents amino-alcools.....	71
3.3.3. Couplage de Suzuki en position 9 .....	73
4. Synthèse des dérivés thieno[3,2-d]pyrimidines à partir du 7-bromo-2,4-dichloro-thieno[3,2-d]pyrimidine.....	73
4.1. Synthèse du 7-bromo-2,4-dichloro-thieno[3,2-d]pyrimidine .....	73
4.2. Synthèse des dérivés thieno[3,2-d]pyrimidine : .....	74
5. Evaluation biologique .....	76
5.1. Résultats .....	76
6. Conclusion et perspectives.....	78
<b>V. CONCLUSION GENERALE .....</b>	<b>79</b>
<b>VI. PARTIE EXPERIMENTALE .....</b>	<b>82</b>
1. Généralités .....	83
2. Produits synthétisés .....	83
<b>VII. BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>111</b>

# LISTE DES ABREVIATIONS ET SYMBOLES

---

## A

$\alpha$ : alpha

AcOEt : acétate d'éthyle

AcOH : acide acétique

$A_E$  : addition électrophile

Alk : alkyle

AMM : autorisation de mise sur le marché

ANSM : agence nationale de sécurité des médicaments

Ar : aromatique

ARNm : acide ribonucléique messenger

ASMR : amélioration du service médical rendu

Asp : acide aspartique

ATP : adénosine triphosphate

$AUC_{INF}$  : « air under curve », à partir de l'instant zéro à l'infini.

## B

$\beta$ : beta

$BCl_3$ : Trichlorure de bore

Bcr-abl: breakpoint cluster region-abelson

$BF_3.OEt_2$ : trifliore de bore diethyl ether

Bn: benzyle

Boc: *tert*-butyloxycarbonyle

BuOH: butanol

## **C**

Cat : catalyseur

CCM : chromatographie sur couche mince

CDKs : "cyclin-dependent kinases"

Cdc 25 : cell division cycle

CGS : chromatographique sur gel de silice

CDKI: "cyclin-dependent kinase inhibitor"

CKs : "casein kinases"

Cl : clairance

$C_{\max}$  : concentration plasmatique maximale

Coll : collaborateurs

CPS: Cognitive Performance Scale

Cyc : cyclohexane

CYP : cytochrome P 450

## **D**

DCM : dichlorométhane

DCP : dichloropurine

DFS: disease-free survival

DIBAL: Diisobutylaluminium hydride

DLT: Dose-limiting toxicity

DMAP: 4-Dimethylaminopyridine

DMF : Dimethylformamide

DMSO : diméthylsulfoxyde

DMT: dose maximale tolérée

DYRK: "dual specificity phosphorylation regulated kinase"

## **E**

$\epsilon$ : epsilon

ED<sub>50</sub> : dose effective médiane, produit effet escompté pour 50 % de la population

eq: équivalent

EGFR: "epidermal growth factor receptor"

ESI : Electrospray ionization

Et : éthyle

EtOH : éthanol

Et<sub>2</sub>O : éther diéthylique

## **F**

FAK : Focal Adhesion Kinase

FU : fluoro-uracile

## **G**

$\gamma$  : gamma

GABA : acide  $\gamma$ -aminobutyrique

Glu : acide glutamique

GSK-3: "glycogen synthase kinase 3"

## **H**

h: heures

Hal: halogène

HCMV: " human cytomegalovirus"

HER 2: Human Epidermal Growth Factor Receptor 2

HIPK: "homeodomain- interacting protein kinase"

HIV: "human immunodeficiency virus"

HMPT: Hexamethylphosphoric Triamide

HR: hormonal receptor

HSV: "virus herpes simplex"

HTLV-1: "human T cell leukemia/lymphoma type 1"

## **I**

IC<sub>50</sub> : constante d'inhibition à 50 %

ID<sub>50</sub> : dose infectieuse médiane

IG<sub>50</sub> : constante d'inhibition à 50 % de la croissance cellulaire ou d'une enzyme

*i*-Pr : isopropyle

*i*-PrOH : isopropanol

IV: intraveineuse

## **J**

JAK : "Janus kinase"

## **K**

K<sub>i</sub> : constante d'inhibition

K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> : carbonate de potassium

## **L**

LAL : leucémie aigue lymphoblastique

LAM : leucémie aigue myéloïde

LiAlH<sub>4</sub> : lithium aluminium hydride

LiCl : chlorure de lithium

LLC : leucémie lymphoïde chronique

LMC : leucémie myéloïde chronique

LH : lymphome hodgkinien

LNH : lymphome non hodgkinien

Lys : lysine

## **M**

MA : maladie d'Alzheimer

MAPK : "mitogen activated protein kinase "

MARK : "microtubule affinity regulating kinase"

m-CPBA : acide *mé*ta-chloroperbenzoïque

Me : méthyle

MeOH : méthanol

Mg<sup>2+</sup> : ion magnésium

MHz: megahertz

MM: myelome multiple

MS: mass spectrometry

mTOR: "mammalian target of rapamycin"

MYT1: myelin transcription factor 1

**N**

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>: Carbonate de sodium

NaOH: Hydroxyde de sodium

Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: Sulfate de sodium anhydre

NEt<sub>3</sub>: triéthylamine

NF-κB: "nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B cells"

NSCLC: non small cell lung cancer

**O**

OMS : organisation mondiale de la santé

**P**

Pd : palladium

Pdt : produit

Ph : phenyl

Ph+: Philadelphie positif

PI3K: inositol-1,4,5-triphosphate-3-kinase

PI3: inositol-1,4,5-triphosphate

PI4: inositol-1,3,4,5-triphosphate

PIM: "proto oncogene serine/threonine kinase"

PKs : protéines kinases

POCl<sub>3</sub> : Oxychlorure de phosphore

ppm : partie par millions

PKA : protéine kinase A

PKC: protéine kinase C

PKG: protéine kinase G

PKR : polykystose rénale

Pyr : pyridine

## **R**

Rb : rétinoblastoma protéin

Rdt: rendement

Rf : rapport frontal

Ros : roscovitine

RMN : résonance magnétique nucléaire

RSA: Relation structure-activité

## **S**

SE<sub>Ar</sub> : substitution électrophile aromatique

Ser : sérine

SMR : service médical rendu

SN : substitution nucléophile

SN<sub>Ar</sub> : substitution nucléophile aromatique

## **T**

T<sub>1/2</sub>: temps de demi-vie

T.A : température ambiante

TBDMS : *tert*-Butyldimethylsilyl

TFA : acide trifluoroacétique

THF : tétrahydrofurane

TKs: tyrosine kinases

TLK: "tyrosine like kinase"

TMS: tétraméthylsilane

TMSOTf: Trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate

TrK: "transforming tyrosine kinase"

Tyr : tyrosine

**U, V, W**

UDP : uridine diphosphate

UGT : uridine triphosphate

UV : ultraviolet

Vd : volume de distribution

VEGFR: "vascular endothelial growth factor receptor"

**X, Y, Z**

ZnBr<sub>2</sub> : bromure de zinc

ZVZ : "zona varicaela virus"

# **I. INTRODUCTION**

---

## Introduction

Les kinases sont des enzymes qui catalysent les réactions de phosphorylation par l'ajout d'un ion phosphate à une molécule variée. Ces substrats, peuvent être de nature aussi diverse qu'une protéine, un lipide un sucre ou même une autre kinase.

La mise en évidence de la dérégulation des kinases dans de nombreuses pathologies a été à l'origine de l'intérêt pour cet ensemble de classes thérapeutiques et constitue le motif qui conduit de très nombreuses équipes à rechercher des inhibiteurs de ces cibles.

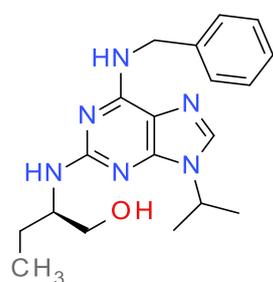
Leur dérégulation a d'abord été caractérisée dans les affections cancéreuses et les leucémies. L'idée d'exploiter cette voie de recherche a pris corps à la fin du XX<sup>ème</sup> siècle. Cependant, les effets pléiotropiques de ces kinases au niveau des processus biologiques vitaux de l'organisme ont longtemps été considérés comme la cause probable de toxicités insurmontables et donc incompatibles avec un usage thérapeutique.

Actuellement on estime que plus de 30 % des programmes des entreprises industrielles visent à développer des inhibiteurs de kinases. Une vingtaine d'inhibiteurs de kinases ont atteint le marché certains de ces inhibiteurs de kinases sont des petites molécules d'autres des anticorps. A ce jour aucun n'a pour principal mécanisme d'action la propriété d'inhiber des kinases dépendantes de cyclines (CDKs). Cependant il est vraisemblable que ces inhibiteurs arriveront prochainement sur le marché.

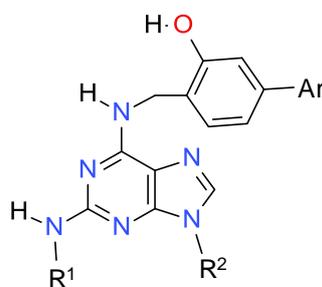
Le but de cette thèse est de développer de nouvelles séries d'hétérocycles analogues de la Roscovitine (premier inhibiteur de CDK a entré en clinique) afin d'identifier de nouveaux inhibiteurs de kinases, elle suit un double objectif :

1. Etudier en termes d'activité et de sélectivité l'influence de l'introduction de structures originales en position 6 sur le squelette purine.

Préparer et évaluer des molécules (I) dans lesquelles une structure d'hydroxy biarylamine a été introduite en position 6.

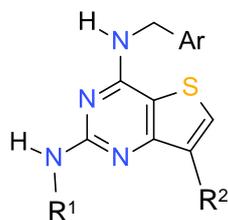


**(R)- Roscovitine**



**I**

2. Rechercher si une structure de type thieno[3,2-d]pyrimidines (II) isostère des purines pouvait constituer un nouveau squelette porteur d'activité inhibitrice de kinases.



II

Avant d'aborder les principales voies d'accès à ces molécules, nous allons dans une introduction bibliographique rappeler le fonctionnement des CDKs, puis présenter les principaux inhibiteurs de CDKs décrits récemment, en s'attardant sur les molécules évaluées en essais cliniques.

Cette thèse présentera donc trois chapitres :

1. Les kinases cyclines dépendantes et leurs inhibiteurs actuellement en cours d'essais cliniques.
2. La préparation de purines porteuses d'un groupement hydroxybiarylamine en position 6.
3. La préparation de thiéno[3,2-d]pyrimidines.

## **II. CHAPITRE I:**

---

### **Les kinases cyclines dépendantes et leurs inhibiteurs actuellement en cours d'essais cliniques**

## Les principales étapes de la découverte de *La R-Roscovitine... un CDKI*

Le développement de la *R-Roscovitine* provient d'études réalisées par le Dr L. Meijer (CNRS) qui a testé divers dérivés de purine par leur activité sur la division des embryons d'oursins et les œufs d'étoile de mer. Cette découverte fait suite à l'identification de la 6-diméthylaminopurine (DMAP) comme inhibiteur non sélectif du complexe CDK1/CyB. A partir de la DMAP, un screening avait été réalisé afin d'identifier de nouveaux inhibiteurs de ce complexe. Ces recherches ont conduit à l'Isopentanyladénine (Schéma 1), qui est légèrement plus actif que la 6-DMAP mais faiblement sélectif. L'Olomoucine dérivé trisubstitué a été ensuite préparée. Elle présente une modeste activité mais une sélectivité prometteuse. L'optimisation de cette structure a conduit à la Roscovitine, le premier inhibiteur de CDK découvert. Il s'agit d'un dérivé de purine tri-substituée en 2, 6 et 9. C'est une molécule qui présente une activité sur CDK 1, 2, 5, 7, et 9 avec une  $IC_{50} < 1\mu M$ . Son activité tumorale se traduit par le blocage de la prolifération en une ou plusieurs étapes du cycle cellulaire. Ces différentes actions en font ainsi une molécule prometteuse qui est par ailleurs actuellement en phase clinique IIb dans le cancer du poumon non à petites cellules.

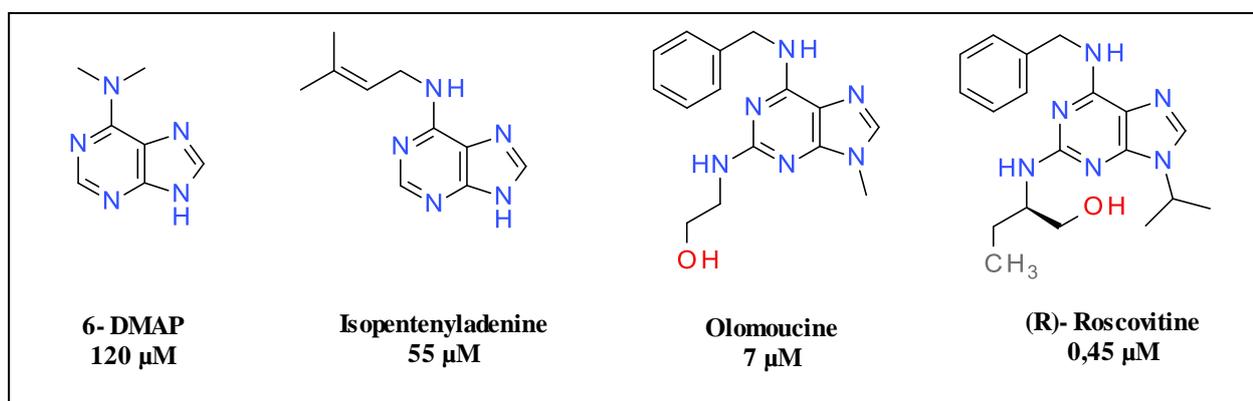


Schéma 1 : Inhibiteurs de CDK avec leur  $CI_{50}$  pour le complexe CDK1/Cycline B<sup>1</sup>

L'entrée en clinique de la Roscovitine a été le point de départ de développement de cette nouvelle série. Un point clef a été la mise en vente par les principaux vendeurs de produits chimiques. De très nombreux laboratoires ont alors testé la Roscovitine qui à fait, à ce jour l'objet de plus de deux milles publications. Ces travaux vont essentiellement concerner les applications prévisibles des CDKIs tels que les pathologies prolifératives et également des affections non prolifératives dans lesquelles certaines CDKs sont impliquées. Ces très nombreuses études vont dessiner les contours de cette classe pharmacologique. Au delà de l'inhibition des kinases, d'autres applications mettant en jeu des mécanismes indépendant des kinases impliquant par exemple les canaux ioniques. De nouvelles molécules analogues des la Roscovitine et ciblant d'autres pathologies ont ainsi été découvertes.

# Les kinases cyclines dépendantes et leurs inhibiteurs actuellement en cours d'essais cliniques

## 1. Introduction

Les kinases sont des protéines fondamentales dans le contrôle des fonctions du vivant. On en dénombre 518 chez l'Homme. Elles sont impliquées dans la régulation de la cellule, plusieurs protéines kinases sont dérégulées dans les proliférations cancéreuses.

Les protéines kinases ont fait l'objet de recherches intenses qui ont abouties à la mise sur le marché de plusieurs inhibiteurs de tyrosine kinases, actuellement une vingtaine d'inhibiteurs sont commercialisés (imatinib Glivec®, gefitinib iressa®, lapatinib Tyverb®, bosutinib bosulif®, sunitinib sutent®, vandetanib caprelsa®, erlotinib tarceva®...).

L'imatinib (Glivec®), a eu l'AMM en 2002 pour le traitement des LMC et LAL chromosome Philadelphie (bcr-abl) positive (Ph+) et les tumeurs stromales gastro-intestinales. Il a montré un service médical rendu (SMR) niveau très important, révolutionnant par la suite la prise en charge des leucémies chromosome Philadelphie (bcr-abl) positive (Ph+).

L'intérêt pour les kinases cyclines dépendantes (CDKs) est relativement récent. Il résulte de l'observation de la dérégulation des CDKs dans une grande diversité de maladies telles que les infections virales, les troubles neuro-dégénératifs comme la maladie d'Alzheimer, ainsi que pour certaines maladies rénales et les cancers<sup>2</sup>.

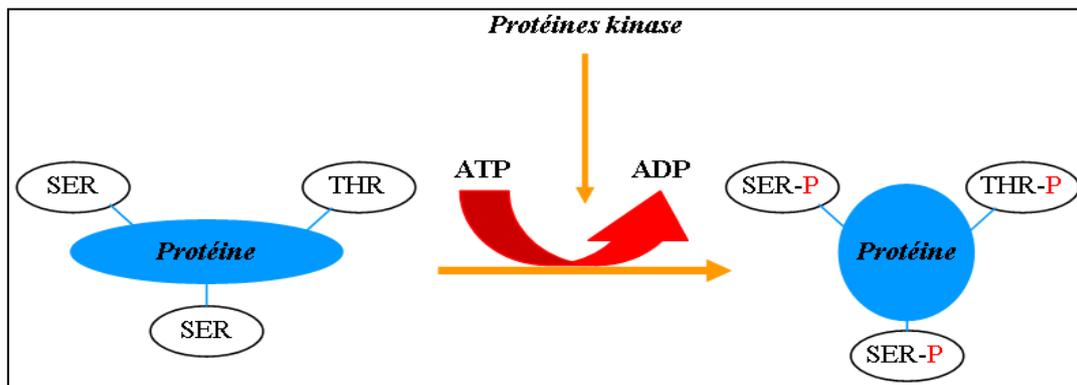
Plusieurs molécules inhibitrice de CDKs sont en cours d'évaluation et font l'objet d'essais cliniques, certains sont encourageants et laisse même espérer une prochaine mise sur le marché. Dans cette première partie nous allons étudier les différentes molécules inhibitrices de CDKs en cours d'essai cliniques ainsi que les principales indications.

Tout d'abord, nous rappelons certaines notions fondamentales à savoir le rôle des CDKs et les pathologies qui impliquent cette classe de kinase.

## 2. Rôle des CDKs

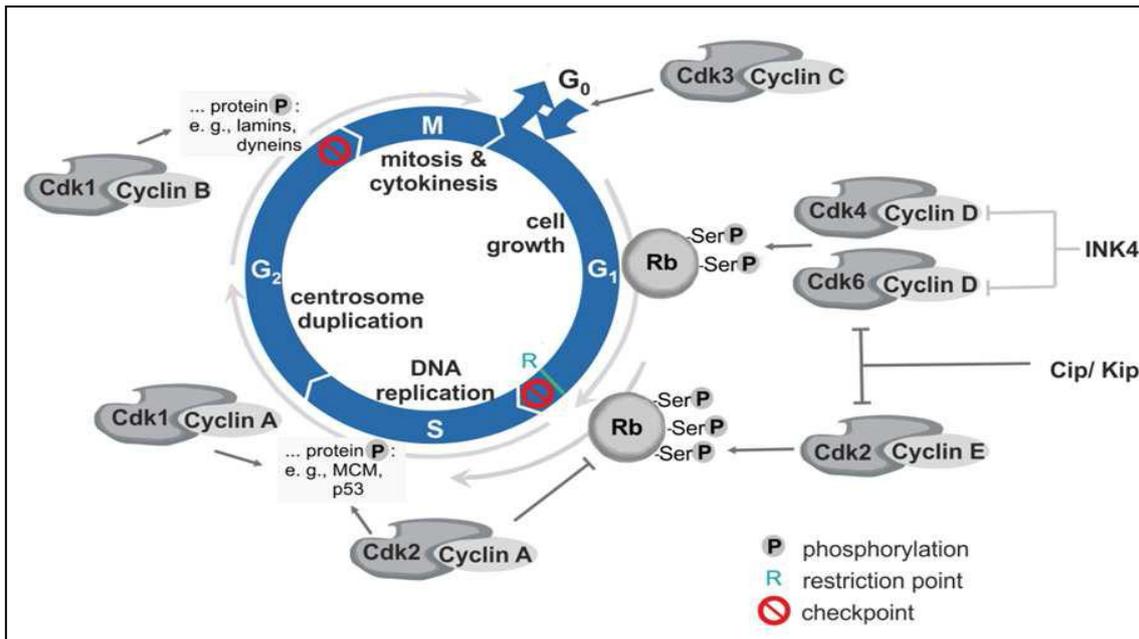
Ces enzymes catalysent la phosphorylation de résidus sérine et thréonine, par addition d'un groupement phosphate provenant du phosphate terminal de l'ATP. Il s'agit d'un mécanisme de régulation cellulaire réversible, qui a lieu sur les protéines pour en modifier l'activité. En effet, la phosphorylation induit un changement de conformation des protéines cibles et par la suite l'apparition d'une nouvelle propriété enzymatique (Schéma 2).

Les cyclines n'ont pas d'activité enzymatique, se sont des protéines régulatrices nécessaires à l'activité des CDKs.



*Schéma 2 : bilan schématique de phosphorylation*

Ces phosphorylations régulent beaucoup de phénomènes physiologiques, parmi lesquels, le cycle cellulaire. Les CDKs liées à des Cyclines permettent ainsi le passage entre les phases du cycle. Le blocage du cycle par les inhibiteurs peut donc s'opposer à la prolifération anarchique des cellules tumorales (Schéma 3).



*Schéma 3 : Le cycle cellulaire*

Les complexes CDK4/cycline D et CDK6 / cycline D phosphorylent et inactivent la protéine Rb « rétinoblastoma protéin » ce qui permet la synthèse des cyclines A et E nécessaires pour la transition G<sub>1</sub>/S et pour la progression de la phase S. Le complexe CDK2 / cycline E est responsable de la transition G<sub>1</sub>/S et régule la duplication du centrosome. Au cours de la phase S, le complexe CDK2/cycline A phosphoryle des substrats qui déclenchent la réplication de l'ADN et l'inactivation de facteurs de transcription de la phase G<sub>1</sub>. Enfin, le complexe CDK1 / cycline B dirige la transition G<sub>2</sub>/M par phosphorylation de nombreux substrats et conduit la progression de la mitose.

Certaines CDKs participent à la régulation de la transcription : CDK7 / cycline H participe avec CDK8 / cycline C à l'étape de l'élongation par phosphorylation de l'ARN polymérase II. CDK9 / cycline T permet la transcription du facteur P-TEFb qui intervient dans l'activation de Tat, kinase du HIV.

Les CDKs interviennent également en dehors du cycle cellulaire, notamment par l'intermédiaire de CDK5 dans le fonctionnement du système nerveux central, dans la mort neuronale par CDK1/4/6, dans l'apoptose (CDK2/5/11) et dans la différenciation cellulaire (CDK4/5/9).<sup>3</sup>

### 3. Régulations des CDKs

L'activité des CDKs est contrôlée de façon très précise, cette régulation intervient à quatre niveaux :

- La liaison cycline/CDK.
- Les modifications post-traductionnelles : phosphorylation et déphosphorylation.
- La modification de la localisation intracellulaire des CDKs.
- Les associations transitoires avec des inhibiteurs protéiques.

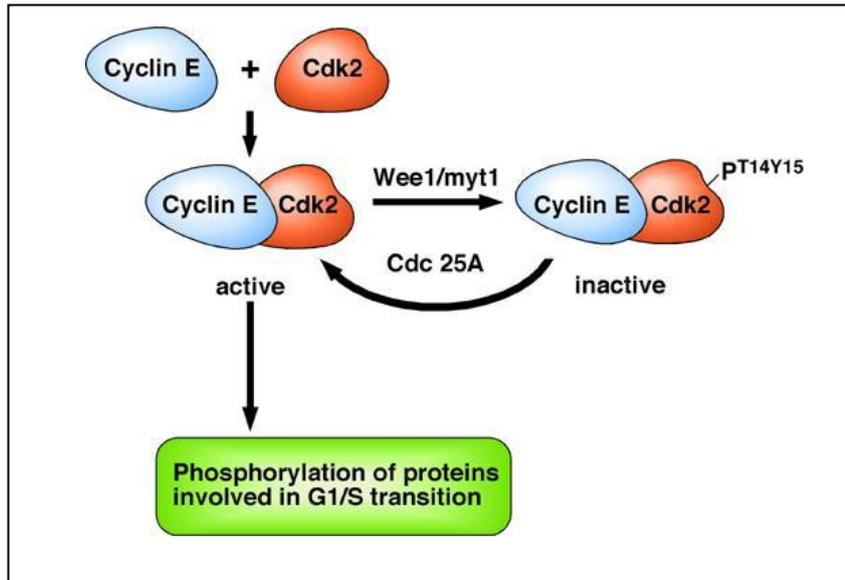
Initialement, le site catalytique de l'ATP est inaccessible car l'entrée est bloquée par la boucle T, cette dernière est à l'origine d'un encombrement stérique. La liaison de la cycline avec la protéine kinase provoque un déplacement partiel de la boucle T.

Le taux de cycline est finement régulé, en effet la transcription des gènes codant ces cyclines va se faire à des moments bien précis du cycle cellulaire. Ils vont ainsi activer les CDKs qui contrôlent ce cycle. Les cyclines possèdent également des séquences particulières permettant leur dégradation. La succession expression/dégradation des cyclines va permettre la transition d'une phase à une autre.

Cependant il faut noter, que la liaison de la cycline ne permet qu'une activation partielle des CDKs. L'activation complète des complexes cyclines/CDKs passe par les réactions de phosphorylation et de déphosphorylation.

En effet la présence de groupements phosphate au niveau de certains acides aminés peut être responsable de l'activation ou de l'inhibition du complexe cycline/CDK<sup>4</sup>.

La réaction de phosphorylation est catalysée par des protéines kinases : WEE 1 et MYT1 (Schéma 4). Il existe par ailleurs des phosphatases qui peuvent lever l'inhibition liée à l'action de WEE1 et MYT 1 : les phosphatases Cdc 25 A, B, C<sup>3,5</sup>.



**Schéma 4 : Inhibition par la kinase Wee de CDK2**

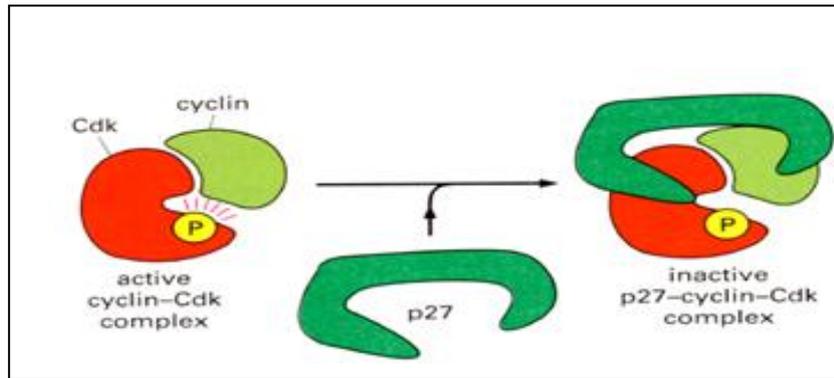
Enfin, un dernier système de contrôle de l'activité des complexes Cycline/CDK fait intervenir des inhibiteurs protéiques de CDKs ou CDKIs (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor). Ces CDKIs sont classés en deux familles en fonction de leur structure, de leur spécificité et leur mode d'action<sup>6</sup>.

- Famille INK (p16, p15, p18 et p19) : Ils inhibent la formation de complexe CDK4/6 et cycline D.

Les inhibiteurs de cette famille vont former un complexe binaire en se liant aux protéines kinases dépendantes de cyclines. La liaison aux CDKs se fait du côté opposé au site de fixation de la cycline, provoquant ainsi une modification du site de fixation de l'ATP et de la cycline.

- Famille CIP/KIP (p27, p57 et p21) : Ils inhibent les complexes CDK2, CDK4/6 associés à leurs cyclines et retardent le passage de la phase G1 à la phase S.

Les inhibiteurs de cette famille agissent en formant un complexe ternaire Cycline-CDK-CDKI (Schéma 5). La liaison au complexe Cycline-CDK provoque une réorganisation du lobe amino-terminal et une modification du site de fixation de l'ATP. L'inhibiteur possède également une hélice  $\alpha$  qui va se placer au niveau du site catalytique empêchant ainsi la fixation de l'ATP.



*Shéma 5 : Inactivation des CDKs par interaction avec CDKI (CIP/INK)*

#### **4. Principales pathologies dans lesquelles les CDKs sont des cibles potentielles pour des inhibiteurs.**

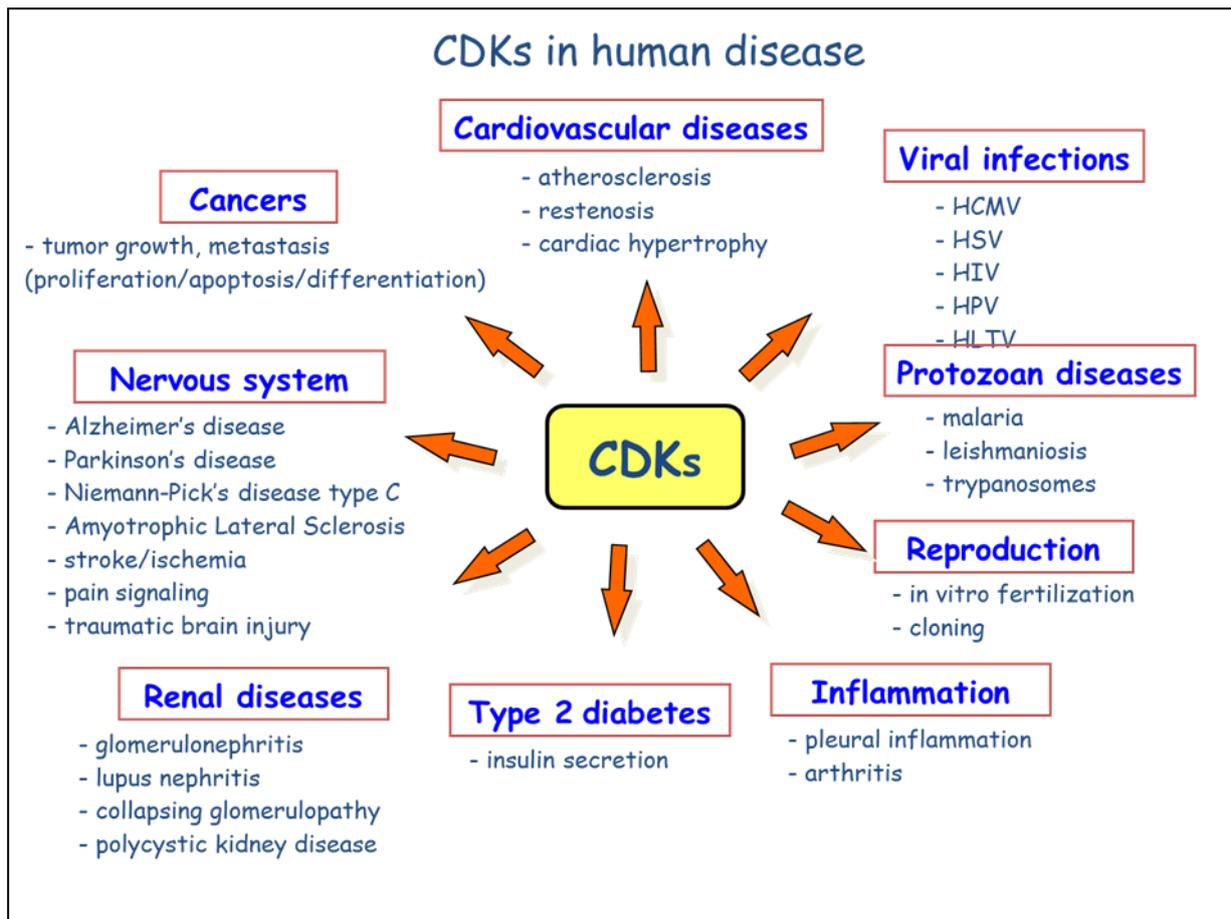
D'une manière générale, tous les événements physiologiques sont régulés par phosphorylation. La plupart des pathologies sont associées à une phosphorylation anormale.

Le dérèglement du fonctionnement des CDKs va être impliqué dans de nombreuses pathologies.

Initialement, les inhibiteurs de CDKs ont été mis au point et caractérisés pour leurs applications potentielles en cancérologie. Leurs effets sur le cycle cellulaire et sur le déclenchement de l'apoptose sont deux propriétés très favorables à leur développement en tant qu'agents anticancéreux. A l'heure actuelle, plusieurs inhibiteurs de CDKs sont en phase clinique pour de telles applications.

La découverte progressive de l'implication des CDKs dans d'autres domaines que le contrôle du cycle cellulaire a considérablement élargi le champ d'applications potentielles de ces composés. Les inhibiteurs de CDKs ont des applications dans le domaine des maladies neurodégénératives, des infections par des virus ou par des parasites unicellulaires, dans certaines maladies rénales ou encore dans le domaine cardiovasculaire.

Le schéma 6 regroupe l'essentiel des pathologies pour lesquelles le rapport avec les CDKs a été établi.



*Schéma 6: CDKs dans les maladies humaines*

## 5. Les inhibiteurs de CDKs

### 5.1. Les structures des CDKI décrites dans la littérature

Depuis une vingtaine d'année, les CDKI font l'objet d'intenses recherches. Ces travaux sont d'abord motivés par les très nombreuses pathologies dans lesquelles les CDKs sont dérégulées.

Les résultats favorables décrits dans des études précliniques et cliniques des deux inhibiteurs de CDKs les plus avancés : le Flavopiridol <sup>7</sup> et la Roscovitine <sup>8</sup> (Schéma 7) renforcent l'intérêt pour de nouveaux inhibiteurs tout en encourageant les études dédiées aux mécanismes d'action de ces produits et notamment à l'identification de leurs cibles moléculaires. Toutefois, on a remarqué que le nombre de brevets qui portent sur les CDKI décroît d'une année à une autre, comme le montre le tableau ci-dessous<sup>9</sup>. Cela est du

probablement à la phase de crise qui touche la recherche scientifiques, d'ailleurs nombreux géants pharmaceutiques n'investissent plus dans la recherche et préfèrent miser sur des molécules prometteuses déjà développées.

**Tableau 1 : Nombre de brevets portants sur les CDK entre 2005 et 2012<sup>9</sup>**

2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
191	150	174	151	125	142	99	60 <sup>¥</sup>

<sup>¥</sup> : janvier- septembre

Nous nous sommes intéressés aux inhibiteurs de CDK décrits récemment. Pour cela nous avons consultés les différents brevets publiés entre 2009 et 2013<sup>10</sup>, ainsi que les essais cliniques en cours d'étude qui évaluent les CDKI. Nous avons effectué notre recherche respectivement sur les sites internet suivants: <http://worldwide.espacenet.com>, <http://clinicaltrials.gov>, <http://www.medkoo.com/anticancer-trials.htm> et Pharmaprojects database.

Les structures de ces molécules diffèrent considérablement les unes des autres et malgré leur diversité chimique, ces molécules sont toutes des inhibiteurs compétitifs de l'ATP. Les résultats seront présentés en quatre schémas :

- Les molécules en cours d'essai clinique (Schéma 7).
- Les molécules sortantes des essais cliniques (Schéma 8).
- Les nouvelles structures dérivées de la Roscovitine (Schéma 9).
- Les nouvelles structures non dérivées de la Roscovitine (Schéma 10).

#### **5.1.1.5.1.1. Molécules en cours d'essais cliniques**

Le schéma 7 explore les CDKI en cours d'études cliniques, ce sont les molécules les plus avancées, elles sont en phase I, II et même III. Il s'agit d'évaluer leur tolérance et l'absence d'effets indésirables chez des patients atteints de pathologie cancéreuse avancée, métastatique ou en rechute.

Ces études permettent également d'étudier le métabolisme et la pharmacocinétique. Les études de pharmacocinétique fournissent des informations clefs pour la sécurité des essais cliniques en phase I et la prédiction d'une dose clinique efficace.

Une molécule semble être prometteuse et laisse espérer voir prochainement un CDKI commercialisé, c'est la dinaciclib ou la SCH727965, qui est actuellement en phase III comparative par rapport à un traitement de référence des LLC<sup>10</sup>.

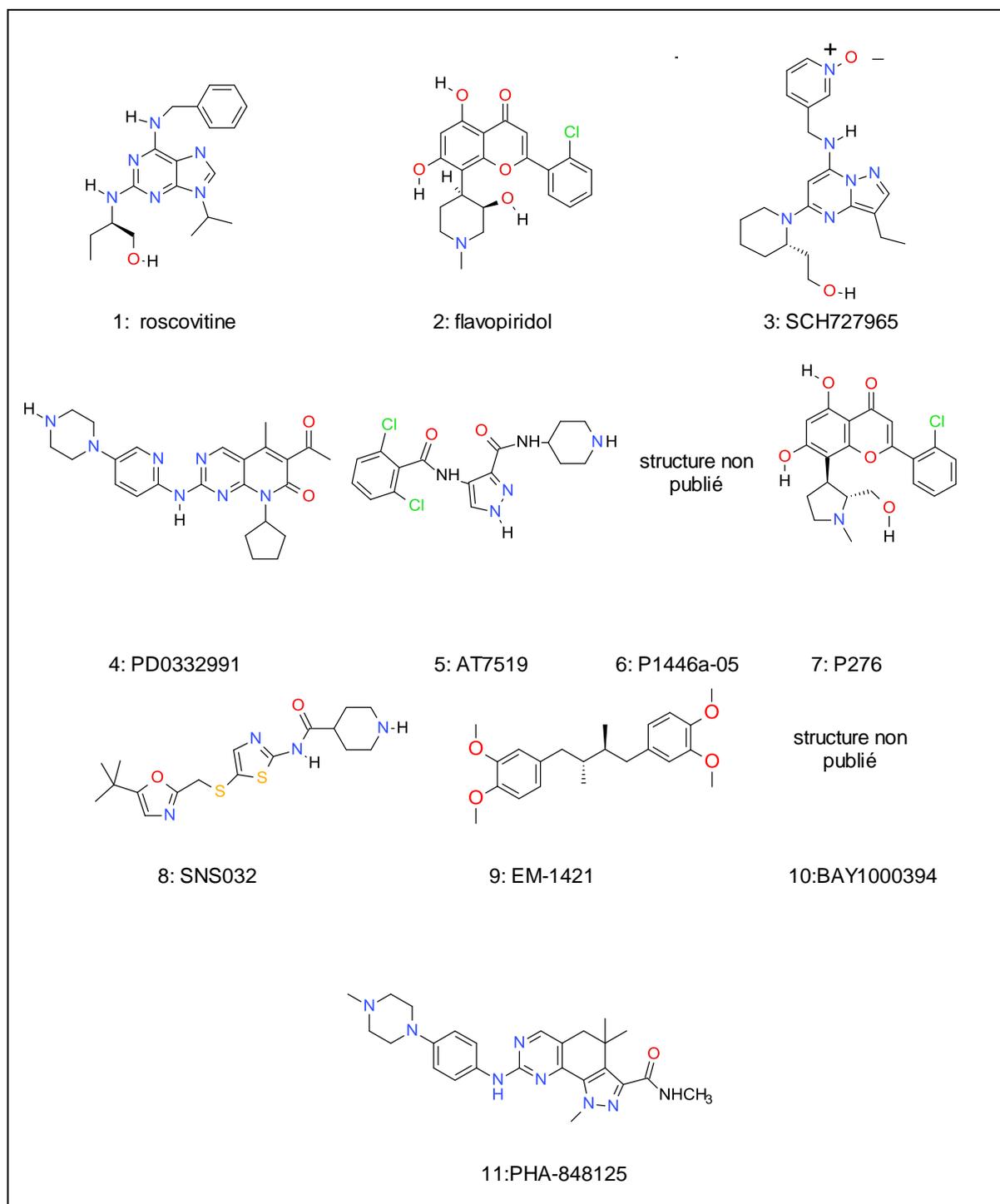
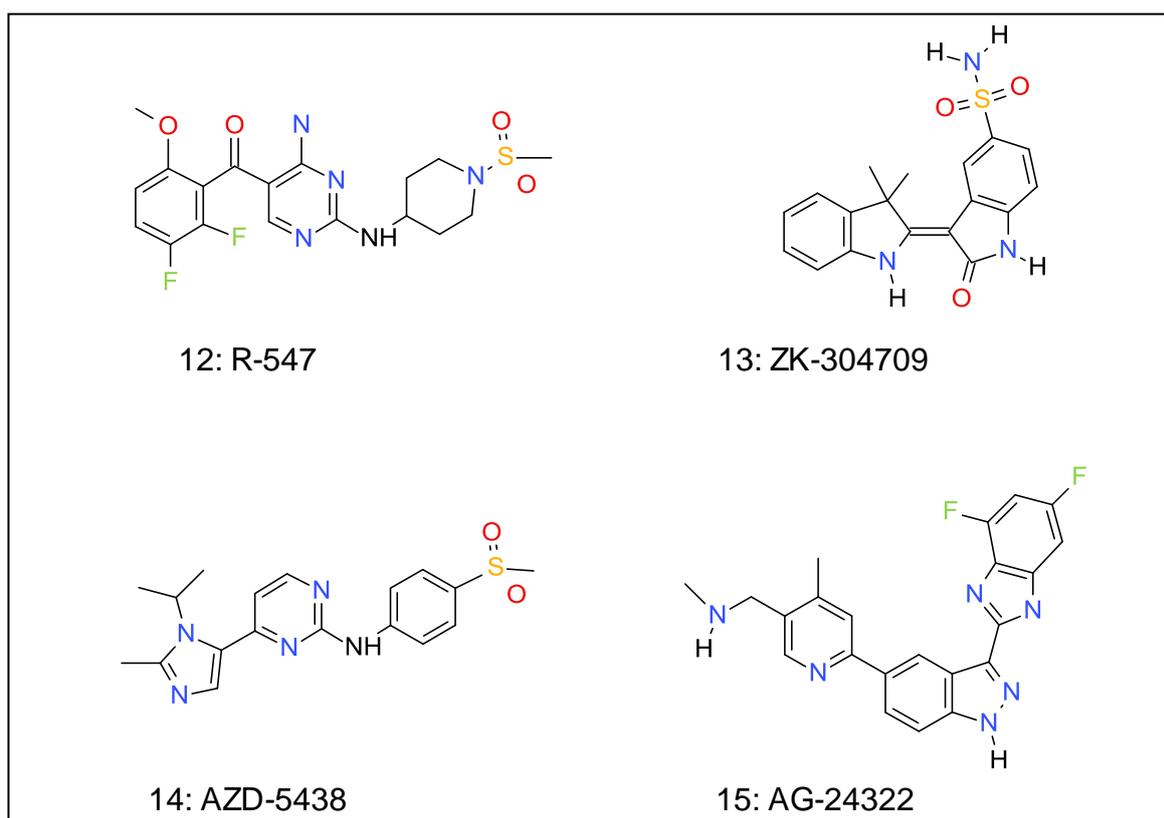


Schéma N°7 : Molécules en cours d'études cliniques<sup>10</sup>

### 5.1.2. Molécules sortantes des essais cliniques

La base de données Pharmaprojects, ainsi que la revue « Expert Opinion on Investigational Drugs » font le point tous les ans et discutent les molécules retirées des essais cliniques. Ces inhibiteurs de CDK suivants (Schéma 8): R-547, ZK-304709, AZD-5438, AG-24322 ne font plus partie des investigations cliniques<sup>11</sup>.

Parmi les causes d'abandon de ces molécules est une mauvaise tolérance et une toxicité importante. A titre d'exemple le CDKI d'AstraZeneca l'AZD-5438, dont le programme d'étude clinique phase I n'a pas réussi à établir un profil bénéfice-risque approprié. Par la suite, son développement clinique a été interrompu. Les données pharmacocinétiques et pharmacodynamiques disponibles, ont conduit AstraZeneca de prendre la décision d'arrêter prématurément toutes les études cliniques de ce dernier<sup>12</sup>.



*Schéma 8 : Molécules sortantes des études cliniques<sup>10</sup>*

### 5.1.3. Les nouvelles structures dérivées ou non de la (R)- roscovitine

Les schémas 9 et 10 décrivent les structures publiées récemment. Certaines structures sont dérivées de la roscovitine (Schéma 9), les changements sont fait soit en position 2 et 6, soit le noyau purine est remplacé par un noyau pyrazolo-pyrimidine ou imidazo-pyridine.

Chaque molécule constitue une « tête de file » à partir de laquelle de nouveaux dérivés sont obtenus par synthèse chimique classique ou combinatoire. Des produits plus actifs, plus sélectifs ou plus stables dans la cellule sont ainsi mis au point par des études structure/activité et par modélisation moléculaire basée sur la structure cristalline des complexes CDK/inhibiteur.

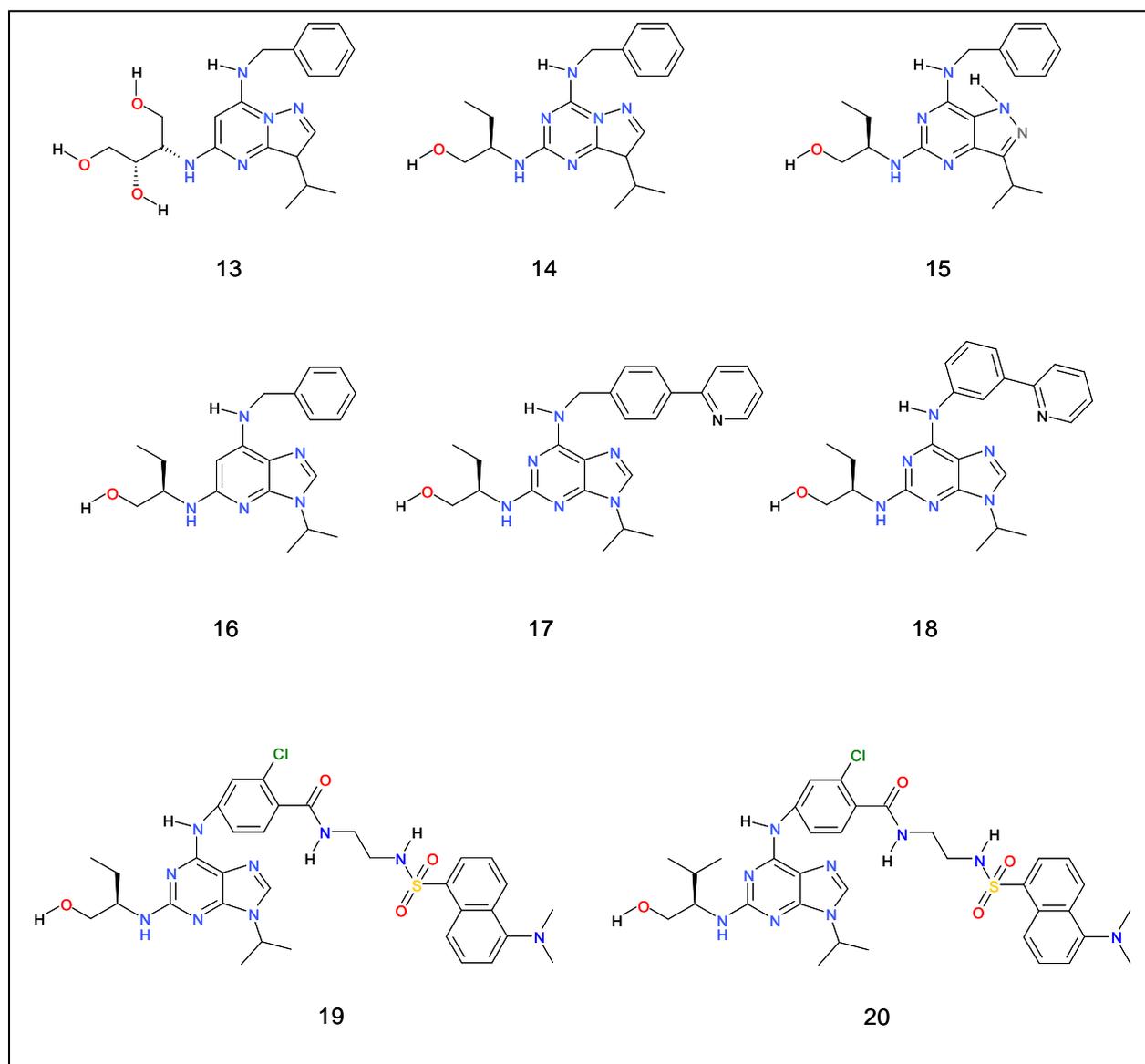


Schéma 9 : Nouvelles structures dérivées de la Roscovitine<sup>10</sup>

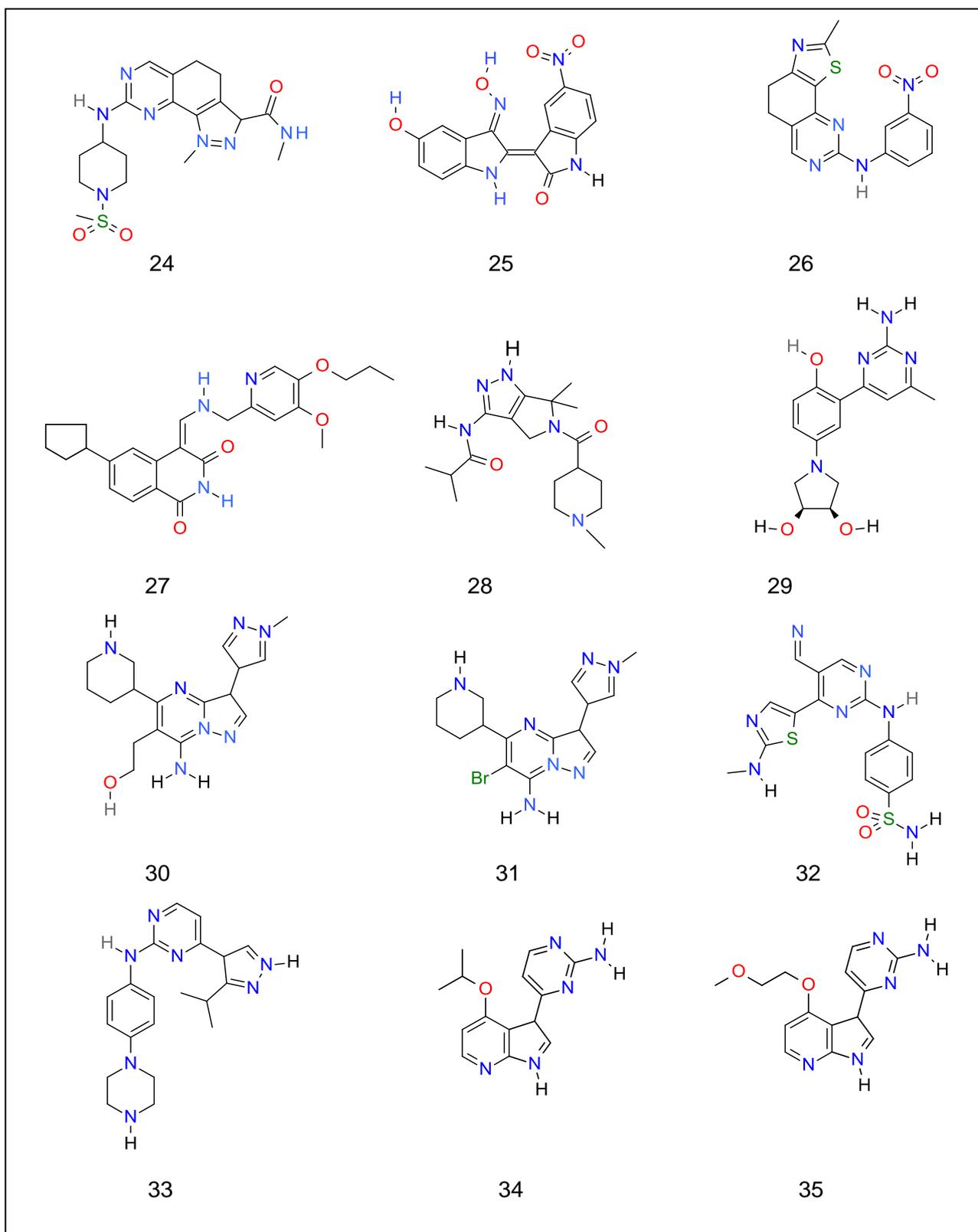


Schéma 10 : Autres nouvelles structures<sup>10</sup>

## 5.2. Cibles et sélectivité des CDKIs

La sélectivité d'un composé mesure sa capacité à inhiber d'autres kinases en plus de sa kinase cible, elle est mesurée en testant le composé sur un panel de kinases purifiées. Un composé est dit non sélectif s'il inhibe un grand nombre de kinases sans montrer de préférence particulière pour une famille plutôt qu'une autre. En revanche, un composé est dit sélectif s'il est capable d'inhiber plus efficacement une famille de kinases plutôt qu'une autre ou même au sein d'une famille, un membre plutôt qu'un autre.

En défilant la littérature, on a noté un grand nombre de publications qui portent sur les inhibiteurs de CDKs. Nous avons sélectionnés une trentaine d'inhibiteurs de CDK parmi les molécules les plus actives *in vitro*. Le tableau 2 résume les principales CDK cibles et leurs IC<sub>50</sub>, ainsi que l'activité cellulaire.

Après une analyse bibliographique approfondie, nous avons constaté que ces inhibiteurs sont sélectifs *vis-à-vis* des CDKs mais aucun d'entre eux n'est sélectif pour une seule CDK, A l'heure actuelle, aucun inhibiteur sélectif pour une seule CDK n'a été identifié.

La roscovitine et le flavopiridol sont les deux molécules les plus anciennes et les plus décrites dans la littérature, elles sont considérées comme inhibiteurs de référence.

### 5.2.1. La (R)-Roscovitine (Seliciclib, CYC202)

En travaillant sur la division cellulaire à partir d'embryons d'oursins, la roscovitine a été identifiée en 1997. Elle est l'un des produits pionniers qui a été largement étudié, elle a fait l'objet de plus de 1500 publications<sup>13, 14</sup>.

La R-roscovitine inhibe différentes CDKs telles que la CDK1, CDK2, CDK5, CDK7 et CDK9 avec une sélectivité pour CDK4 et CDK5<sup>15</sup>. En conséquence, la R-roscovitine bloque la prolifération des cellules tumorales dans presque toutes les phases du cycle cellulaire. Ceci a été démontré chez plus de 60 lignées cellulaires tumorales humaines (par exemple, le mélanome, du poumon, du sein, du côlon, de leucémie).

Les effets antiprolifératifs et pro-apoptotiques de la Roscovitine ont ouvert une nouvelle voie pour le traitement du cancer. De plus, ils ont permis d'étudier ses effets anti tumoraux.

La Roscovitine a montré une cytotoxicité prometteuse dans les lignées cellulaires et les xénogreffes tumorales. Jusqu'à présent aucune lignée cellulaire résistante à la Roscovitine n'a été rapportée. Elle a une activité cellulaire *in vitro* sur la ligné cellulaire SH-SY5Y avec une IC<sub>50</sub> de l'ordre de 16,1 µM. D'autres effets ont été décrit *in vivo*, tels que l'interruption de la transcription, l'induction de la phosphorylation et l'apoptose par p53<sup>8,16</sup>.

### **5.2.2. Le Flavopiridol (Alvociclib)**

Le Flavopiridol est une molécule cytotoxique, inhibitrice des CDKs 1, 2, 4, 6, 7 et 9. Le flavopiridol a une bonne affinité pour les CDKs du cycle cellulaire, il favorise l'arrêt du cycle cellulaire à des concentrations nanomolaires. Il cible plusieurs CDKs avec des IC<sub>50</sub> inférieure à 100 nM. Son activité cellulaire a été évaluée sur les cellules du carcinome de l'ovaire A2780 et du colon HTC116 avec des IC<sub>50</sub> respectives de 0,015 et 0,013.

Le Flavopiridol inhibe la progression du cycle cellulaire en induisant l'arrêt au point de contrôle, en interrompant l'allongement de la transcription et en déclenchant l'apoptose sélective de l'ADN endommagé par les cellules tumorales<sup>17</sup>.

### **5.2.3. Le Dinaciclib (SCH727965)**

Le Dinaciclib SCH 727965, un nouveau médicament en développement, est actuellement en phase III des essais cliniques<sup>18</sup>. Il inhibe puissamment et sélectivement les CDK 1, 2, 5 et 9 avec une IC<sub>50</sub> de 1 nM, 1 nM, 3 nM et 4 nM, respectivement<sup>19</sup>. Son activité anti-tumorale intervient dans plusieurs lignées cellulaires tumorales : lignées myéloïdes et lymphoïdes de cellules leucémiques *in vitro* et xénogreffes de tumeurs humaines *in vivo*.

L'activité cellulaire sur la ligné A2780 est supérieure à celle du flavopiridole, elle est quatre fois plus puissante avec une IC<sub>50</sub> de l'ordre de 4 nM.

### **5.2.4. Le SNS-032**

Dans le cycle cellulaire, les phases sont régulées par les CDKs. Ainsi, la CDK2 intervient dans le contrôle d'entrée du cycle cellulaire et dans la progression en phase S. D'autres CDKs sont associés au contrôle de la transcription. En particulier, les CDK7 et CDK9 ont un rôle important dans les étapes d'initiation et d'élongation de la transcription<sup>20</sup>.

SNS-032, anciennement connu sous le nom BMS-387032, est une petite molécule synthétique inhibitrice de CDK. Elle est actuellement en phase II des essais cliniques pour le traitement

des hémopathies malignes (LLC avancée, MM). Les études précliniques ont montré que SNS-032, est un inhibiteur hautement sélectif et puissant vis-à-vis des CDK 2, 7 et 9 avec une IC<sub>50</sub> de 38 nM, 62 nM et 4 nM, respectivement.<sup>21,22</sup>

Ce composé présente une puissante cytotoxicité *in vitro* sur des lignées cellulaires cancéreuses. Il induit un arrêt du cycle cellulaire par inhibition de la synthèse d'ARN ce qui conduit sélectivement à l'apoptose des lignées cellulaires tumorale quel que soit le pronostic engagé et les antécédents thérapeutiques. De plus, son activité *in vivo* est confirmée dans la leucémie humaine<sup>20</sup>.

### **5.2.5. Le PD0332991 (Palbociclib)**

Le pyrido[2,3-*d*]pyrimidine PD 0332991 est un inhibiteur sélectif de CDK4 et 6 avec une IC<sub>50</sub> de 11 nM et 16 nM<sup>19</sup>, respectivement.

L'inhibition de la progression tumorale a été évaluée *in vivo* ainsi qu'*in vitro* sur des souris xénotreffées<sup>23</sup>.

Le PD 0332991 a un puissant effet antiprolifératif *in vitro*, les différentes études ont montré que son effet antiprolifératif résulte du blocage de la phase G1 par la protéine *Rb* suite à l'inhibition de CDK4 et CDK6.

En effet, puisque au cours du cycle cellulaire, les complexes CDK4/cycline D et CDK6 / cycline D phosphorylent et inactivent la protéine *Rb* ce qui permet la libération des facteurs de transcriptions E2F et DP1 contrôlant l'expression de gènes nécessaires pour la transition G1/S et pour la progression de la phase S (synthèse des cyclines A et E).

Le PD 0332991 n'induit pas d'apoptose, puisque il n'agit pas sur les LLC dans lesquelles l'apoptose est principalement altérée<sup>24</sup>. L'action du PD 0332991 a été observée sur les lymphomes, myélomes, sarcomes et les carcinomes du sein, poumons et colons exprimant le gène *Rb* sauvage. En effet, il n'a pas d'activité contre les lignées cellulaires rétinoblastome négatif (*Rb*<sup>-</sup>). Ainsi, PD0332991 réduit de manière significative la croissance de la tumeur et conduit, *in vivo*, à une régression tumorale dans différents modèles de xénotreffes humains *Rb*<sup>+</sup>, et est sans activité sur les tumeurs *Rb*<sup>-</sup>.

### **5.2.6. L'AT7519**

L'AT7519 est un puissant agent antitumoral, il inhibe le complexe CDK2/ cycline E avec une  $IC_{50}$  de 44 nM<sup>25</sup>, ainsi que d'autres CDKs: CDK1 (220 nM), CDK2 (44 nM), CDK4 (67 nM), CDK5 (11 nM) et CDK9 (<100 nM)<sup>26</sup>. Il est inactif sur les kinases non cycline dépendante à l'exception de la GSK-3 $\beta$  avec une  $IC_{50}$  de 89 nM. Actuellement, l'AT7519 est en phase I/II des essais cliniques.

Il a montré une puissante activité antiproliférative sur un panel de lignées cellulaires tumorales humaines. Dans ces lignées, l'AT7519 inhibe plus particulièrement les CDK1 et CDK2, Il est responsable de l'arrêt du cycle cellulaire, l'inhibition de la croissance et l'apoptose de plusieurs tumeurs solides<sup>27, 28</sup>. *In vivo*, Il inhibe la croissance tumorale dans des modèles de xénogreffes de tumeurs humaines. En effet, une régression tumorale est observée dans des modèles de xénogreffe de cancer du côlon<sup>29</sup>.

### **5.2.7. Le P276-00**

C'est un nouvel inhibiteur de CDK1, CDK4 et CDK9 avec  $IC_{50}$  respectivement de l'ordre de 79 nM, 63 nM et 20 nM<sup>30</sup>. Il démontre une activité antitumorale et proapoptotique *in vitro* sur différentes lignés cancéreuse humaines, tels que le carcinome du sein, du colon et du poumon<sup>31</sup>.

### **5.2.8. Le BAY 1000394**

Il cible CDK1, CDK2 et CDK4 avec une forte affinité ( $IC_{50} < 11$  nM)<sup>32</sup>. L'inhibition de la prolifération cellulaire est indépendante de Rb et p53 et la suppression de la phosphorylation de Rb et l'inhibition de la croissance après traitement avec BAY 1000394 a été observée dans les études précliniques dans un large éventail de xénogreffes de tumeurs.

### **5.2.9. Le PHA-848125**

Le PHA-848125 est un puissant inhibiteur de CDK ( $IC_{50} < 400$  nM)<sup>33</sup>. Il a été testé sur 43 autres sérine-thréonine kinases et tyrosine kinase, seulement le TRKA « tropomyosin récepteur kinase A » (liée à la survie des cellules cancéreuses) a été inhibée. *In vivo* le PHA-848125 est actif par voie orale sur les cellules A2780 du carcinome ovarien humain xénogreffé sur des souris. Une inhibition significative de la croissance tumorale a également

été observée pour l'adénocarcinome de poumon K-Ras muté dans un modèle de souris transgéniques<sup>35</sup>.

### 5.2.10. Le P1446A-05

Il est décrit dans les essais cliniques, mais la structure chimique n'a pas été publiée. Aucune donnée concernant l'activité *in vitro*, *in vivo* ainsi que le mécanisme d'action n'ont été divulguées.

### 5.2.11. Nouvelles structures

Plusieurs nouvelles structures ont été décrites dans la littérature, ces molécules récentes sont de puissants inhibiteurs *in vitro* de CDK, les IC<sub>50</sub> peuvent être égales ou inférieures à 3 nM telles que les molécules 16, 24, 25, 34 et 35. Elles sont plus puissantes que la roscovitine et le flavopiridol, mais on ne dispose pas de données *in vivo*. Une forte inhibition *in vitro* n'est pas toujours synonyme d'une meilleure action *in vivo*, car on peut observer une toxicité qui limite l'utilisation. Un autre critère déterminant, est la sélectivité de la molécule. Cette notion de spécificité ou de sélectivité en biologie cellulaire est très importante car elle va de pair avec la notion d'effets secondaires en thérapeutique. On doit pouvoir utiliser une molécule inhibitrice de CDKs agissant de façon très spécifique sur un type de CDK et ainsi n'affectant aucunement le bon fonctionnement cellulaire et donc n'engendrant aucun effet secondaire.

**Tableau 2 : Cibles des CDKIs**

Molécule	Test sur CDK (IC <sub>50</sub> μM)	Test sur Cellule (IC <sub>50</sub> μM)
Roscovitine <sup>35, 36</sup>	CDK1:0,33 CDK2/ E: 0,17 CDK4:0,1 CDK5:0,27 CDK9: 0,23	SH-SY5Y: 17,1 MCF-7: 7,8
Flavopiridol <sup>37, 38</sup>	CDK1:0,03 CDK2/ E: 0,1 CDK4:0,1 CDK6:0,06 CDK9: 0,003	A2780 : 0.015 HTC116 : 0.013
SCH727965 <sup>39, 37</sup>	CDK1: 0.001 CDK2: 0.001 CDK5: 0.003 CDK9: 0.004	A2780 :0.004
PD0332991 <sup>12, 40</sup>	CDK4: 0.011 CDK6: 0.015	MCF-7 : 0.148

<u>AT7519</u>	CDK1:0,18 CDK2/ E: 0,044 CDK4:0,067 CDK5:0,011 CDK9: <0,1	A2780 :0.35 MCF7 : 0.04
<u>P276-00</u> <sup>41</sup>	CDK1: 0,079 CDK4: 0,063 CDK9: 0,02	HTC 116 : 0.12 (µg/mL) MCF7 : 0.14(µg/mL)
<u>SNS032</u> <sup>31</sup>	CDK1:0,48 CDK2: 0,038 CDK4: 0,925 Cdk7 : 0,062 Cdk9 :0,004	A2780 : 0.095
<u>BA1000394</u> <sup>42</sup>	CDK1:0,007 CDK2: 0,009 CDK4: 0,011	-
<u>PHA-848125</u>	CDK1:0,398 CDK2/A: 0,045 CDK4:0,16 CDK5: 0,265	MSTO- 211H: 0.23±0.10 NCI-H2052: 0.74 ± 0.37
<u>16</u> <sup>43</sup>	CDK1:0,033 CDK2:0,003 CDK5:0,03 CDK9: 0,09	MCF-7: 0,3 HepG2: 1
<u>17</u> <sup>44</sup>	CDK1:0,073 CDK2:0,04 CDK5:0,07 CDK7:0,5 CDK9: 0,043	SH-SY5Y: 2,7 HEK293:7,6
<u>18</u> <sup>35, 45</sup>	CDK2: 0,04 CDK9: 1	MCF-7: 7,5 U266: 4,9 RPMI-8226: 3,
<u>19</u> <sup>46</sup>	CDK1:0,35 CDK5:0,2 CDK7:0,9	SH-SY5Y: 16,2 HEK293: 35,6
<u>20</u> <sup>47</sup>	CDK1:0,0.13 CDK5:0,13	SH-SY5Y: 0,43 HEK293: 0,56
<u>21</u> <sup>48</sup>	CDK5:0,08 CK1:0,014	SH-SY5Y: 0,43
<u>22</u> <sup>26</sup>	CDK1:16 (inhibition à 0.1 µm)	MDA: 4,86 MCF-7: 19,05
<u>23</u> <sup>49</sup>	CDK1:35 (inhibition à 0.1 µm)	MDA: 4,06 MCF-7: 10,03

<b>Molecule</b>	<b>CDK IC50 <math>\mu\text{m}</math></b>	<b>cell (IC50 <math>\mu\text{M}</math>)</b>
<u>24</u> <sup>28</sup>	(CDK2/CyA)=0,002	A2780: 0,388
<u>25</u> <sup>50</sup>	CDK2:0.0019	MCF-7: 1.21 HT1080: 0.45 HCT116: 0.44 K562: 0.91
<u>26</u> <sup>51</sup>	CDK2: 0.023	MCF-7: 1.7 HT29: 1,4 A549: 0,69
<u>27</u> <sup>52</sup>	CDK4: <0.005	HCT116: 0.15 MCF-7: 0.3
<u>28</u> <sup>53</sup>	CDK2/A: 0.008 CDK5/ p25: 0.005	A2780: 0.088 HCT-116: 0.163 COLO-205: 0.188 MCF-7: 1.287
<u>29</u> <sup>54</sup>	CDK1: 0.02 CDK2: 0.042	HCT116: 0,4 A549: 2
<u>30</u> <sup>55</sup>	CDK 2 : 0.048	Pas de test cellulaire
<u>31</u> <sup>55</sup>	CDK 2 : 0.16	Pas de test cellulaire
<u>32</u> <sup>56</sup>	CDK 9: 0.006 (Ki)	HCT-116 : 436 (GI50 nmol) MCF-7 : 483(GI50 nmol)
<u>33</u> <sup>57</sup>	CDK4: <0.005 CDK1: 0.071 CDK2: 0.04	Pas de test cellulaire
<u>34</u> <sup>58</sup>	CDK1:0,007 CDK2:0,003 CDK5:0,003 CDK9: 0,0056	SH-SY5Y: 0,026 HEK293: 0,085
<u>35</u> <sup>59</sup>	CDK1:0,008 CDK2:0,005 CDK5:0,003 CDK9: 0,0056	SH-SY5Y: 0,038 HEK293: 0,089

## 5.3. Les CDKI et essais cliniques

### 5.3.1. Les essais cliniques

Selon l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM), un essai clinique est une recherche biomédicale organisée et pratiquée sur l'Homme en vue du développement des connaissances biologiques ou médicales. Les essais cliniques portant sur les médicaments ont pour objectif, d'établir ou de vérifier certaines données pharmacocinétiques (modalités de l'absorption, de la distribution, du métabolisme et de l'excrétion du médicament), pharmacodynamiques (mécanisme d'action du médicament notamment) et thérapeutiques (efficacité et tolérance) d'un nouveau médicament ou d'une nouvelle façon d'utiliser un traitement connu <sup>60</sup>.

Le concept des essais cliniques est assez ancien, il a été introduit par le médecin Avicenne en 1025 après J.C. dans son ouvrage encyclopédique de médecine médiévale « كتب القانون في الطب » (livre des lois médicales). Dans cet ouvrage Avicenne établit d'ores et déjà les règles de l'expérimentation des médicaments, incluant un guide précis pour la pratique expérimentale dans le but de découvrir et de prouver l'efficacité des médicaments et des substances <sup>61</sup>.

En France, l'essai doit avoir obtenu un avis favorable du Comité de protection des personnes et une autorisation de l'ANSM.

Pendant toute la durée de l'essai, l'ANSM est tenue informée des effets indésirables graves et inattendus pouvant être liés au médicament expérimental et de tout fait nouveau lié à la recherche susceptible de remettre en cause la sécurité des personnes se prêtant à la recherche, elle peut prendre toute décision concernant ces essais (suspension, interdiction).

L'objectif, les conditions de réalisation et de déroulement de l'essai, les modalités d'inclusion, d'information, de traitement et de surveillance des personnes participant à l'essai par les médecins investigateurs et les procédures de recueil des informations sur l'efficacité et la tolérance des médicaments sont notamment définis dans un protocole préétabli <sup>60</sup>.

### 5.3.2. CDKI en essai clinique

Les CDKIs ciblent essentiellement les enzymes clés du cycle cellulaire (CDK1, CDK2, CDK4 et CDK6). Plusieurs articles de revue ont décrit le développement et l'évaluation des CDKIs<sup>62,63, 64</sup>. Une vingtaine de CDKIs ont atteint l'étape d'essai Clinique, certaines études étaient arrêté ou interrompu en phase I, par exemple AG-24322, AZD-5438, R547, et ZK 304709<sup>10,37</sup> (schéma 8).

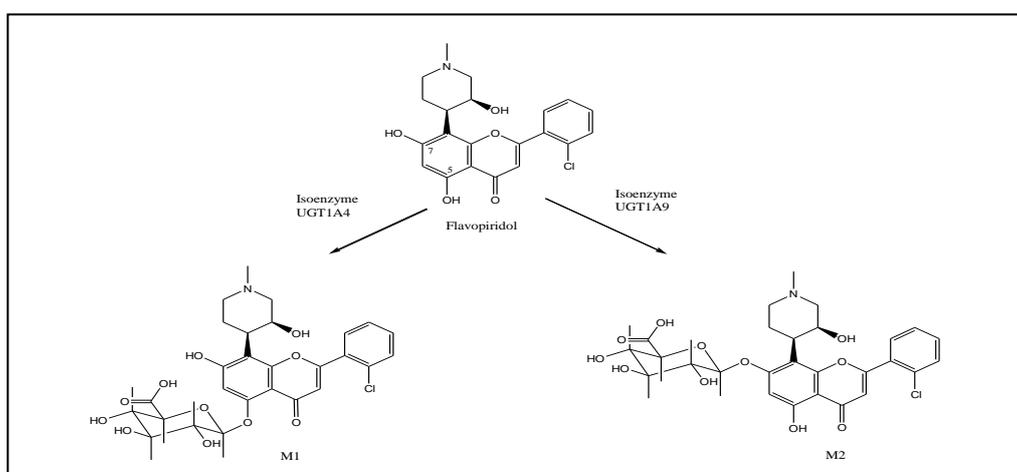
Nous allons nous attarder sur onze produits prometteurs actuellement en essai clinique, représentés dans le schéma 7 précité.

#### 5.3.2.1. Le Flavopiridol

Le Flavopiridol est testé en essais cliniques dès le début des années 90<sup>65</sup>. Il a été largement étudié en monothérapie chez les patients avec un néoplasme réfractaire, mais ces essais cliniques ont montré une activité antitumorale insatisfaisante<sup>65, 66, 67,68</sup>.

Par contre, ces essais ont permis de collecter les données pharmacocinétiques nécessaires pour ajuster le schéma de traitement.

Le Flavopiridol a une forte liaison aux protéines plasmatiques (94%). Il est métabolisé principalement au niveau du foie, *via* la glucurono-conjugaison par les enzymes uridine diphospho-glucuronosyltransférases (UGTs). Ainsi, le Flavopiridol est conjugué majoritairement en position 7-hydroxyl (98.5%) et minoritairement en position 5-hydroxyl (1.5%). L'isoenzyme UGT1A9 est le principal UGT responsable de la formation du métabolite majeur flavopiridol-7-G (M2) alors que l'UGT1A4 catalyse la formation du flavopiridol-5-G (M1)<sup>69</sup>.



**Schéma 11 : Métabolisme du flavopiridol par les enzymes UDP-glucuronosyltransférases (UGTs) humains<sup>69</sup>**

Des résultats encourageants ont été obtenus avec des hémopathies malignes. Lors d'un essai clinique de phase I chez des patients atteints de leucémie lymphoïde chronique, l'utilisation hebdomadaire du flavopiridol en monothérapie pendant 6 semaines a montré une survie moyenne sans progression qui atteint les 12 mois<sup>70</sup>. On a même observé plusieurs rémissions complètes pour la leucémie myéloïde aiguë avec une thérapie séquentielle utilisant la flavopiridol suivie de cytarabine et mitoxantrone<sup>71</sup>.

En regardant les essais cliniques récents, on a relevé plusieurs essais en cours avec le flavopiridol (tableau 3). On ne peut que constater un regain d'intérêt pour cette molécule malgré que les premiers essais cliniques ne fussent pas concluants.

Ces essais en cours, portent aussi bien sur les tumeurs solides que les hémopathies malignes, le flavopiridol est utilisé soit en monothérapie soit en association avec la chimiothérapie conventionnelle (cisplatine, gemcitabine, cytarabine...) ou la thérapie ciblée (Rituximab).

Certains essais sont en cours d'évaluation, d'autres en phase de recrutement de patients et certains sont terminés et les résultats sont d'ores et déjà publiés.

Les résultats ont montré que l'utilisation de flavopiridol peut être bénéfique, en effet un traitement combiné avec la gemcitabine et l'irinotecan a permis de stabiliser différents Tumeurs solides non résecable ou métastatiques dans un essai de phase I<sup>72</sup>. Cependant, l'essai clinique de phase II ultérieur en combinaison avec le docétaxel a donné des résultats décevants et une toxicité importante chez les patients atteints d'adénocarcinome pancréatique métastatique<sup>73</sup>. Actuellement, une vingtaine d'essais sont en cours (tableau 3), ils axent sur l'évaluation des flavopiridol seul ou combiné (bortézomib, oxaliplatine, lénalidomide, cytarabine, doxorubicine...) chez les patients atteints de LLC à cellules B, lymphome, myélome multiple, les tumeurs germinales...

### **5.3.2.2. La Roscovitine**

Plusieurs essais cliniques ont été conduits, les essais de phase I et II ont porté sur différentes indications soit des tumeurs solides ou hématologiques. Les essais cliniques les plus récents ont pour indications des tumeurs solides. L'essai en association avec la doxorubicine pour le cancer de sein triple négatif métastatique est arrêté, le statut triple positif implique que les récepteurs d'œstrogène et de progestérone sont négatifs ainsi que le statut HER. Ce cancer triple négatif est de mauvais pronostic au quel on rajoute le stade métastatique de la maladie,

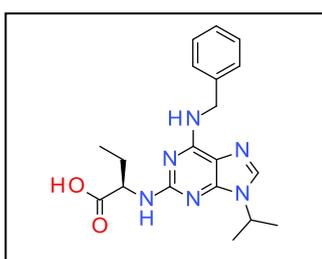
probablement le mauvais pronostic a motivé l'arrêt de cet essai. Les résultats de l'essai de phase IIb concernant le cancer de poumon non à petite cellule (NSCLC) ne sont pas encore publiés. L'activité antitumorale et les effets pharmacodynamiques de l'administration séquentielle de la R-roscovitine et la sapacitabine sont en cours d'évaluation depuis 2009 chez les patients atteints de tumeurs solides avancées.

Concernant la pharmacocinétique de la Roscovitine, deux études ont été rapportées<sup>74, 75</sup>.

Dans la première étude, la Roscovitine a été administrée par voie orale en une seule dose (50 à 800 mg) à des volontaires sains. Sa concentration ainsi que celle de son métabolite carboxylé ont été suivies dans le plasma et dans l'urine. La Roscovitine a montré une lente absorption par le tractus gastro-intestinal, mais la prise alimentaire n'a pas affecté pas la biodisponibilité du médicament. Elle a un métabolisme rapide et se lie fortement aux protéines sans les saturer.

Dans la seconde enquête, 21 patients âgés en moyenne de 62 ans ont été traités avec des doses de Roscovitine de 100, 200 et 800 mg deux fois par jour pendant 7 jours. La  $t_{1/2}$  varie entre 2 et 5 heures en fonction de la dose de Roscovitine. Une forte liaison aux protéines plasmatiques a été observée (92% à 96%).

Son métabolisme a été décrit récemment dans des études *in vitro* et *in vivo*. Ses principales enzymes de métabolisme sont CYP3A4 et le CYP2B6. Plusieurs métabolites ont été identifiés y compris le métabolite carboxylé<sup>74</sup>.



**Schéma 12 : Métabolite de la Roscovitine<sup>74</sup>**

### **5.3.3.2.3. Le P276-00**

Cette molécule est actuellement en essai clinique phase II, pour déterminer l'activité anticancéreuse chez les patients atteints de cancer de sein métastatique triple négatif et de carcinome du cou et de la tête.

Plusieurs études de phase I/II ont été réalisées pour différentes indications (mélanome malin, lymphome du manteau, le myélome multiple...). Aucun résultat n'a été publié jusqu'à présent.

#### **5.3.2.4. La SCH 727965 (Dinaciclib)**

Le promoteur de cette molécule est le laboratoire Merck, fait l'objet de plusieurs essais cliniques phase I/II/ III actifs, c'est le premier CDK qui a atteint la phase III s'essai clinique.

Comme les autres inhibiteurs de CDK déjà citées, les indications sont larges, englobent les hémopathies malignes ainsi que les tumeurs solides.

Le cancer de sein est une pathologie fréquente, dont le standard thérapeutique diffère selon le stade et le type, par conséquent, l'activité du SCH 727965 est comparée à différentes molécules tels que la capécitabine, l'épirubicine et le paclitaxel.

Concernant, les hémopathies malignes (MM, LNH, leucémie...) et le mélanome cutané

Des essais de phase I/II sont en cours afin d'évaluer l'activité du SCH 727965.

En aout 2012 une étude phase III est conduite pour démontrer la supériorité du dinaciclib par rapport à l'ofatumumab Arzerra® chez les patients atteints de LLC réfractaire à la fludarabine ou la chimioimmunothérapie. Le critère principal étant la survie sans progression<sup>10</sup>.

Le Dinaciclib est métabolisé par le CYP 3A4<sup>76</sup>, il est rapidement éliminé avec un temps de demi-vie ( $t_{1/2}$ ) de 1.04 à 3.03 heures. La dose et la durée de la perfusion sont corrélées avec le degré et la durabilité de la suppression de la prolifération des lymphocytes<sup>77</sup>.

Dans l'optique de réduire certains effets secondaires du Dinaciclib, il a été envisagé d'associer le Dinaciclib à l'Aprépitant. En effet l'Aprépitant associé à un antagoniste 5HT<sub>3</sub> et à la dexaméthasone, est indiqué pour la prévention des nausées et vomissements induits par la chimiothérapie<sup>77</sup>.

De plus, cette étude a permis d'analyser l'effet de l'Aprépitant sur la pharmacocinétique du Dinaciclib. L'Aprépitant, antagoniste des récepteurs Neurokinine-1, présente un potentiel d'interaction complexe. Il s'agit d'un substrat, inducteur et inhibiteur de CYP3A4, inducteur de CYP2C9 et potentiellement d'autres enzymes impliqués dans le métabolisme de médicaments. Il ne doit par conséquent pas être administré de façon concomitante avec d'autres substrats de CYP3A4.

Dans cette étude, le Dinaciclib est administré par perfusion IV de deux heures. L'Aprépitant est, quant à lui, administré par voie orale à une dose de 125 mg le premier jour et de 80 mg les 2 jours suivants<sup>76</sup>.

L'administration concomitante du Dinaciclib avec l'Aprépitant n'a entraîné aucun effet significatif sur la pharmacocinétique et n'a pas modifié le profil d'innocuité du Dinaciclib. Par ailleurs, cette association a permis de limiter les nausées, vomissements liés au traitement par le Dinaciclib<sup>77</sup>.

### **5.3.2.5. L'AT7519**

Un essai phase I est en cours d'évaluation de l'AT7519 en monothérapie chez les patients atteints de tumeurs solides avancés/ métastatiques ou LNH en rechute. Cette étude permettrait de déterminer les paramètres pharmacocinétiques, pharmacodynamiques et les effets indésirables.

Le profil pharmacocinétique a révélé une variation inter et intra individuelle modeste à l'exposition linéaire à des doses croissantes. Après une perfusion d'une heure, le volume de distribution de l'AT7519 est de 2 l/kg, ce qui suggère qu'il est stocké ou lié spécifiquement dans certains tissus. Quant à sa clairance plasmatique totale, elle est faible (<30% du débit sanguin hépatique). Sa demi-vie moyenne varie de 7 à 10 heures et peut atteindre au maximum un t $\frac{1}{2}$  de 25 heures<sup>26</sup>.

Les premiers résultats montrent une activité clinique de cette molécule, se traduisant par une augmentation des marqueurs de l'apoptose. Les effets indésirables rencontrés lors de cette étude sont principalement de nature gastro-intestinale. Cette molécule présente une toxicité hématologique (neutropénie, thrombocytopenie...) qui limite l'augmentation des doses<sup>26</sup>. En effet, à des doses supérieures à 34 mg/m<sup>2</sup>, une toxicité hématologique significative et une neutropénie transitoire ont été observées.

L'innocuité et le profil de tolérance favorable d'AT7519 ont été constatés chez des patients atteints de tumeurs solides réfractaires.

On a noté deux essais phase II, qui évaluent l'activité de l'AT7519 en monothérapie pour des atteintes hématologiques, lymphome du manteau et LLC.

Aussi, l'efficacité de l'AT7519 en association avec le bortezomib, est en cours d'évaluation chez les patients souffrant de MM.

### **5.3.2.6. Le PHA-848125**

Cette molécule a été évaluée dans une étude multicentrique phase I, pour déterminer l'innocuité et les paramètres pharmacocinétiques chez les patients atteints de tumeurs solides avancées / métastatique. L'administration orale de PHA-848125 a montré une bonne tolérance<sup>78, 79</sup>.

L'activité antitumorale de PHA-848125 est actuellement évaluée dans des essais cliniques de phase II chez des patients atteints d'un carcinome thymique récurrent ou métastatique précédemment traités.

### **5.3.2.7. BAY 1000394 et P1446A-05**

Ils sont en cours d'essai phase I, pour déterminer la dose tolérée, l'efficacité et les effets indésirables<sup>80</sup>.

### **5.3.2.8. Le PD 0332991 (Palbociclib)**

Une douzaines d'études cliniques phase I/II sont en cours, et le recrutement des patients est imminent. Les indications sont les suivantes: cancer avancé du poumon non à petites cellules, sein avancé, tumeurs solides réfractaires, glioblastome Rb positif récurrent, liposarcome métastatique...

L'évaluation du PD 0332991 en monothérapie ou en association avec d'autres médicaments tels que le letrozole pour le cancer de sein ou le bortezomib pour le lymphome du manteau. Une étude phase II, évalue l'association avec le bortezomib et dexaméthasone chez les patients atteints de MM, surtout que l'activité antitumorale dans un essai phase I, évaluant la même association, est encourageante<sup>81, 82</sup>.

L'étude qui évalue l'association du PD0332991 avec le létrozole, a été réalisée par PFIZER afin de déterminer le bénéfice clinique de cette association chez des femmes ménopausées atteintes du cancer du sein métastasé avec récepteurs d'œstrogènes positifs et HER2-négatif.

Les résultats de cette combinaison de PD0332991 (125 mg) et du Létrozole (2,5 mg) montrent une amélioration statistiquement significative de la médiane de survie sans progression par rapport au Létrozole seul. Les effets indésirables les plus fréquents sont une neutropénie, leucopénie et la fatigue<sup>83</sup>. Les résultats de cette étude ont été présentés au Symposium sur le cancer de San Antonio 2012, une étude de commercialisation a été prévue

pour 2013. En effet, un essai clinique phase III appelé « PENELOPEB » est enregistrée sur le site [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov), cette étude n'est pas encore ouverte aux recrutements de patients<sup>10</sup>.

L'étude PENELOPEB vise à démontrer que, dans le traitement de fond avec un anti-hormonal standard, palbociclib donne une supériorité en terme de survie sans maladie (DFS) comparativement au placebo chez les femmes pré-et post-ménopausées atteintes d'un cancer du sein précoce HR-positif/HER2-normal à haute risque de rechute après avoir montré moins de réponse pathologique complète à la chimiothérapie néoadjuvante contenant des taxanes. Compte tenu du risque élevé de récurrence chez les patients après chimiothérapie néoadjuvante et un score CPS élevé, palbociclib semble être une option intéressante avec un profil d'innocuité favorable pour ces patients.

### 5.3.2.9. La SNS-032

Une étude phase I a été menée afin d'évaluer l'innocuité et la tolérance du SNS-032 chez des patients atteints de LLC et du MM à un stade avancé, l'objectif de cette étude est d'identifier la DMT et de déterminer la DLT<sup>22</sup>.

Les patients atteints de LLC, ont reçu une dose allant de 22 à 100 mg/m<sup>2</sup>. La DMT a été fixée à 75 mg/m<sup>2</sup>, suite à l'apparition du syndrome de lyse tumorale à partir de cette dose.

Les patients ayant reçu une dose de 100 mg/m<sup>2</sup> ont manifesté un syndrome de lyse tumorale importante, ainsi la DLT a donc été fixée à 100 mg/m<sup>2</sup>.

Pour les patients atteints de MM, la dose administrée varie de 15 à 75 mg/m<sup>2</sup>. La DMT et la DLT n'ont pas été identifiées en raison de l'abandon anticipé de l'étude<sup>21</sup>.

Cette étude a permis de déterminer différents paramètres pharmacocinétiques exprimés dans le tableau 3 ci-dessous.

**Tableau 3 : Paramètres pharmacocinétiques du SNS-032<sup>21</sup>**

Dose (mg/m <sup>2</sup> )	Nbre de patients	AUC <sub>INF</sub> (h.ng/mL)	IC (h.ng/ml)	C <sub>max</sub> 6h (ng/mL)	T <sub>1/2</sub> (h)	Vd <sub>s</sub> (L/m <sup>2</sup> )
15	3	376	41,22	38,13	8,68	348
22	2	630	36,74	41,5	7,39	229
33	8	1,099	30,74	105,1	8,39	165
50	7	1,668	35,12	142,7*	9,77	228
75	10	2,767	28,71	251,5	9,02	185
100	2	6,049	18,12	319	15,95	194

\* n =6

### 5.3.3. Principales indications des essais cliniques avec les CDKIs

Les essais cliniques de phases I sont conduits normalement chez les sujets sains. Les anticancéreux, compte tenu de leur toxicité et la nature critique du cancer feront l'exception, leur première administration à l'Homme se fera chez des patients malades.

En effet, l'éthique prime avant toute autre considération, ces essais peuvent être proposés à des patients en impasse thérapeutique, pour lequel le traitement étudié représente la seule chance de survie. Ces patients sont atteints soit de tumeurs avancées ou métastatiques, soit la tumeur est en rechute et réfractaire aux traitements de référence.

En général l'état de ses patients est aggravé, d'une part la médication lourde et la dégénérescence de certains organes (rein, foie...) et d'autre part l'état avancé de la maladie. Ainsi, le métabolisme de la substance étudiée peut se trouver altéré, rendant l'interprétation des résultats difficile. D'ailleurs, aucun CDKI à l'heure actuelle n'a été commercialisé, le plus avancé en essai clinique est le dinaciclib qui est en phase III comparative, qui laisse espérer voir prochainement une AMM pour un CDKI (tableau 6).

Le deuxième produit prometteur est le palbociclib (tableau 4), dont un essai clinique phase III appelé « PENELOPEB » est enregistrée, mais n'est pas encore ouvert aux recrutements de patients<sup>10</sup>.

Nous nous sommes intéressées aux essais cliniques récents qui sont en cours, qui viennent de s'achever ou qui ont été interrompus. Les indications sont larges, elles ont en commun le fait que la pathologie est à un stade avancé ou métastatique, ou le plus souvent en rechute et réfractaire aux traitements de référence.

Les indications des essais concernant l'alvociclib, le palbociclib, le dinaciclib ainsi que l'AT 7519M couvrent la majorité des indications néoplasiques, aussi bien les tumeurs solides que les hémopathies malignes, ces indications sont détaillées dans les tableaux respectifs ci-dessous (tableaux 3, 4, 6, 7).

Pour d'autres molécules les indications des essais cliniques se voient plus restreintes, elles peuvent concernées les tumeurs solides aux détriments des hémopathies malignes et *vice versa*. La seliciclib a été testée sur le cancer de poumon à petites cellules, et actuellement fait l'objet d'étude sur les tumeurs solides (tableau 5)

Nous avons résumés les indications des CDKIs en études cliniques dans les tableaux ci-dessous, ces tableaux concernent les CDKIs suivants :

- Flavopiridol (Alvocidib) : Tableau 3
- PD0332991 (Palbociclib) : Tableau 4
- Roscovitine (Seliciclib): Tableau 5
- SCH 727965 (dinaciclib): Tableau 6
- AT7519M: Tableau 7
- PHA 848125AC (Milciclib Maleate) : Tableau 8
- P1446a-05, P276-00, SNS-032, Terameprocol (EM-1421), BAY1000394, LY2835219: Tableau 9

**Tableau 3: Principales indications des essais cliniques de Flavopiridol (Alvocidib)**  
**(administration intraveineuse)**

<b>Médicaments associés</b>	<b>Indications</b>	<b>Statut</b>	<b>Phase</b>	<b>Identifiant de l'essai clinique</b>
Gemcitabine irinotecan	Tumeur solide non résecable ou métastatique <sup>72</sup>	terminé <sup>¥</sup>	I	NCT00079352
Cisplatine ou carboplatine	Tumeur solide avancée (seins, mélanome prostate)	en cours <sup>¥</sup>	I	NCT00003690
-	Tumeur solide localement avancée ou métastatique	en cours	I	NCT00112684
Cisplatine	Cancer épithélial ovarien ou cancer primaire péritonéal	recrutement <sup>¥</sup>	II	NCT00083122
Irinotecan	Cancer de foie avancé	terminé	II	NCT00087282
Irinotecan	Cancer avancé de l'estomac ou cancer de la jonction gastrique	recrutement	II	NCT00991952
Oxaliplatine fluorouracil leucovorin calcium	Tumeur germinale	recrutement	II	NCT00957905
Doxorubicine	Sarcome	en cours	I	NCT00098579
Docetaxel	Cancer pancréatique réfractaire métastatique <sup>73</sup>	terminé	II	NCT00331682
Romidepsin	cancer avancé: poumons, eosophage pleural advanced	recrutement	I	NCT00098644
-	Les enfants atteints de tumeurs solides ou lymphomes réfractaire ou en rechute <sup>84</sup>	en cours	I	NCT00012181
Rituximab cyclophosphamide	LLC à cellule B	recrutement	I	NCT01076556
-	LLC à cellule B	recrutement	I	NCT00377104
-	LAM, LLC <sup>85</sup>	en cours	I	NCT00101231
Cytarabine mitoxantrone	Leucémie aigüe en rechute ou réfractaire	en cours	I	NCT00470197
Lenalidomide	Leucémie, lymphome	recrutement	I	NCT00735930
-	LLC <sup>86, 87</sup>	terminé	I	NCT00058240
-	LLC	en cours	II	NCT00098371
-	LLC leucémie préalablement traités ou prolifératoire	en cours	II	NCT00464633
-	MM	recrutement	I/II	NCT00112723
Bortezomib	MM	recrutement	I	NCT00082784
Rituximab fludarabine	Lymphome du manteau <sup>88</sup>	terminé	I	NCT00058227
	Lymphome du manteau en rechute	recrutement	I/II	NCT00445341

**Tableau 4 : Principales indications des essais cliniques de la molécule PD0332991 Palbociclib  
(administration orale)**

<b>Médicaments associés</b>	<b>Indications</b>	<b>Statut</b>	<b>Phase</b>	<b>Identifiant de l'essai clinique</b>
<i>Versus</i> Placebo	Cancer du sein Luminal Aet B Score CPS-EG	en cours pas de recrutement	III	NCT01864746
	Liposarcome avancé ou métastatique	recrutement	II	NCT01209598
Bortezomib Dexamethasone	MM	recrutement	I/ II	NCT00555906
	LNH <sup>89, 90</sup>	en cours	I	NCT00141297
	NSCLC	recrutement	II	NCT01291017
Bortezomib	Lymphome du manteau	recrutement	I	NCT01111188
	glioblastome Rb positive	recrutement	II	NCT01227434)
	Tumeur solide réfractaire	recrutement	II	NCT01037790
Paclitaxel	Cancer de sein avancé	recrutement	I	NCT01320592
Letrozole	Première ligne cancer de sein avancé hormono-dépendant	recrutement	I/ II	NCT00721409
	Lymphome du manteau, seconde ligne	recrutement	I	NCT00420056
5-FU + oxaliplatine	Cancer Colorectal	recrutement	I	NCT01522989
	Carcinome épithélial de l'ovaire	recrutement	II	NCT01536743

**Tableau 5 : Principales indications des essais cliniques avec la Roscovitine Seliciclib  
(administration orale)**

<b>Médicaments associés</b>	<b>Indications</b>	<b>Statut</b>	<b>Phase</b>	<b>Identifiant de l'essai clinique</b>
doxorubicine	Cancer de sein triple négatif métastatique	Arrêtée <sup>¥</sup>	I	NCT01333423
Sapacitabine	Tumeurs solides avancées	recrutement	I	NCT00999401
	NSCLC	terminé	IIb	NCT00372073

**Tableau 6: Principales indications des essais cliniques de la molécule SCH 727965 dinaciclib  
(administration intraveineuse)**

<b>Médicaments associés</b>	<b>Indications</b>	<b>Statut</b>	<b>Phase</b>	<b>Identifiant de l'essai clinique</b>
Versus ofatumumab	LLC à cellule B Leucémie prolymphocytaire LLC Réfractaire	en cours	III	NCT01515176
Aprépitant Ondansetron Dexaméthasone	Tumeurs solides Lymphome non hodgkinien MM	terminé	I	NCT00871910
	Myélome multiple réfractaire ou en rechute	terminé	II	NCT01096342
Bortezomib Alemtuzumab	Lymphome du manteau ou	en cours	II	NCT00871546
	tumeur solide Lymphome non hodgkinien Myélome multiple, LLC à cellules B	en cours	I	NCT00871663
	Mélanome Stade III-IV	en cours pas de recrutement	I/ II	NCT01026324
Capecitabine Erlotinib	cancer du poumon et du sein avancé	en cours	II	NCT00732810
	Mélanome cutané	en cours	II	NCT00937937
Epirubicin hydrochloride	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cancer du sein récepteur œstrogène négatif.</li> <li>- Cancer du sein HER2-négatif.</li> <li>- Cancer du sein masculin.</li> <li>- Cancer du sein récepteur progestérone négatif.</li> <li>- Cancer du sein récurrent.</li> <li>- Cancer du sein Stade IV.</li> <li>- Cancer du sein triple négatif.</li> </ul>	en cours	I	NCT01624441
Paclitaxel	Tumeur solide maligne Cancer du sein triple négatif	recrutement	I	NCT01676753
Veliparib + carboplatin	Mutation du gène BRCA1, BRCA2 Tumeurs solides de l'adulte	recrutement	I	NCT01434316

**Tableau 7: Principales indications des essais cliniques de la molécule AT7519M (administration intraveineuse)**

Médicaments associés	Indications	Statut	Phase	Identifiant de l'essai clinique
Bortezomib	MM traités antérieurement	recrutement	I/ II	NCT01183949
	Tumeurs solides avancées ou métastatiques ou lymphome non hodgkinien réfractaire	recrutement	I	NCT00390117
	Lymphome du manteau	en cours pas de recrutement	II	NCT01652144
	LLC	recrutement	II	NCT01627054

**Tableau 8 : Principales indications des essais cliniques avec PHA 848125AC Milciclib Maleate (administration orale)**

Médicaments associés	Indications	Statut	Phase	Identifiant de l'essai clinique
	Thymome malin précédemment traités par plusieurs lignes de chimiothérapie	recrutement	II	NCT01301391
	Carcinome thymique	recrutement	II	NCT01011439

**Tableau 9: Principales indications des essais cliniques avec P1446a-05, P276-00, SNS-032, Terameprocol (EM-1421), BAY1000394 et LY2835219**

CDKI	Indications	Statut	Phase	Identifiant de l'essai clinique
P1446a-05	Tumeur solide, Hémopathie maligne	recrutement	I	NCT00840190
P276-00	Carcinome épidermoïde de la tête et du cou	recrutement	II	NCT00824343
P276-00 + Gemcitabine + Carboplatin	Cancer du sein	recrutement	II	NCT01333137
SNS-032	LLC, lymphome du manteau, MM, tumeur solide	en cours	I	NCT00446342
Terameprocol (EM-1421)	Leucémie	en cours	I	NCT00664677
BAY 1000394	Tumeurs avancés	recrutement	I	NCT01188252
BAY 1000394	Tumeurs avancés	Terminé	I	NCT01335256
BAY 1000394 + Cisplatine / Etoposide ou Carboplatin / Etoposide	Carcinome du poumon à petite cellules	recrutement	I/ II	NCT01573338
LY2835219	Cancer avancé	recrutement	I	NCT01394016

¶:

- Recrutement: les participants sont actuellement recrutés et inscrits
- En cours: étude en cours (par exemple, les patients sont traités ou examinés), mais le recrutement est terminé
- Terminé: l'étude a été conclue normalement, les participants ne sont plus en cours d'examen ou de traitement (la dernière visite de dernier patient a eu lieu)
- Arrêté: le recrutement ou l'inscription des participants a été interrompu prématurément, les participants ne seront plus examinés ou traités

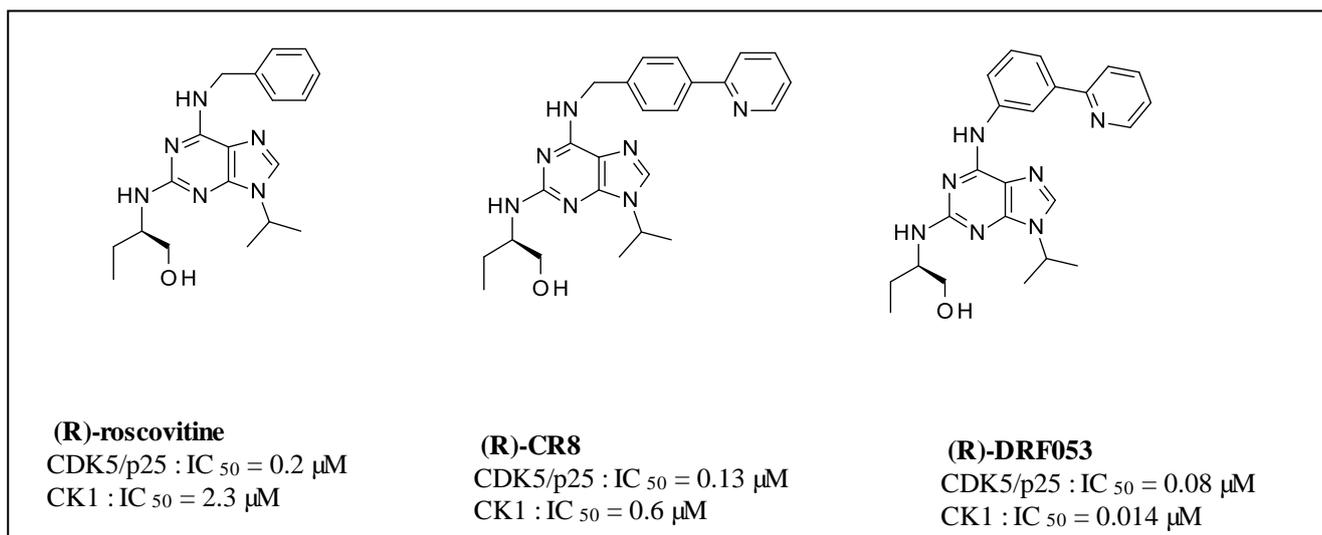
## **III. CHAPITRE II:**

---

**Préparation de purines porteuses d'un  
groupement hydroxybiarylméthylamine  
en position 6**

# Préparation de purines porteuses d'un groupement hydroxybiarylméthylamine en position 6

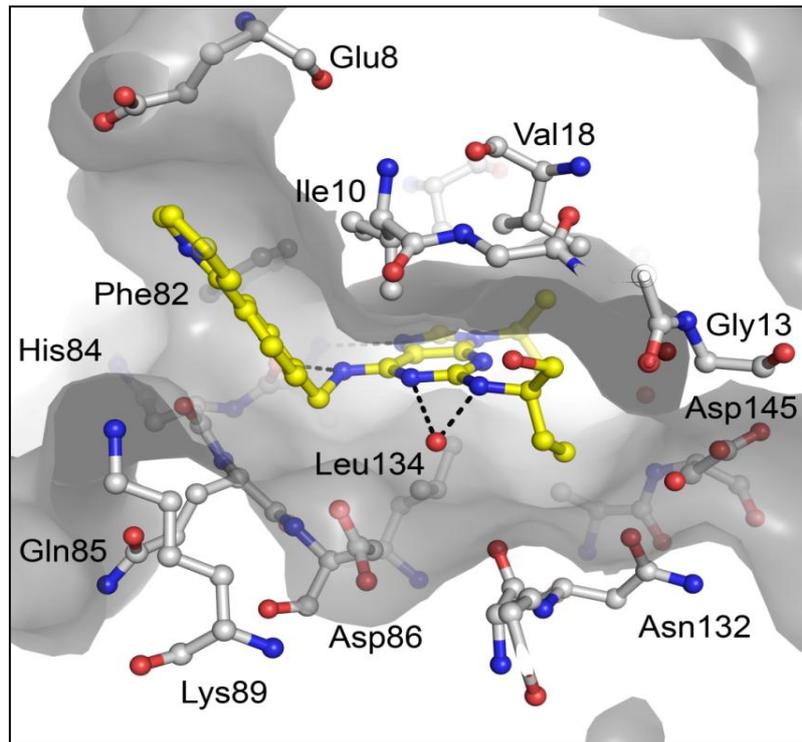
## 1. Conception des composés hydroxybiarylméthylamine



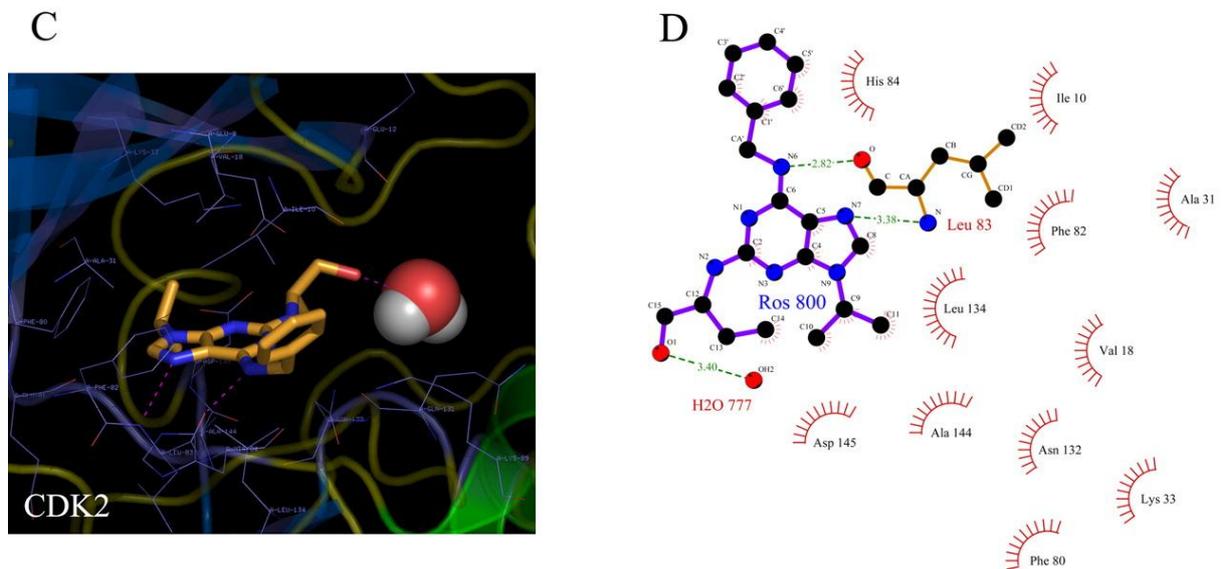
**Schéma 13 : Inhibition comparative de la Roscovitine, du CR8 et du DRF053**<sup>48</sup>

Des structures de biarylméthylamines ont été introduites sur plusieurs squelettes d'inhibiteurs. En particulier en position 6 de purines dérivées de la Roscovitine (schéma 13). Les produits ainsi obtenus se sont révélés nettement plus actifs que la roscovitine aussi bien dans des tests enzymatiques cellulaires qu'*in vivo*<sup>48,91, 92</sup>. On peut citer parmi eux, les travaux entrepris par Oumata et al. portant sur l'introduction en position 6 du squelette purine de dérivés de type amino aryles et en position 2 de groupements de type amino alcools<sup>48</sup>. Ces travaux ont mis en lumière des composés actifs et sélectifs sur certaines CDKs et sur CK1. Les composés synthétisés tels que le CR8, ont démontré une activité anti proliférative intéressante. D'autres (DRF053) sont très actifs sur les kinases et possèdent une activité anti proliférative faible, qui pourrait être exploitée pour protéger les cellules dans les maladies neurodégénératives notamment la maladie d'Alzheimer (schéma 13).

Ce gain d'activité peut être expliqué par une meilleure occupation du site ATP de la kinase comme semble l'indiquer les structures cristallographiques du complexe CR8-CDK2 (schéma 14)<sup>4</sup> et du complexe Roscovitine-CKD2 (schéma 15)<sup>5</sup>.

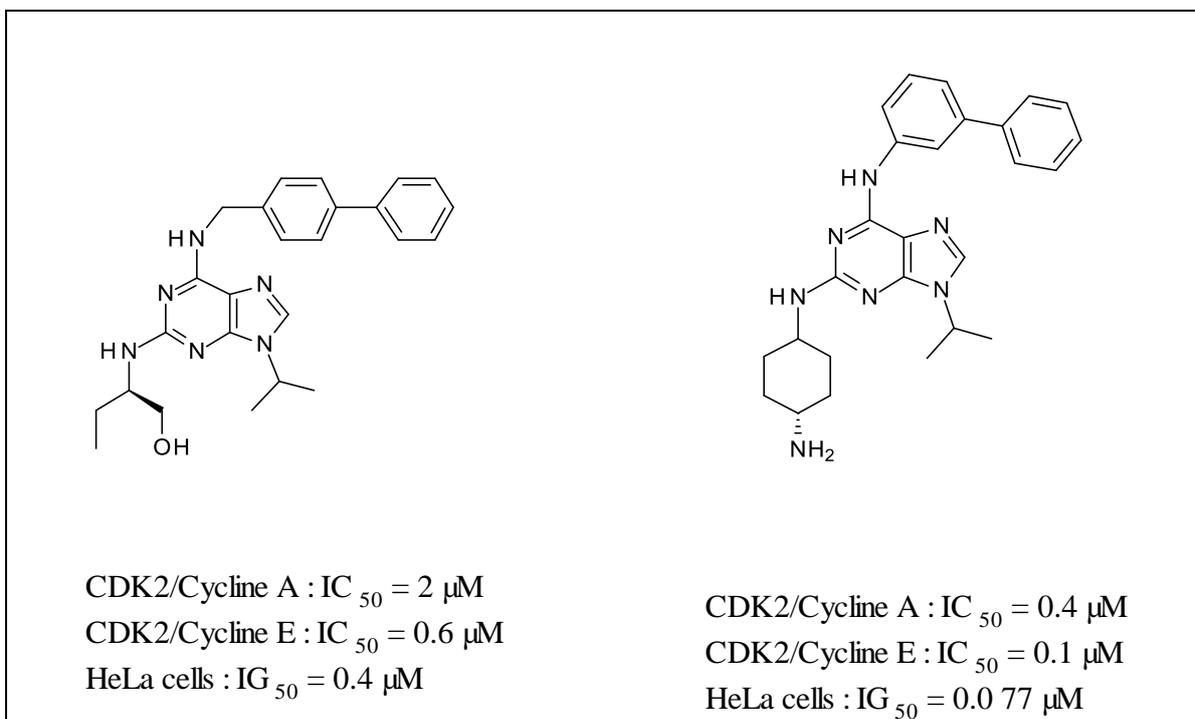


*Schéma 14 : Structure cristallographique du complexe CR8-CDK2<sup>93</sup>*



*Schéma 15 : Structure cristallographique du complexe Roscovitine-CDK2<sup>94</sup>*

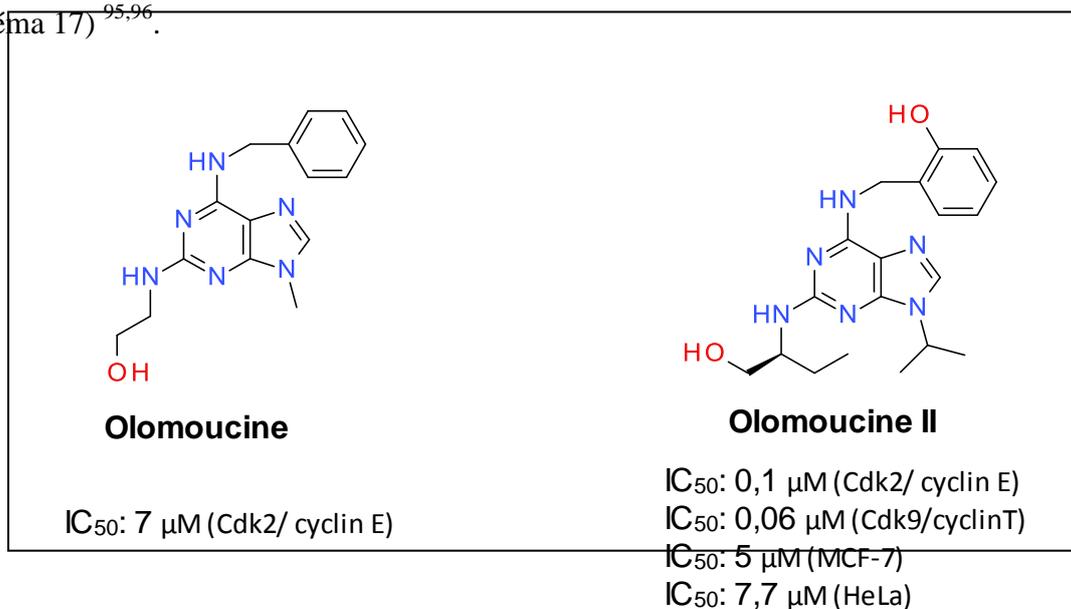
Plus récemment, en 2010, les travaux de Trova et coll.<sup>91, 92</sup> ont montré une diminution significative (50 fois supérieure) de la prolifération cellulaire par rapport à la (R)-roscovitine (schéma 16).



*Schéma 16 : Composés développés par Trova et coll.<sup>91, 92</sup>*

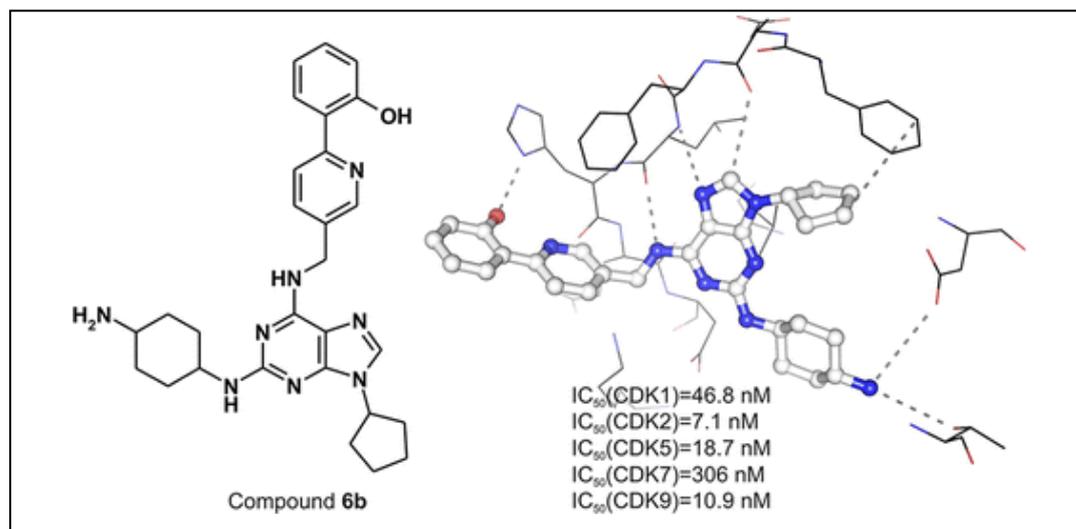
Cependant, ces composés présentent, malgré une  $IC_{50}$  intéressante, une biodisponibilité ainsi qu'une distribution limitée dans l'organisme en raison notamment de leur haut poids moléculaire et de leur faible lipophilie.

Par ailleurs, il a été rapporté que l'adjonction d'un groupement hydroxyle en position 2 du benzyle comme dans l'exemple de l'olomoucine II, modifie favorablement l'activité (schéma 17)<sup>95,96</sup>.



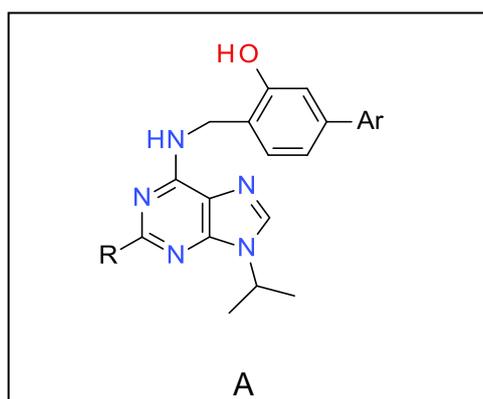
*Schéma 17 : Olomoucine I et II*

Ce constat a été confirmé dernièrement en 2013 par Gucky et coll, qui ont greffé un groupement hydroxyl sur un groupement biarylméthylamine<sup>97</sup> (schéma 18)



*Schéma 18 : composé développé par Gucky et coll*

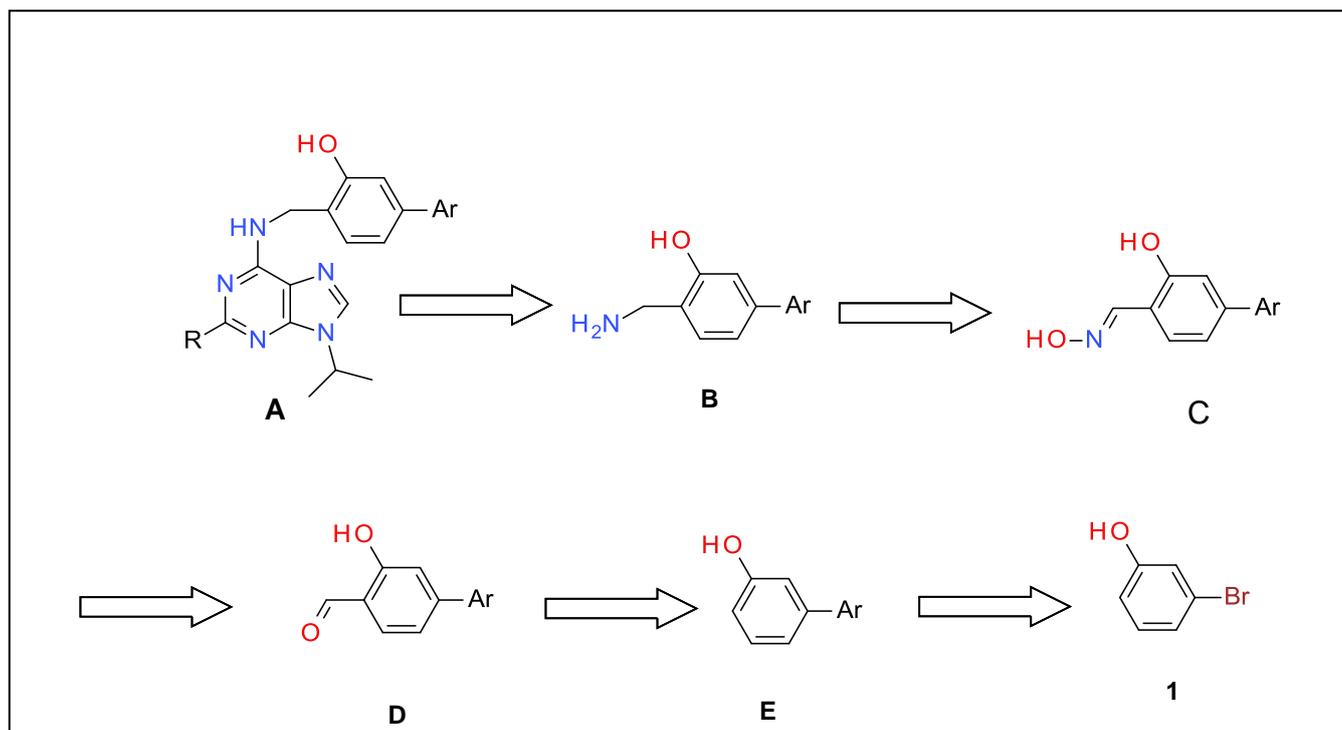
Compte tenu des données de littérature, nous nous sommes intéressés à la synthèse de molécules associant ces deux types de modification, c-a-d l'adjonction d'un groupement hydroxyl sur une structure biarylméthylamine de structure générale A (Schéma 19). Il s'agit de rechercher si ces deux modulations peuvent éventuellement s'additionner pour améliorer l'activité de la (*R*)-roscovitine et le CR8.



*Schéma 19 : Structure générale des molécules à synthétiser*

## 2. Rétrosynthèse

L'approche envisagée pour accéder aux produits est résumé dans le schéma rétrosynthétique ci-dessous (schéma 20)



*Schéma 20 : rétro-synthèse des composés hydroxyl biarylméthylamine*

La molécule finale **A** pourrait être obtenue suite à l'attaque nucléophile de l'amine primaire **B**, qui résulterait de la réduction de l'hydroxylamine **C**. Cette dernière serait le produit de réaction du chlorhydrate d'hydroxylamine et l'aldéhyde **D**.

Le composé biaryl **D** résulterait de la formylation du dérivé **E**, lui-même proviendrait du couplage de Suzuki entre deux aryles le bromophénol **1** et un autre aryle sous forme d'acide ou ester boronique.

### 3. Synthèse des dérivés de roscovitine hydroxybiarylméthylamine

#### 3.1. Synthèse du 2-(aminométhyl)-5-phényl-phénol

##### 3.1.1. Obtention du 2-hydroxy-4-phényl-benzaldehyde

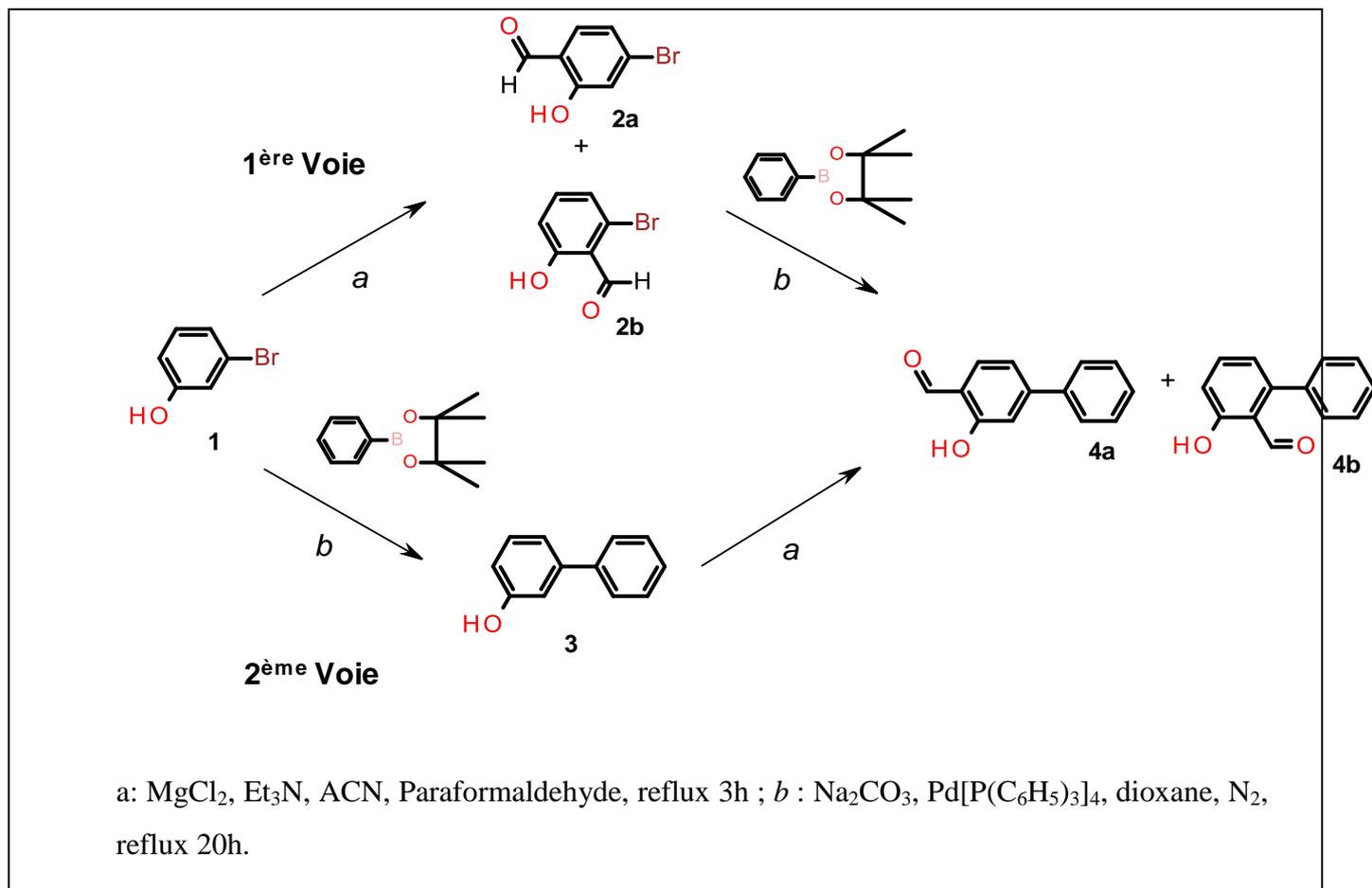


Schéma 21 : Synthèse du 2-hydroxy-4-phényl-benzaldehyde

Le biaryle **4a** a été obtenu en deux étapes, via deux voies de synthèse qui diffèrent par l'ordre des réactions (schéma 21).

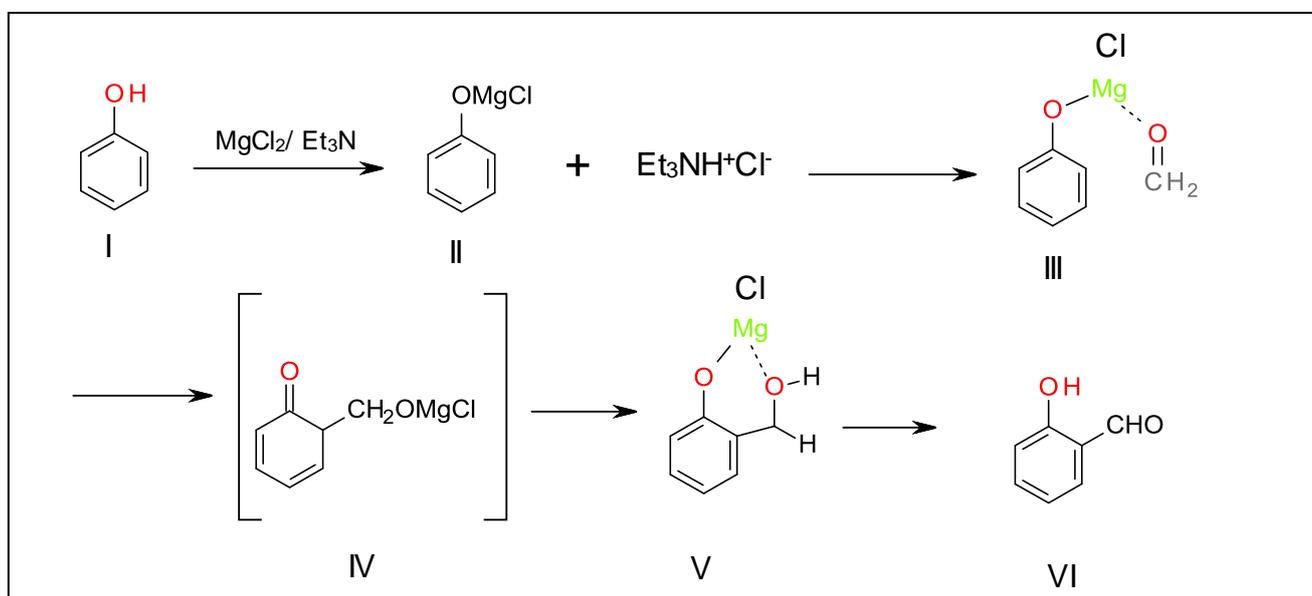
##### 3.1.1.1. Première voie de synthèse du 2-hydroxy-4-phényl-benzaldehyde

La première voie consiste à réaliser en premier temps la formylation puis ultérieurement le couplage de Suzuki. La première étape de formylation devrait être sélective<sup>98, 99</sup> et permettrait la formylation du bromophénol **1** en *ortho* de l'hydroxyl et en para du groupement Br. La formylation sélective en *ortho* du phénol a été décrite par Casiraghi et coll<sup>100, 101</sup>, en présence de paraformaldehyde, de réactif de grignard (éthylmagnésium de bromure) et de

HMPTA. Ce procédé de formylation a été simplifié par une équipe norvégienne, en remplaçant le réactif de grignard par le dichlorure de magnésium. Il a été décrit que ce dernier procédé simplifié a permis d'améliorer les rendements, d'obtenir moins de produits secondaires et d'éviter le HMPTA, produit hautement carcinogène<sup>102</sup>.

Cette réaction de formylation est une réaction de substitution aromatique électrophile, qui est favorisée par les groupements électrodonneurs qui sont ortho et para orienteurs. Alors que les groupements électroattracteurs sont désactivants et méta orienteurs.

Les halogènes constituent un cas particulier, étant à la fois faiblement mésomères donneurs et faiblement inductifs attracteurs. Ces groupements sont faiblement désactivants mais ortho-para orienteurs.



**Schéma 22 : Mécanisme d'orthoformylation<sup>102</sup>**

La réaction de formylation est initiée par le système MgCl<sub>2</sub>/ Et<sub>3</sub>N pour donner le sel **III** (Schéma 22). Cette réaction n'a pas eu lieu en absence de MgCl<sub>2</sub> ou Et<sub>3</sub>N, ce système base est indispensable.

Le phénoxy-magnésium chlorure **III** réagit avec le formaldéhyde pour aboutir à une structure cyclohexadienone **IV** instable qui va générer le sel de magnésium de l'alcool salicylique **V**. Ce dernier s'oxyde en donnant le produit final formylé **VI**.

Suite à la formylation du bromophénol **I** on a obtenu deux isomères le **2a** formylé en para du Br et le **2b** formylé en ortho du Br et de l'hydroxyle, dont la séparation chromatographique

s'avère très difficile. En effet ces deux isomères possèdent des propriétés physiques semblables et par la suite deux Rf proches.

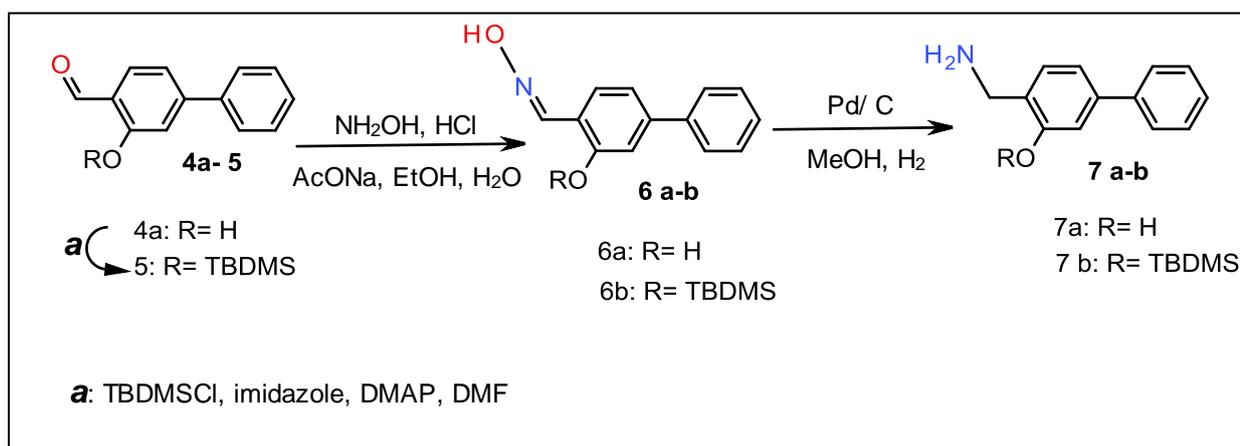
Ainsi, pour cette première voie, la purification a été réalisée avant et après le couplage de Suzuki, le produit **4a** a été isolé avec un mauvais rendement de 30%.

### 3.1.1.2. Deuxième voie de synthèse du 2-hydroxy-4-phényl-benzaldehyde

Pour remédier aux faibles rendements, on a opté pour une deuxième voie de synthèse (schéma 21), qui consiste à réaliser la formylation après le couplage de Suzuki.

Cette deuxième voie présente un double avantage, elle permet une seule purification et ceci après la formylation, en plus le rendement a été nettement amélioré en passant de 30% à 60%.

### 3.1.2. Synthèse du 2-(aminométhyl)-5-phényl-phénol



*Schéma 23 : Obtention du 2-(aminométhyl)-5-phényl-phénol*

La fonction carbonyle de l'hydroxyphényl benzaldéhyde **4a** sera transformée en fonction amine (schéma 23) puis mise en réaction dans des substitutions nucléophiles. Cependant, la présence d'une fonction hydroxyle pourrait être une source de génération de produits secondaires. Car la fonction hydroxyle en elle-même pourrait faire une substitution nucléophile.

Pour cela on a protégé la fonction hydroxyle par un groupement silyl<sup>103</sup>, en utilisant le chlorure de tert-butyldiméthylsilyl en présence d'imidazole avec ou sans DMAP. L'imidazole et la DMAP exaltent la nucléophilie de l'hydroxyle en formant l'ion imidazolium. Cette réaction de silylation est limitante car elle n'offre qu'un rendement avoisinant les 50%.

En parallèle à cette stratégie de silylation, la voie sans protection de l'hydroxyle a été conduite avec le produit **4a** (schéma 23).

La première étape de la chaîne réactionnelle décrite dans le schéma 23, est la transformation des produits **4a** et **5** en imine correspondante. Cette amination est réalisée sous l'action du chlorhydrate d'hydroxylamine en présence d'acétate de sodium<sup>104</sup>.

Ensuite les oximes **6** sont réduites en amine correspondante **7a** ou **7b** par hydrogénation catalytique en présence de palladium sur charbon activé.

On obtient l'amine finale facilement et avec de bons rendements dépassant les 90 %. En effet dès leur formation, les oximes **6** et les amines **7** précipitent dans le milieu réactionnel, ce qui rend leur purification rapide et efficace.

### 3.2. Synthèse du 2-(aminométhyl)-5-(3-thiényl)phénol

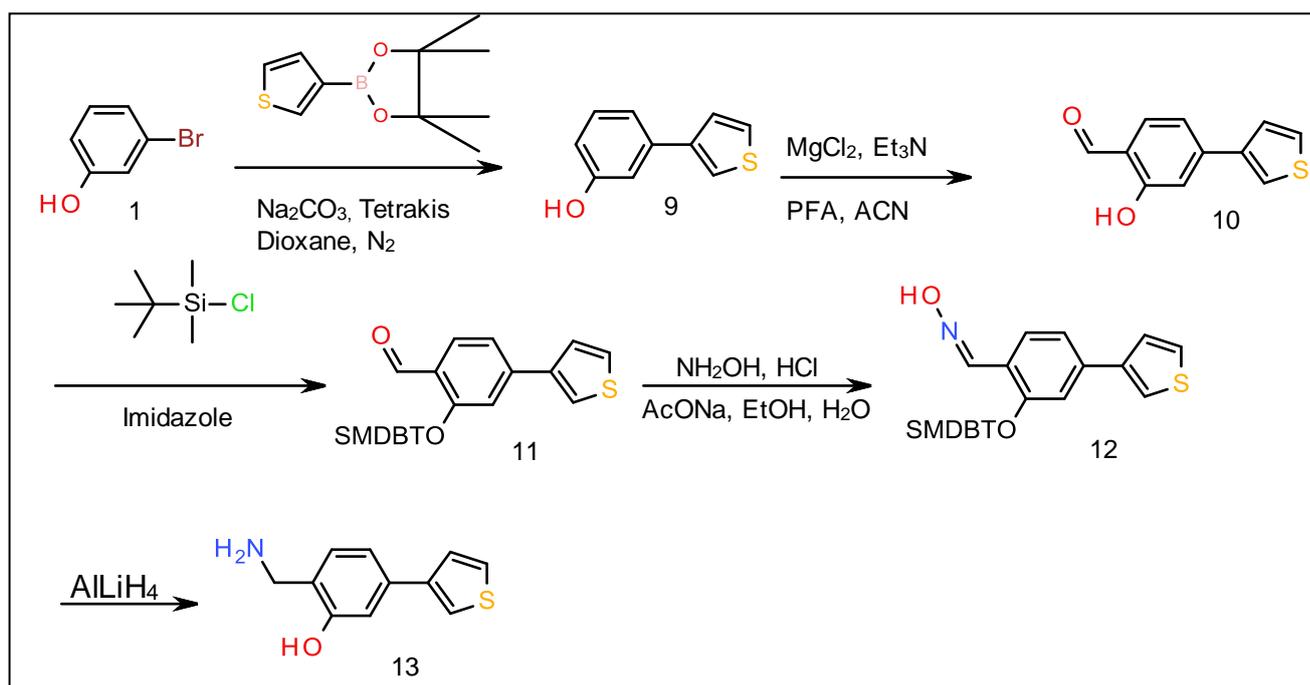


Schéma 24 : Synthèse du 2-(aminométhyl)-5-(3-thiényl)phénol

Par analogie au schéma de synthèse du 2-(aminométhyl)-5-phenyl-phenol, la synthèse d'un dérivé amino thiénylphénol, a été réalisée en commençant par le couplage de Suzuki suivi par la formylation (schéma 24). Ainsi, on a obtenu le thiénylphénol **9** avec un bon rendement de

98%. Puis, dans un deuxième temps on a formylé le dérivé **9** en présence de paraformaldehyde, de dichlorure de magnésium et de la triéthylamine<sup>102</sup>.

Le 2-hydroxy-4-(3-thienyl)benzaldehyde **10** obtenu, est le produit de la formylation sélective en ortho de l'hydroxyl et en para du cycle thiényl du dérivé **9**. Au contraire de la formylation précédente du composé **3**, qui n'a pas été sélective et on a isolé deux isomères **4a** et **4b**. Le dérivé **10** a été obtenu avec un faible rendement de 35%, alors que le rendement d'obtention du produit **4a** était satisfaisant de 60%.

On a également opté pour la protection de l'hydroxyle par le chlorure de tert-butyltriméthylsilyl en présence d'imidazole<sup>105</sup>. Le produit **11** silylé a été obtenu avec un bon rendement de 80 % (schéma 24).

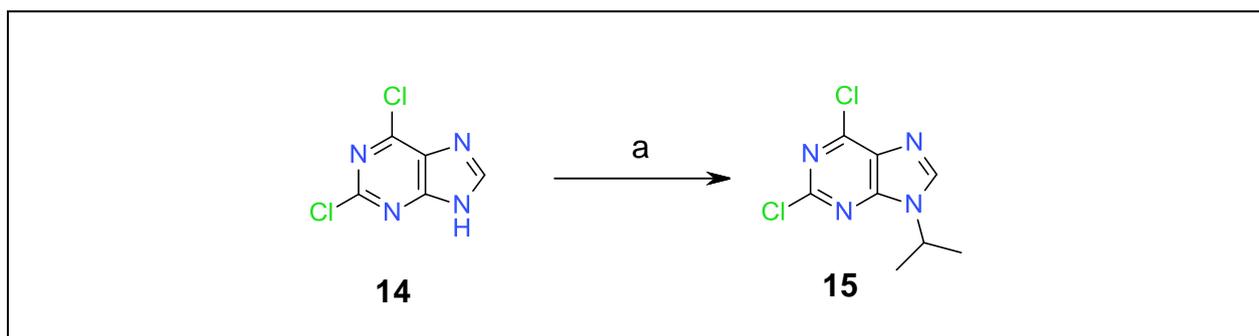
La transformation du produit **11** en oxime **12** correspondante a été décrite précédemment (schéma 23), cette amination est réalisée sous l'action du chlorhydrate d'hydroxylamine en présence d'acétate de sodium<sup>104</sup>, l'oxime **12** a été isolé avec un rendement de 50%.

La réduction de l'oxime **12** en amine **13** par hydrogénation sous pression en présence de palladium sur charbon n'a pas aboutit à l'amine correspondante, d'où le recours à une autre méthode de réduction par les hydrures en utilisant le  $\text{LiAlH}_4$ <sup>106</sup>. Lors de cette réduction on déprotège aussi l'hydroxyle silylé. Habituellement on déprotège le groupement TBDMS en présence d'un acide de Lewis type:  $\text{TMSOTf}$ ,  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ ,  $\text{BCl}_3$ ,  $\text{ZnBr}_2$ ,  $\text{LiCl}$ <sup>106</sup>, mais il a été rapporté que cette déprotection a été observée lors des réductions moyennant le Pd/C, le DIBAL ou encore le  $\text{LiAlH}_4$ <sup>107, 108</sup>.

### 3.3. SN<sub>Ar</sub> par les dérivés méthylamine hydroxybiaryle en position 6

#### 3.3.1. Préparation de la 2,6-dichloro-9- isopropylpurine 15

La préparation de la 2,6-dichloro-9- isopropylpurine a été réalisée en suivant un protocole de la littérature<sup>48</sup>, l'azote en 9 de la 2,6-dichloropurine **14** commerciale, a été alkylée avec de la 2-bromopropane (schéma 25). Le dérivé 9-alkylé a été obtenu avec un rendement de 57%, puisque on obtient en parallèle une petite quantité de l'isomère 7-alkyl. La séparation chromatographique fournit en premier l'isomère 7-alkyl avant le produit recherché le 9-alkyl.



a : 2-bromopropane, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DMSO, 13-18°C.

Schéma 25: préparation de la 2,6-dichloro-9- isopropylpurine

#### 3.3.2. SN<sub>Ar</sub> par le 2-(aminométhyl)-5-phényl-phénol

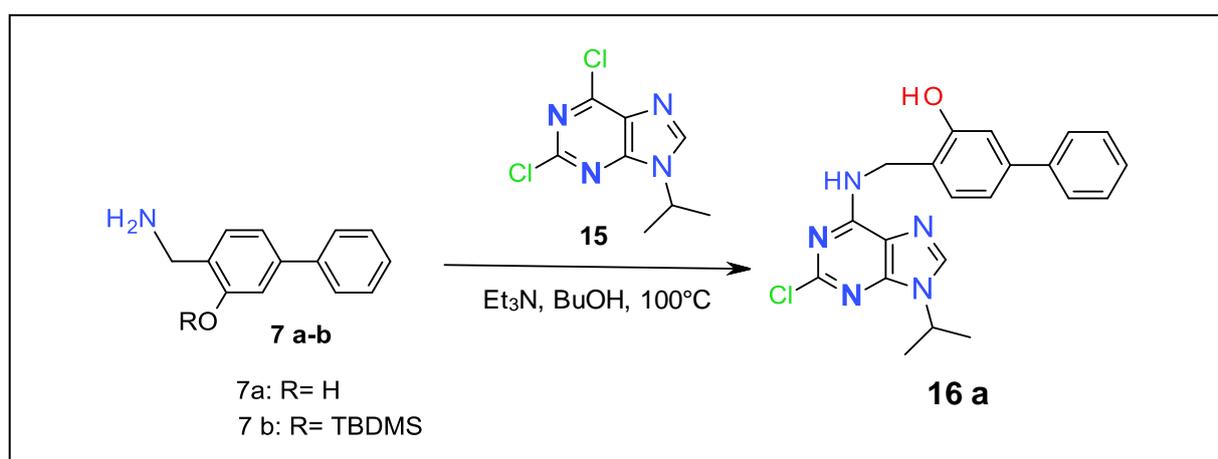


Schéma 25 : SN<sub>Ar</sub> par le 2-(aminométhyl)-5-phényl-phénol

Les amines **7a** et **7b** ont été mis en réaction avec le 2,6-dichloro-9-isopropyl-purine **15**.

On a remarqué que même sans protection du groupement hydroxyle pour le produit **7a**, l'obtention du produit chloré correspondant **15a** a été réalisée avec succès (schéma 25).

Le dérivé silylé **7b** a aussi bien réagi avec la dichloropurine alkylé **14**. Lors de cette étape de substitution nucléophile, on a remarqué la déprotection simultanée du groupement TBDMS.

Ainsi, on a conclu que cette étape peut être réalisée sans protection au préalable du groupement hydroxyle.

Néanmoins, le rendement est nettement meilleur avec le produit **7b** quand la fonction hydroxyle est protégée 60% *versus* 33% avec le dérivé **7a**.

### 3.3.3. $S_NAr$ par le 2-(aminométhyl)-5-(3-thiényl)phénol

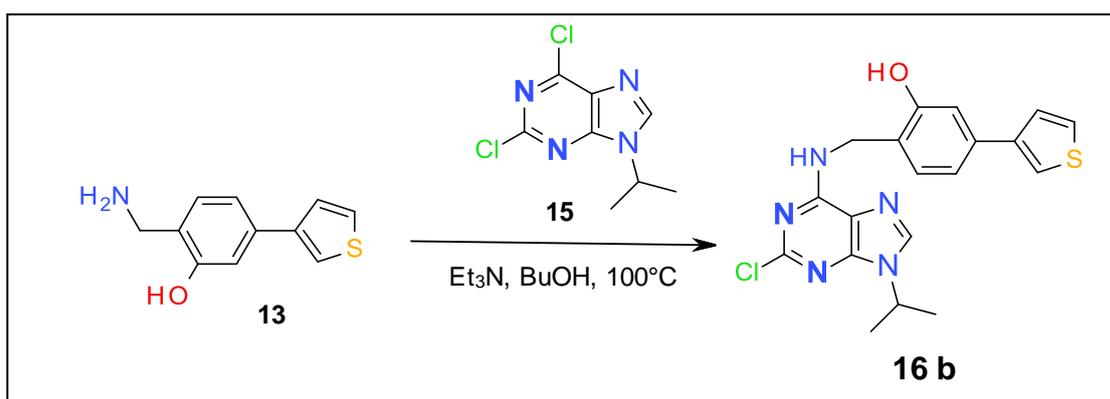
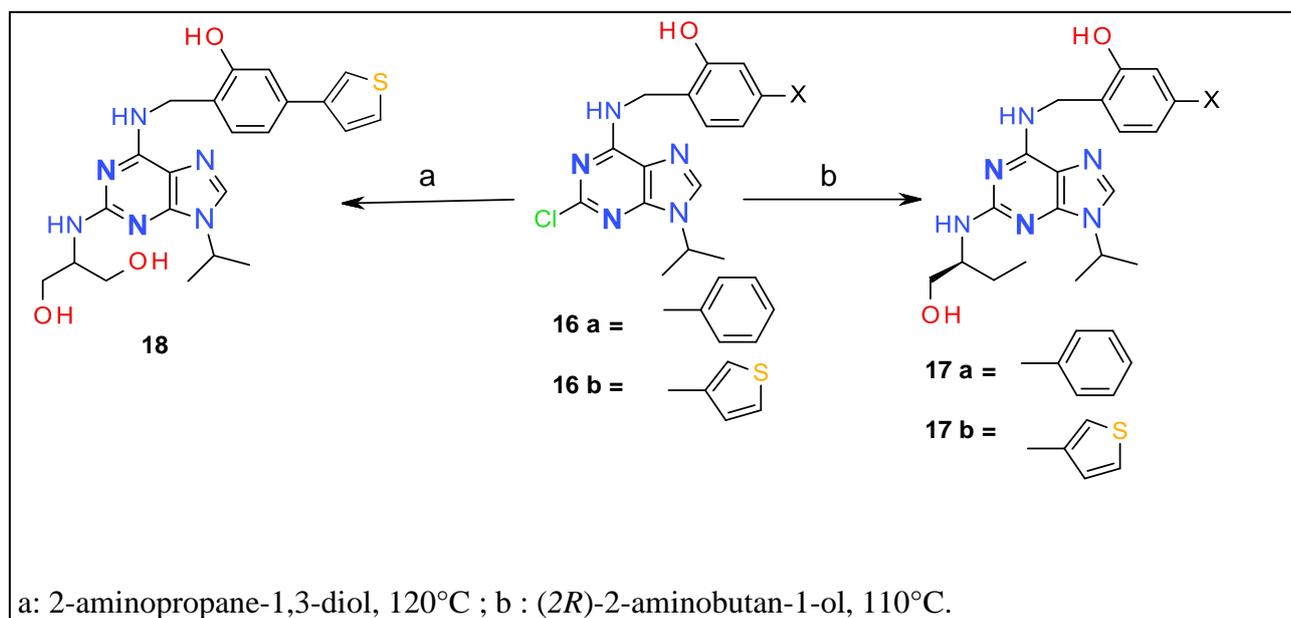


Schéma 26 :  $S_NAr$  le 2-(aminométhyl)-5-(3-thiényl)phénol

La  $S_NAr$  de la purine dichlorée **15** par le 2-(aminométhyl)-5-(3-thiényl)phénol **13**, a donné le dérivé chloré **16b** avec un rendement de 70% (schéma 26).

Malgré qu'il y a eu une déprotection de l'hydroxyle lors de l'obtention de l'amine **13**, la  $S_NAr$  par ce dernier a bien marché. D'ailleurs, on a observé le même résultat avec la synthèse précédente (schéma 25). Par la suite, la protection du groupe hydroxyle ne s'avère pas nécessaire.

### 3.4. SN<sub>Ar</sub> par les aminoalcools en position 2



**Schéma 27 : SN<sub>Ar</sub> par les aminoalcools en position 2**

Lors de la dernière étape, le dérivé chloré **16a** est couplé avec le (2R)-2-aminobutan-1-ol à 110°C pour donner le produit correspondant **17a** avec un rendement de 54% (schéma 27).

De même le composé **16b** a été mis en réaction avec des aminoalcools, d'une part avec (2R)-2-aminobutan-1-ol pour donner le produit **17b** avec un rendement de 65%, d'autre part la SN<sub>Ar</sub> a été conduite avec le sérinol à 120°C pour aboutir au produit **18** avec un rendement de 50% (schéma 27).

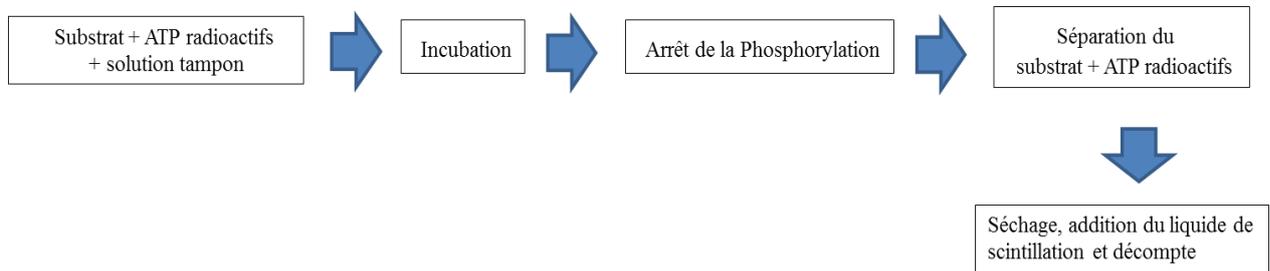
## 4. Evaluation biologique

### 4.1. Principe de la mesure de l'activité biologique

L'activité biologique des kinases est évaluée par mesure de la phosphorylation par radioactivité grâce au marquage du  $\gamma$ -phosphore de l'ATP, l'agent de marquage introduit est le P<sup>33</sup>. Cette technique est couramment utilisée pour mesurer l'activité de phosphorylation des protéines kinases.

Le principe de cette méthode repose sur le transfert du groupement phosphore radiomarqué de l'ATP vers le substrat. L'ATP et le substrat marqués sont ensuite séparés par trois techniques

principales : chromatographie, électrophorèse ou par filtration. La quantité de substrat est alors mesurée en utilisant dans notre cas un liquide de scintillation (figure 28).



**Schéma 28 : Représentation schématique de la mesure de l'activité des kinases**

Ces tests ont été réalisés par les équipes du Dr. Laurent Meijer à Roscoff (France), au Laboratoire de « protein phosphorylation and human disease group, USR3051, station biologique (Roscoff) » et le département de biologie de Manros therapeutics.

## **4.2. Résultats :**

L'activité des kinases a été mesurée par radioactivité et évaluée sur un panel de protéines kinases : CDKs, GSK-3, CK1, DYRK1A ainsi que sur des cellules tumorales humaines du neuroblastome de type SH-SY5Y afin d'estimer leur activité antiproliférative. Les constantes d'inhibition ( $IC_{50}$ ) sont la moyenne de trois expériences et sont exprimées en  $\mu M$ . L'activité biologique des composés et l'analyse des résultats observés sont décrits dans le Tableau ci-dessous (tableau 10).

**Tableau 10 : Activités biologiques des dérivés hydroxylbiaryles développés,**

**(-) : non testés sur ces kinases.**

Pdt	Structure	IC <sub>50</sub> (μM)								
		CDK1	CDK2	CDK5	CDK9	CK1	CLK1	Dyrk1A	GSK3	SHSY5Y
<b>Ros</b>		0.33	0.21	0.28	0.23	60	4	4.3	3	17
<b>CR 8</b>		0.13	-	0.13	-	0.6	-	-	12	0.43
<b>17a</b>		0.1	0.05 3	0.09 6	0.23	0.3	2.1	9.5	4.3	0.71
<b>17b</b>		0.11	0.03	0.1	0.4	0.5	2.3	8.1	1.6	0.14
<b>18</b>		0.09	0.04	0.07	0.2	0.34	1.1	6.4	2.2	0.36

Les résultats obtenus pour les composés hydroxybiaryles développés montrent une  $IC_{50}$  inférieure à  $1\mu M$  sur les différentes CDKs testées (CDK1, CDK2/CyclineA, CDK5 et CDK9/CyclineT). Par ailleurs, les composés sont inactifs sur la protéine kinase GSK-3, Dyrk1A et CLK1, mais présentent une inhibition intéressante des cellules SH-SY5Y.

Les meilleures activités biologiques sont obtenues avec les dérivés méthylamino-thiénylphénol **17b** et **18**, ces résultats sont meilleurs que ceux observés avec la roscovitine et le dérivé CR8 envers les protéines CDK1, CDK2, CDK5, CDK9 et CK1.

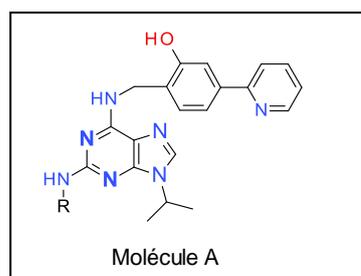
Cependant les produits développés sont inactifs envers la protéine CLK1. De plus, comme la (R)-roscovitine, ils ne démontrent pas une inhibition intéressante envers les protéines DYRK1A et GSK3.

L'effet anti-prolifératif observé sur les cellules SH-SY5Y s'avère intéressant, en effet les produits **17a**, **17b** et **18** présentent des  $IC_{50}$  inférieur à  $1\mu M$ . Notamment, le composé **17b** qui a une  $IC_{50}$  de 140 nM, ce dernier est 120 fois plus puissant que la (R)-roscovitine et 3 fois plus actif que le CR8.

## 5. Conclusion et perspectives

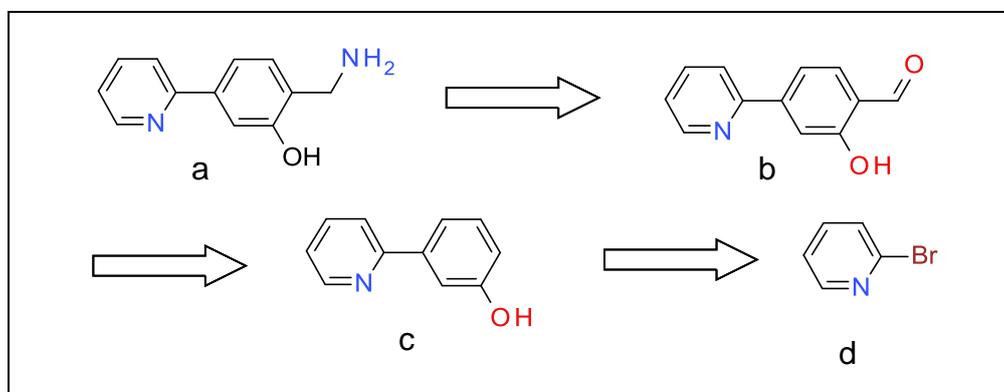
Dans cette première partie nous avons introduit des groupements hydroxybiaryle en position 6 de la (R)-roscovitine. Cette famille de composé n'est pas spécifique mais démontre une certaine sélectivité envers la protéine CDK2 avec des  $IC_{50} \leq 53$  nM, ainsi qu'une activité antiproliférative de l'ordre de la micromole. Le composé **17a** s'est montré le plus actif présentant une  $IC_{50}$  égale à  $0.03\mu M$  envers CDK2, supérieure à celle observé avec la (R)-roscovitine ( $IC_{50} = 0.21\mu M$ ). De plus, il a une forte activité antiproliférative avec une  $IC_{50}$  de  $0.14\mu M$ .

Parmi les groupement qui semble être intéressant à greffer en position 6 est le 2-(aminométhyl)-5-(2-pyridyl)phénol (schéma 29a), il s'agirait de rajouter un groupement hydroxyl au biaryl en 6 du CR8. Un groupement semblable, le 2-[5-(aminométhyl)-2-pyridyl]phénol a été récemment décrit par Gucky et coll<sup>97</sup> (schéma 18).



**Schéma 29a : molécules à développer**

La préparation du 2-(aminométhyl)-5-(2-pyridyl)phénol peut être envisagée selon le schéma rétrosynthétique ci-dessous (schéma 29b).



**Schéma 29b : Rétrosynthèse du 2-(aminométhyl)-5-(2-pyridyl)phénol**

## **IV. CHAPITRE III :**

---

### **Préparation de thieno[3,2-d] pyrimidines**

# Préparation de thiéno[3,2-d]pyrimidines

La troisième partie de ce travail de recherche s'est orientée vers la synthèse, l'identification et l'évaluation d'une nouvelle classe de composés, la famille des thieno[3,2-d]pyrimidine.

## 1. Conception des dérivés thiéno [3,2-d] pyrimidines

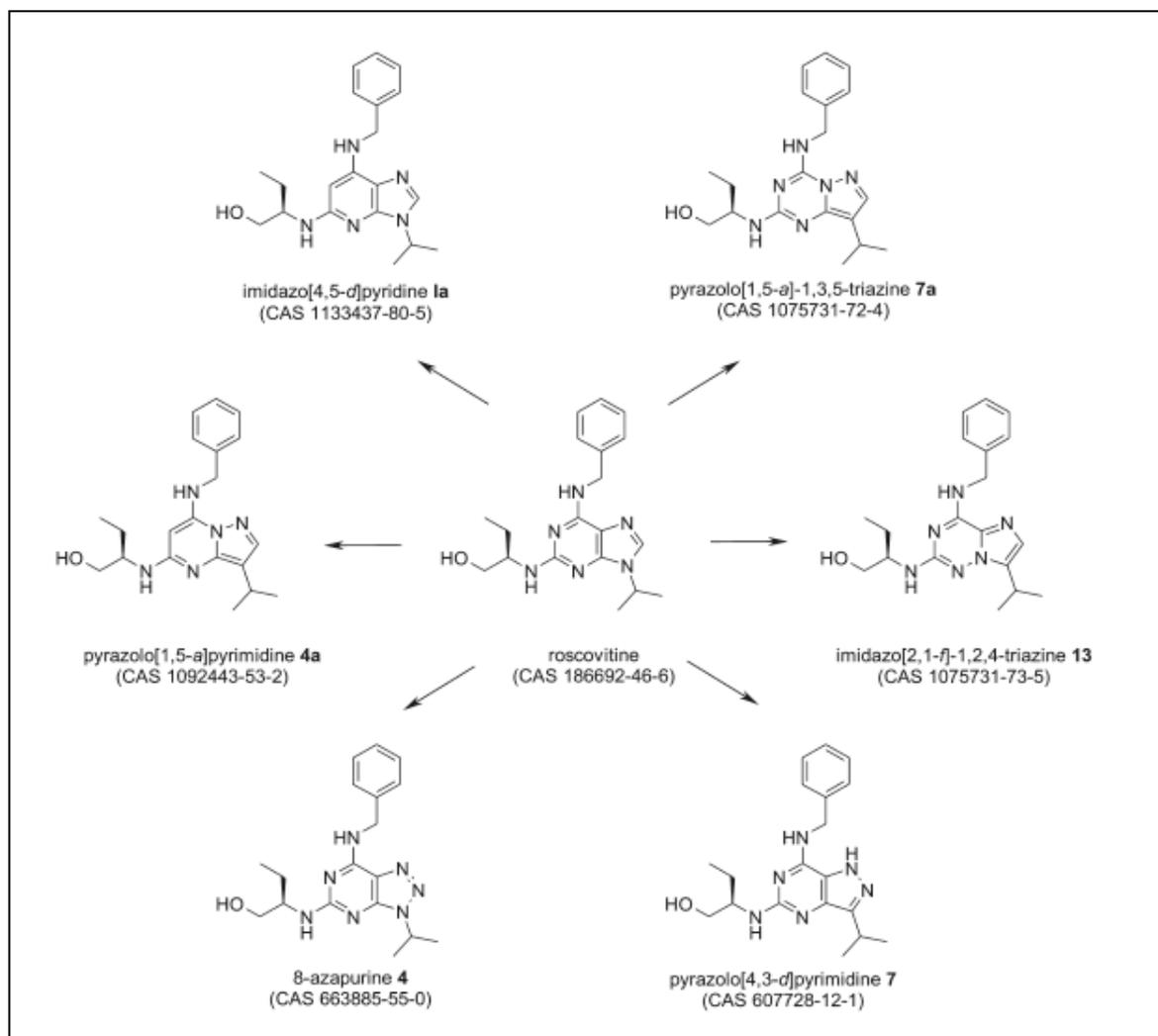


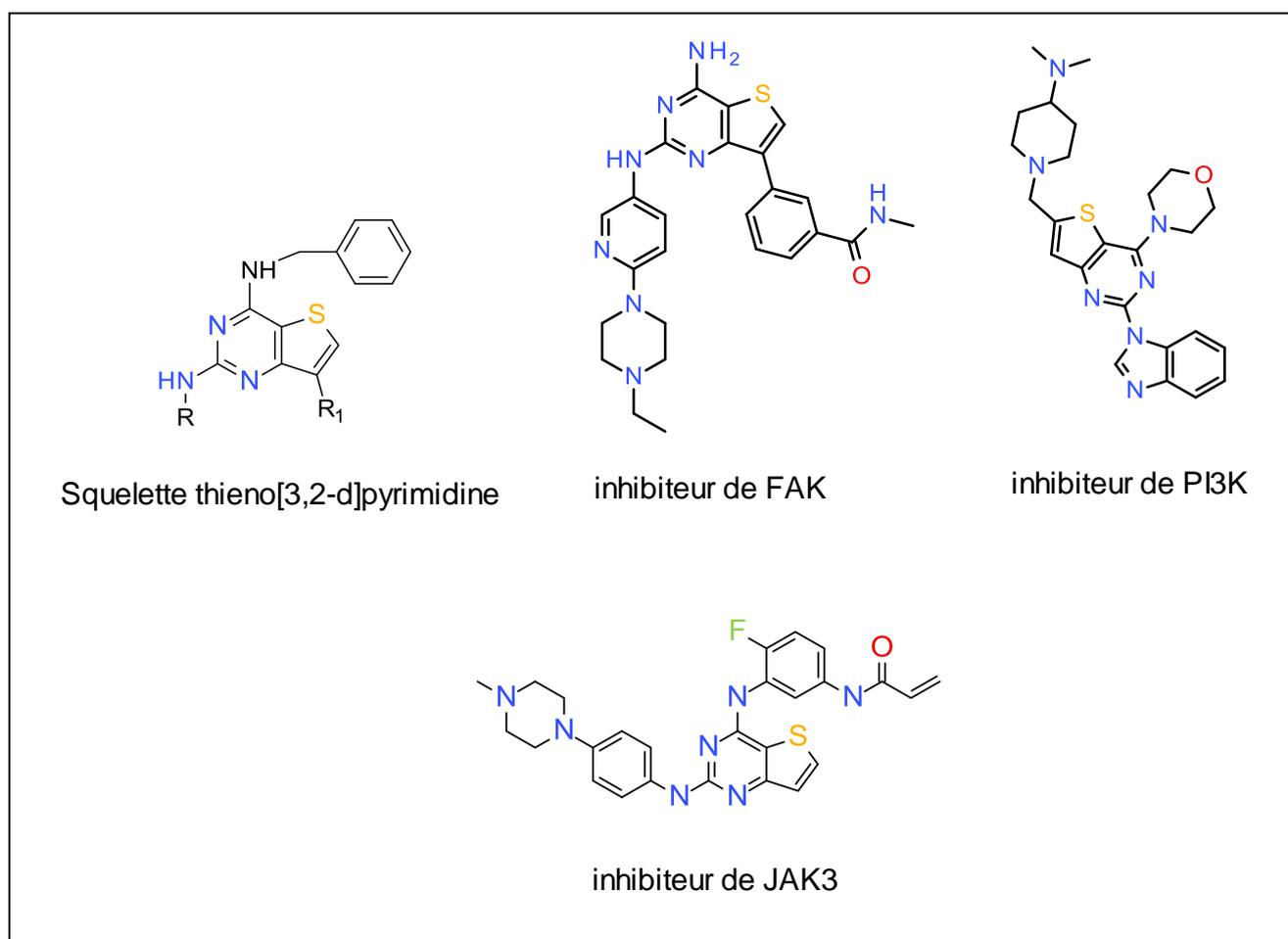
Schéma 30 : bioisostère de la (*R*)-roscovitine<sup>45</sup>

Tableau 11 : Activité du composé 7a<sup>45</sup>

	( <i>R</i> )-roscovitine	7a
IC <sub>50</sub> (SH-SY5Y)	17 $\mu$ M	10 $\mu$ M

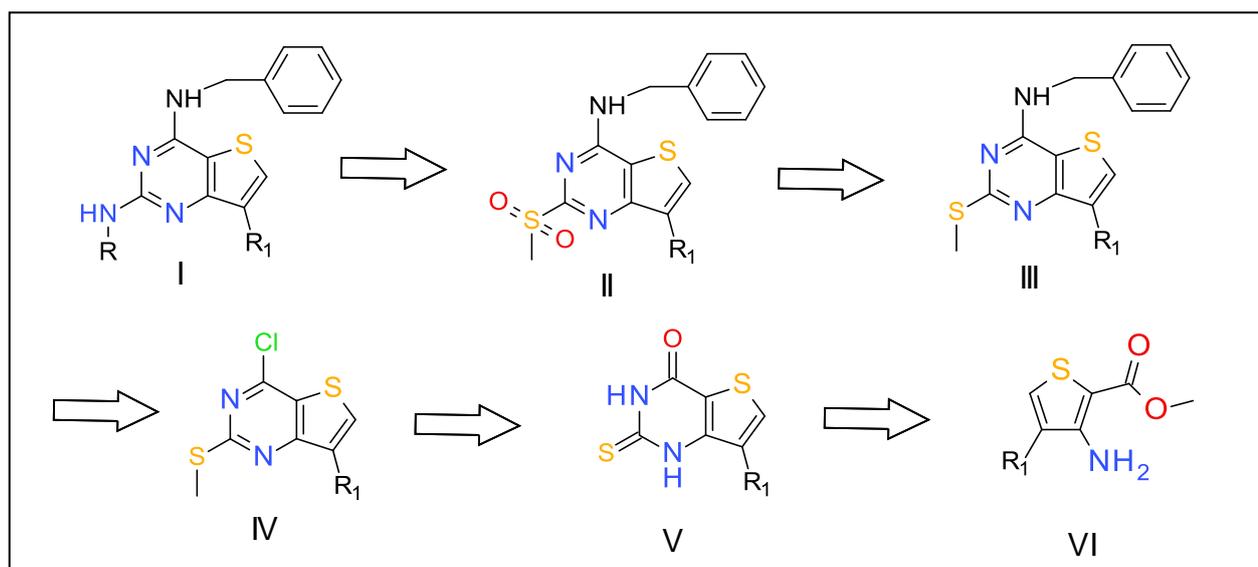
Jorda et Coll ont décrit les différents isostère identifiés de la (*R*)-roscovitine (schéma 30). Parmi les molécules citées on trouve le composé **7a** (shéma 30), qui est plus actif que la (*R*)-roscovitine sur les CDKs avec un facteur de 3 à 5. Les tests d'inhibition cellulaire SH-SY5Y ont montré aussi sa supériorité (tableau 11). Le composé **7a** ne renferme pas un azote en position 9, ainsi que d'autres isostères évoqués dans le schéma 30. L'azote en position 9 pourrait être supprimé et un nouvel hétéroatome pourrait intégrer le cycle, tels que le soufre en position 7 (schéma 31). Ce nouveau squelette « thieno[3,2-d]pyrimidine » (schéma 31), a été décrit récemment et très peu comme un inhibiteur de kinase tels que FAK<sup>109</sup>, PI3K<sup>110, 111</sup> et JAK3<sup>112</sup>.

Dans le cadre de l'identification de nouveaux inhibiteurs de CDK, nous avons envisagé la synthèse d'analogues de la (*R*)-roscovitine, en modifiant le squelette purinique par une thieno[3,2-d]pyrimidine.



*Schéma 31 : molécules thieno[3,2-d]pyrimidine décrites dans la littérature*

## 2. Rétrosynthèse

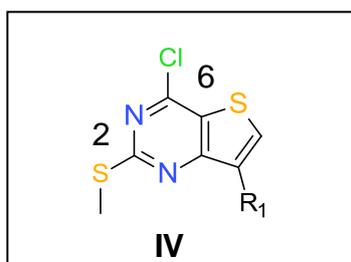


*Schéma 32 : Rétrosynthèse du squelette thieno[3,2-d]pyrimidine*

La voie rétro-synthétique montre que les produits *I* recherchés (analogues de la (*R*)-Roscovitine) peuvent être préparés en 3 étapes à partir du dérivé 4-chloro-2-methylsulfanyl-thieno[3,2-d]pyrimidine *IV*, via une réaction de  $S_NAr$ , d'oxydation suivie d'une nouvelle  $S_NAr$ . Le composé *IV* quant à lui, peut être préparé à partir du dérivé 2-thioxo-1H-thieno[3,2-d]pyrimidin-4-one *V* par une S-méthylation suivie d'une chloration. La préparation de ce dernier, peut être réalisée en 3 étapes à partir du composé methyl-3-amino-thiophène-2-carboxylate *VI*.

## 3. Synthèses de composés thieno[3,2-d]pyrimidine à partir du dérivé chloro-thiométhane

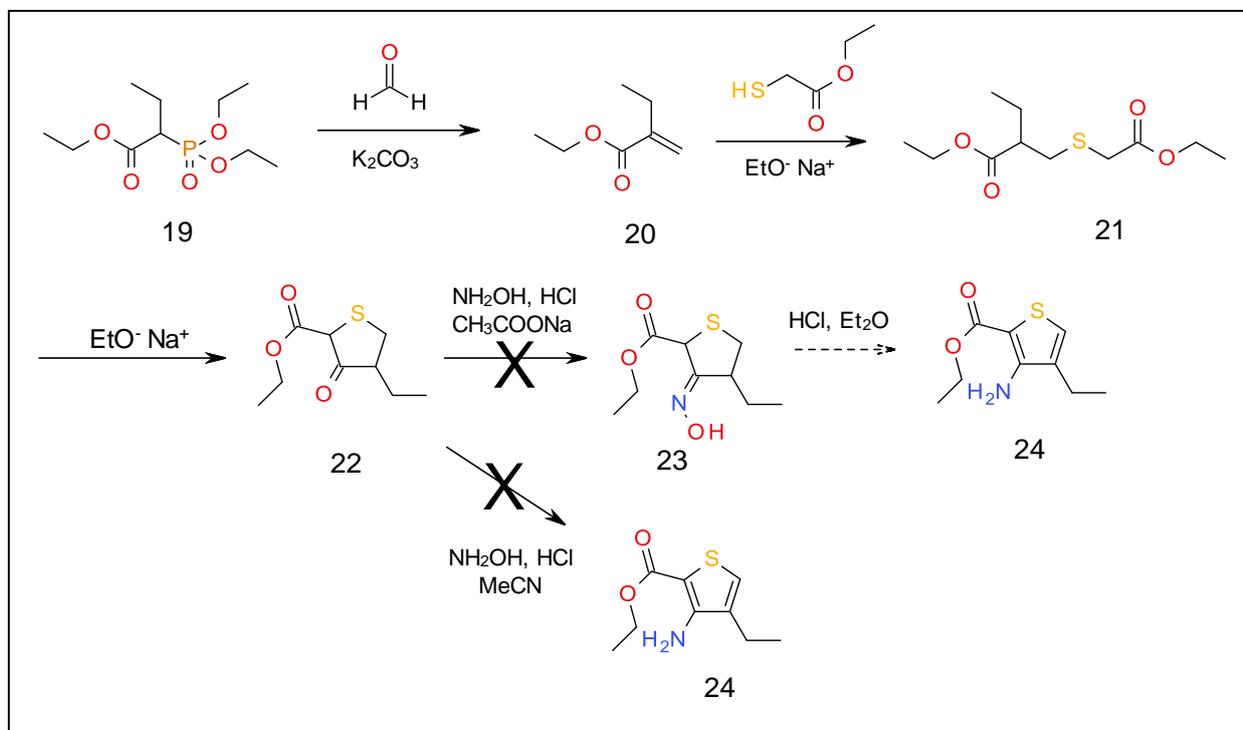
L'obtention du dérivé chloro-thiométhyle *IV* (schéma 33), nous donnera la possibilité de synthétiser différents composés en variant les substituants en position 2 et 6.



*Schéma 33 : dérivé chloro-thiométhyle*

### 3.1. Synthèse des composés de structure générale VI

#### 3.1.1. Synthèse de l'intermédiaire 2- carboxylate d'éthyle 3-amino 4-ethyl thiophène



*Schéma 34 : Tentative de synthèse de l'intermédiaire 2- carboxylate d'éthyle 3-amino 4-ethyl thiophène (24)*

Le produit **20** n'est pas commercialisé, on l'a synthétisé par une condensation d'Horner Wadsworth Emmons entre le phosphonate **19** et le formaldéhyde<sup>113</sup> (schéma 34).

La synthèse du cycle 3-oxotétrahydrothiophène-2 carboxylate d'éthyle **22** a été largement décrite dans la littérature, il est obtenu par cyclisation en milieu basique du 2-éthyl 3-(éthoxycarbonylméthylthio) propanoate d'éthyle **21**<sup>114</sup>.

Ainsi nous avons obtenu le produit **22** le 4-éthyl-3-oxo-tetrahydrothiophene-2-carboxylate d'éthyle suite à la cyclisation du dérivé **21**, ce dernier est le résultat d'une addition 1,4 du thiol de l'éthyl 2-sulfanylacétate sur la double liaison du 2-méthylène butanoate d'éthyle **20**.

L'étape de transformation de l'oxothiolane **22** en aminothiophène **24** n'a pas abouti, malgré qu'on a essayé deux protocoles différents décrits dans la littérature<sup>114, 115</sup>.

### 3.1.2. Synthèse du méthyl 3-amino-4-bromo-thiophène-2-carboxylate (26)

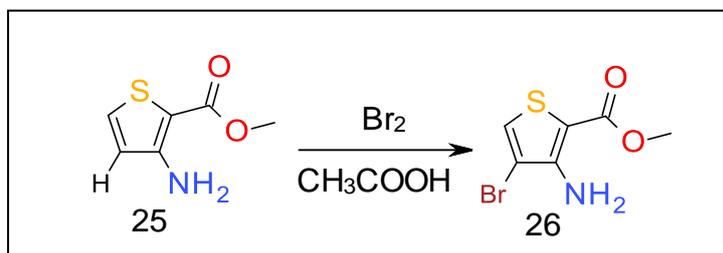


Schéma 35: Voie de synthèse du méthyl 3-amino-4-bromo-thiophène-2-carboxylate 26

Dans un deuxième temps, suite à l'échec de la synthèse de l'intermédiaire 2-carboxylate d'éthyle 3-aminothiophène **24** (schéma 34), nous sommes partis du dérivé aminothiophène **25** commercialisé le «méthyl 3-aminothiophène-2-carboxylate». On a réussi à introduire un groupement bromé en position 4<sup>116</sup>, en présence Br<sub>2</sub> et d'acide acétique à TA ce qui nous a conduit au méthyl 3-amino-4-bromo-thiophène-2-carboxylate **26**.

La SE<sub>Ar</sub> par le brome en position 4 donne des rendements médiocres de l'ordre 20%. Cette SE<sub>Ar</sub> est normalement favorisée en α du soufre puisque cette position donne le complexe de Whealand le plus stable, mais grâce à la présence de groupement donneur NH<sub>2</sub> *ortho* orienteur, on a obtenu le dérivé **26**.

Ce groupement halogéné va permettre de créer une diversité en greffant différents substituants par couplage, tels que la synthèse décrite dans le paragraphe suivant.

### 3.1.3. Synthèse du méthyl 3-amino-4-isopropényl-thiophène-2-carboxylate (27)

Pour obtenir le dérivé **27** (schéma 36), nous avons réalisé un couplage de Suzuki<sup>117</sup>, ce qui nous a permis d'intégrer un groupement isopropényl en position 4. On peut envisager de greffer d'autre groupement moyennant ce couplage.

Le dérivé halogéné, le méthyl 3-amino-4-bromo-thiophène-2-carboxylate **26** réagit avec l'ester boronique le 2-isopropényl-4,4,5,5-tetraméthyl-1,3,2-dioxaborolane en présence du catalyseur au palladium le tétrakis(triphénylphosphine) palladium (0). Cette réaction est extrêmement sensible à la présence d'oxygène, il est impératif de la conduire sous

atmosphère inerte d'azote, par contre grâce à la présence de la triphénylphosphine, cette réaction est moins sensible à la présence de l'eau.

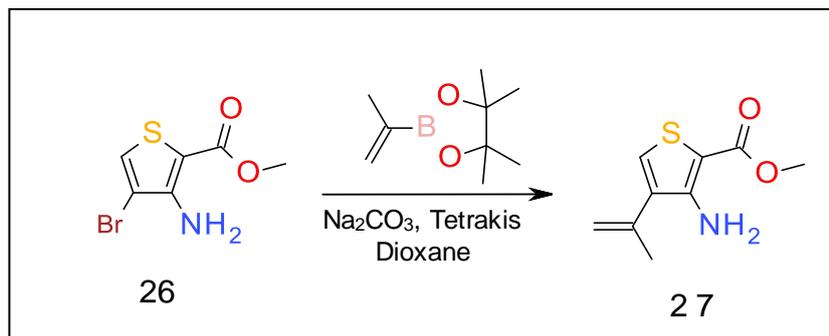


Schéma 36: Voie de synthèse du methyl 3-amino-4-isopropenyl-thiophene-2-carboxylate

## 3.2. Synthèse de composé de structure générale III

### 3.2.1. Synthèse des composés 4-chloro-2-méthylsulfanyl-thiéno[3,2-d]pyrimidine 32 (a-b-c)

#### 3.2.1.1. Obtention du cycle thieno[3,2-d]pyrimidin-4-one

Plusieurs réactions de cyclisation ont été essayés pour former le cycle 2-thioxo-1H-thieno[3,2-d]pyrimidin-4-one. En effet, on a fait réagir le produit bromé **26** avec la thiourée puis l'éthylisothiourée, mais aucune cyclisation n'a été observée même en variant les conditions opératoires<sup>118, 119</sup>.

Pour aboutir à cette cyclisation, on s'est basé sur une méthode en deux étapes décrite par Song et coll<sup>120, 121</sup> (schéma 37). Dans la première étape le produit de départ est opposé en réaction avec l'isothiocyanate de benzoyle dans l'acétone à reflux.

La deuxième étape de la cyclisation a été réalisée sous reflux d'éthanol en milieu basique (schéma 37).

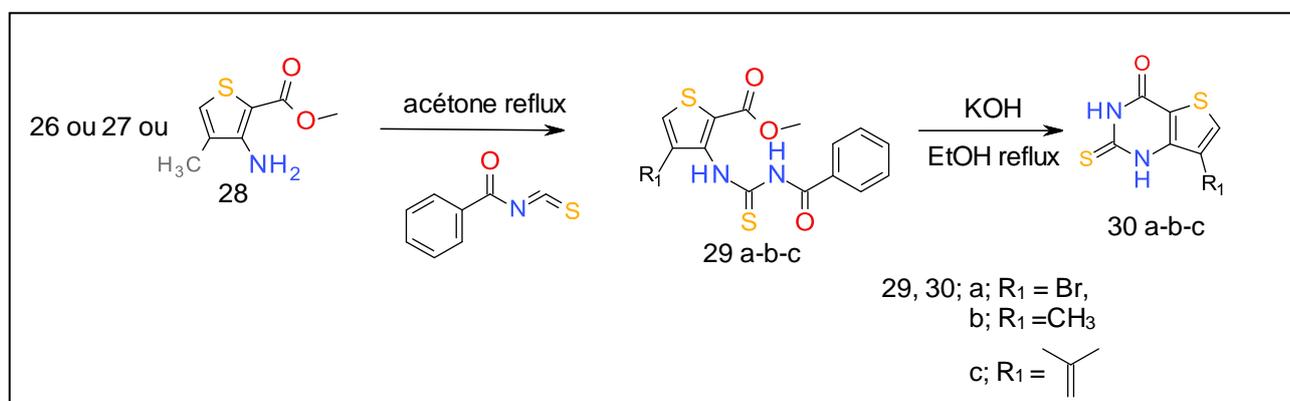


Schéma 37: Voie de synthèse de la 2-thioxo-1H-thiéno[3,2-d]pyrimidin-4-one 30 (a- b- c)

### 3.2.1.2. Fonctionnalisation du cycle thieno[3,2-d]pyrimidin-4-one

Afin d'obtenir les composé **32 (a-b-c)**, nous avons procédé dans un premier temps au traitement des dérivés 2-thioxo-1H-thieno[3,2-d]pyrimidin-4-one **30 (a-b-c)** par de l'iodométhane en présence d'une solution aqueuse de NaOH <sup>121, 122</sup>, pour obtenir le thio-méthyl **31** correspondant (schéma 38). Les conditions opératoires doivent être suivies avec soin car la formation du produit de double-alkylation est possible (S et O-méthyl). Dans un second temps, nous avons engagé les composés **31 (a-b-c)** dans une réaction de chloration en présence d'oxychlorure de phosphore POCl<sub>3</sub> et de la *N,N* diéthylaniline dans l'acétonitrile<sup>45</sup>. Les produits finaux **32 (a-b-c)** ont été isolés avec un bon rendement qui varie de 62% à 92%. Un autre protocole breveté par Benish et coll <sup>123</sup>, en utilisant du POCl<sub>3</sub> en excès comme solvant et réactant et en absence de diéthylaniline conduirait au produits **32 (a-b-c)** avec un rendement de l'ordre de 80%.

Ainsi, nous avons développé un procédé simple et efficace de synthèse en 4 étapes (schéma 37 et 38) du « scaffold » pyrimidothiophène, chloré en position 6 et thio-méthylé en position 2.

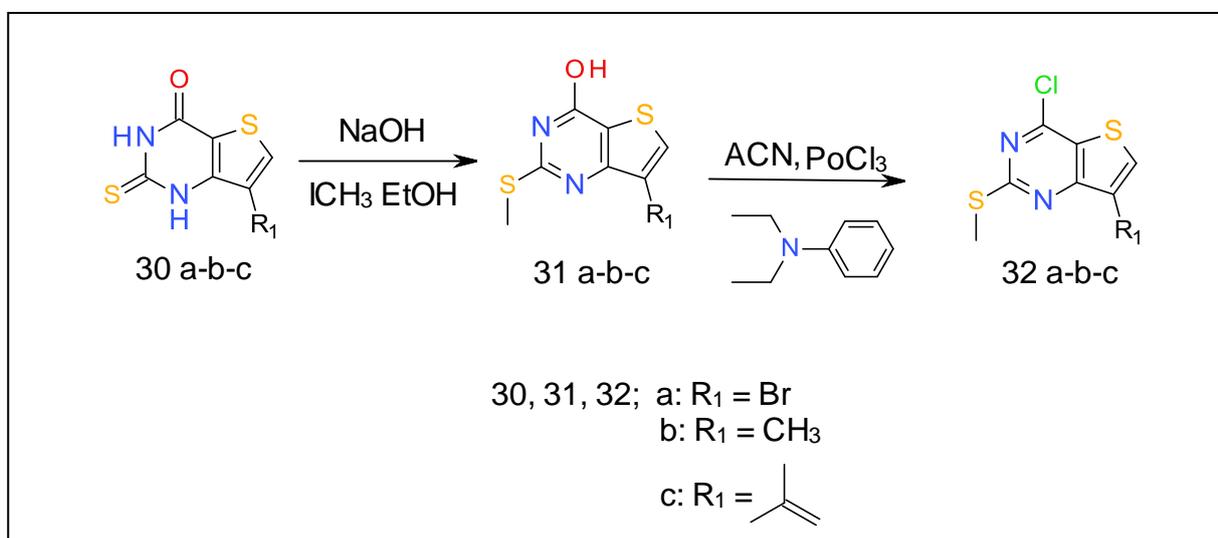
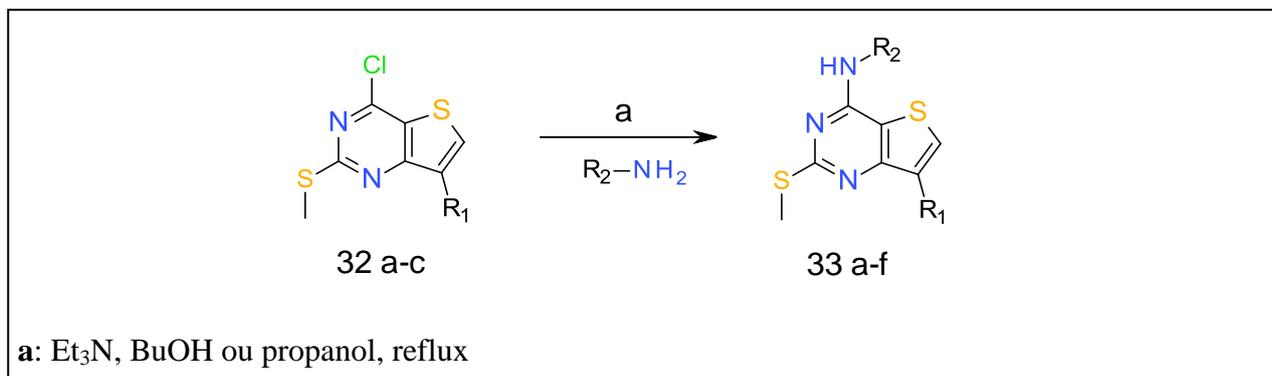


Schéma 38: Obtention des dérivés **32 (a-b-c)**

### 3.2.2. Etape de $S_NAr$ de 4-chloro-2-methylsulfanyl-thieno[3,2-d]pyrimidine (**32**) en position 6 par différentes amines

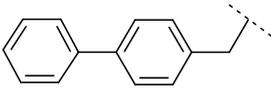
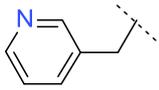
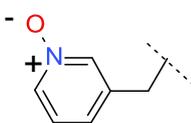
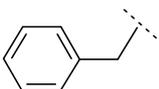
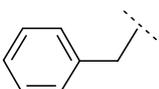
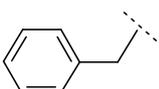
Une fois les produits de squelette thieno[3,2-d]pyrimidine **32** ont été isolés, nous avons ensuite procédé à la  $S_NAr$  de ces derniers en position 6 par différentes amines (Schéma 39, tableau 12).



*Schéma 39: Voie de synthèse des composés aminés 33*

Ces aminations sont conduites en présence de triéthylamine dans le propanol ou le butanol à reflux<sup>124</sup>. La durée du chauffage à reflux a été optimisée au laboratoire lors de la synthèse de la Roscovitine et son analogue le CR8<sup>104</sup>. Par la suite, les produits **33 (a, b, c)** (Tableau 12), ont été obtenus après reflux de 3 h. Malgré que les rendements d'obtention de la (*R*)-roscovitine et le CR8 étaient élevés, respectivement de 95% et 93%<sup>104</sup>, nos rendements sont nettement inférieurs allant de 48% à 76%. Pour cela, lors de la synthèse des produits **33 (d,e,f)** on a chauffé à reflux pendant un jour. Ainsi, ces derniers produits ont été obtenus avec de bons rendements, supérieurs à 90%.

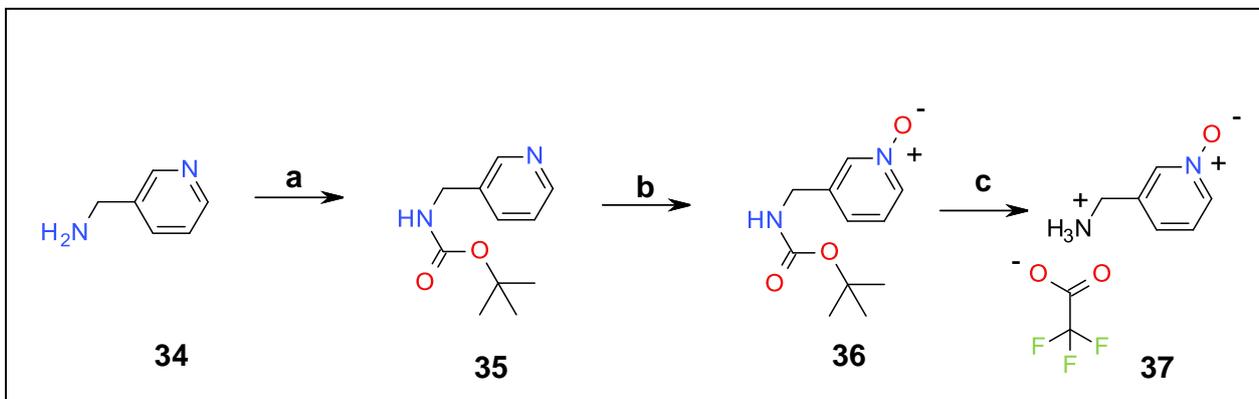
**Tableau 12 : les différents produits 33**

Composé	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Durée du reflux	Rdt
33a	Br		3 h	64%
33b	Br		3h	76%
33c	Br		3h	48%
33d	Br		20 h	97%
33 e	CH <sub>3</sub>		20h	97%
33f			24h	90%

La phényl-benzylamine, la 3-picolylamine et la benzylamine sont des amines commerciales, alors que la 3-picolylamine N-oxyde n'est pas commercialisée.

Pour obtenir le produit **33c**, la 3-picolylamine N-oxyde a été préparée à partir de la 3-picolylamine (schéma 40).

La fonction amine de la 3-pyridylmethanamine **34** est d'abord protégée par un groupement BOC<sup>125</sup>. Puis, nous avons poursuivi la synthèse par une oxydation en utilisant du mCPBA dans du DCM<sup>126</sup>. Enfin, nous avons déprotégé la fonction amine du produit **36** par du TFA<sup>127</sup> pour obtenir la 3-picolylamine N-oxyde **37** sous forme de sel de TFA (Schéma 40).



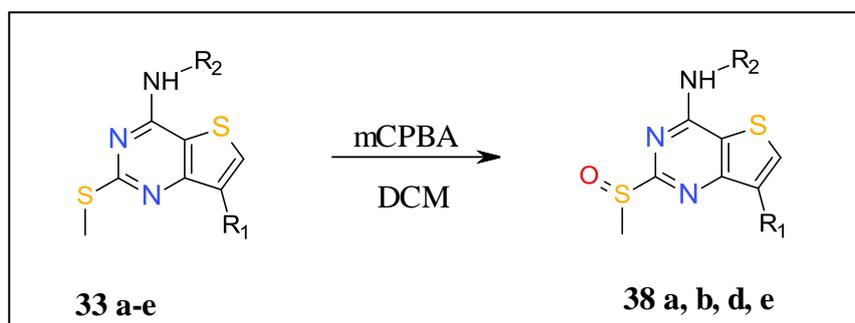
a: BOC<sub>2</sub>O, Et<sub>3</sub>N, Dioxane ; b : mCPBA, DCM ; c : TFA, DCM.

*Schéma 40: Voie de synthèse du 1-oxypyridin-1-ium-3-yl)methylammonium;2,2,2-trifluoroacetate*

### 3.3. Synthèse des produits finaux de structure I :

#### 3.3.1. L'oxydation du thio-méthyle

Afin de diversifier les substituants au niveau de la position 2 des dérivés **33 (a-e)**, nous avons transformé le groupement thio-méthyle en un bon groupement partant. L'oxydation du thio-méthyle donne le sulfoxyde correspondant qui est un bon nucléofuge (Schéma 41).

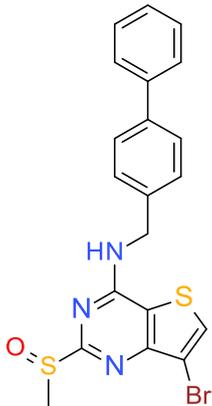
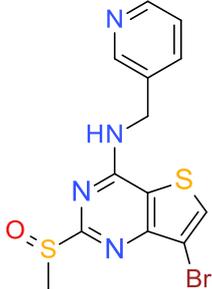
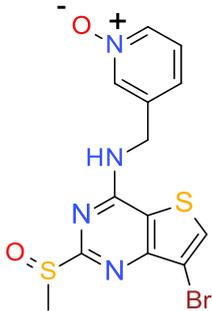
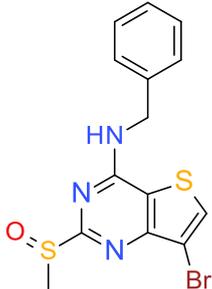
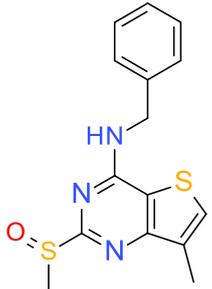


*Schéma 41 : oxydation du groupement thio-méthyle par le mCPBA*

L'oxydation peut être réalisée sous l'action de différents oxydants tels que : hydrogénéopersulfate de potassium (Oxone®), acide méta-chloroperbenzoïque (m-CPBA)...

L'oxydation des composés **33(a-e)** a été envisagée par le mCPBA à une température contrôlée de 0°C dans le DCM <sup>128</sup>.

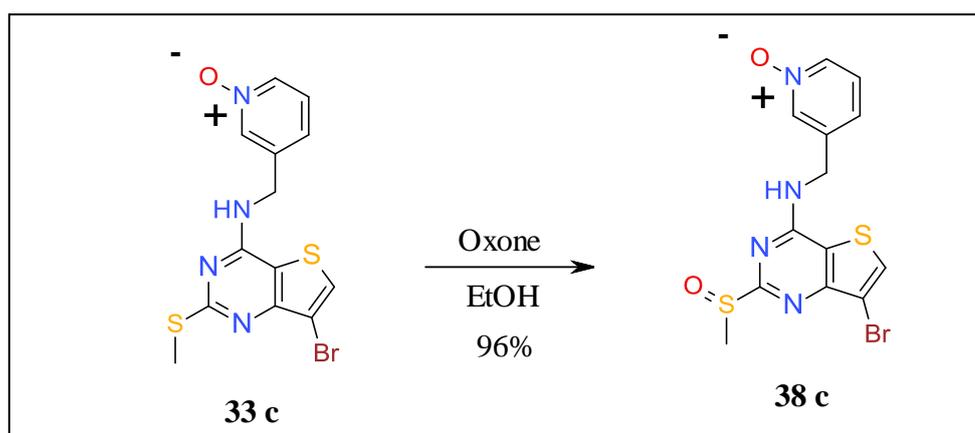
**Tableau 13 : Produits 38 obtenus par oxydation des produits 31 par le mCPBA**

Produit	Structure	Rendement
38a		94%
38b		38%
38c		0%
38d		92%
38 e		90%

L'oxydation du composé **33a** nous a permis d'obtenir le produit correspondant **38a** (tableau 13) avec un rendement de 94%. La fonction sulfoxyde est identifiée grâce à son déplacement chimique caractéristique à 2.9 ppm, alors que la fonction sulfonyle apparait aux alentours de 3.7 ppm.

De manière comparable, l'oxydation du composé **33b** nous a conduit au composé **38b** (tableau 13), mais avec faible rendement 38%. L'analyse du composé **38b** par RMN nous a confirmé que seul le groupement thiométhyle a été oxydé. En effet, les déplacements chimiques des protons de la pyridine n'ont pas été modifiés.

En revanche, dans les mêmes conditions que pour **33a** et **33b**, l'oxydation du produit **33c** a été infructueuse. Aucune trace du produit souhaité n'a été détectée et cette réaction s'est soldée par la seule récupération du produit de départ. Ce résultat s'explique probablement par l'insolubilité du composé **33c** dans le DCM. Cet échec nous a alors poussés à envisager l'oxydation du produit **33c** par l'oxone, car celle-ci est conduite dans l'éthanol (Schéma 42).



*Schéma 42: Voie d'oxydation du composé 33c*

Ainsi, le traitement du dérivé **33c** par l'oxone dans l'éthanol à 60°C pendant 12h<sup>129</sup>, nous a menés au produit **38c** avec un très bon rendement de 96%.

Les produits **33d** et **33e** ont été oxydés par le mCPBA comme les produits **33a** et **33b**, leurs produits correspondants **38d** et **38e** (tableau 13) ont été isolés avec de bon rendement, respectivement 92% et 90%.

### 3.3.2. Etape de $SN_{Ar}$ en position 2 par différents amino-alcools

Les composés sulfoxyde **38a-e** obtenus ont été engagés dans des  $SN_{Ar}$  avec différents amino-alcools (Schéma 43). Dans un premier temps, notre choix s'est porté sur le D-thréoninol car sa structure semble intéressante d'un point de vue RSA : des liaisons hydrogènes pourraient éventuellement s'établir avec des molécules d'eau présentes dans le site de fixation de l'ATP ou avec des acides aminés du site actif de la kinase. Nous commençons alors par introduire cet amino-alcool sur les composés **38 (a-c)** par chauffage à 160°C pendant 6h<sup>126</sup>.

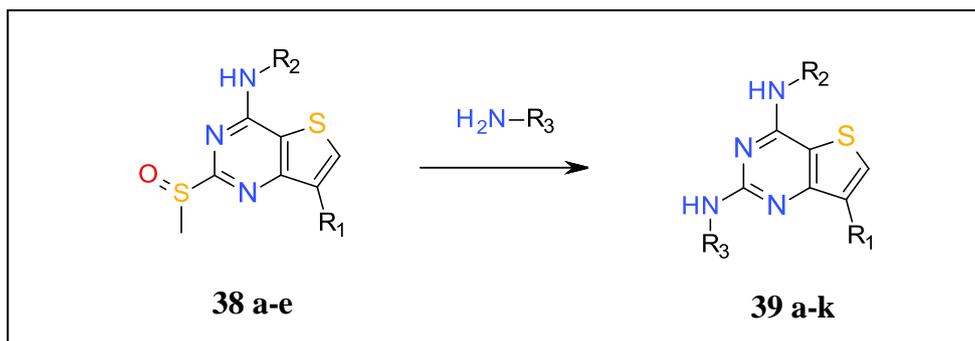


Schéma 43:  $SN_{Ar}$  sur les composés **38** par les amino-alcools

Afin de diversifier les structures, nous avons substitué le composé **38** par différents amino-alcools décrits dans le tableau : le 2-amino-1-butanol de configuration (*S*) et (*R*), le sérinol (2-aminopropane-1,3-diol), le D-thréoninol et le D et L-leucinol.

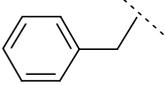
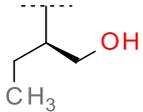
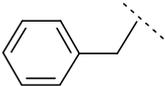
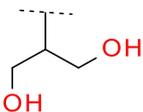
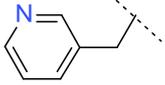
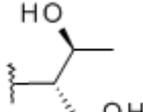
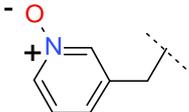
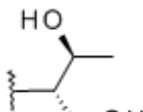
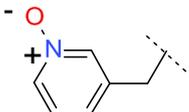
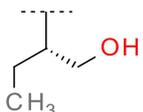
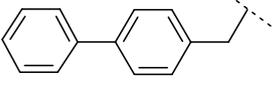
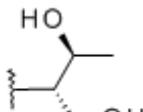
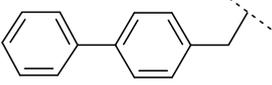
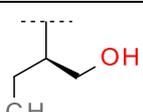
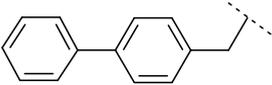
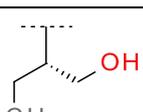
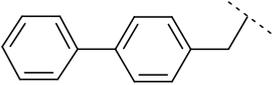
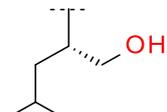
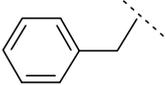
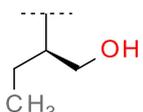
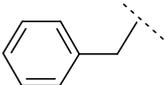
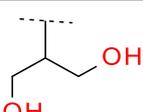
Le tableau ci-dessous présente les différents produits obtenus, ainsi que leurs rendements, nous isolons les produits **39** finaux avec des rendements moyens allant de 26% à 64% (tableau 14).

La fonctionnalisation de la position 2 du composé **38b** a donné le produit **39c** avec un faible rendement de 26% (tableau 14).

Lors de la  $SN_{Ar}$  sur le composé **38c**, on a chauffé à 140°C, on s'est demandé si le chauffage pourrait éliminer la liaison N-O. L'analyse par RMN, ne permet pas de confirmer si la liaison N-O a résisté ou non, par la suite une analyse par le spectre de masse a été réalisée sur les produits **39d** et **39e**, le spectre de masse confirme la présence du noyau pyridine oxyde.

Les produits **39d** et **39e** (tableau 14) ont été obtenus avec un rendement satisfaisant avoisinant 55%.

Tableau 14 : Obtention des produits finaux 39

Composé	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Rdt
39a	Br			35%
39b	Br			64%
39c	Br			26%
39d	Br			55%
39e	Br			53%
39f	Br			48%
39g	Br			34%
39h	Br			50%
39i	Br			60%
39j	CH <sub>3</sub>			35%
39k	CH <sub>3</sub>			50%

### 3.3.3. Couplage de Suzuki en position 9

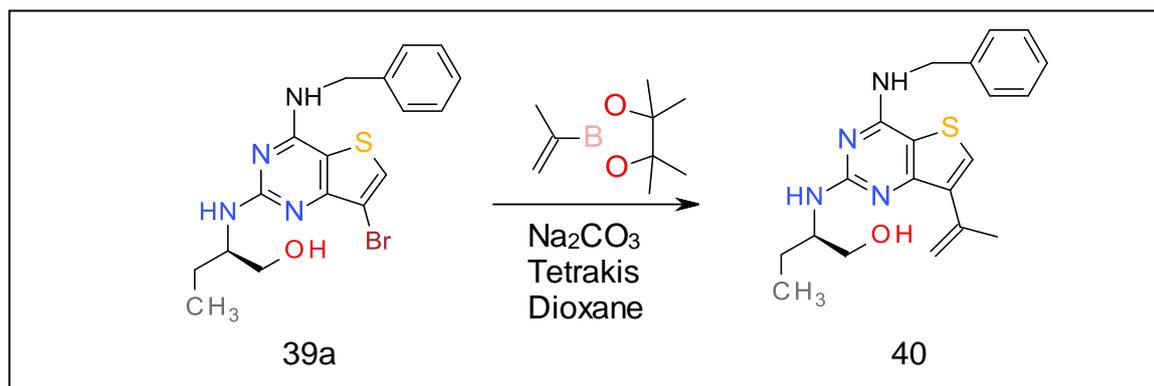


Schéma 44 : Couplage de Suzuki

Le couplage de Suzuki a permis l'introduction d'un groupement isopropényle en position 9 du dérivé **39a** (schéma 44), le composé **40** a été obtenu avec un bon rendement 95%.

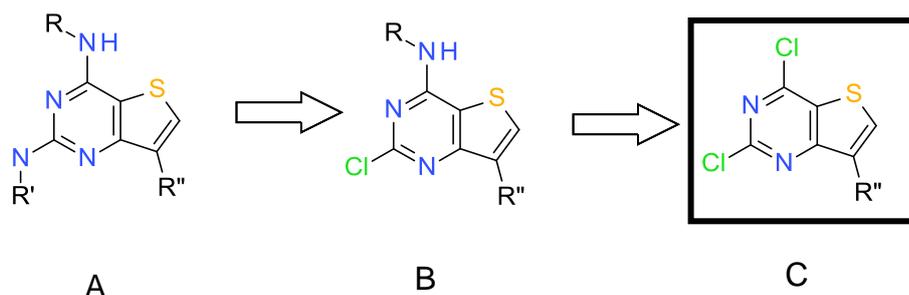
Ce couplage nous permettra de diversifier les produits et d'identifier les groupements les plus actifs après leurs évaluations biologiques.

## 4. Synthèse des dérivés thieno[3,2-d]pyrimidines à partir du 7-bromo-2,4-dichloro-thieno[3,2-d]pyrimidine

### 4.1. Synthèse du 7-bromo-2,4-dichloro-thieno[3,2-d]pyrimidine

Au cours de cette thèse nous avons pu optimiser les voies d'accès aux thieno[3,2-d]pyrimidines. Ainsi, la synthèse des intermédiaires chlorés thiométhyle **32 (a-b-c)** a été un élément clef qui a permis l'introduction de groupements nucléophiles.

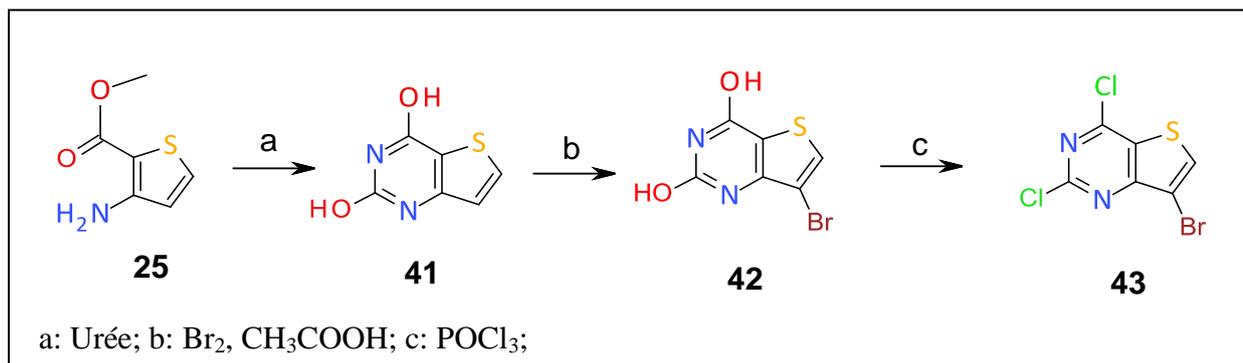
Cependant la stratégie que nous avons développée présente des limites de synthèse, notamment, au niveau de l'introduction en position 2 par S<sub>N</sub>Ar de certaines amines. Nous avons donc décidé d'élaborer une nouvelle stratégie qui pourrait présenter l'avantage d'être plus convergente. Il s'agit de synthétiser un dérivé 2,4-dichloro-thieno[3,2-d]pyrimidine **C** (Schéma 45), produit clef pour les S<sub>N</sub>Ar en position 2 et 6.



**Schéma 45: Autre voie de rétro-synthèse possible pour les analogues thieno[3,2-d]pyrimidine**

La synthèse de la 7-bromo-2,4-dichloro-thiéno[3,2-d]pyrimidine **41** résulte d'une cyclisation intermoléculaire entre le thiophène amine **25** et l'urée<sup>130</sup>, qui sont commerciaux. Le produit de cyclisation **41** est obtenu avec un bon rendement et est engagé dans une réaction de bromation en présence de Br<sub>2</sub> et de l'acide acétique à 110°C<sup>131</sup> pour conduire au composé **42**.

Ensuite, le composé **42** a fait l'objet d'une double chloration des fonctions amides au POCl<sub>3</sub> pour donner le produit dichloré **43** avec un rendement de 90%.

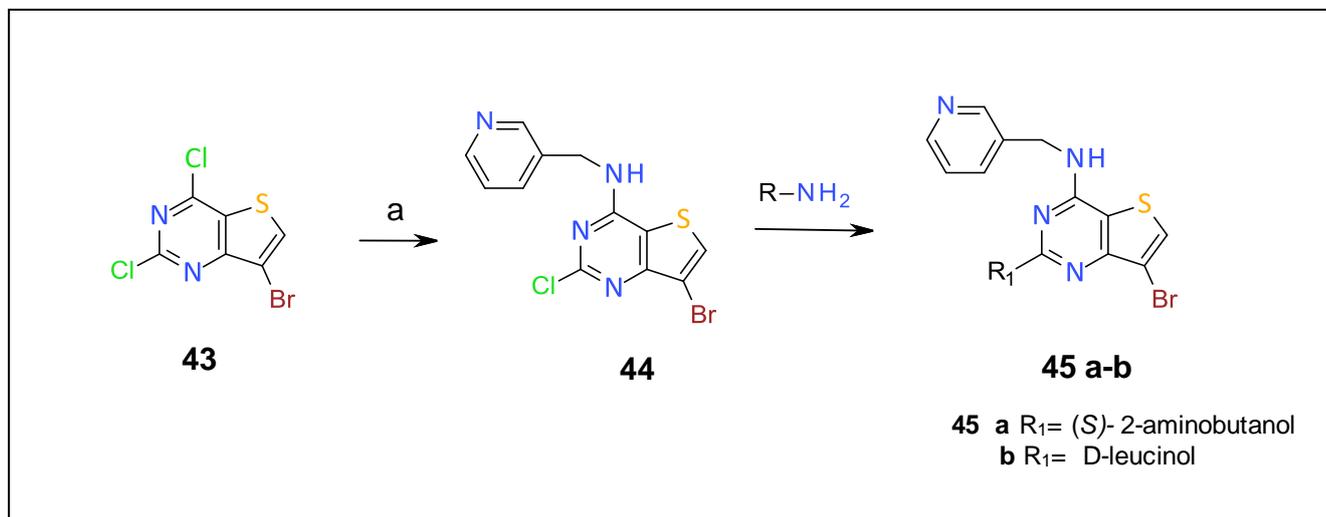


**Schéma 46: Synthèse de la 7-bromo-2,4-dichloro-thiéno[3,2-d]pyrimidine**

## 4.2. Synthèse des dérivés thieno[3,2-d]pyrimidine :

Une fois la 7-bromo-2,4-dichloro-thiéno[3,2-d]pyrimidine **43** a été isolé, des amines et aminoalcools seront introduits par S<sub>N</sub>Ar ou par couplage de Buchwald en position 2 et 6. Cette voie de synthèse nous permettrait ainsi de diversifier les substituants en partant d'un seul et unique intermédiaire le dérivé trihalogéné **43**.

La S<sub>N</sub>Ar du composé **43** en position 6 par le méthylpyridylamine a abouti au composé **44** avec un bon rendement de 85% (schéma 47). Ensuite, deux aminoalcools ont été greffés en position 2 le (S)-2-aminobutanol et le D-leucinol en chauffant à 140°C pendant 8h.

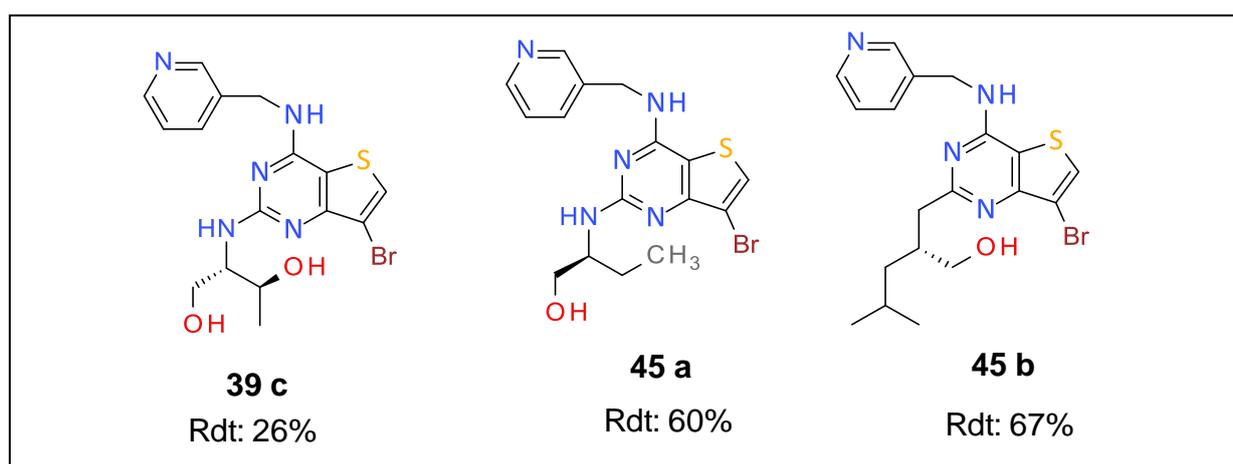


a: picolyl-amine, MeOH;

**Schéma 47: Synthèse des dérivés thieno[3,2-d]pyrimidine à partir de la 7-bromo-2,4-dichloro-thieno[3,2-d]pyrimidine**

Les deux produits **45a-b** ont été obtenus avec un rendement respectif de 60% et 67%, ces rendements sont nettement meilleurs que le rendement d'obtention du composé **39c** décrit dans le tableau 14, qui a été estimé à 26% (schéma 48).

La synthèse de composé thieno[3,2-d]pyrimidine à partir du dérivé trihalogéné **43** offre de meilleurs rendements par rapport à la voie de synthèse à partir des intermédiaires chlorés thiométhyle **32**.



**Schéma 48: Rendements des produits 39c, 45a et 45b**

## 5. Evaluation biologique

### 5.1. Résultats

Différents produits de cette série thiéno[3,2-d]pyrimidine sont évaluée sur un panel de protéines kinases : CDKs, GSK-3, CK1, DYRK1A, DYRK1B et DYRK2 ainsi que sur des cellules tumorales humaines du neuroblastome de type SH-SY5Y afin d'estimer leur activité antiproliférative. Les constantes d'inhibition ( $IC_{50}$ ) sont la moyenne de trois expériences et sont exprimées en  $\mu\text{M}$ . L'activité biologique des composés et l'analyse des résultats observés sont décrits dans le Tableau ci-dessous (tableau 15).

**Tableau 15 : Activités biologiques des dérivés thiéno[3,2-d]pyrimidine développés (-) : non testés sur ces kinases.**

Pdt	Structure	$IC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	CDK1	CDK2	CDK5	CDK9	CK1	CLK1	Dyrk1A	Dyrk1B	Dyrk2	GSK3	SHSY5Y
<b>Ros</b>			0.33	0.21	0.28	0.23	60	4	4.3	-	-	3	17
<b>33f</b>			>10	8,1	2,9	7,8	>10	>10	>10	>10	-	-	>10
<b>39a</b>			0,28	0,17	1,2	3,9	-	-	7,9	4,5	8,3	4,2	>10
<b>39b</b>			1,6	1,4	4,5	$\geq 10$	-	-	>10	$\geq 10$	>10	>10	>10
<b>39c</b>			0,79	0,28	1,4	2,1	>10	>10	>10	-	-	3,2	-

<b>39e</b>		0,92	0,32	3,1	1,6	>10	>10	>10	-	-	>10	-
<b>39f</b>		1,3	0,89	3,2	5,1	>10	>10	>10			>10	-
<b>39g</b>		1	0,48	>10	>10	>10	>10	>10	-	-	>10	-
<b>39h</b>		1,9	0,51	2,2	>10	>10	>10	>10	-	-	>10	-
<b>39j</b>		8,9	3,4	2,4	9,1	>10	>10	>10	>10	-	-	>10
<b>39k</b>		2,1	5,6	3,2	8,3	>10	>10	>10	11,5	-	-	11
<b>40</b>		-	-	-	-	-	-	-	11,5	-	-	11

Le composé **39a** présente une certaine activité sur les CDK en particulier les CDK1 et CDK2, avec des IC<sub>50</sub> respectifs de 0,28 et 0,17 µM. alors que le dérivé **39b** est inactif, pourtant il diffère du composé précédent par l'aminoalcool substitué en position 2. La substitution en 2 par le sérinol rend la molécule totalement inactive sur les kinases. D'ailleurs le composé **33f**

est inactif sur les kinases et au niveau cellulaire, l'adjonction d'un aminoalcool en 2 confère une certaine activité aux molécules.

En effet, les composés **39c**, **39e**, **39f**, **39g** et **39h** sont actifs sur CDK2. En revanche, les dérivés **39j** et **39k** sont inactifs sur les kinases.

L'activité antiproliférative a été testée. Il est à remarquer que deux produits : les **39k** et **40** ont montré une certaine activité  $IC_{50} = 11 \mu M$  sur la lignée tumorale SH-SY5Y. Ces deux produits comportent un groupement alkyle. L'activité de ces deux produits est supérieure à celle de la Roscovitine.

Compte tenu que ces composés ne sont pas actifs sur les kinases étudiées un autre mécanisme différent des CDKs pourrait expliquer ce résultat.

## 6. Conclusion et perspectives

Au cours de ce projet, nous avons pu optimiser les voies d'accès aux thieno[3,2-d]pyrimidines. Ainsi, la synthèse de l'intermédiaire thiométhyle **32** a été un élément clef qui a permis l'introduction de différents groupements nucléophiles en position 2 et 6 par des  $SN_{Ar}$ . Toutefois, certaines  $SN_{Ar}$  ont donné de mauvais rendements, ce qui nous a conduits à développer une deuxième voie de synthèse plus simple et plus rapide. En effet, nous avons synthétisé le dérivé trihalogéné **43** en trois étapes avec un bon rendement de 90%. De plus, les  $SN_{Ar}$  conduites sur ce dérivé ont donné de bons rendements contrairement à la première voie qui passe par l'intermédiaire thiométhyle.

Nous avons validé aussi la réaction de couplage de Suzuki en position 9, cette réaction va nous permettre de greffer une large diversité de groupements alkyles.

Compte tenu des résultats du premier chapitre de préparation des biarylhydroxylés, l'adjonction du phénylphénol **7** ou du thiénylphénol **13** en 6 sur ce nouveau « scaffold » a été envisagé dans un deuxième temps, après l'optimisation de l'alkyle en 9 (schéma 49).

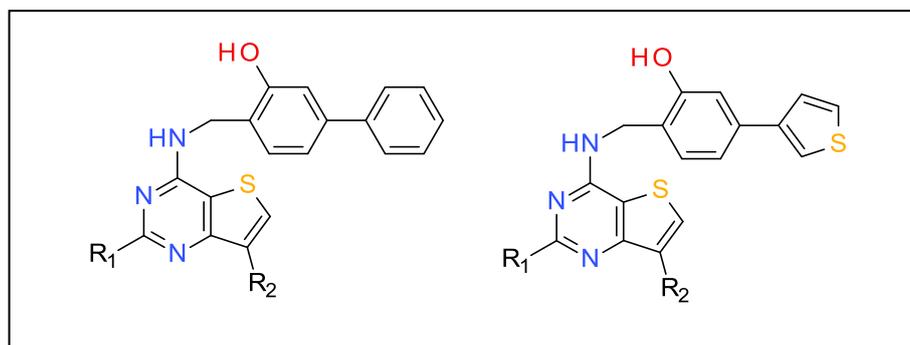


Schéma 49 :  $SN_{Ar}$  en 6 par des biarylhydroxylés

## **V. CONCLUSION GENERALE**

---

Cette thèse s'est déroulée à une période charnière des recherches de nouveaux inhibiteurs de CDK. En effet comme indiqué dans la première partie, au moins deux inhibiteurs de CDKs ont atteint la phase III des études cliniques. Il est possible qu'au moins un d'entre eux arrive sur le marché en 2015. Ce qui constituera la véritable validation de cette classe thérapeutique. Par la suite compte tenu des nombreuses activités que possèdent cette famille de molécule il est vraisemblable que des essais de phase II pour d'autres indications seront alors initiés.

L'application des inhibiteurs de CDKs à des pathologies cancéreuses se heurte à plusieurs difficultés. Ethiquement, les essais doivent être conduits chez des patients qui n'ont pas d'autre choix thérapeutiques. Ce qui, sous entend qu'on ne peut pas espérer un service médical rendu (SMR) important de la molécule de même pour l'amélioration du service médical rendu (ASMR). Pourtant, le SMR et l'ASMR sont deux paramètres décisifs pour l'octroi d'AMM. De ce fait, l'apport des CDKI dans les essais cliniques n'est pas bien palpable.

Une autre difficulté décrite est le développement de résistance d'ores et déjà. En effet, des résistances ont été observées sur des lignées cellulaires en cultures, avec le Flavopiridol. La lignée résistante sur-exprimait la cycline E mais restait cependant sensible à d'autres inhibiteurs tels que l'hymenialdisine<sup>132</sup>.

Compte tenu que les thérapeutiques ciblées anticancéreuses sont introduites en association avec les anticancéreux classiques. Le choix de l'association et du protocole clinique devraient être particulièrement réfléchi et bien fondé, afin d'obtenir un effet anticancéreux synergique.

A notre connaissance les CDKIs ne présentent pas d'action mutagène ce qui abaisse considérablement les risques et le coût de la synthèse comparée aux anticancéreux classiques. Pour lesquels le nombre d'étapes, qui mettent en jeu des molécules mutagènes, est une contrainte majeure.

Lors de la préparation de la première série de molécules, l'introduction de l'hydroxyle sur le système biarylique a conduit à des inhibiteurs relativement spécifique de la kinase CDK2 avec des  $IC_{50} \leq 50$  nM, ce qui a montré l'intérêt de cette modulation. Ces activités puissantes se retrouvent sur les lignées cellulaires tumorales.

Certaines molécules seront présentées à des physico-chimistes pour réaliser des travaux de modélisation afin de comprendre si l'accroissement de l'activité est plutôt lié à une interaction supplémentaire avec les kinases ou s'il s'agit d'un effet électronique. La détermination de la structure cristalline du complexe molécule-CDK2 est en cours et est susceptible d'orienter vers de nouveaux inhibiteurs.

L'activité antiproliférative élevée du dérivé **17b** conduit à envisager la conception d'inhibiteurs mixtes comportant deux éléments biologiques actifs et éventuellement l'association de deux mécanismes d'actions.

Au cours de cette thèse, nous avons pu développer dans une deuxième partie un nouveau squelette (scaffold) thieno[3,2-d]pyrimidines. Dont les voies d'accès a été optimisée par la synthèse de l'intermédiaire trihalogéné **43** qui a permis *via* la  $S_NAr$  l'introduction de différents groupements en position 2 et 6.

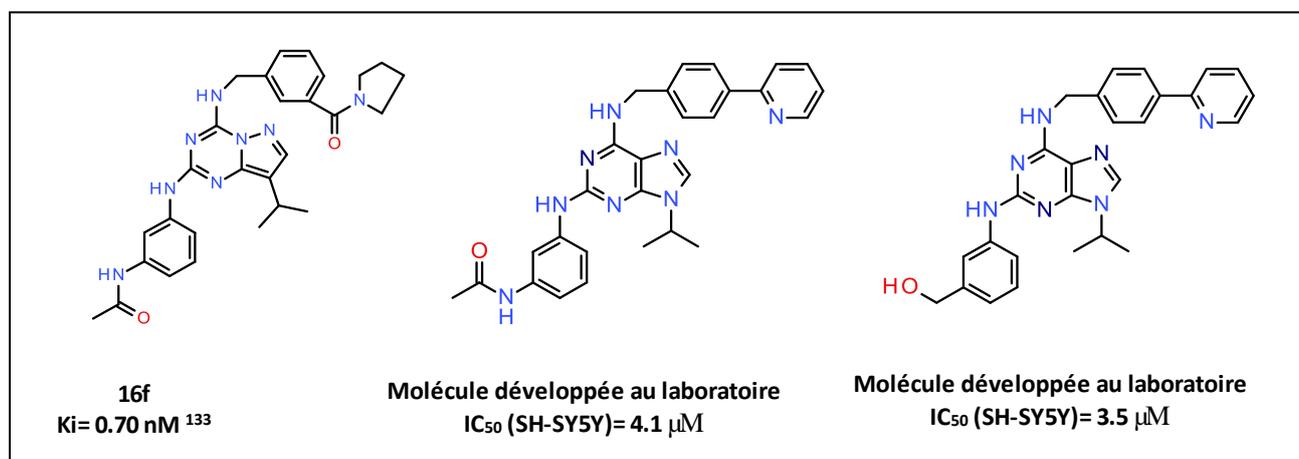
Nous avons remarqués que les molécules développées avec un brome en position 9 sont plus actives sur les kinases que celles portant le méthyle et l'isopropylène qui ont montré une activité antiproliférative.

Les évaluations de ces dernières molécules ne sont pas totalement terminées. Ces molécules sont moins puissantes que les purines sur les CDKs mais agissent au niveau d'autres kinases. Pour cela, une molécule de cette série sera évaluée dans un test de sélectivité sur un large panel de kinase afin de rechercher une activité sur d'autres kinases et ainsi comprendre le mécanisme d'action antiproliférative de ces molécules.

Il est envisagé de poursuivre l'optimisation des molécules de ce squelette en développant des dérivés comportant un groupement alkyle en position 9.

Puis, nous envisageons d'introduire en position 2 des dérivés anilines, en se basant sur les données de la littérature<sup>133</sup> et les travaux réalisés au sein de notre laboratoire (schéma 50).

Ce groupement aniline permettra de cibler d'autres kinases tels que les protéines kinases CK2, qui sont impliquées dans la pathologie cancéreuse et l'apparition de métastases. Ainsi, nous pourrions obtenir des inhibiteurs mixtes de CDK et CK2, en vue d'obtenir une action anti-proliférative plus efficace.



**Schéma 50 : Inhibiteurs agissant sur CK2**

# **VI. PARTIE EXPERIMENTALE**

---

## 1. Généralités

Les chromatographies analytiques sur couche mince ont été réalisées sur des plaques Kieselgel 60F<sub>254</sub> (Merck), les points visualisés sous rayonnement UV à 254 nm. Les purifications ont été réalisées soit sur gel de silice 60 (0,04-0,063 mm) de Carlo-Erba-SDS. Les spectres de <sup>1</sup>H-RMN sont enregistrés sur un appareil Bruker Advance 400 MHz et 100 MHz en <sup>13</sup>C. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm le TMS étant la référence interne.

Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm (partie par million), les constantes de couplage, *J*, en Hertz. Les spectres de masse ont été enregistrés sur un spectromètre LCQ Advantage, en utilisant une source électrospray. Les points de fusion inférieurs à 260 °C ont été mesurés au banc Köfler.

## 2. Produits synthétisés

### 4-bromo-2-hydroxy-benzaldehyde (2a)

Le bromophénol **1** (26 mmol, 4.5 g, 1 eq) est mis en solution dans 100 ml d'ACN, puis on rajoute successivement le MgCl<sub>2</sub> (39 mmol, 3.7 g, 1.5 eq) la Et<sub>3</sub>N (52 mmol, 7.2 ml, 2 eq) et le paraformaldéhyde (130 mmol, 4g, 5 eq). On obtient une suspension blanchâtre qui sera portée à reflux pendant 3 h. La suspension change de couleur, elle vire en premier temps au jaune, puis au brun, ensuite au vert bouteille et la fin de la réaction est marquée par le virage au jaune clair. On remarque sur la plaque CCM (cyc/ DCM ; 6 : 4) la formation de deux produits.

Le milieu réactionnel est neutralisé par 40 ml d'une solution de HCl 1 N, en refroidissant dans un bain de glace. Ensuite on extrait par l'éther et on évapore sous pression, le produit brut est purifié sur colonne de silice (cyclohexane/ DCM ; 7 :3).

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 7.16- 7.24 (m, 2H, CHCHBr, COHCH); 7.42 (dd, *J* = 7.8 Hz, *J* = 1.5 Hz, 1H, CHCHBr); 9.86 (s, 1H, CHO); 11.12 (s, 1H, OH).

### 2-bromo-6-hydroxy-benzaldehyde (2b)

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm): 7.0 (dd, *J* = 8.33 Hz, *J* = 1.5 Hz, 1H, COHCHCH); 7.36 (dd, *J* = 8.33 Hz, *J* = 1.5 Hz 1H, CHCHBr); 7.39 (t, *J* = 8.33 Hz, 1H, CHCHCHBr); 10.39 (s, 1H, OH); 12.02 (s, 1H, OCH).

### **3-phénylphénol (3)**

Le bromophénol **1** (40 mmol, 6.9g, 1eq) est dissout dans 180 ml de dioxane, puis sous barbotage d'azote on rajoute successivement 80 ml d'une solution de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2M, du tetrakis (1 mmol, 1.16 g, 0.025eq) et enfin l'ester boronique (40 mmol, 8.16 g, 1eq). La suspension obtenue est portée à reflux pendant 24 h. Le dioxane est ensuite évaporé, puis le milieu réactionnel est extrait par le DCM et une solution aqueuse acide et concentré sous vide. Le brut est purifié sur colonne de silice (Cyc/ DCM ; 88 :12). On obtient une poudre crème avec un Rdt de 90 %.

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 6.82 (d, *J*= 7.32 Hz, 1H, COHCHCH); 7.06 (s, 1H, COHCHC); 7.17 (d, *J*= 7.32 Hz, 1H, COHCHCHCH); 7.41- 7.44 (m, 2H, H<sub>ar</sub>); 7.29- 7.37 (m, 2H, H<sub>ar</sub>); 7.56- 7.58 (m, 2H, H<sub>ar</sub>).

### **2-hydroxy-4-phenyl-benzaldehyde (4a)**

#### **Méthode A**

Le produit **2a** (34.8mmol, 7g, 1eq) est dissout dans 160 ml de dioxane, puis sous barbotage d'azote on rajoute successivement 70 ml d'une solution de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2M, du tetrakis (0.87 mmol, 1g, 0.025 eq) et enfin l'ester boronique (41.7 mmol, 8.5 g, 1.2 eq). La suspension obtenue est portée à reflux pendant 24 h. Le dioxane est ensuite évaporé, puis le milieu réactionnel est extrait par le DCM et une solution aqueuse acide et concentré sous vide. Le brut est purifié sur colonne de silice (cyclohexane/ DCM/ AcOEt ; 7 :3 :0.01) pour obtenir une poudre blanche avec un Rdt de 30%.

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 7.29 (s, 1H, COHCH) 7.31 (d, *J*= 8.33, 1H, H<sub>ar</sub>); 7.46- 7.49 (m, 3H, H<sub>ar</sub>); 7.65- 7.67 (m, 3H, H<sub>ar</sub>); 9.96 (s, 1H, OH); 11.16 (s, 1H, OCH).

### **2-hydroxy-6-phenyl-benzaldehyde (4b)**

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 6.89 (d, *J*= 8.33 Hz, 1H, COHCH); 6.99 (t, *J* = 8.33 Hz, 1H, H<sub>ar</sub>); 7.36- 7.38 (m, 2H, H<sub>ar</sub>); 7.44- 7.46 (m, 3H, H<sub>ar</sub>); 7.53 (t, *J* = 8.08 Hz, 1H, H<sub>ar</sub>); 9.83 (s, 1H, OH); 11.92 (s, 1H, OCH).

#### **Méthode B**

Le 3-phenylphenol **3** (26 mmol, 4.5 g, 1 eq) est mis en solution dans 100 ml d'ACN, puis on rajoute successivement le  $MgCl_2$  (39 mmol, 3.7 g, 1.5 eq) la  $Et_3N$  (52 mmol, 7.2 ml, 2 eq) et le paraformaldéhyde (130 mmol, 4g, 5 eq). On obtient une suspension blanchâtre qui sera porter à reflux pendant 3 h. La suspension change de couleur, elle vire en premier temps au jaune, puis au brun, ensuite au vert bouteille et la fin de la réaction est marquée par le virage au jaune clair. On remarque sur la plaque CCM (Cyc/ DCM ; 6 :4) la formation de deux produits.

Le milieu réactionnel est neutralisé par 40 ml d'une solution de HCl 1 N, en refroidissant dans un bain de glace. Ensuite on extrait par l'éther et on évapore sous pression, le produit brut est purifié sur colonne de silice (Cyc/ DCM ; 7 :3). Le produit **4a** a été obtenu avec un Rdt de 60%.

### **2-[tert-butyl(dimethyl)silyl]oxy-4-phenyl-benzaldehyde (5)**

On dissout à froid le composé **4a** (20 mmol, 4g, 1 eq) dans 60 ml de DMF, puis sous agitation on ajoute successivement l'imidazole (86 mmol, 5.8 g, 4.3 eq), la tert-Butyldimethylchlorosilane (30 mmol, 4.5 g, 1.5 eq) et la DMAP (20 mmol, 2.45 g, 1 eq). A la fin du rajout on chauffe à 80°C pendant 30 h. le milieu réactionnel est extrait par l'AcOEt, lavé par une solution saline, desséché et concentré sous vide. On obtient un brut qui a été purifié par colonne (Cyc/ AcOEt ; 9 :1) pour donner une poudre crème avec un Rdt de 50%.

$^1H$ -RMN ( $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 0.193 (s, 6H, Si( $\underline{CH_3}_2$ )); 0.916 (s, 9H, C( $\underline{CH_3}_3$ )); 6.953 (s, 1H, TBDMSOCCH); 7.13 (d,  $J= 8.084$  Hz, 1H, HCOCCHCH); 7.27 -7.35 (m, 3H); 7.43-7.45 (m, 2H); 7.74 (d,  $J= 8.084$  Hz, 1H, HCOCCHCH); 10.35 (s, 1H, OCH).

### **Dérivé oxime (6)**

L'aldéhyde **5** (1 eq) est dissout dans l'éthanol (6 ml pour 20 mmol d'aldéhyde), ensuite on rajoute successivement l'hydroxylamine sous forme chlorhydrate (1,05 eq) et l'acétate de sodium (1,05 eq) avec quelque goutte d'eau (1 ml pour 20 mmol d'aldéhyde). On laisse sous agitation à T.A pendant 12h, puis concentre sous vide, on filtre, on lave à l'eau et on sèche à l'étuve.

### **(1Z)-2-hydroxy-4-phenyl-benzaldehyde oxime (6a)**

$^1\text{H}$ -RMN (DMSO)  $\delta$  (ppm): 7.17- 7.16 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{ar}}$ ); 7.39-7.35 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{ar}}$ ); 7.48-7.44 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{ar}}$ ); 7.57 (d,  $J= 8.337$  Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{ar}}$ ); 7.64-7.62 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{ar}}$ ); 9.27 (s, 1H,  $\text{CHN}$ ).

### **(1Z)-2-[tert-butyl(dimethyl)silyl]oxy-4-phenyl-benzaldehyde oxime (6b)**

$^1\text{H}$ -RMN (DMSO)  $\delta$  (ppm): 0.28 (s, 6H,  $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$ ); 1.04 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ); 7.04 (s, 1H,  $\text{TBDMSOCC}$ ); 7.20 (d,  $J = 8.08$  Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{ar}}$ ); 7.35- 7.39 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{ar}}$ ); 7.46-7.43 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{ar}}$ ); 7.55-7.57 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{ar}}$ ); 7.80 (d,  $J= 8.08$  Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{ar}}$ ); 8.84 (s, 1H,  $\text{CHN}$ ).

### **Dérivé amine (7)**

Le dérivé oxime **6** est réduit par hydrogénation catalytique en présence de Pd sur charbon activé à 40 Barr de pression. Cette réduction a été réalisé dans un mélange EtOH/ THF pendant 72 h.

### **2-(aminométhyl)-5-phenyl-phenol (7a)**

$^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 4.06 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{NH}_2$ ); 6.95 (s, 1H,  $\text{OH}$ ); 7.19 (d,  $J= 8.084$  Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{CCH}$ ); 7.21 (s, 1H,  $\text{COHCH}$ ); 7.35-7.39 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{ar}}$ ); 7.43-7.47 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{ar}}$ ); 7.51-7.55 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{ar}}$ ); 7.80 (d,  $j= 8.084$  Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{CCH}$ ).

### **[2-[tert-butyl(dimethyl)silyl]oxy-4-phenyl-phenyl]methanamine (7b)**

$^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 0.38 (s, 6H,  $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$ ); 1.12 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ); 4.05 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{NH}_2$ ); 7.11-7.13 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{ar}}$ ); 7.25 (d,  $J= 7.57$ Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{ar}}$ ); 7.36- 7.39 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{ar}}$ ); 7.44-7.48 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{ar}}$ ); 7.60-7.62 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{ar}}$ ).

### **3-(3-thiényl)phénol (9)**

On dissout le bromophénol **1** (40 mmol, 6.9 g, 1 eq) dans 150 ml de dioxane, ensuite sous barbotage d'azote on rajoute 80 ml de carbonate de sodium 2M. On laisse agiter sous azote puis on additionne successivement le tétrakis (1 mmol, 1.2 mg, 1.025 eq) puis en dernier l'ester boronique 4,4,5,5-tetraméthyl-2-(3H-thiophen-3-yl)-1,3,2-dioxaborolane (41 mmol, 8.6 g, 1.025 eq).

Le mélange est porté à reflux pendant 5h sous azote, puis lavé avec un mélange eau acide et DCM, concentré sous vide et purifié sur colonne (Cyc/ DCM ; 4: 6). On obtient une poudre ocre avec un Rdt de 98%.

$^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 6.79 (dd,  $J= 7.83$  Hz,  $J= 1.4$  Hz, 1H,  $\text{COHCHCH}$ ); 7.11 (s, 1H,  $\text{COHCHC}$ ); 7.18 (d,  $J= 7.83$  Hz, 1H,  $\text{COHCHCCH}$ ); 7.23- 7.28 (m, 1H,  $\text{COHCHCH}$ ); 7.45 (s, 1H,  $\text{CCHS}$ ); 7.58 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{thiophène}}$ ).

### **2-hydroxy-4-(3-thienyl)benzaldehyde (10)**

Le thiophène phénol **9** (53.4 mmol, 9.5 g, 1 eq) est dissout dans 200 ml d'ACN, puis sous agitation on additionne le  $\text{MgCl}_2$  (80 mmol, 7.6g, 1,5 eq), la  $\text{Et}_3\text{N}$  (133.5 mmol, 18.5 ml, 2.5 eq) et la PFA (360 mmol, 10.8 g, 6.75 eq). La réaction est portée au reflux pendant 8 h. A la fin de la réaction on évapore l'ACN, on acidifie le milieu avec une solution de HCl puis on extrait avec l'AcOEt. Le brut est purifié sur colonne de silice (Cyc/ AcOEt ; 92 : 8), on obtient une poudre crème avec un Rdt 35%.

$^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7.21 (s, 1H,  $\text{COHCHC}$ ); 7.27 (d,  $J= 7.83$  Hz, 1H,  $\text{COHCHCCH}$ ); 7.43 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{thiophène}}$ ); 7.57 (d,  $J= 7.83$  Hz, 1H,  $\text{COHCCH}$ ); 7.63 (s, 1H,  $\text{CCHS}$ ); 9.88 (s, 1H,  $\text{OH}$ ); 11.14 (s, 1H,  $\text{OCH}$ ).

$^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 110.9, 116.0, 122.2, 124.5, 127.4, 127.8, 130.2, 144.0, 161.0, 149.8, 191.8.

### **2-[tert-butyl(dimethyl)silyl]oxy-4-(3-thienyl)benzaldehyde (11)**

Préparé selon le même mode opératoire que le produit **5**, on obtient une poudre jaune avec un Rdt de 80%.

$^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 0.31 (s, 6H,  $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$ ); 1.04 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ); 7.08 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{phenyl}}$ ); 7.28 (d,  $J= 8.58$  Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{phenyl}}$ ); 7.37- 7.40 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{thiophène}}$ ); 7.54 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{thiophène}}$ ); 7.84 (d,  $J= 8.58$  Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{phenyl}}$ ); 10.43 (s, 1H,  $\text{OCH}$ ).

$^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.0, 25.7, 18.5, 113.9, 116.8, 124.5, 127.4, 127.8, 130.3, 131.3, 144.7, 149.8, 164.3, 187.5.

### **(1Z)-2-[tert-butyl(dimethyl)silyl]oxy-4-(3-thienyl)benzaldehyde oxime (12)**

Préparé selon le même mode opératoire que le produit **6**, on obtient une poudre blanche avec un Rdt de 50 %.

$^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 0.30 (s, 6H,  $\text{Si}(\underline{\text{CH}_3})_2$ ); 1.04 (s, 9H,  $\text{C}(\underline{\text{CH}_3})_3$ ); 7.04 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{phenyl}}$ ); 7.20 (d,  $J= 8.58$  Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{phenyl}}$ ); 7.35- 7.38 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{thiophène}}$ ); 7.63 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{thiophène}}$ ); 7.75 (d,  $J= 8.58$  Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{phenyl}}$ ); 8.45 (s, 1H,  $\text{OCH}$ ).

### **2-(aminométhyl)-5-(3-thienyl)phénol (13)**

Dans un ballon on met du  $\text{LiAlH}_4$  (26.4 mmol, 1g, 4.5 eq) puis on verse une suspension de l'oxime **12** (6 mmol, 2.1g, 1 eq) dans du THF. On chauffe à  $70^\circ\text{C}$  pendant 2h, puis on refroidie le milieu et on hydrolyse doucement avec l'eau glacé. Le milieu réactionnel est ensuite filtré sur fritté, le filtrat est extrait avec l'AcOEt et concentré sous vide. On obtient une poudre ocre avec un Rdt de 60%.

$^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 4.15 (s, 2H,  $\underline{\text{CH}_2}\text{NH}_2$ ); 6.97- 6.88 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{phenyl}}$ ); 7.10 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{phenyl}}$ ); 7.36 (s, 2H,  $\text{H}_{\text{thiophène}}$ ); 7.42 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{thiophène}}$ ).

$^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 42.4, 109.0, 119.8, 127.4, 124.5, 127.8, 128.7, 130.3, 137.2, 149.8, 157.1.

### **2,6-dichloro-9-isopropyl purine (15)**

A une solution de 2,6-dichloro-9H-purine **14** (52.9 mmol, 10.00 g, 1 eq) dans le DMSO (75 ml) à  $13^\circ\text{C}$  a été ajouté du  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (158.7 mmol, 21.9 g, 3 eq) et du 2-bromopropane (264 mmol, 32.5 ml, 5 eq). Après 8 heures d'agitation à  $15-18^\circ\text{C}$ , l'eau a été ajoutée et la solution a été extraite avec AcOEt. Les phases organiques sont réunis, lavés avec  $\text{H}_2\text{O}$  (3 x 20 mL), séchées ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), concentré et purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (cyclohexane / AcOEt ; 7: 3) pour donner un solide blanc avec un rendement 57%. P.F :  $149-152^\circ\text{C}$ .

$^1\text{H}$ -RMN (DMSO)  $\delta$  (ppm): 1.65 (d, 6H,  $J= 6.8$  Hz,  $\text{CH}(\underline{\text{CH}_3})_2$ ), 4.91 (hept, 1H,  $J= 6.8$  Hz,  $\underline{\text{CH}}(\text{CH}_3)_2$ ), 8.17 (s, 1H,  $\underline{\text{H}}_8$ ).

### **Produit 16**

On mélange à température ambiante l'amine **7 a-b** ou **13** (1,2 eq), la purine dichlorée **15** (1 eq) et la  $\text{Et}_3\text{N}$  (5eq) dans du BuOH (30 ml pour 10 mmol du produit 15). Le mélange est chauffé à  $110^\circ\text{C}$  pendant 4h, puis le BuOH est évaporé et le milieu réactionnel est extrait par l'AcOEt pour donner un brut qui a été purifié sur colonne (DCM/ AcOEt; 9,5: 0,5)

**2-[[2-(2-chloro-9-isopropyl-purin-6-yl)amino]methyl]-5-phenyl-phenol (16a) : Rdt 60%**

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.54 (d, 6H,  $J=6$  Hz,  $\text{CH}(\underline{\text{CH}_3})_2$ ); 4.69 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{NH}_2$ ); 4.81-4.78 (m, 1H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ); 6.93 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{phénol}}$ ); 7.10 (d,  $J=7.57$  Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{phénol}}$ ); 7.27 (d,  $J=7.57$  Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{phénol}}$ ); 7.33-7.30 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{phényl}}$ ); 7.42-7.38 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{phényl}}$ ); 7.56-7.54 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{phényl}}$ ); 7.78 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{purine}}$ ); 10.19 (s, 1H,  $\text{OH}$ ).

$^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 18.8, 39.1, 48.2, 112.6, 118.2, 124.9, 126.4, 127.1, 127.4, 128.5, 128.9, 140.2, 141.2, 142.3, 153.3, 153.8, 154.6, 155.8.

**2-[[2-(2-chloro-9-isopropyl-purin-6-yl)amino]methyl]-5-(3-thienyl)phenol (16b): Rdt 70%**

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.56 (d, 6H,  $J=6$  Hz,  $\text{CH}(\underline{\text{CH}_3})_2$ ); 4.51-4.55 (m, 1H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ); 4.76 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{NH}_2$ ); 7.14 (d,  $J=7.50$  Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{phénol}}$ ); 7.23 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{phénol}}$ ); 7.28 (d,  $J=7.50$  Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{phénol}}$ ); 7.45 (d,  $J=3.50$  Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{thiophène}}$ ); 7.61 (d,  $J=3.50$  Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{thiophène}}$ ); 7.67 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{thiophène}}$ ); 7.84 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{purine}}$ ); 9.61 (s, 1H,  $\text{OH}$ ).

$^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 18.7, 39.1, 48.2, 108.7, 120.0, 124.5, 127.4, 127.8, 128.9, 130.6, 137.4, 142.3, 149.8, 153.3, 153.8, 154.6, 156.7.

**Produit 17**

Le dérivé chloré **16** (1eq) est mis en réaction avec le (2*R*)-2-aminobutan-1-ol (8 eq) dans un tube bouché et chauffé à 110°C pendant 10h. Puis le milieu réactionnel est extrait par du DCM, concentré puis purifié sur colonne (DCM/ AcOEt/ MeOH ; 9 : 1: trace).

**2-[[[2-[(2*R*)-2-(hydroxyméthyl)butyl]-9-isopropyl-purin-6-yl]amino]methyl]-5-phenyl-phenol (17a): Rdt 54%**

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.05 (t, 3H,  $J=7.07$  Hz,  $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ); 1.51 (d, 6H,  $J=5.55$  Hz,  $\text{CH}(\underline{\text{CH}_3})_2$ ); 1.56-1.74 (m, 2H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ); 3.69 (dd, 1H,  $J=10.6$  Hz et  $J=2.27$  Hz,  $\text{OHCH}_2$ ); 3.84 (dd, 1H,  $J=10.6$  Hz et  $J=1.7$  Hz,  $\text{OHCH}_2$ ); 3.90-3.94 (m, 1H,  $\text{NHCH}$ ); 4.59 (s, 2H,  $\text{NH}_2\text{CH}_2$ ); 4.63-4.68 (m, 1H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ); 4.98 (s, 1H,  $\text{NH}$ ); 5.63 (s, 1H,  $\text{NH}$ ); 7.08 (d, 1H,  $J=7.32$ ,  $\text{H}_{\text{phénol}}$ ); 7.16 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{phénol}}$ ); 7.24 (d, 1H,  $J=7.32$ ,  $\text{H}_{\text{phénol}}$ ); 7.30-7.33 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{phényl}}$ ); 7.38-7.42 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{phényl}}$ ); 7.50 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{purine}}$ ); 7.54-7.56 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{phényl}}$ ); 11.45 (bs, 1H,  $\text{OH}$ ).

$^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 10.1, 18.8, 24.1, 38.3, 48.5, 55.7, 64.6, 112.6, 118.2, 119.5, 125.2, 126.8, 127.1, 128.5, 128.9, 140.3, 141.3, 141.8, 152.8, 153.4, 154.2, 155.8.

P.F: 100- 111°C.

**2-[[[2-[(2R)-2-(hydroxymethyl)butyl]-9-isopropyl-purin-6-yl]amino]methyl]-5-(3-thienyl)phenol (17b), Rdt 65%**

$^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.06 (t, 3H,  $J= 6.56$  Hz,  $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ); 1.49 (d, 6H,  $J= 5.81$  Hz,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ); 1.58-1.74 (m, 2H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ); 3.67 (d, 1H,  $J= 10.80$  Hz,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ); 3.86 (d, 1H,  $J= 10.80$ ,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ); 3.91-3.94 (m, 1H,  $\text{NHCH}$ ); 4.47-4.64 (m, 3H,  $\text{CH}_2\text{NH}$ ,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ); 4.88 (bs, 1H,  $\text{OH}$ ); 5.00 (s, 1H,  $\text{NH}$ ); 5.8 (s, 1H,  $\text{NH}$ ); 7.06 (d, 1H,  $J= 7.83$ ,  $\text{H}_{\text{phénol}}$ ); 7.15 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{phénol}}$ ); 7.17 (d, 1H,  $J= 7.83$ ,  $\text{H}_{\text{phénol}}$ ); 7.34-7.37 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{thiophène}}$ ); 7.40 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{thiophène}}$ ); 7.48 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{purine}}$ ); 11.48 (bs, 1H,  $\text{OH}$ ).

$^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 10.0, 18.7, 24.1, 38.2, 48.5, 55.7, 64.8, 108.9, 119.6, 120.2, 125.9, 127.9, 128.9, 129.6, 131.0, 137.5, 141.8, 152.3, 152.8, 153.4, 154.2, 156.8.

P.F: 106-115°C.

**2-[[[6-[[2-hydroxy-4-(3-thienyl)phenyl]methylamino]-9-isopropyl-purin-2-yl]methyl]propane-1,3-diol (18)**

Le dérivé chloré **16b** (1eq) est mis en réaction avec le 2-aminopropane-1,3-diol (8 eq) dans un tube bouché et chauffé à 120°C pendant 24h. Puis le milieu réactionnel est extrait par du DCM, concentré puis purifié sur colonne (DCM/ AcOEt/ MeOH ; 56% : 37% : 7%), on obtient une poudre crème avec un Rdt de 50%. P.F : 90- 95°C.

$^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.50 (d, 6H,  $J= 6.56$  Hz,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ); 3.62 (bs, 2H, 2  $\text{OH}$ ); 3.87-3.96 (m, 4H, 2( $\text{CH}_2\text{OH}$ )); 3.91-3.94 (m, 1H,  $\text{NHCH}$ ); 4.54-4.7 (m, 3H,  $\text{CH}_2\text{NH}$ ,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ); 5.54 (s, 1H,  $\text{NH}$ ); 6.04 (s, 1H,  $\text{NH}$ ); 7.07 (d, 1H,  $J= 7.83$ ,  $\text{H}_{\text{phénol}}$ ); 7.14 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{phénol}}$ ); 7.19 (d, 1H,  $J= 7.83$ ,  $\text{H}_{\text{phénol}}$ ); 7.33-7.36 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{thiophène}}$ ); 7.40 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{thiophène}}$ ); 7.52 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{purine}}$ ); 11.36 (bs, 1H,  $\text{OH}$ ).

$^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 18.6, 24.1, 39.2, 48.5, 55.7, 64.3, 107.9, 119.6, 121.4, 125.9, 127.9, 128.9, 129.6, 131.2, 137.5, 142.1, 152.3, 152.8, 153.5, 154.4, 157.2.

### **Ethyl 2-methylenebutanoate (20)**

On prépare une solution aqueuse de carbonate de potassium (39 mmol, 5.5 g, 2.02 eq), à laquelle on rajoute de l'éthyl 2-diéthoxyphosphorylbutanoate (19 mmol, 5 g, 1 eq) et 6 ml d'une solution aqueuse de formaldéhyde (76 mmol, 2.3 g, 4 eq). Le milieu réactionnel est chauffé à reflux pendant 1h. Ensuite on extrait à l'éther et on lave avec une solution saline, après évaporation douce sous vide on isole une huile incolore avec un Rdt de 94%.

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.14 (t, 3H,  $J=6$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 1.38 (t, 3H,  $J=6$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 2.5 (q, 2H,  $J=6$  Hz,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 4.24 (q, 2H,  $J=6$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 5.48 (s, 1H,  $\text{CCH}_2$ ), 6.06 (s, 1H,  $\text{CCH}_2$ ).

### **Ethyl 2-[(2-ethoxy-2-oxo-ethyl)sulfanylmethyl]butanoate (21)**

Dissoudre le  $\text{Na}_{(s)}$  (13.7 mmol, 0.32 g, 0.8 eq) dans 5 ml d'EtOH, puis ajouter le mercaptoacétate d'éthyle (18.9 mmol, 2.27 g, 2.07 ml, 1.1 eq) et le produit **20** (17.18 mmol, 2.2g, 1 eq) à l'aide d'une seringue. On chauffe à reflux pendant 17h, puis on extrait à l'éther en neutralisant l'excès de base et on lave avec du NaCl saturé. La phase organique est ensuite séchée avec le  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrée et évaporée. On obtient une huile orange foncée avec Rdt de 56%.

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 0.11 (t, 3H,  $J=6$  Hz,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CHCOCH}_2\text{S}$ ); 1.2 (t, 6H,  $J=6$  Hz, 2  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OCO}$ ); 1.6 (m, 2H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CHCOCH}_2\text{S}$ ); 2.5 (m, 1H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CHCOCH}_2\text{S}$ ); 2.8 (m, 2H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CHCOCH}_2\text{S}$ ); 3.2 (m, 2H,  $\text{SCH}_2\text{COO}$ ); 4.1 (q, 4H, 2  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OCO}$ ).

### **Ethyl 4-ethyl-3-oxo-tetrahydrothiophene-2-carboxylate (22)**

On dissout le  $\text{Na}_{(s)}$  (11 mmol, 0.7 g, 1.2 eq) dans 5 ml d'éthanol. Après dissolution complète, on ajoute à chaud ( $70^\circ\text{C}$ ) 20 ml de toluène, puis le produit **21** (9 mmol, 2.36 g, 1eq) et on chauffe à  $100^\circ\text{C}$  pendant 6h. Ensuite, on refroidit la solution, on neutralise l'excès d'éthanolate, et on extrait avec une solution saturée de NaCl. La phase organique est séchée avec le  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  puis évaporée pour donner une huile jaunâtre avec un Rdt de 73%.

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.01 (t,  $J=6$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}$ ); 1.38 (t,  $J=6$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$ ); 1.41 (m, 1H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}$ ); 1.53 (m, 1H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}$ ); 2.79 (m, 1H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}$ ); 3.21 (m, 2H,  $\text{SCH}_2\text{CH}$ ); 4.21 (q, 2H,  $J=6\text{Hz}$ ,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$ ); 4.32 (m, 1H,  $\text{SCHCO}$ ).

### **Methyl 3-amino-4-bromo-thiophene-2-carboxylate (26)**

Le produit **25** (38.1 mmol, 6g, 1 eq) est mis en solution dans 60 ml d'acide acétique, puis on rajoute une solution de brome (38.1 mmol, 1.95 ml, 1 eq) dans 6 ml d'acide acétique. On laisse sous agitation pendant 16 h, à température ambiante. Le milieu réactionnel est neutralisé par une solution de  $\text{KHCO}_3$ . Ensuite on extrait par DCM, on dessèche et on évapore. Le brut est purifié sur silice (Cyc/ AcOEt ; 9 : 1). On obtient un solide brun avec un Rdt de 30%.

$^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 3.84 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 5.63 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ); 7.29 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{thiophène}}$ ).

### **Methyl 3-amino-4-isopropenyl-thiophene-2-carboxylate (27)**

Le produit **26** (11 mmol, 2.6 g, 1 eq) est mis en solution dans 41 ml de dioxane, puis sous azote on rajoute successivement du carbonate de sodium 2M (33 mmol, 16.5ml, 3eq), du tétrakis (0.22 mmol, 254 mg, 0.02 eq) et en dernier l'ester boronique 2-isopropenyl-4,4,5,5-tetraméthyl-1,3,2-dioxaborolane (16.55 mmol, 3.13 ml, 1.5 eq). Le milieu réactionnel est chauffé à reflux pendant 5h, la réaction est suivie par CCM (100% DCM). Après extraction par AcOEt le brut est purifié sur silice (100% DCM). Le produit cristallise par concentration, on obtient une poudre crème avec un Rdt de 50%.

$^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 2.03 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 3.79 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ); 5.14 (s, 1H,  $\text{CCH}_2$ ); 5.22 (s, 1H,  $\text{CCH}_2$ ); 5.70 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ); 7.10 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{thiophène}}$ ).

### **Methyl 3-(benzoylcarbamothioylamino)-4-bromo-thiophene-2-carboxylate (29a)**

Une solution de benzoyl isothiocyanate (15 mmol, 2 ml, 1.5 eq) dans 6 ml d'acétone est additionné à une solution du produit **26** (10 mmol, 2.4 g, 1 eq) dans 10 ml d'acétone. Le mélange est chauffé à reflux pendant 3h. Un solide se forme, on le récupère sur un fritté et on le rince avec l'éther. CCM (DCM/ Cyc; 3: 2). On isole une poudre crème avec un Rdt de 95%.

$^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 3.88 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ); 7.21(s, 1H,  $\text{H}_{\text{thiophène}}$ ); 7.55 (d, 2H,  $J=8.08$ ,  $\text{H}_{\text{phényl}}$ ); 7.64-7.68 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{phényl}}$ ); 7.94 (d, 2H,  $J=8.08$ ,  $\text{H}_{\text{phényl}}$ ); 9.30 (s, 1H,  $\text{NH}$ ); 12.19 (s, 1H,  $\text{NH}$ ).

### **Methyl 3-(benzoylcarbamothioylamino)-4-methyl-thiophene-2-carboxylate (29b)**

Une solution de benzoyl isothiocyanate (17.5 mmol, 2.3 ml, 1.5 eq) dans 6 ml d'acétone est additionnée à une solution du produit methyl 3-amino-4-methyl-thiophene-2-carboxylate

**28** (11.7 mmol, 2 g, 1 eq) dans 10 ml d'acétone. Le mélange est chauffé à reflux pendant 3h. Un solide se forme, on le récupère sur un fritté et on le rince avec l'éther. CCM (DCM/ Cyc ; 3 : 2). On obtient un solide crème avec un Rdt de 89%.

$^1\text{H-RMN}$  (DMSO)  $\delta$  (ppm): 2.15 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 3.75 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ); 7.19 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{thiophène}}$ ); 7.56 (d,  $J= 7.32$  Hz, 2H,  $\text{H}_{\text{phényl}}$ ); 7.67 (t, 1H,  $J= 7.07$  Hz,  $\text{H}_{\text{phényl}}$ ); 8.00 (d,  $J= 7.32$  Hz, 2H,  $\text{H}_{\text{phényl}}$ ); 11.82 (s, 1H,  $\text{NH}$ ); 12.24 (s, 1H,  $\text{NH}$ ).

### **Methyl 3-(Benzoylcarbamothioylamino)-4-Isopropenyl-Thiophene-2-Carboxylate (29c)**

Une solution de benzoyl isothiocyanate (6.09 mmol, 0.83 ml, 1.5 eq) dans 3 ml d'acétone est additionné à une solution du produit 27 (4 mmol, 0.8 g, 1 eq) dans 3 ml d'acétone. Le mélange est chauffé à reflux pendant 2h. Un solide se forme, on le récupère sur un fritté et on le rince avec l'éther. CCM (100% DCM). On obtient une poudre blanchâtre avec un Rdt de 85%.

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 2.12 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 3.86 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ); 5.12 (s, 1H,  $\text{CH}_2$ ); 5.21 (s, 1H,  $\text{CH}_2$ ); 7.29 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{thiophène}}$ ); 7.52-7.56 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{phényl}}$ ); 7.63-7.67 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{phényl}}$ ); 7.91-7.93 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{phényl}}$ ); 9.22 (s, 1H,  $\text{NH}$ ); 12.30 (s, 1H,  $\text{NH}$ ).

### **7-bromo-2-thioxo-1H-thieno[3,2-d]pyrimidin-4-one (30a)**

On dissout l'hydroxyde de potassium (14.45 mmol, 0.81 g, 1.7 eq) à chaud dans 34 ml d'éthanol, puis on additionne cette solution sur le produit **29a** (8.5 mmol, 3.5 g, 1eq) et on chauffe à reflux pendant 2h. La réaction est arrêtée par 50 ml d'eau et l'acide acétique jusqu'à pH acide, et le milieu réactionnel est mis au congélateur pendant 12h. Le précipité obtenu est filtré et lavé avec l'EtOH froid. La réaction est suivi par CCM (Cyc/ DCM/ AcOEt; 3: 2 :0,5). On obtient un solide blanc avec un de Rdt 97%.

Deux tautomère 25% la forme OH, SH

$^1\text{H-RMN}$  (DMSO)  $\delta$  (ppm): 7.62 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{thiophène}}$ ); 11.77 (s, 0.5H,  $\text{NH}$ ); 12.25 (s, 0.5H,  $\text{NH}$ ).

### **7-methyl-2-thioxo-1H-thieno[3,2-d]pyrimidin-4-one (30b)**

On dissout l'hydroxyde de potassium (17.5 mmol, 0.98 g, 1.7 eq) à chaud dans 40 ml d'éthanol, puis on additionne cette solution sur le produit **29b** (10 mmol, 3.3 g, 1eq) et on chauffe à reflux pendant 2h. La réaction est arrêtée par 60 ml d'eau et l'acide acétique jusqu'à pH acide, et le milieu réactionnel est mis au congélateur pendant 12h. Le précipité obtenu est filtré et lavé avec l'EtOH froid. CCM (CH/ DCM/ AcOEt ; 3 : 2 : 0,5). On obtient une poudre beige avec un Rdt de 73%.

<sup>1</sup>H-RMN (DMSO) δ (ppm): 2.25 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 7.74 (s, 1H, H<sub>thiophène</sub>); 12.30 (s, 1H, NH); 12.95 (s, 1H, NH).

### **7-isopropenyl-2-thioxo-1H-thieno[3,2-d]pyrimidin-4-one (30c)**

On dissout l'hydroxyde de potassium (4.7 mmol, 0.26 g, 1.7 eq) à chaud dans 11 ml d'éthanol, puis on additionne cette solution sur le produit **29c** (2.77 mmol, 1g, 1eq) et on chauffe à reflux pendant 2h. La réaction est arrêtée par 20 ml d'eau et l'acide acétique jusqu'à pH acide, et le milieu réactionnel est mis au congélateur pendant 12h. Le précipité obtenu est filtré et lavé avec l'EtOH froid. On obtient une poudre crème avec un rendement quantitatif.

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 1.60 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.14 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 5.17 (s, 1H, CH<sub>2</sub>); 5.30 (s, 1H, CH<sub>2</sub>); 5.43 (s, 1H, CH<sub>2</sub>); 7.61 (s, 1H, H<sub>thiophène</sub>); 9.37 (s, 1H, NH); 9.42 (s, 1H, NH).

### **7-bromo-2-methylsulfonyl-thieno[3,2-d]pyrimidin-4-ol (31a)**

Une solution de NaOH (16.6 mmol, 0.67 g, 2 eq) dans 8,5 ml d'eau, est ajoutée à une suspension du produit **30a** (8.3 mmol, 2.2 g, 1 eq) dans 10 ml l'EtOH, refroidie dans un bain de glace. Puis le ICH<sub>3</sub> (12.45 mmol, 0.8 ml, 1.5 eq) est mis en réaction. Le milieu réactionnel est agité pendant 3 h. Le solide formé est filtré et lavé à l'eau. CCM (DCM/ AcOEt ; 9: 1). On obtient une poudre crème avec Rdt de 97%.

<sup>1</sup>H-RMN (DMSO) δ (ppm): 2.58 (s, 3H, SCH<sub>3</sub>); 7.22 (s, 1H, H<sub>thiophène</sub>); 12.14 (s, 1H, OH).

### **7-methyl-2-methylsulfonyl-thieno[3,2-d]pyrimidin-4-ol (31b)**

Une solution de NaOH (14.4 mmol, 0.60 g, 2 eq) dans 8,5 ml d'eau, est ajoutée à une suspension du produit **30b** (7.2 mmol, 1.4 g, 1 eq) dans 10 ml l'EtOH, refroidie dans un bain

de glace. Puis le ICH<sub>3</sub> (10.8 mmol, 0.7 ml, 1.5 eq) est mis en réaction. Le milieu réactionnel est agité pendant 45 min. Le solide formé est filtré et lavé à l'eau. CCM (DCM/ AcOEt ; 9: 1). On isole une poudre crème avec un Rdt quantitatif.

<sup>1</sup>H-RMN (DMSO) δ (ppm): 2.26 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.53 (s, 3H, SCH<sub>3</sub>); 7.32 (s, 1H, H<sub>thiophène</sub>); 12.34 (s, 1H, OH).

#### **7-isopropenyl-2-methylsulfanyl-thieno[3,2-d]pyrimidin-4-ol (31c)**

Une solution de NaOH (5 mmol, 0.20 g, 2.3 eq) dans 3 ml d'eau, est ajoutée à une suspension du produit **30c** (2.2 mmol, 0.5 g, 1 eq) dans 3,5 ml l'EtOH, refroidie dans un bain de glace. Puis le ICH<sub>3</sub> (4.4 mmol, 0.27 ml, 2 eq) est mis en réaction. Le milieu réactionnel est agité pendant 1h. Le solide formé est filtré et lavé à l'eau. On obtient une poudre crème avec un Rdt de 82%.

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 2.10 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.41 (s, 3H, SCH<sub>3</sub>); 5.15 (s, 1H, CH<sub>2</sub>); 6.57 (s, 1H, CH<sub>2</sub>); 7.13 (s, 1H, H<sub>thiophène</sub>), 10.57 (s, 1H, OH).

#### **7-bromo-4-chloro-2-methylsulfanyl-thieno[3,2-d]pyrimidine (32a)**

A froid, dans un bain de glace, on dilue du POCl<sub>3</sub> (43 mmol, 40 ml, 5.4 eq) dans 15 ml d'ACN, puis on rajoute 1,8 ml de diéthylaniline et à la fin le produit **31a** (8 mmol, 2.2 g, 1eq). On chauffe à reflux pendant 3h, la fin de la réaction est suivie par CCM (DCM/ AcOEt ; 6: 4). Après distillation du POCl<sub>3</sub>, on refroidi le milieu réactionnel et on extrait par DCM. Le brut est purifié par une colonne flash (DCM/ CH ; 8: 2). On obtient un solide crème avec un Rdt de 90%.

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 2.67 (s, 3H, SCH<sub>3</sub>); 7.48 (s, 1H, H<sub>thiophène</sub>).

<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 14.8, 120.2, 123.4, 131.3, 158.4, 163.2, 174.8.

#### **4-chloro-7-methyl-2-methylsulfanyl-thieno[3,2-d]pyrimidine (32b)**

A froid, dans un bain de glace, on dilue du POCl<sub>3</sub> (43 mmol, 40 ml, 5.4 eq) dans 15 ml d'ACN, puis on rajoute 1,8 ml de diéthylaniline et à la fin le produit **31b** (7 mmol, 1.5 g, 1eq). On chauffe à reflux pendant 3h, la fin de la réaction est suivie par CCM (100% DCM). Après distillation du POCl<sub>3</sub>, on refroidi le milieu réactionnel et on extrait par DCM. Le brut est purifié par une colonne flash (100% DCM). Le produit 6b a été isolé avec un Rdt de 62%.

$^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 2.44 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 2.65 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ); 7.58 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{thiophène}}$ ).

$^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 14.6, 14.8, 118.5, 123.4, 135.8, 155.2, 161.2, 175.3.

#### **4-chloro-7-isopropenyl-2-methylsulfanyl-thieno[3,2-d]pyrimidine (32c)**

A froid, dans un bain de glace, on dilue du  $\text{POCl}_3$  8,5 (9.14 mmol, 8.5 ml, 5.7 eq) dans 4 ml d'ACN, puis on rajoute 0,4 ml de diéthylaniline et à la fin le produit **31c** (1.6 mmol, 0.38 g, 1 eq). On chauffe à reflux pendant 3h, la fin de la réaction est suivie par CCM (100% DCM). Après distillation du  $\text{POCl}_3$ , on refroidi le milieu réactionnel et on extrait par DCM. On obtient un solide crème avec un Rdt de 92%.

$^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 2.23 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 2.62 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ); 5.39 (s, 1H,  $\text{CH}_2$ ); 6.54 (s, 1H,  $\text{CH}_2$ ); 7.79 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{thiophène}}$ ).

$^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 14.9, 22.6, 118.2, 120.5, 125.5, 144.6, 148.7, 152.3, 161.1, 172.1.

#### **7-bromo-2-methylsulfanyl-N-[(4-phenylphenyl)methyl]thieno[3,2-d]pyrimidin-4-amine (33a)**

On dissout le composé **32a** (4 mmol, 1.1 g, 1 eq) dans 8 ml de propanol sous  $\text{N}_2$ . On ajoute la  $\text{Et}_3\text{N}$  (7 mmol, 1 ml, 1.75 eq) puis la 4-phényl-benzyl-amine (0.9 g, 7 mmol, 1.75 eq) avant de porter le milieu réactionnel à reflux ( $120^\circ\text{C}$ ) pendant 3h. Après avoir évaporé le propanol et l'excès de la  $\text{Et}_3\text{N}$ , on ajoute de l'éther pour faire cristalliser le produit, ensuite on filtre le précipité. On obtient une poudre crème avec un rendement de 64%.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 2.64 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 4.89 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 5.18 (s, 1H,  $\text{NH}$ ), 7.36 (m, 1H,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 7.45 (m, 4H,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 7.59 (m, 4H,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 7.65 (s, 1H,  $\text{CH}_{\text{thiophène}}$ ).

$^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 15.1, 43.4, 114.5, 120.2, 127.1, 128.1, 128.4, 128.7, 129.1, 131.3, 138.7, 139.6, 140.8, 156.1, 161.6, 170.5.

#### **7-bromo-2-methylsulfanyl-N-(3-pyridylmethyl)thieno[3,2-d]pyrimidin-4-amine(33b)**

On dissout le composé **32a** (7 mmol, 2 g, 1 eq) dans 15 ml de propanol sous  $\text{N}_2$ . On ajoute la  $\text{Et}_3\text{N}$  (14 mmol, 2 ml, 2 eq) puis la 3-picolyl-amine (9 mmol, 1 ml, 1.3 eq) avant de porter le milieu réactionnel à reflux ( $120^\circ\text{C}$ ) pendant 3h. Une fois le mélange refroidi, le produit

cristallise. On filtre le précipité que l'on lave au cyclohexane et à l'éther. On obtient un solide beige avec un rendement de 76%.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 2.60 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 4.87 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 5.32 (s, 1H,  $\text{NH}$ ), 7.30 (dd,  $J=7.80$  Hz, 1H,  $\text{CH}_{\text{pyridyl}}$ ), 7.66 (s, 1H,  $\text{CH}_{\text{thiophène}}$ ), 7.74 (d,  $J=7.80$  Hz, 1H,  $\text{CH}_{\text{pyridyl}}$ ), 8.57 (d,  $J=7.80$  Hz, 1H,  $\text{CH}_{\text{pyridyl}}$ ), 8.64 (s, 1H,  $\text{CH}_{\text{pyridyl}}$ ).

$^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 14.9, 42.5, 114.1, 120.4, 125.2, 132.3, 133.9, 135.7, 147.4, 148.2, 156.7, 161.2, 171.6

### **7-bromo-2-methylsulfanyl-N-[(1-oxidopyridin-1-ium-3-yl)methyl]thieno[3,2-d]pyrimidin-4-amine(33c)**

Le composé **33c** est obtenu à partir du composé **32a** (3.4 mmol, 1 g, 1 eq) et du composé **37** (4.4 mmol, 1.05 g, 1.3 eq), selon les conditions décrites pour le composé **33a**, dans 8 ml de propanol avec de la  $\text{Et}_3\text{N}$  (5.4 mmol, 0.8 ml, 1.6 eq). On obtient un solide marron clair avec un rendement de 48%.

$^1\text{H}$  NMR (DMSO)  $\delta$  (ppm): 2.46 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 4.65 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7.28 (s, 1H,  $\text{CH}_{\text{thiophène}}$ ), 7.33 (dd,  $J=7.6$  Hz, 1H,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 8.11 (d,  $J=7.6$  Hz, 1H,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 8.20 (s, 1H,  $\text{NH}$ ), 8.30 (d,  $J=7.6$  Hz, 1H,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 8.8 (s, 1H,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ).

$^{13}\text{C}$ -RMN (DMSO)  $\delta$  (ppm): 14.9, 42.1, 114.2, 120.6, 128.5, 131.7, 133.3, 136.20, 138.9, 141.7, 156.2, 161.1, 171.6.

### **Benzyl-(7-bromo-2-methylsulfanyl-thieno[3,2-d]pyrimidin-4-yl)-3-chlorane (33d)**

Le produit **32a** (3.7 mmol, 1.1 g, 1 eq) est mis en solution dans 13 ml de BuOH. A cette solution on rajoute la benzylamine (4.45 mmol, 0.6 ml, 1.2 eq) et la  $\text{Et}_3\text{N}$  (18.5 mmol, 2.6 ml, 5 eq). Après chauffage à reflux pendant 20 h, un solide se forme. Ce dernier est filtré, lavé avec 1 ml de BuOH froid et séché à l'étuve. La réaction est suivie par plaque CCM (DCM/Cyc ; 8: 2). On obtient un solide jaune clair avec un Rdt 97%.

$^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 2.61 (s, 3H,  $\text{SCH}_3$ ); 4.84 (d,  $J=5.55$ , 2H); 5.15 (s, 1H,  $\text{NH}$ ); 7.30-7.35 (m, 1H,  $H_{\text{ar}}$ ); 7.35-7.37 (m, 4H,  $H_{\text{ar}}$ ); 7.63 (s, 1H,  $H_{\text{thiophène}}$ ).

$^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 14.8, 43.2, 114.7, 120.2, 126.8, 127.6, 128.3, 131.1,

139.4, 156.1, 161.5, 170.8.

### **Benzyl-(7-methyl-2-methylsulfanyl-thieno[3,2-d]pyrimidin-4-yl)-3-chlorane (33e)**

Le produit **32b** (4.3 mmol, 1g, 1 eq) est mis en solution dans 13 ml de BuOH. A cette solution on rajoute la benzylamine (5.16 mmol, 0.56 ml, 1.2 eq) et la Et<sub>3</sub>N (21.5 mmol, 3 ml, 5 eq). Après chauffage à reflux pendant 20 h, un solide se forme. Ce dernier est filtré, lavé avec 1 ml de BuOH froid et séché à l'étuve. La réaction est suivie par plaque CCM (100% DCM). On obtient une poudre beige avec un Rdt de 97%.

<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 2.26 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.42 (s, 3H, SCH<sub>3</sub>); 4.69 (d, *J*= 5.05, 2H, CH<sub>2</sub>); 7.15-7.17 (m, 1H, *H*<sub>ar</sub>); 7.20- 7.24 (m, 2H, *H*<sub>ar</sub>); 7.29 (d, *J*= 7.07, 2H, *H*<sub>ar</sub>); 7.35 (s, 1H, *H*<sub>thiophène</sub>).

<sup>13</sup>C-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 14.5, 14.9, 42.4, 104.8, 119.5, 126.6, 127.6, 128.9, 135.5, 139.8, 153.6, 158.4, 171.6.

### **benzyl-(7-isopropenyl-2-methylsulfanyl-thieno[3,2-d]pyrimidin-4-yl)-3-chlorane (33f)**

Le produit **32c** (1.5 mmol, 0.38 g, 1 eq) est mis en solution dans 5 ml de Propanol. A cette solution on rajoute la benzylamine (1.8 mmol, 0.2 ml, 1.2 eq) et la Et<sub>3</sub>N (7.5 mmol, 1 ml, 5 eq). Après chauffage à reflux pendant 24 h, on extrait par la DCM et on purifie le brut sur silice (DCM/ Cyc; 8: 2).

Le produit cristallise dans l'éther avec un Rdt de 90%.

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 2.23 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.58 (s, 3H, SCH<sub>3</sub>); 4.84 (d, *J*= 5.55 Hz, 2H); 5.02 (m, 1H, CH<sub>2</sub>); 5.35 (s, 1H, CH<sub>2</sub>); 6.12 (s, 1H, NH); 7.30-7.39 (m, 5H, *H*<sub>ar</sub>); 7.49 (s, 1H, *H*<sub>thiophène</sub>).

<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 14.7, 22.5, 43.6, 103.2, 118.3, 125.6, 126.7, 127.5, 128.8, 139.7, 144.4, 148.3, 152.5, 161.9, 168.8.

### **Tert-butyl N-(3-pyridylmethyl)carbamate (35)**

On dissout le composé **34** (98 mmol, 10.6 g, 1 eq) dans 115 ml de dioxane. On place ensuite le mélange dans un bain de glace à 5°C pendant 10 min. Puis, on ajoute progressivement la Et<sub>3</sub>N (130 mmol, 18 ml, 1.3 eq) ainsi que le BOC<sub>2</sub>O. Le milieu réactionnel est alors mis sous

agitation à TA pendant 12h. Une fois la réaction achevée, on distille le dioxane avant de purifier le produit par chromatographie sur colonne, en utilisant un éluant (AcOEt/ Cyc ; 7: 3). Après évaporation, on obtient un produit blanc avec un rendement de 45%.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.37 (s, 9H,  $3\text{CH}_3$ ), 4.23 (d, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 5.49 (s, 1H,  $\text{NH}$ ), 7.17 (dd,  $J=4.80$  Hz,  $J=7.83$  Hz, 1H,  $\text{CH}_{ar}$ ), 7.54 (d,  $J=7.83$  Hz, 1H,  $\text{CH}_{ar}$ ), 8.40 (d,  $J=4.80$  Hz, 1H,  $\text{CH}_{ar}$ ), 8.43 (s, 1H,  $\text{CH}_{ar}$ ).

### **Tert-butyl N-[(1-oxidopyridin-1-ium-3-yl)methyl]carbamate (36)**

On dissout le composé **35** (44.36 mmol, 9.24 g, 1 eq) dans 175 mL de DCM. On place ensuite le mélange dans un bain de glace à 5°C avant d'ajouter progressivement le mCPBA (88.74 mmol, 15.3 g, 2 eq). Le milieu réactionnel est alors mis sous agitation à TA pendant 6h. Puis, on le neutralise à l'aide d'une solution de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  avant d'effectuer une extraction à l'AcOEt. Les phases organiques sont ensuite rassemblées, séchées par du sulfate de magnésium et enfin, évaporées. On obtient un produit blanc avec un rendement de 67%.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.45 (s, 9H,  $3\text{CH}_3$ ), 4.29 (d, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 5.18 (s, 1H,  $\text{NH}$ ), 7.22 (m, 2H,  $\text{H}_{ar}$ ), 8.11 (m, 1H,  $\text{H}_{ar}$ ), 8.17 (s, 1H,  $\text{H}_{ar}$ ).

### **1-oxidopyridin-1-ium-3-yl)methylammonium;2,2,2-trifluoroacetate (37)**

On dissout le composé **36** (9.7 mmol, 2.20 g, 1 eq) dans 14 ml de DCM. On ajoute le TFA (97 mmol, 7.4 ml, 10 eq) puis on place la réaction sous agitation à 0°C pendant 4h. Une fois la réaction terminée, on distille le TFA. Puis, on ajoute un peu de Cyclohexane avant de remettre sous agitation. On retire ensuite le surnageant avant d'ajouter un peu d'éther pour faire cristalliser le produit. On retire de nouveau le surnageant et on sèche l'éther restant pour obtenir un produit blanc avec un rendement de 95%.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm): 5.12 (d,  $J=5.5$ , 2H,  $\text{CH}_2$ ), 8.55 (d, 1H,  $\text{H}_{ar}$ ), 9.33 (m, 1H,  $\text{H}_{ar}$ ), 9.38-9.48 (m, 2H,  $\text{H}_{ar}$ ).

### **7-bromo-2-methylsulfinyl-N-[(4-phenylphenyl)methyl]thieno[3,2-d]pyrimidin-4-amine (38a)**

On dissout le composé **33a** (2.3 mmol, 1 g, 1 eq) dans 60 ml de DCM sous  $\text{N}_2$ . On plonge la solution dans un bain de glace à 0°C puis on ajoute le mCPBA (2.9 mmol, 0.5 g, 1.3 eq) petit

à petit. Le milieu réactionnel est mis sous agitation et maintenu à 0°C pendant 5h. On neutralise ensuite avec du Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en solution avant d'extraire au DCM. Les phases organiques sont alors regroupées et séchées avec du sulfate de sodium (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) puis évaporées sous pression. Enfin, on ajoute de l'éther pour faire cristalliser le produit. On évapore le solvant et on obtient un solide jaune pâle avec un rendement de 94%.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 2.96 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.96 (d, J=5.5, 2H, CH<sub>2</sub>), 5.30 (s, 1H, NH), 7.36 (dd, J=7.5, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.45-7.49 (m, 4H, H<sub>ar</sub>), 7.58-7.62 (m, 4H, H<sub>ar</sub>), 7.79 (s, 1H, H<sub>thiophène</sub>).

<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 35.6, 43.4, 120.2, 122.8, 127.3, 128.2, 128.4, 131.3, 139.2, 139.6, 140.4, 155.6, 164.5.

### **7-bromo-2-methylsulfinyl-N-(3-pyridylmethyl)thieno[3,2-d]pyrimidin-4-amine (38b)**

Le composé **38b** a été obtenu à partir de **33b** (2.5 mmol, 0.9 g, 1 eq) et du mCPBA (3.3 mmol, 0.6 g, 1.3 eq) selon les conditions décrites pour le composé **38a**. C'est un solide marron clair avec un rendement de 38%.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 2.92 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.88 (d, J= 5.05, 2H, CH<sub>2</sub>), 6.90 (s, 1H, NH), 7.25 (t, J= 7.83 Hz, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.77 (s, 1H, H<sub>thiophène</sub>), 7.79 (d, J=7.83 Hz, 1H, H<sub>ar</sub>), 8.48 (d, J= 7.83 Hz, 1H, CH<sub>ar</sub>), 8.63 (s, 1H, H<sub>ar</sub>).

<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 35.6, 42.3, 120.4, 122.8, 125.2, 130.9, 133.5, 135.7, 147.8, 148.5, 155.8, 164.

MS (ESI) m/z théorique : 381,9 Obtenu : ESI (+) 383 (M+H<sup>+</sup>).

### **7-bromo-2-methylsulfinyl-N-[(1-oxidopyridin-1-ium-3-yl)methyl]thieno[3,2-d]pyrimidin-4-amine (38c)**

On dissout le composé **33c** (0.78 mmol, 0.3 g, 1 eq) avec l'oxone (0.47 mmol, 0.29 g, 0.6 eq) dans 5 ml d'EtOH sous N<sub>2</sub>. Le milieu réactionnel est ensuite chauffé à 60°C pendant 12h. Une fois la réaction terminée, on laisse le mélange revenir à TA avant de le filtrer, de le laver à l'eau et enfin à l'éther. On obtient un solide blanc avec un rendement de 96%.

$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) : 2.92 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 4.74 (d,  $J= 5.5$ , 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7.30 (d,  $J=7.6$  Hz, 1H,  $H_{ar}$ ), 7.36 (t,  $J= 7.6$  Hz,  $J= 6.5$  Hz, 1H,  $H_{ar}$ ), 8.12 (d,  $J= 6.5$  Hz, 1H,  $H_{ar}$ ), 8.28 (s, 1H,  $H_{thiophène}$ ), 8.53 (s, 1H,  $\text{NH}$ ), 9.40 (s, 1H,  $H_{ar}$ ).

$^{13}\text{C}$ -RMN (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 35.6, 42.3, 120.2, 122.9, 128.5, 131.6, 133.4, 136.5, 138.9, 141.7, 155.4, 165.1.

MS (ESI) m/z théorique : 399,96 Obtenu : ESI (+) 400,7. ( $\text{M}+\text{H}^+$ ).

### **Benzyl-(7-bromo-2-methylsulfonyl-thieno[3,2-d]pyrimidin-4-yl)- 3-chlorane (38d)**

Dans un bain de glace, on dissout le produit **33d** (3.28 mmol, 1.2 g, 1 eq) dans 65 ml de dichlorométhane, puis on additionne 0,88 g (1.5 eq) d'acide meta-chloroperbenzoïque a 80%. Le mélange est agité 1h, puis lavé par une solution de carbonate de sodium. Le produit cristallise par concentration. On obtient une poudre jaunâtre avec un Rdt de 92%. La réaction est suivie par CCM (DCM/ AcOEt ; 95: 5).

$^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 2.91 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 4.89 (d,  $J= 5.55$ , 2H,  $\text{NHCH}_2$ ), 5.96 (s, 1H,  $\text{NH}$ ), 7.29- 7.39 (m, 5H,  $H_{ar}$ ), 7.77 (s, 1H,  $H_{thiophène}$ ).

$^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 35.8, 43.5, 121.1, 122.9, 126.7, 127.8, 128.5, 131.6, 139.7, 155.4, 164.7.

### **Benzyl-(7-methyl-2-methylsulfonyl-thieno[3,2-d]pyrimidin-4-yl)-3-chlorane (38e)**

Dans un bain de glace, on dissout le produit **33e** (3.8 mmol, 1g, 1 eq) dans 65 ml de dichlorométhane, puis on additionne 0,78 g (1.5 eq) d'acide meta-chloroperbenzoïque a 80%. Le mélange est agité 1h, puis lavé par une solution de carbonate de sodium. Le produit cristallise par concentration. On obtient une poudre jaune clair avec un Rdt de 90%. La réaction est suivie par CCM (DCM/ AcOEt ; 7: 3).

$^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 2.37 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.79 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 4.78 (d,  $J= 4.29$ , 2H,  $\text{CH}_2$ ), 5.57 (s, 1H,  $\text{NH}$ ), 7.15-7.30 (m, 6H,  $H_{ar}$ ).

$^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 14.7, 36.6, 43.2, 118.5, 120.6, 126.3, 127.5, 128.4, 135.4, 139.2, 153.1, 162.8.

**(2r)-2-[[4-(benzyl-3-chloranyl)-7-bromo-thieno[3,2-d]pyrimidin-2-yl]amino]butan-1-ol**  
**(39a)**

Dans un tube fermé, le produit **38d** (1 mmol, 0.4 g, 1 eq) est mis en réaction avec du R-aminobutanol (8 mmol, 0.75 ml, 8 eq) en chauffant à 100°C pendant 24 h. Après extraction par DCM et évaporation sous vide, le produit formé cristallise dans l'éther.

La réaction est suivie par CCM (DCM/ AcOEt ; 8 : 2). On obtient une poudre crème avec un Rdt de 35%. P.F : 89- 95°C.

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 1.01 (t, *J*= 7.57, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 3.63-3.68 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 3.82-3.93 (m, 2H, CH<sub>2</sub>OH); 4.76 (d, *J*= 5.55, 2H, NHCH<sub>2</sub>); 5.04-5.08 (m, 2H, NHCH, OH); 7.304-7.374 (m, 5H, *H<sub>ar</sub>*), 7.54 (s, 1H, *H<sub>thiophène</sub>*).

<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 10.3, 24.5, 43.6, 55.7, 64.6, 101.9, 120.6, 126.5, 127.7, 128.5, 131.1, 139.9, 154.1, 158.4, 167.2.

**2-[[4-(benzyl-3-chloranyl)-7-bromo-thieno[3,2-d]pyrimidin-2-yl]amino]propane-1,3-diol**  
**(39b)**

Dans un tube fermé, le produit **38d** (1 mmol, 0.4 g, 1 eq) est mis en réaction avec du 2-aminopropane-1,3-diol (5 mmol, 0.6g, 5 eq) en chauffant à 100°C pendant 12 h. après extraction par AcOEt et évaporation sous vide, le produit formé cristallisé dans l'éther. On isole une poudre crème avec un Rdt de 64%. P.F : 85-92°C.

La réaction est suivie par CCM (DCM/ AcOEt/ EtOH/ Et<sub>3</sub>N ; 4 : 5,8 : 0,2: trace).

<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 3.50 (s, 4H, 2 CH<sub>2</sub>OH), 3.92 (s, 1H, NH), 3.64-3.66 (m, 3H, NH CH<sub>2</sub>, NHCH), 6.11 (s, 1H, OH), 7.22-7.35 (m, 5H, *H<sub>ar</sub>*), 8.06 (s, 1H, *H<sub>thiophène</sub>*), 8.40 (s, 1H, NH).

<sup>13</sup>C-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 43.5, 52.7, 62.3, 100.9, 121.2, 126.9, 127.5, 128.4, 131.5, 139.8, 153.2, 158.3, 167.1.

**(2S,3S)-2-[[4-(bromomethyl)-6-(3-pyridylmethylamino)-5-sulfanyl-pyrimidin-2-yl]amino]butane-1,3-diol (39c)**

On ajoute au composé **38b** (0.65 mmol, 0.25 g, 1 eq) le D-thréoninol (2.6 mmol, 0.27 g, 4eq) puis on chauffe la réaction à 160°C pendant 8h. On procède ensuite à une extraction au DCM. Les phases organiques sont alors regroupées et séchées avec du sulfate de sodium (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) avant d'être évaporées sous pression. Enfin, on ajoute de l'éther pour faire cristalliser le produit. On évapore le solvant et on obtient un solide jaune avec un rendement de 26%.

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 1.01 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.47 (m, 2H, CH, CH), 3.90 (d, *J*= 5.5, 2H, CH<sub>2</sub>OH), 4.66 (m, 4H, NH, OH, NHCH<sub>2</sub>), 5.9 (s, 1H, OH), 7.35 (t, *J*= 7.83 Hz, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.75 (d, *J*=7.83 Hz, 1H, H<sub>ar</sub>), 8.06 (s, 1H, H<sub>thiophène</sub>), 8.40 (s, 1H, NH), 8.44 (d, *J*= 7.83 Hz, 1H, H<sub>ar</sub>), 8.60 (s, 1H, H<sub>ar</sub>).

<sup>13</sup>C-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 21.1, 42.0, 55.4, 63.2, 68.0, 102.0, 121.12, 125.7, 131.6, 133.9, 136.8, 147.5, 148.8, 152.3, 158.7, 167.5.

**2-[[7-bromo-4-[(1-hydroxy-3-pyridyl)methylamino]thieno[3,2-d]pyrimidin-2-yl]amino]-3-methyl-butan-1-ol (39d)**

On ajoute au composé **38c** (0.4 mmol, 0.16 g, 1 eq) le D-thréoninol (1.6 mmol, 0.168 g, 4 eq) puis on chauffe la réaction à 160°C pendant 8h. On procède ensuite à une extraction par l'AcOEt. Les phases organiques sont alors regroupées et séchées avec du sulfate de sodium (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) avant d'être évaporées sous pression. Enfin, le brut est purifié sur une colonne flash AcOEt/ EtOH (90/10). On obtient un solide crème avec un rendement de 55%.

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): δ 1.05 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.49 (m, 2H, CH, CH), 3.93 (d, *J*= 5.5, 2H, CH<sub>2</sub>OH), 4.69 (m, 4H, NH, OH, NHCH<sub>2</sub>), 5.6 (s, 1H, OH), 6.5 (s, 1H, OH), 7.40 (d, *J*= 7.83 Hz, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.56 (t, *J*= 7.83 Hz, 1H, H<sub>ar</sub>), 8.02 (d, *J*= 7.83 Hz, 1H, H<sub>ar</sub>), 8.18 (s, 1H, H<sub>thiophène</sub>), 8.57 (s, 1H, H<sub>ar</sub>).

<sup>13</sup>C-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 20.4, 42.2, 55.6, 62.5, 68.8, 102.1, 120.3, 128.7, 131.3, 133.9, 136.0, 138.9, 141.5, 153.1, 158.8, 166.1.

**MS (ESI) m/z théorique : 439,06 Obtenu : ESI (+) 440,1. (M+H<sup>+</sup>).**

**2-[[7-bromo-4-[(1-hydroxy-3-pyridyl)methylamino]thieno[3,2-d]pyrimidin-2-yl]amino]butan-1-ol (39e)**

On ajoute au composé **38c** (0.37 mmol, 0.15 g, 1 eq) le (*S*)-2-amino-1-butanol (5.3 mmol, 0.47 g, 14 eq) puis on chauffe la réaction à 160°C pendant 8h. On procède ensuite à une extraction par l'AcOEt. Enfin, le brut est purifié sur colonne (DCM/ EtOH/ Et<sub>3</sub>N ; 94 : 5 : 1). On obtient un solide crème avec un rendement de 53%.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 1.0 (t, *J*= 6 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.56 (m, 2H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 3.67 (m, 1H, NHCH), 3.84 (m, 1H, CH<sub>2</sub>OH), 3.92 (m, 1H, CH<sub>2</sub>OH), 4.80 (d, *J*= 5.5, 2H, NHCH<sub>2</sub>), 4.96 (s, 1H, NH), 6.5 (s, 1H, OH), 7.40 (d, *J*= 7.83 Hz, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.46 (t, *J*= 7.83 Hz, 1H, H<sub>ar</sub>), 8.12 (d, *J*= 7.83 Hz, 1H, H<sub>ar</sub>), 8.31 (s, 1H, H<sub>thiophène</sub>), 8.49 (s, 1H, H<sub>ar</sub>).

<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 10.4, 24.3, 42.5, 56.7, 64.4, 101.9, 121.2, 128.6, 131.4, 133.2, 136.4, 138.9, 142.5, 153.2, 158.4, 166.4.

MS (ESI) *m/z* théorique : 425,05 Obtenu : ESI (+) 426,01. (M+H<sup>+</sup>).

**(2*S*,3*S*)-2-[[7-bromo-4-[(4-phenylphenyl)methylamino]thieno[3,2-d]pyrimidin-2-yl]amino]butane-1,3-diol(39f)**

On ajoute au composé **38a** (0.33 mmol, 0.15 g, 1 eq) le D-thréoninol (1.3 mmol, 0.14 g, 4 eq) puis on chauffe la réaction à 160°C pendant 8h. On procède ensuite à une extraction au DCM. Les phases organiques sont alors regroupées et séchées avec du sulfate de sodium (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) avant d'être évaporées sous pression. Enfin, on ajoute de l'éther pour faire cristalliser le produit. On évapore le solvant et on obtient un solide marron avec un rendement de 48%.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 1.3 (d, *J*= 6 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.65 (s, 1H, NH), 3.83-3.9 (m, 2H, CH<sub>2</sub>OH), 4.0 (m, 1H, CH), 4.2 (m, 1H, CH), 4.80 (d, *J*= 5.5, 2H, NHCH<sub>2</sub>), 5.12 (s, 1H, NH), 5.8 (d, 1H, OH), 7.35 (t, *J*=7.83 Hz, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.44 (m, 4H, H<sub>ar</sub>), 7.57 (s, 1H, H<sub>thiophène</sub>), 7.59 (s, 4H, H<sub>ar</sub>).

<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 20.3, 43.4, 55.4, 62.4, 68.2, 102.3, 120.7, 127.3, 128.1, 128.4, 129.1, 132.3, 139.5, 139.6, 140.4, 152.9, 158.5, 167.3.

**(2R)-2-[[7-bromo-4-[(4-phenylphenyl)methylamino]thieno[3,2-d]pyrimidin-2-yl]amino]butan-1-ol (39g)**

On ajoute au composé **38a** (0.33 mmol, 0.15 g, 1 eq) le R-2-amino-1-butanol (5.31 mmol, 0.5 ml, 35 eq) puis on chauffe la réaction à 160°C pendant 8h. On procède ensuite à une extraction au DCM. Les phases organiques sont alors regroupées et séchées avec du sulfate de sodium (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) avant d'être évaporées sous pression. Enfin, on ajoute de l'éther pour faire cristalliser le produit. Après filtration, on obtient un solide marron clair avec un rendement de 34%.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 1.03 (t, *J* = 6 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.56 (m, 2H, CH<sub>2</sub>OH), 3.68 (m, 1H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 3.84 (m, 1H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 3.93 (m, 1H, NHCH), 4.82 (d, *J* = 5.5, 2H, NHCH<sub>2</sub>), 5.10 (m, 2H, OH, NH), 7.35 (t, *J* = 7.83 Hz, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.44 (m, 4H, H<sub>ar</sub>), 7.57 (s, 1H, H<sub>thiophène</sub>), 7.60 (s, 4H, H<sub>ar</sub>).

<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 10.3, 24.5, 43.4, 55.7, 64.4, 101.9, 120.2, 127.3, 128.2, 128.3, 128.6, 128.9, 132.3, 139.2, 139.7, 140.4, 153.2, 158.8, 167.2.

**(2S)-2-[[7-bromo-4-[(4-phenylphenyl)methylamino]thieno[3,2-d]pyrimidin-2-yl]amino]butan-1-ol (39h)**

On ajoute au composé **38a** (0.33 mmol, 0.15 g, 1 eq) le S-2-amino-1-butanol (5.31 mmol, 0.5 ml, 16 eq) puis on chauffe la réaction à 160°C pendant 8h. On procède ensuite à une extraction au DCM. Les phases organiques sont alors regroupées et séchées avec du sulfate de sodium (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) avant d'être évaporées sous pression. Puis, on purifie le produit sur colonne avec un éluant (DCM/AcOEt/Cy/EtOH ; 50 :24.5 :24.5 :1). Enfin, on ajoute de l'éther pour faire cristalliser le produit. On obtient un solide jaune pâle avec un rendement de 50%.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 1.0 (t, *J* = 6 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.56 (m, 2H, CH<sub>2</sub>OH), 3.67 (m, 1H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 3.84 (m, 1H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 3.92 (m, 1H, NHCH), 4.80 (d, *J* = 5.5, 2H, NHCH<sub>2</sub>), 5.11 (t, *J* = 1.5, 1H, NH), 5.23 (d, 1H, OH), 7.35 (t, *J* = 7.83 Hz, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.45 (m, 4H, H<sub>ar</sub>), 7.57 (s, 1H, H<sub>thiophène</sub>), 7.59 (s, 4H, H<sub>ar</sub>).

<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 10.3, 24.5, 43.4, 55.7, 64.4, 101.9, 120.2, 127.3, 128.2, 128.3, 128.6, 128.9, 132.3, 139.2, 139.7, 140.4, 153.2, 158.8, 167.2.

**(2S)-2-[[7-isopropenyl-4-[(4-phenylphenyl)methylamino]thieno[3,2-d]pyrimidin-2-yl]amino]-4-methyl-pentan-1-ol (39i)**

On ajoute au composé **38a** (0.24 mmol, 0.11 g, 1 eq) le *L*-leucinol (*S*)-2-Amino-4-methyl-1-pentanol (3.9 mmol, 0.5 ml, 16 eq) puis on chauffe la réaction à 160°C pendant 8h. On procède ensuite à une extraction par l'AcOEt. Les phases organiques sont alors regroupées et séchées avec du sulfate de sodium (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) avant d'être évaporées sous pression. Enfin, on ajoute de l'éther pour faire cristalliser le produit. On obtient un solide jaune pâle avec un rendement de 60%.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) (ppm): 1,04 (d, *J*= 6.65, 6H, 2 CH<sub>3</sub>), 1.18 (m, 1H, CHCH<sub>2</sub>), 1.27 (m, 1H, CHCH<sub>2</sub>), 1.64 (s, 1H, NH), 1.82 (m, 1H, CH), 2.63 (s, 1H, NH), 3.49 (m, 2H, CH<sub>2</sub>OH), 3.69 (m, 1H, CH), 4.58 (s, 2H, NHCH<sub>2</sub>), 7.38(m, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.45 (d, *J*= 7.64, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.48 (d, *J*=7.64, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.67 (d, *J*=7.64, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.72 (dd, *J*= 1.5, *J*=7.64, 2H, H<sub>ar</sub>), 8.03 (s, 1H, H<sub>thiophène</sub>)

<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 23.2, 25.1, 39.4, 43.4, 50.7, 65.7, 101.9, 120.2, 127.7, 128.1, 128.5, 128.9, 129.3, 131.3, 139.5, 139.7, 141.4, 153.7, 158.8, 166.7.

**(2R)-2-[[4-(benzyl-3-chloranyl)-7-methyl-thieno[3,2-d]pyrimidin-2-yl]amino]butan-1-ol (39j)**

Dans un tube fermé, le produit **38d** (1.5 mmol, 0.5 g, 1 eq) est mis en réaction avec du *R*-aminobutanol (7.5 mmol, 0.67 ml, 5 eq) en chauffant à 100°C pendant 48 h. Après extraction par DCM, on purifie le brut sur une colonne (DCM/ AcOEt/ EtOH/ Et<sub>3</sub>N ; 4 :1 : 0,03 : trace), puis on évapore sous vide, le produit formé cristallise dans l'éther.

La réaction est suivie par CCM (DCM/ AcOEt ; 8 : 2). On obtient une poudre crème avec un Rdt de 35%. P.F : 110- 110 °C.

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 0.91 (t, *J*= 6.56 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>); 1.46-1.56 (m, 2H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>); 2.21 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3.55-3.57 (m, 1H, NHCH); 3.72-3.78 (m, 2H, CH<sub>2</sub>OH); 4.62-4.72 (m, 2H, NHCH<sub>2</sub>); 4.89 (bs, 1H, NH); 4.99 (s, 1H, OH); 7.08 (s, 1H, H<sub>thiophène</sub>); 7.15-7.31(m, 6H, H<sub>ar</sub>).

$^1\text{H}$ -RMN (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 0.81 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ); 1.39-1.42 (m, 1H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ); 1.55-1.60 (m, 1H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ); 2.17 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 3.82 (s, 1H,  $\text{NH}$ ); 4.57-4.73 (m, 3H,  $\text{NHCH}_2$ ,  $\text{OH}$ ); 7.18-7.22 (m, 1H,  $H_{ar}$ ); 7.27-7.35 (m, 4H,  $H_{ar}$ ); 7.46 (s, 1H,  $H_{thiophène}$ ); 7.87 (s, 1H,  $\text{NH}$ ).

$^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 10.5, 14.6, 24.1, 43.4, 55.7, 64.4, 99.6, 118.5, 126.9, 127.6, 128.4, 135.8, 139.8, 153.9, 155.5, 158.9

**2-[[4-(benzyl-3-chloranyl)-7-methyl-thieno[3,2-d]pyrimidin-2-yl]amino]propane-1,3-diol (39k)**

Dans un tube fermé, le produit **38d** (1.34 mmol, 0.43 g, 1 eq) est mis en réaction avec du 2-aminopropane-1,3-diol (6.7 mmol, 0.6g, 5 eq) en chauffant à 100°C pendant 12 h. La réaction est suivie par CCM (5 DCM/ 5 AcOEt). Après extraction par AcOEt et évaporation sous vide, le brut est purifié par une colonne flash (DCM/ AcOEt/ EtOH/ Et<sub>3</sub>N ; 2 : 3 : 0,2: trace). Le produit cristallise par concentration, on obtient une poudre crème avec un Rdt de 50%. P.F : 91- 98°C.

$^1\text{H}$ -RMN (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 2.21 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 3.50 (s, 4H, 2  $\text{CH}_2\text{OH}$ ); 3.92 (s, 1H,  $\text{NH}$ ); 3.64-3.66 (m, 3H,  $\text{NHCH}_2$ ,  $\text{NHCH}_2$ ); 6.11 (s, 1H,  $\text{OH}$ ); 7.22-7.35 (m, 5H,  $H_{ar}$ ); 8.06 (s, 1H,  $H_{thiophène}$ ), 8.22 (s, 1H,  $\text{NH}$ ).

$^{13}\text{C}$ -RMN (DMSO- $d_6$ ) : 14.5, 43.6, 53.7, 62.3, 99.1, 118.5, 126.9, 127.3, 128.5, 135.8, 139.8, 153.7, 155.8, 158.5.

**(2r)-2-[[4-(benzyl-3-chloranyl)-7-isopropenyl-thieno[3,2-d]pyrimidin-2-yl]amino]butan-1-ol (40)**

Le produit **39a** (0.37 mmol, 0.15 g, 1 eq) est mis en solution dans 1.5 ml de dioxane, puis sous azote on rajoute successivement du carbonate de sodium 2M (0.74 mmol, 0.5 ml, 2eq), du tetrakis (0.07 mmol, 0.085 g, 0.02 eq) et en dernier l'ester boronique (0.55 mmol, 0.1 ml, 1.5 eq). Le milieu réactionnel est chauffé à reflux pendant 5h, la réaction est suivie par CCM (8 DCM/ 2 AcOEt). Après extraction par AcOEt le brut est purifié sur silice (DCM/ AcOEt/ EtOH/ Et<sub>3</sub>N ; 8 : 2 : trace : trace). On obtient une poudre beige avec un Rdt de 95%. P.F : 112- 116°C.

$^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.02 (t, J= 7.57 Hz, 3H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ); 1.64-1.68 (m, 2H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ); 2.18 (s, 3H,  $\text{CCH}_3$ ); 3.60-3.65 (m, 1H,  $\text{NHCH}$ ); 3.80-3.85 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ); 3.97-4.00 (m,

1H,  $\underline{CH_2OH}$ ); 4.77 (d,  $J=5.55$  Hz, 2H,  $\underline{NHCH_2}$ ); 4.92 (s, 1H,  $\underline{CCH_2}$ ); 5.33 (s, 1H,  $\underline{CCH_2}$ ); 6.25 (s, 1H,  $\underline{NH}$ ); 7.31-7.40 (m, 6H,  $H_{ar}$ ).

$^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 10.3, 22.5, 24.2, 43.6, 55.9, 64.2, 99.7, 118.3, 125.4, 126.9, 127.4, 128.2, 139.6, 144.2, 148.5, 154.9, 157.6, 163.1.

#### **Synthèse du 1H-thieno[3,2-d]pyrimidine-2,4-dione (41)**

On ajoute au composé **25** (63.7 mmol, 10 g, 1 eq) de l'urée (318.5 mmol, 19.1 g, 5 eq) avant de chauffer la réaction à 190°C pendant 2.5h. Une fois la température retombée à 120°C, on verse le mélange dans 20 ml d'une solution de NaOH 1M. Les résidus insolubles sont ensuite filtrés et le filtrat acidifié par de l'HCl 2M. Il se forme alors un précipité que l'on filtre avant de le laisser sécher à l'étuve pendant 24h. On obtient alors un produit crème avec un rendement de 62%.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  (ppm): 7.19 (d,  $J=5.05$  Hz, 1H,  $H_{\text{thiophène}}$ ), 8.04 (d,  $J=5.05$  Hz, 1H,  $H_{\text{thiophène}}$ ), 11.37 (s, 2H, 2  $\underline{OH}$ ).

#### **Synthèse du 7-bromo-1H-thieno[3,2-d]pyrimidine-2,4-dione (42)**

On dissout le composé **40** (2.96 mmol, 0.5 g, 1 eq) dans de l'acide acétique avant d'ajouter le  $\text{Br}_2$  (8.9mmol, 0.5 ml, 3 eq). On chauffe la réaction à 110°C pendant 48h. Une fois à TA, le mélange est versé progressivement dans 40 ml d'eau. Il se forme alors un précipité qui est filtré puis sécher à l'étuve pendant 24h. On obtient un produit crème avec un rendement de 86%.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  (ppm): 8.23 (s, 1H,  $H_{\text{thiophène}}$ ), 11.52 (s, 2H, 2  $\underline{OH}$ ).

#### **7-bromo-2,4-dichloro-thieno[3,2-d]pyrimidine (43)**

On dissout le composé **42** (4.94 mmol, 1.2 g, 1 eq) dans 30 ml de  $\text{POCl}_3$ , ensuite on chauffe à 100°C toute la nuit. Le  $\text{POCl}_3$  est éliminé par distillation, puis On extrait au DCM et on concentre sous vide. On obtient une poudre blanchâtre avec un rendement de 90%.

$^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 8,02 (s, 1H).

$^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 120.2, 131.3, 132.4, 158.6, 160.5, 169.9.

### **7-bromo-2-chloro-N-(3-pyridylmethyl)thieno[3,2-d]pyrimidin-4-amine (44)**

Le produit **43** (3.87 mmol, 1.1g, 1 eq) est dissout dans 18 ml de MeOH. Ensuite sous azote, on ajoute la 3-pyridylmethanamine (9.08 mmol, 0.98 ml, 2.5 eq) et on laisse 3h, sous agitation à T.A. après évaporation du MeOH, on reprend avec de l'eau, le produit formé sera filtré et séché. On obtient une poudre crème avec un rendement de 85%.

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 3.17 (s, 1H,  $\text{NH}$ ), 4.65 (s, 2H,  $\text{NHCH}_2$ ), 7.33 (d,  $J= 7.5$ , 1H,  $H_{ar}$ ), 7.69 (dd,  $J= 7.5$ ,  $J= 1.5$ , 1H,  $H_{ar}$ ), 8.04 (s, 1H,  $H_{thiophène}$ ), 8.34 (dt,  $J= 7.5$ ,  $J= 1.5$ , 1H,  $H_{ar}$ ), 8.48 (t,  $J= 1.5$ , 1H,  $H_{ar}$ ).

### **(2S)-2-[[7-bromo-4-(3-pyridylmethylamino)thieno[3,2-d]pyrimidin-2-yl]amino]butan-1-ol (45a)**

Le composé **43** (0.42 mmol, 0.15g, 1 eq) est chauffé avec le *S*-2-amino-1-butanol (5.3 mmol, 0.5 ml, 12 eq) à 150°C pendant 6h. Ensuite on extrait avec du DCM et on évapore sous vide. On obtient une poudre jaune claire avec un rendement de 60%.

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.01 (t,  $J= 6$ , 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.53 (m, 2H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ), 3.1 (s, 1H,  $\text{NH}$ ), 3.45 (m, 1H,  $\text{NHCH}$ ), 3.58 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 3.85 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 4.71 (s, 2H,  $\text{NHCH}_2$ ), 7.32 (t,  $J= 7.5$ , 1H,  $H_{ar}$ ), 7.69 (d,  $J= 7.5$ , 1H,  $H_{ar}$ ), 8.06 (s, 1H,  $H_{thiophène}$ ), 8.38 (d,  $J= 7.5$ , 1H,  $H_{ar}$ ), 8.51 (s, 1H,  $H_{ar}$ ).

$^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 10.8, 24.1, 41.1, 55.9, 64.7, 101.9, 118.7, 125.9, 132.5, 133.9, 135.5, 148.5, 149.1, 155.1, 155.9, 168.9.

### **(2R)-2-[[7-bromo-4-(3-pyridylmethylamino)thieno[3,2-d]pyrimidin-2-yl]amino]-4-methyl-pentan-1-ol (45b)**

Le composé **43** (0.42 mmol, 0.15g, 1 eq) est chauffé avec le D-leucinol (*R*)-2-Amino-4-methyl-1-pentanol (3.9 mmol, 0.5 ml, 9 eq) à 120°C pendant 6h. Ensuite on extrait avec de l'AcOEt et on évapore sous vide. On obtient une poudre jaune claire avec un rendement de 67%.

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.05 (d,  $J= 6$ , 6H, 2  $\text{CH}_3$ ), 1.3 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}$ ), 1.71 (m, 1H,  $\text{CH}$ ), 1.76 (s, 1H,  $\text{NH}$ ), 3.18 (s, 1H,  $\text{NH}$ ), 3.53 (m, 1H,  $\text{CH}$ ), 3.58 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 3.83 (m,

1H,  $\underline{\text{CH}_2\text{OH}}$ ), 4.69 (s, 2H,  $\text{NHCH}_2$ ), 7.33 (t,  $J=7.5$ , 1H,  $H_{ar}$ ), 7.67 (dt,  $J=1.5$ ,  $J=7.5$ , 1H,  $H_{ar}$ ), 8.02 (s, 1H,  $H_{\text{thiophène}}$ ), 8.34 (dt,  $J=1.5$ ,  $J=7.5$ , 1H,  $H_{ar}$ ), 8.49 (t,  $J=1.5$ , 1H,  $H_{ar}$ ).

$^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 23.3, 25.2, 39.3, 41.1, 51.5, 65.7, 101.9, 118.4, 125.1, 132.7, 133.7, 135.5, 148.1, 148.6, 155.5, 156.8, 168.7.

## **VII. BIBLIOGRAPHIE**

---

1. Meijer, L.; Raymond, E. Roscovitine and Other Purines as Kinase Inhibitors. From Starfish Oocytes to Clinical Trials. *Acc. Chem. Res.* **2003**, *36*, 417-25.
2. Niedner, R.H.; Buzko OV, Haste NM, et al. Protein kinase resource: an integrated environment for phosphorylation research. *Proteins.* **2006**, *63*, 78–86.
3. Borgne, A.; Meijer, L. The search for and potential therapeutic applications of chemical inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Med. Sci.* **1999**, *15*, 496-503.
4. Parkitna, J.R.; Obara, I.; Wawrzczak-Bargiela, A.; Makuch, W.; Przewlocka, B.; Przewlocki, R. Effects of glycogen synthase kinase 3 beta and cyclin-dependent kinase 5 inhibitors on morphine-induced analgesia and tolerance in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2006**, *319*, 832-9.
5. Superti, F.; Ammendolia, M. G.; Marchetti, M. New advances in anti-HSV chemotherapy. *Curr. Med. Chem.* **2008**, *15*, 900-11.
6. Diwan, P.; Lacasse, J.J.; Schang, L.M. Roscovitine inhibits activation of promoters in herpes simplex virus type 1 genomes independently of promoter-specific factors. *J. Virol.* **2004**, *78*, 9352-65.
7. Bible, K.C.; Lensing, J.L.; Nelson, S.A.; Lee, Y.K.; Reid, J.M.; Ames, M.M.; Isham, C. R.; Piens, J.; Rubin, S.L.; Rubin, J.; Kaufmann, S.H.; Atherton, P.J.; Sloan, J.A.; Daiss, M.K.; Adjei, A.A.; Erlichman, C. Phase 1 trial of flavopiridol combined with cisplatin or carboplatin in patients with advanced malignancies with the assessment of pharmacokinetic and pharmacodynamic end points. *Clin. Cancer Res.* **2005**, *11*, 5935-41.
8. Dey, A.; Wong, E.T.; Cheok, C.F.; Tergaonkar, V.; Lane, D.P. R-Roscovitine simultaneously targets both the p53 and NF-kappaB pathways and causes potentiation of apoptosis: implications in cancer therapy. *Cell Death Differ.* **2008**, *15*, 263-73.
9. Galons, H.; Oumata, N.; Gloulou, O.; Meijer, L. Cyclin-dependent kinase inhibitors closer to market launch? *Expert Opin Ther. Pat.* **2013**, *23*, 945-63.
10. [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov).

11. Williams, R. Discontinued drugs in 2007: oncology drugs. *Expert Opin. Investig. Drugs*. **2008**, *17(12)*, 1791-816.
12. Boss, D.S.; Schwartz, G.K.; Middleton, M.R.; Amakye, D.D.; Swaisland, H.; Midgley, R.S.; Ranson, M.; Danson, S.; Calvert, H.; Plummer, R.; Morris, C.; Carvajal, R.D.; Chirieac, L. R.; Schellens, J.H.M.; Shapiro, G. I. Safety, tolerability, pharmacokinetics and pharmacodynamics of the oral cyclin-dependent kinase inhibitor AZD5438 when administered at intermittent and continuous dosing schedules in patients with advanced solid tumours. *Ann. Oncol.* **2010**, *21*, 884–894.
13. Meijer, L.; Bettayeb, K.; Galons, H. (R)-Roscovitine (CYC202, Seliciclib) CDK inhibitors and their potential as anti-tumor agents. In: Yue, E.; Smith, P.J. Editors, Chapter 9, monographs on enzyme inhibitors, (volume 2). Taylor & Francis, CRC Press. **2006**, 187-226.
14. Galons, H.; Oumata, N.; Meijer, L. Cyclin-dependent kinase inhibitors : a survey of recent patent literature. *Expert opin. Ther. Patents* .**2010**, *20*, 3. 377-404.
15. Meijer, L.; Borgne, A.; Mulner, O.; Chong, J. P.; Blow, J. J.; Inagaki, N.; Inagaki, M.; Delcros, J.G. & Moulinoux, J. P. Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. *Eur. J. Biochem.* **1997**, *243*, 1-2, 527-36.
16. Alvi, A.J.; Austen, B.; Weston, V.J.; Fegan, C.; MacCallum, D.; Gianella-Borradori, A.; Lane, D.P.; Hubank, M.; Powell, J.E.; Wei, W.; Taylor, A.M.; Moss, P.A.; Stankovic, T. A novel CDK inhibitor, CYC202 (R-roscovitine), overcomes the defect in Cyclin-Dependent Kinases (Cdk) as Targets for Cancer Therapy and Imaging 279 p53-dependent apoptosis in B-CLL by down-regulation of genes involved in transcription regulation and survival. *Blood*. **2005**, *105 (11)*, 4484-91.
17. Karp, J. Phase 1 and pharmacokinetic study of bolus-infusion flavopiridol followed by cytosine arabinoside and mitoxantrone for acute leukemias. *Blood*. **2011**, *117*, 3302-10.
18. Parry, D.; Guzi, T.; Shanahan, F.; Davis, N.; Prabhavalkar, D.; Wiswell, D.; Seghezzi, W.; Paruch, K.; Dwyer, M.P.; Doll, R.; Nomeir, A.; Windsor, W.; Fischmann, T.; Wang, Y.; Oft, M.; Chen, T.; Kirschmeier, P.; Lees, E. M. Dinaciclib (SCH 727965) a novel and potent cyclin-dependent kinase inhibitor. *Mol. Cancer Ther.* **2010**, *9 (8)*, 2344-53.

19. [www.selleckchem.com](http://www.selleckchem.com)
20. Conroy, A.; Stockett, D.E.; Walker, D.; Arkin, M.R.; Hoch, U.; Fox, J.A.; Hawtin, R.E. SNS-032 is a potent and selective CDK 2, 7 and 9 inhibitor that drives target modulation in patient samples. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2009**, *64*, 723-32.
21. Tong, W.G.; Chen, R.; Plunkett, W.; Siegel, D.; Sinha, R.; Harvey, R.D.; Badros, A.Z.; Popplewell, L.; Coutre, S.; Fox, J.A.; Mahadocon, K.; Chen, T.; Kegley, P.; Hoch, U.; Wierda, W.G. Phase I and pharmacologic Study of SNS-032, a Potent and Selective Cdk2, 7, and 9 Inhibitor, in Patients with Advanced Chronic Lymphocytic Leukemia and Multiple Myeloma. *J. Clin. Oncol.* **2010**, *28*, 3015-22.
22. Chen, R.; Wierda, W.G.; Chubb, S.; Hawtin, R.E.; Fox, J.A.; Keating, M.J.; Gandhi, V.; Plunkett, W. Mechanism of action of SNS-032, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* **2009**, *113*, 4637-45.
23. Menu, E.; Garcia, J.; Huang, X.; Di Liberto, M.; Toogood, P.L.; Chen, I.; Vanderkerken, K.; Chen-Kiang, S. A novel therapeutic combination using PD 0332991 and bortezomib: study in the 5T33MM myeloma model. *Cancer. Res.* **2008**, *68*, (14), 5519-23.
24. Wesierska-Gadek, J.; Maurer, M.; Zulehner, N.; Komina, O. Whether to target single or multiple CDKs for therapy? That is the question. *J. Cell. Physiol.* **2011**, *226* (2), 341-9.
25. Wyatt, P.G.; Woodhead, A.J.; Berdini, V.; Boulstridge, J.A.; Carr, M.G.; Cross, D.M.; Davis, D.J.; Devine, L.A.; Early, T.R.; Feltell, R.E.; Lewis, E.J.; McMenamin, R.L.; Navarro, E.F.; O'Brien, M.A.; O'Reilly, M.; Reule, M.; Saxty, G.; Seavers, L.C.; Smith, D.M.; Squires, M.S.; Trewartha, G.; Walker, M.T.; Woolford, A.J. Identification of N-(4-piperidinyl)-4-(2,6-dichlorobenzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxamide (AT7519), a novel cyclin dependent kinase inhibitor using fragmentbased X-ray crystallography and structure based drug design. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, (16), 4986-99.
26. Mahadevan, D.; Plummer, R.; Squires, M.S.; Rensvold, D.; Kurtin, S.; Pretzinger, C.; Dragovich, T.; Adams, J.; Lock, V.; Smith, D.M.; Von Hoff, D.; Calvert, H. A phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of AT7519, a cyclin-dependent kinase inhibitor in patients with refractory solid tumors. *Ann. Oncol.* **2011**, *22*, 2137-43.

27. Santo, L.; Vallet, S.; Hideshima, T.; Cirstea, D.; Ikeda, H.; Pozzi, S.; Patel, K.; Okawa, Y.; Gorgun, G.; Perrone, G.; Calabrese, E.; Yule, M.; Squires, M.; Ladetto, M.; Boccadoro, M.; Richardson, P.G.; Munshi, N.C.; Anderson, K.C.; Raje, N. AT7519, A novel small molecule multi-cyclin-dependent kinase inhibitor, induces apoptosis in multiple myeloma via GSK-3beta activation and RNA polymerase II inhibition. *Oncogene*. **2010**, *29*, (16), 2325-36.
28. Squires, M.S.; Cooke, L.; Lock, V.; Qi, W.; Lewis, E.J.; Thompson, N.T.; Lyons, J.F.; Mahadevan, D. AT7519, a cyclin-dependent kinase inhibitor, exerts its effects by transcriptional inhibition in leukemia cell lines and patient samples. *Mol. Cancer. Ther.* **2010**, *9*, (4), 920-8.
29. Squires, M.S.; Feltell, R.E.; Wallis, N.G.; Lewis, E. J.; Smith, D.M.; Cross, D.M.; Lyons, J.F.; Thompson, N.T. Biological characterization of AT7519, a small-molecule inhibitor of cyclin-dependent kinases, in human tumor cell lines. *Mol. Cancer. Ther.* **2009**, *8*, (2), 324-32.
30. Joshi, K.S.; Rathos, M.J.; Joshi, R.D.; Sivakumar, M.; Mascarenhas, M.; Kamble, S.; Lal, B.; Sharma, S. In vitro antitumor properties of a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, P276-00. *Mol. Cancer. Ther.* **2007a**, *6*, (3), 918-25
31. Joshi, K.S.; Rathos, M.J.; Mahajan, P.; Wagh, V.; Shenoy, S.; Bhatia, D.; Chile, S.; Sivakumar, M.; Maier, A.; Fiebig, H.H.; Sharma, S. P276-00, a novel cyclindependent inhibitor induces G1-G2 arrest, shows antitumor activity on cisplatinresistant cells and significant in vivo efficacy in tumor models. *Mol. Cancer. Ther.* **2007b**, *6*, (3), 926-34.
32. Siemeister, G.; Lücking, U.; Wengner, A.; Lienau, P.; Schatz, C.; Mumberg, D. ; Ziegelbauer, K. Pharmacologic profile of the oral novel pan-CDK inhibitor BAY 1000394 in chemosensitive and chemorefractory tumor models. Proceedings of the 101<sup>st</sup> Annual Meeting of the American Association for Cancer Research (AACR), Abstract number 3883, Washington, DC. Philadelphia (PA), Apr 17-21, **2010**.
33. Caporali, S.; Alvino, E.; Starace, G.; Ciomei, M.; Brasca, M. G.; Levati, L.; Garbin, A.; Castiglia, D.; Covaciu, C.; Bonmassar, E.; D'Atri, S. The cyclin-dependent kinase inhibitor PHA-848125 suppresses the in vitro growth of human melanomas sensitive or

resistant to temozolomide, and shows synergistic effects in combination with this triazene compound. *Pharmacol. Res.* **2010**, *61*, (5), 437-48.

- 34.** Albanese, C.; Alzani, R.; Amboldi, N.; Avanzi, N.; Ballinari, D.; Brasca, M.G.; Festuccia, C.; Fiorentini, F.; Locatelli, G.; Pastori, W.; Patton, V.; Roletto, F.; Colotta, F.; Galvani, A.; Isacchi, A.; Moll, J.; Pesenti, E.; Mercurio, C.; Ciomei, M. Dual targeting of CDK and tropomyosin receptor kinase families by the oral inhibitor PHA-848125, an agent with broad-spectrum antitumor efficacy. *Mol. Cancer. Ther.* **2010**, *9*, (8), 2243-54.
- 35.** Popowycz, F.; Fournet, G.; Schneider, C.; Bettayeb, K.; Ferandin, Y.; Lamigeon, C.; Tirado, O.M.; Mateo-Lozano, S.; Notario, V.; Colas, P.; Bernard, P.; Meijer, L.; Joseph, B. Pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazine as a Purine Bioisostere: Access to Potent Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor (*R*)-Roscovitine Analogue. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 655-63.
- 36.** Raynaud, F.I., Whittaker, S.R., Fischer, P.M., McClue, S., Walton, M.I., Barrie, S.E., Garrett, M.D., Rogers, P., Clarke, S.J., Kelland, L.R., Valenti, M., Brunton, L., Eccles, S., Lane, D.P., and Workman, P. In vitro and in vivo pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships for the trisubstituted aminopurine cyclin-dependent kinase inhibitors olomoucine, bohemine and CYC202. *Clin. Cancer Res.* **2005**, *11*, 4875-87.
- 37.** Lapenna, S.; Giordano, A. Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer? *Nat. Rev. Drug Discovery*, **2009**, *8*, 547-66.
- 38.** Kim, K.S.; Sack, J.S.; Tokarski, J.S.; Qian, L.; Chao, S.T.; Leith, L.; Kelly, Y.F.; Misra, R.N.; Hunt, J.T.; Kimball, S.D.; Humphreys, W.G.; Wautlet, B.S.; Mulheron, J.G.; Webster, K.R. Thio- and Oxoflavopiridols, Cyclin-Dependent Kinase I Selective Inhibitors: Synthesis and Biological Effects. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4126-34.
- 39.** Paruch, K.; Dwyer, M.P.; Alvarez, C.; Brown, C.; Chan, T.; Doll, R.J.; Keertikar, K.; Knutson, C.; McKittrick, B.; Rivera, J.; Rossman, R.; Tucker, G.; Fischmann, T.; Hruza, A.; Madison, A.; Park, H.; Rokosz, L.R.; Stauffer, T.R.; Guzi, T.J. Discovery of Dinaciclib (SCH 727965): A Potent and Selective Inhibitor of Cyclin-Dependent Kinases. *ACS Med. Chem. Lett.* **2010**, *1* (5), 204-8.
- 40.** Fry, D.W.; Harvey, P.J.; Keller, P.R.; Elliott, W.L.; Meade, M.; Trachet, E.; Albassam, M.; Zheng, X.; Leopold, W.R.; Pryer, N.K.; Toogood, P.L. Specific inhibition of cyclin-

dependent kinase 4/6 by PD 0332991 and associated antitumor activity in human tumor xenografts. *Mol. Cancer Ther.* **2004**, *3*, 1427–38.

41. Finn, R.S.; Dering, J.; Conklin, D.; Kalous, O.; Cohen, D.J.; Desai, A.J.; Ginther, C.; Atefi, M.; Chen, I.; Fowst, C.; Los, G.; Slamon, D.J. PD 0332991, a selective cyclin D kinase 4/6 inhibitor, preferentially inhibits proliferation of luminal estrogen receptor-positive human breast cancer cell lines *in vitro*. *Breast Cancer Res.* **2009**, *11* (5), R77.
42. Misra, R.N.; Xiao, H.Y.; Kim, K.S.; Lu, S.; Han, W.C.; Barbosa, S.A.; Hunt, J.T.; Rawlins, D.B.; Shan, W.; Ahmed, S.Z.; Qian, L.; Chen, B.C.; Zhao, R.; Bednarz, M.S.; Kellar, K.A.; Mulheron, J.G.; Batorsky, R.; Roongta, U.; Kamath, A.; Marathe, P.; Ranadive, S.A.; Sack, J.S.; Tokarski, J.S.; Pavletich, N.P.; Lee, F.Y.; Webster, K.R.; Kimball, S.D. N-(Cycloalkylamino)acyl-2-aminothiazole Inhibitors of Cyclin-Dependent Kinase 2. N-[5-[[[5-(1,1-Dimethylethyl)-2-oxazolyl]methyl]thio]-2-thiazolyl]-4-piperidinecarboxamide (BMS-387032), a Highly Efficacious and Selective Antitumor Agent. *J. Med. Chem.* **2004**, *47* (7), 1719-28.
43. Musgrove, E.A.; Caldon, C.E.; Barraclough, J.; Stone, A.; Sutherland, R.L. Cyclin D as a therapeutic target in cancer. *Nat. Rev. Cancer.* **2011**, *11*, 558-72.
44. Heathcote, D.A.; Patel, H.; Kroll, S.H.B.; Hazel, P.; Periyasamy, M.; Alikian, M.; Kanneganti, S.K.; Jogalekar, A.S.; Scheiper, B.; Barbazanges, M.; Blum, A.; Brackow, J.; Siwicka, A.; Pace, R.; Fuchter, M.J.; Snyder, J.P.; Liotta, D.C.; Freemont, P.S.; Aboagye, E.O.; Coombes, R.C.; Barrett, A.G.M.; Ali, S.A. Novel Pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine Is a Potent Inhibitor of Cyclin-Dependent Protein Kinases 1, 2, and 9, Which Demonstrates Antitumor Effects in Human Tumor Xenografts Following Oral Administration. *J. med. Chem.* **2010**, *53* (24), 8508-22.
45. Jorda, R.; Havlíček, L.; McNae, I.W.; Walkinshaw, M.D.; Voller, J.; Šturc, A.; Navrátilová, J.; Kuzma, M.; Mistrík, M.; Bártek, J.; Strnad, M.; Kryštof, V. Pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidine Bioisostere of Roscovitine: Evaluation of a Novel Selective Inhibitor of Cyclin-Dependent Kinases with Antiproliferative Activity. *J. Med. Chem.* **2011**, *54* (8), 2980–2993.
46. Patent : EP1348707 A1, **2003**.
47. WO2009/34475 A2, **2009**.

48. Oumata, N.; Bettayeb, K.; Ferandin, Y.; Demange, L.; Lopez-Giral, A.; Goddard, M.L.; Myrianthopoulos, V.; Mikros, E.; Flajolet, M.; Greengard, P.; Meijer, L.; Galons, H. *J. Med. Chem.* **2008**, *51* (17), 5229–42.
49. Yenugonda, V.M.; Deb, T.B.; Grindrod, S.C.; Dakshanamurthy, S.; Yang, Y.; Paige, M.; Brown, M.L. Fluorescent cyclin-dependent kinase inhibitors block the proliferation of human breast cancer cells. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19* (8), 2714–25
50. Traquandi, G.; Ciomei, M.; Ballinari, D.; Casale, E.; Colombo, N.; Croci, V.; Fiorentini, F.; Isacchi, A.; Longo, A.; C.; Mercurio, Panzeri, A.; Pastori, W.; Pevarello, P.; Volpi, D.; Roussel, P.; Vulpetti, A.; Brasca, M.G. Identification of Potent Pyrazolo[4,3-*h*]quinazoline-3-carboxamides as Multi-Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors. *J. med. Chem.* **2010**, *53* (5), 2171–87.
51. Choi, S.J.; Lee, J.E.; Jeong, S.Y.; Im, I.; Lee, S.D.; Lee, E.J.; Lee, S. K.; Kwon, S.M.; Ahn, S.G.; Yoon, J.H.; Han, S.Y.; Kim, J.I.; Kim, Y.C. 5,5'-Substituted Indirubin-3'-oxime Derivatives as Potent Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors with Anticancer Activity. *J. med. chem.* **2010**, *53*, 3696-3706.
52. McIntyre, N.A.; McInnes, C.; Griffiths, G.; Barnett, A.L.; Kontopidis, G.; Slawin, A. M. Z.; Jackson, W.; Thomas, M.; Zheleva, D.I.; Wang, S.; Blake, D.G.; Westwood, N.J.; Fischer, P.M. Design, Synthesis, and Evaluation of 2-Methyl- and 2-Amino-*N*-aryl-4,5-dihydrothiazolo[4,5-*h*]quinazolin-8-amines as Ring-Constrained 2-Anilino-4-(thiazol-5-yl)pyrimidine Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors. *J. med. Chem.* **2010**, *53* (5), 2136-45.
53. Tsou, H.R.; Liu, X.; Birnberg, G.; Kaplan, J.; Otteng, M.; Tran, T.; Kutterer, K.; Tang, Z.; Suayan, R.; Zask, A.; Ravi, M.; Bretz, A.; Grillo, M.; McGinnis, J.; Rabindran, S.; Ayril-Kaloustian, S.; Mansour, T.S. Discovery of 4-(Benzylaminomethylene)isoquinoline-1,3-(2*H*,4*H*)-diones and 4-[(Pyridylmethyl)aminomethylene]isoquinoline-1,3-(2*H*,4*H*)-diones as Potent and Selective Inhibitors of the Cyclin-Dependent Kinase 4. *J. med. Chem.* **2009**, *52*, 8, 2289–2310
54. Brasca, M.G.; Albanese, C.; Alzani, R.; Amici, R.; Avanzi, N.; Ballinari, D.; Bischoff, J.; Borghi, D.; Casale, E.; Croci, V.; Fiorentini, F.; Isacchi, A.; Mercurio, C.; Nesi, M.; Orsini, P.; Pastori, W.; Pesenti, E.; Pevarello, P.; Roussel, P.; Varasi, M. Optimization

- of 6,6-dimethyl pyrrolo[3,4-*c*]pyrazoles: Identification of PHA-793887, a potent CDK inhibitor suitable for intravenous dosing. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 1844–53
- 55.** Lee, J.; Kim, K.H.; Jeong, S. Discovery of a novel class of 2-aminopyrimidines as CDK1 and CDK2 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 4203–05.
- 56.** Labroli, M.; Paruch, K.; Dwyer, M.P.; Alvarez, C.; Keertikar, K.; Poker, C.; Rossman, R.; Duca, J.S.; Fischmann, T.O.; Madison, V.; Parry, D.; Davis, N.; Seghezzi, W.; Wiswell, D.; Guzi, T. J. Discovery of pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine-based CHK1 inhibitors: A template-based approach-Part 2. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 471–74.
- 57.** Liu, X.; Shi, S.; Lam, F.; Pepper, C.; Fischer, P.M.; Wang, S. CDKI-71, a novel CDK9 inhibitor, is preferentially cytotoxic to cancer cells compared to flavopiridol. *Int. J. Cancer.* **2012**, *130*, 1216–26.
- 58.** Cho, Y. S.; Borland, M.; Brain, C.; Chen, C.H.T.; Cheng, H.; Chopra, R.; Chung, K.; Groarke, J.; He, G.; Hou, Y.; Kim, S.; Kovats, S.; Lu, Y.; O'Reilly, M.; Shen, J.; Smith, T.; Trakshel, G.; Vogtle, M.; Xu, M.; Xu, M.; Sung, M.J. 4-(Pyrazol-4-yl)-pyrimidines as Selective Inhibitors of Cyclin-Dependent Kinase 4/6. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*(22), 7938–57.
- 59.** Echalié, A.; Bettayeb, K.; Ferandin, Y.; Lozach, O.; Clément, M.; Valette, A.; Liger, F.; Marquet, B.; Morris, J.C.; Endicott, J.A.; Joseph, B.; Meijer, L. Meriolins (3-(Pyrimidin-4-yl)-7-azaindoles): Synthesis, Kinase Inhibitory Activity, Cellular Effects, and Structure of a CDK2/Cyclin A/Meriolin Complex. *J. Med. Chem.* **2008**, *51* (4), 737–51.
- 60.** <http://ansm.sante.fr>
- 61.** [wikipedia.org](http://wikipedia.org)
- 62.** Galons, H.; Oumata, N.; Meijer, L. Cyclin-dependent kinase inhibitors: a survey of recent patent literature. *Expert. Opin. Ther. Pat.* **2010**, *20*, (3), 377-404.
- 63.** Rizzolio, F.; Tuccinardi, T.; Caligiuri, I.; Lucchetti, C.; Giordano, A. CDK inhibitors: from the bench to clinical trials. *Curr. Drug Targets.* **2010**, *11*, 3, 279-90.
- 64.** Sharma, P. S.; Sharma, R.; Tyagi, R. Inhibitors of cyclin dependent kinases: useful targets for cancer treatment. *Curr. Cancer Drug Targets.* **2008**, *8*, (1), 53-75.

65. Dispenzieri, A.; Gertz, M.A.; Lacy, M.Q.; Geyer, S.M.; Fitch, T.R.; Fenton, R.G.; Fonseca, R.; Isham, C.R.; Ziesmer, S.C.; Erlichman, C.; Bible, K.C. Flavopiridol in patients with relapsed or refractory multiple myeloma: a phase 2 trial with clinical and pharmacodynamic end-points. *Haematologica*. **2006**, *91*, (3), 390-3.
66. Burdette-Radoux, S.; Tozer, R. G.; Lohmann, R. C.; Quirt, I.; Ernst, D. S.; Walsh, W.; Wainman, N.; Colevas, A. D.; Eisenhauer, E. A. Phase II trial of Advances in Cancer Therapy flavopiridol, a cyclin dependent kinase inhibitor, in untreated metastatic malignant melanoma. *Invest. New. Drugs*. **2004**, *22*, (3), 315-22.
67. Grendys, E.C., Jr.; Blessing, J.A.; Burger, R.; Hoffman, J. A phase II evaluation of flavopiridol as second-line chemotherapy of endometrial carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol. Oncol.* **2005**, *98*, (2), 249-53.
68. Shapiro, G. I.; Supko, J. G.; Patterson, A.; Lynch, C.; Lucca, J.; Zaccarola, P. F.; Muzikansky, A.; Wright, J.J.; Lynch, T.J.; Rollins, B.J. A phase II trial of the cyclindependent kinase inhibitor flavopiridol in patients with previously untreated stage IV non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer. Res.* **2001**, *7*, (6), 1590-9.
69. Jäger, W.; Zembsch, B.; Wolschann, P.; Pittenauer, E.; Senderowicz, A.M.; Sausville, E.A.; Sedlacek, H.H.; Graf, J.; Thalhammer, T. Metabolism of the anticancer drug Flavopiridol, a new inhibitor of cyclin dependent kinases, in rat liver. *Life. Sci.* **1998**, *62*, 1861-73.
70. Byrd, J.C.; Lin, T.S.; Dalton, J.T.; Wu, D.; Phelps, M.A.; Fischer, B.; Moran, M.; Blum, K.A.; Rovin, B.; Brooker-McEldowney, M.; Broering, S.; Schaaf, L.J.; Johnson, A.J.; Lucas, D.M.; Heerema, N.A.; Lozanski, G.; Young, D.C.; Suarez, J.R.; Colevas, A.D.; Grever, M.R. Flavopiridol administered using a pharmacologically derived schedule is associated with marked clinical efficacy in refractory genetically high-risk chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. **2007**, *109*, (2), 399-404.
71. Karp, J.E.; Smith, B.D.; Levis, M.J. Sequential flavopiridol, cytosine arabinoside, and mitoxantrone: a phase II trial in adults with poor-risk acute myelogenous leukemia. *Clin. Cancer. Res.* **2007**, *13* (15 Pt 1), 4467-73.

72. Fekrazad, H. M.; Verschraegen, C. F.; Royce, M.; Smith, H. O.; Chyi Lee, F.; Rabinowitz, I. A phase I study of flavopiridol in combination with gemcitabine and irinotecan in patients with metastatic cancer. *Am. J. Clin. Oncol.* **2010**, *33*(4), 393-7
73. Carvajal, R.D.; Tse, A.; Shah, M.A.; Lefkowitz, R.A.; Gonen, M.; Gilman-Rosen, L.; Kortmansky, J.; Kelsen, D.P.; Schwartz, G.K.; O'Reilly, E.M. A phase II study of flavopiridol (Alvocidib) in combination with docetaxel in refractory, metastatic pancreatic cancer. *Pancreatology.* **2009**, *9*, (4), 404-9.
74. Hassan, M.; Sallam, H.; Hassan, Z. The Role of Pharmacokinetics and pharmacodynamics in Early Drug Development with reference to the Cyclin-dependent Kinase (Cdk) Inhibitor – Roscovitine. *Sultan. Qaboos. Univ. Med. J.* **2011**, *11*, 165-78.
75. Wilson, S.C.; Atrash, B.; Barlow, C.; Eccles, S.; Fischer, P.M.; Hayes, A.; Kelland, L.; Jackson, W.; Jarman, M.; Mirza, A.; Moreno, J.; Nutley, B.P.; Raynaud, F.I.; Sheldrake, P.; Walton, M.; Westwood, R.; Whittaker, S.; Workman, P.; McDonald, E. Design, synthesis and biological evaluation of 6-pyridylmethylaminopurines as CDK inhibitors. *Bioorgan. Med. Chem.* **2011**, *19*, 6949–65.
76. Zhang, D.; Mita, M.; Shapiro, G.I.; Poon, J.; Small, K.; Tzontcheva, A.; Kantesaria, B.; Zhu, Y.; Bannerji, R.; Statkevich, P. Effect of aprepitant on the pharmacokinetics of the cyclin-dependent kinase inhibitor dinaciclib in patients with advanced malignancies. *Cancer. Chemother. Pharmacol.* **2012**, *70*, 891–98.
77. Mita M. A phase I study of the CDK inhibitor dinaciclib (SCH 727965) administered every 3 weeks in patients (pts) with advanced malignancies: Final results. *J. Clin. Oncol.* **2011**, *29*, (suppl; abstr 3080).
78. Benouaich-Amiel, A.; Mazza, E.; Massard, C.; Gaviani, P.; Fiorentini, F.; Scaburri, A.; Pacciarini, M. A. & Calvo, E. Phase I study of the oral CDK-TRKA inhibitor PHA-848125 in recurrent malignant glioma (MG). *J. Clin. Oncol.* **2010**, *28*, 15s (Suppl.), abstract 2087.
79. Cresta, S.; Sessa, C.; Del Conte, G.; Locatelli, A.; Gallerani, E.; Fiorentini, F.; Scaburri, A.; Pacciarini, M. A.; Alzani, R. & Gianni, L. Phase I study of the oral CDK-TRKA inhibitor PHA-848125 administered with prolonged schedules of administration. *J. Clin. Oncol.* **2010**, *28*, 15s (Suppl.), abstract 3065.

- 80.** Graf, F.; Wuest, F.; Pietzsch, J. Cyclin-Dependent Kinases (Cdk) as Targets for Cancer Therapy and Imaging. *Advances in Cancer Therapy*. **2011**.
- 81.** Niesvizky, R.; Lentzsch, S.; Badros, A. Z.; Chanan-Khan, A. A.; Singhal, S. B.; Zonder, J. A.; Vij, R.; Huang, X.; DiLiberto, M.; Courtney, R.; Shaik, M. N.; Kim, S. T.; Randolph, S.; Ely, S. A. & Chen-Kiang, S. A Phase I Study of PD 0332991: Complete CDK4/6 Inhibition and Tumor Response In Sequential Combination with Bortezomib and Dexamethasone for Relapsed and Refractory Multiple Myeloma. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*. **2010**, *116*, abstract 860.
- 82.** Slamon, D. J.; Hurvitz, S. A.; Applebaum, S.; Glaspy, J. A.; Allison, M. K.; DiCarlo, B. A.; Courtney, R. D.; Kim, S. T.; Randolph, S. & Finn, R. S. Phase I study of PD0332991, cyclin-D kinase (CDK) 4/6 inhibitor in combination with letrozole for first-line treatment of patients with ER-positive, HER2-negative breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **2010**, *28*, 15s (Suppl.) abstract 3060.
- 83.** Finn, R.S.; Crown, J.P.; Boer, K.; Lang, I.; Parikh, R.J.; Breazna, A.; Ho, S.N.; Kim, S.T.; Randolph, S.; Slamon, D.J. Results of a randomized phase 2 study of PD 0332991, a Cyclin-Dependent Kinase (CDK) 4/6 Inhibitor, in combination with Letrozole vs Letrozole alone for first-line treatment of (ER + /HER2- ) advanced breast cancer. *Ann. Oncol.* **2012**, *23* (suppl 2), ii43-ii45.
- 84.** Whitlock, J.A.; Krailo, M.; Reid, J.M.; Ruben, S.L.; Ames, M.M.; Owen, W.; Reaman, G. Children's Oncology Group Study. Phase I clinical and pharmacokinetic study of flavopiridol in children with refractory solid tumors: a Children's Oncology Group Study. *J. Clin. Oncol.* **2005**, *23*, (36), 9179-86.
- 85.** Blum, W.; Phelps, M.A.; Klisovic, R.B.; Rozewski, D.M.; Ni, W.; Albanese, K.A.; Rovin, B.; Kefauver, C.; Devine, S.M.; Lucas, D.M.; Johnson, A.; Schaaf, L.J.; Byrd, J.C.; Marcucci, G.; Grever, M.R.; Phase I clinical and pharmacokinetic study of a novel schedule of flavopiridol in relapsed or refractory acute leukemias. *Haematologica*. **2010**, *95*(7), 1098-105.
- 86.** Phelps, M.A.; Lin, T.S.; Johnson, A.J.; Hurh, E.; Rozewski, D.M.; Farley, K.L.; Wu, D.; Blum, K.A.; Fischer, B.; Mitchell, S.M.; Moran, M.E.; Brooker-McEldowney, M.; Heerema, N.A.; Jarjoura, D.; Schaaf, L.J.; Byrd, J.C.; Grever, M.R.; Dalton, J.T. Clinical

response and pharmacokinetics from a phase 1 study of an active dosing schedule of flavopiridol in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. **2009**, *113*(12), 2637-45.

- 87.** Lin, T.S.; Dalton, J.T.; Wu, D. Flavopiridol given as a 30-min intravenous (IV) bolus followed by 4-hr continuous IV infusion (CIVI) results in clinical activity and tumor lysis in refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL). *J. Clin. Oncol.* **2004**, *22* (14), 6564-73.
- 88.** Lin, T.S.; Blum, K.A.; Fischer, D.B.; Mitchell, S.M.; Ruppert, A.S.; Porcu, P.; Kraut, E.H.; Baiocchi, R.A.; Moran, M.E.; Johnson, A.J.; Schaaf, L.J.; Grever, M.R.; Byrd, J.C. Flavopiridol, fludarabine, and rituximab in mantle cell lymphoma and indolent B-cell lymphoproliferative disorders. *J. Clin. Oncol.* **2010**, *28*(3), 418-23.
- 89.** Malumbres, M.; Barbacid, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat. Rev. Cancer.* **2009**, *9*(3), 153-66.
- 90.** Vaughn, D.J.; Flaherty, K.; Lal, P.; Gallagher, M.; O'Dwyer, P.; Wilner, K.; Chen, I.; Schwartz, G. Treatment of growing teratoma syndrome. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *360*(4), 423-4.
- 91.** Torva, M.P.; Barnes, K.; Barford, C.; Benanti, T.; Zheng, X.; Friedrich, T. D. Biaryl purine derivatives as potent antiproliferative agents: Inhibitors of cyclin dependant kinases. Part I. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 6608-6612.
- 92.** Torva, M. P.; Barnes, K.; Alicea, L.; Benanti, T.; Zheng, X.; Friedrich, T. D. Heterobiaryl purine derivatives as potent antiproliferative agents: Inhibitors of cyclin dependant kinases. Part II. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 6613-6617.
- 93.** Bettayeb, K.; Baunbæk, D.; Delehouze, C.; Loaëc, N.; Hole, A.J.; Baumli, S. ; Endicott, J.A.; Douc-Rasy, S.; Bénard, J.; Oumata, N.; Galons, H.; Meijer, L. CDK Inhibitors Roscovitine and CR8 Trigger Mcl-1 Down-Regulation and Apoptotic Cell Death in Neuroblastoma Cells. *Genes and Cancer*, **2010**. *1*(4), 369-80.
- 94.** Tang, L.; Li, M.H.; Cao, P.; Wang, F.; Chang, W.R.; Bach, S.; Reinhardt, J.; Ferandin, Y.; Galons, H.; Wan, Y.; Gray, N.; Meijer, L.; Jiang, T.; Liang, D.C. Crystal structure of pyridoxal kinase in complex with roscovitine and derivatives. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 31220-9.

95. Krystof, V.; McNae, I.W.; Walkinshaw, M.D.; Fischerc P.M.; Müller, P.; Vojtesek, B.; Orság, M.; Havlíček, L. Strnad, M. Antiproliferative activity of olomoucine II, a novel 2,6,9-trisubstituted purine cyclin-dependent kinase inhibitor. *Cell. Mol. Life Sci.* **2005**, *62*, 1763-71.
96. Abraham, R.T.; Acquarone, M.; Andersen, A.; Asens, A.; Bellé, R.; Berger, F.; Bergounioux, C.; Brunn, G.; Buquet-Fagot, C.; Fagot, D. Glab, N.; Goudeau, H.; Goudeau, M.; Guerrier, P.; Houghton, P.; Hendriks, H.; Kloareg, B.; Lippai, M.; Marie, D.; Maro, B.; Meijer, L.; Mester, J.; Mulner-Lorillon, O.; Poulet, S.A.; Schierenberg, E.; Schutte, B.; Vaultot, D. Cellular effects of olomoucine, an inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Biology of the Cell.* **1995**, *83*, (2-3), 105–120.
97. Gucký, T.; Jorda, R.; Zatloukal, M.; Bazgier, V.; Berka, K.; Řezníčková, E. Béres, T.; Strnad, M.; Kryštof, V. A Novel Series of Highly Potent 2,6,9-Trisubstituted Purine Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (15), 6234-47.
98. Sall, D.J.; Arfsten, A.E.; Bastian, J.A.; Denney, M.L.; Harms, C.S.; Wyss, V.L.; Jakubowski, J.A. Use of conformationally restricted benzamidines as arginine surrogates in the design of platelet GPIIb-IIIa receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 2843-57.
99. Casiraghi, G.; Casnati, G.; Cornia, M.; Pochini, A.; Puglia, G.; Sartori, G.; Ungaro, R. Selective Reactions using Metal Phenoxides. Part 1. Reactions with Formaldehyde. *J. Chem. Soc., Perkin Trans I.* **1978**, 318-21.
100. Casiraghi, G.; Casnati, G.; Puglia, G.; Sartori, G.; Terenghi, G. Selective Reactions between Phenols and Formaldehyde. A Novel Route to Salicylaldehydes. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I.* **1980**, 1862-65.
101. Mori, K.; Ichikawa, Y.; Kobayashi, M.; Akiyama, T.; Shibata, Y.; Yamanaka, M. Enantioselective synthesis of multisubstituted biaryl skeleton by chiral phosphoric acid catalyzed desymmetrization/kinetic resolution sequence. *J. Am. Chem.Soc.* **2013**, *135*, 10, 3964-70.
102. Hofsløkken, N.U.; Skattebol, L.; Tuchagues, T.P.; Ogren, M. Convenient Method for the ortho-formylation of phenol. *Acta. Chem. Scand.* **1999**, *53*, 258-262.

- 103.** Goujon, J.Y.; Zammattio, F.; Chrétien, J. M.; Beaudet, I. A new approach to 2,2-disubstituted chromenes and tetrahydroquinolines through intramolecular cyclization of chiral 3,4-epoxy alcohols. *Tetrahedron*. **2004**, *60* (18), 4037-4049.
- 104.** Oumata, N.; Ferandin, Y.; Meijer, L.; Galons, H. Practical Synthesis of Roscovitine and CR8. *Org. Process Res. Dev.* **2009**, *13* (3), 643-44.
- 105.** Barrero, A. F.; Quílez del Moral, J. F.; Herrador, M. M.; Arteaga, P.; Cortés, M.; Benites, J.; Rosellón, A. Mild and rapid method for the generation of *o*-quinone methide intermediates. Synthesis of puupehedione analogues. *Tetrahedron*. **2006**, *62*, 25, 6012–17.
- 106.** Meyer, G.R. Conjugate and Nonconjugate Reduction with LiAlH<sub>4</sub> et NaBH<sub>4</sub>. *J. Chem. Ed.* **1981**, *58*, 628-30.
- 107.** Karimi, B.; Zamani, A.; Zareyee, D. N-Iodosuccinimide (NIS) as a mild and highly chemoselective catalyst for deprotection of tert-butyldimethylsilyl ethers. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 9139–41.
- 108.** Hattori, K.; Sajiki, H.; Hirota, K. Undesirable deprotection of *O*-TBDMS groups by Pd/C-catalyzed hydrogenation and chemoselective hydrogenation using a Pd/C(en) catalyst. *Tetrahedron*. **2001**, *57*(11), 2109–14.
- 109.** Patent: US2013/12703 A1, **2013**.
- 110.** Safina, B.S.; Baker, S.; Baumgardner, M.; Blaney, P.M.; Chan, B.K.; Chen, Y.H.; Cartwright, M.W.; Castanedo, G.; Chabot, C.; Cheguillaume, A.J.; Goldsmith, P.; Goldstein, D.M.; Goyal, B.; Hancox, T.; Handa, R.K.; Iyer, P.S.; Kaur, J.; Kondru, R.; Kenny, J.R.; Krintel, S.L.; Li, J.; Lesnick, J.; Lucas, M.C.; Lewis, C.; Mukadam, S.; Murray, J.; Nadin, A.J.; Nonomiya, J.; Padilla, F.; Palmer, W.S.; Pang, J.; Pegg, N.; Price, S.; Reif, K.; Salphati, L.; Savy, P.A.; Seward, E.M.; Shuttleworth, S.; Sohal, S.; Sweeney, Z.K.; Tay, S.; Tivitmahaisoon, P.; Waszkowycz, B.; Wei, B.; Yue, Q.; Zhang, C.; Sutherlin, D.P. Discovery of novel PI3-kinase  $\delta$  specific inhibitors for the treatment of rheumatoid arthritis: taming CYP3A4 time-dependent inhibition. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 12, 5887 – 5900.
- 111.** Murray, J.M.; Sweeney, Z.K.; Chan, B.K.; Balazs, M.; Bradley, E.; Castanedo, G.; Chabot, C.; Chantry, D.; Flagella, M.; Goldstein, D.M.; Kondru, R.; Lesnick, J.; Li,

J.; Lucas, M.C.; Nonomiya, J.; Pang, J.; Price, S.; Salphati, L.; Safina, B.; Savy, P.P.; Seward, E.M.; Ultsch, M.; Sutherlin, D.P. Potent and highly selective benzimidazole inhibitors of PI3-kinase delta. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 17, 7686 – 95.

**112.** Patent: WO2011/162515 A2, **2011**.

**113.** Shinkwin, A.E. ; Whish, W.J.; Threadgill, M.D. Synthesis of thiophenecarboxamides, thieno[3,4-c]pyridin-4(5H)-ones and thieno[3,4-d]pyrimidin-4(3H)-ones and preliminary evaluation as inhibitors of poly(ADP-ribose)polymerase (PARP). *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 297-308.

**114.** Patent: US5869511 A1, **1999**.

**115.** Barker, J.M.; Huddleston, P.R.; Wood, M.L. A rapid conversion of 3-oxothiolenes into 3-aminothiophenes. *Synth. Commun.* **2002**, *32* (16), 2565-2568.

**116.** Patent: WO 2010/029577, **2010**.

**117.** Patent: WO2009/ 140163A1, **2009**.

**118.** Patent: WO 2010/080996, **2010**.

**119.** Patent: US005654307A, **2005**.

**120.** Patent: EP1502916 A1, **2005**.

**121.** Song, Y. H.; Son, H. Y. Synthesis of new 1-phenylthieno[1,2,4]triazolo[4,3-a]pyrimidin-5(4H)-one derivatives. *J. Heterocyclic Chem.* **2011**, *48*, 3, 597-603.

**122.** Gutschow, M.; Powers, J.C. A new dimerization reaction producing 2-amino-9-oxopyrrolo-[2,1-*b*]quinazoline-1-carbonitriles and analogous pyrrolo-[1,2-*a*]thieno[3,2-*d*]pyrimidinecar bonitriles. *J. Heterocyclic Chem.* **2001**, *38*, 419-24.

**123.** Patent: US 2004/0077663 A1, **2004**.

**124.** Zatloukal, M.; Gemrotová, M.; Doležal, K.; Havliček, L.; Spíchal, L.; Strnad, M. Novel potent inhibitors of *A. thaliana* cytokinin oxidase/dehydrogenase. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16* (20), 9268-9275.

**125.** Patent: WO 2010/109123 A1, **2010**.

- 126.** Bernard, H.; Bülow, G.; Lange, U.; Mack, H.; Pfeiffer, T.; Schäfer, B.; Seitz, W.; Zierke, T. Technical Scale Synthesis of a New and Highly Potent Thrombin Inhibitor. *Synthesis*. **2004**, *14*, 2367-75.
- 127.** Patent: US 2004/0209921 A1, **2004**.
- 128.** Chen, J.J.; Thakur, K.; Clark, M.; Laughlin, S.; George, K.; Bookland, R.; Davis, J.; Cabrera, E.; Easwaran, V.; De, B.; Zhang, G. Development of pyrimidine-based inhibitors of Janus tyrosine kinase 3. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, (21), 5633-5638.
- 129.** Yu, B.; Liu, A-H.; He, L-N.; Li, B.; Diao, Z-F.; Li, Y-N. Catalyst-free approach for solvent-dependent selective oxidation of organic sulfides with oxone. *Green Chem.* **2012**, *14*, 957-962.
- 130.** Zhu, W. ; Liu, Y.; Zhai, X.; Wang, X.; Zhu, Y.; Wu, D.; Zhou, H.; Gong, P.; Zhao Y.. Design, synthesis and 3D-QSAR analysis of novel 2-hydrazinyl-4-morpholinothieno[3,2-d]pyrimidine derivatives as potential antitumor agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *57*, 162-75.
- 131.** Yitzhak, T.; Del Valle, S.; Jaramillo, D. ; Srivatsan, S. G. ; Rios, A. ; Weizma, H. Designing new isomorphic fluorescent nucleobase analogues: the thieno[3,2-d]pyrimidine core. *Tetrahedron*. **2007**, *63*, 3608–14.
- 132.** Smith, V.; Raynaud, F.I.; Workman, P.; Kelland, L.R. Characterisation of a human colorectal cell line with acquired resistance to flavopiridol. *Mol. Pharmacol.* **2001**, *60*, 885-893.
- 133.** Nie, A. Z.; Perretta, A.C.; Erickson, A. P.; Margosiak, B.S.; Almassy, C. R.; Lu, B. J.; Averill, B.A.; Kraig, M.; Yagera, C. Structure-based design, synthesis, and study of pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazine derivatives as potent inhibitors of protein kinase CK2. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 4191–95.

## Summary

In the introduction, the main functions of cyclin dependent kinases are detailed. Whenever it was possible the link with pathologies where these kinases are overexpressed is presented. This is followed by the description of the inhibitors which are actually undergoing clinical testing. Most of these clinical studies are targeting cancer and leukemia. Impressive clinical results have been disclosed for Dinaciclib, Palbociclib and Roscovitine.

The synthesis of two series of compounds is then envisioned. The first series of products are purine derivatives bearing a hydroxybiarylmethyl group on the 6 position of the purine scaffold. Two approaches were compared in the synthesis of the hydroxybiarylmethylamino group. In both approaches the key step was the orthoformylation of phenols using magnesium chloride as catalyst. The prepared compounds were evaluated against kinases and a tumor cell line. They were found more potent than homologous products without hydroxyls.

The second families of products are thieno[3,2-d]pyrimidines. A new general route to these products based on the preparation of 7-bromo-2,4-dichloro-thieno[3,2-d]pyrimidine which can allow the synthesis of a large diversity of trisubstituted derivatives.

*Keywords: Cyclin-Dependent-Kinase, CDK, clinical trials, thieno[3,2-d]pyrimidines, hydroxybiaryl, cancer*

## Résumé

Cette thèse a pour objectif l'identification de nouveaux inhibiteurs de kinase et plus particulièrement de kinases dépendantes de cyclines (CDKs). Des inhibiteurs de CDKs sont en essais clinique depuis une dizaine d'année. Un faisceau d'informations récentes montre que cette nouvelle classe pharmacologique pourrait prochainement occuper une place prépondérante dans la thérapie antitumorale.

L'introduction de cette thèse décrit les principaux inhibiteurs de CDKs en se focalisant sur ceux dont le développement clinique est en cours et sur les structures les plus récemment divulguées (2009 à 2013). Trois molécules avancées en études cliniques s'avèrent intéressantes et s'approchent de la mise sur le marché : la Roscovitine (phase clinique IIb), le Dinaciclib (phase clinique III) et le Palbociclib (phase clinique III).

D'un point de vue expérimental, cette thèse se décompose en deux parties principales. La première modulation a consisté à rechercher des nouveaux groupements qui pourraient sur des squelettes déjà connus comme les purines apporter un avantage en ce qui concerne l'activité des produits. Les structure cristallines des complexes inhibiteur-enzymes et notamment celles de Roscovitine-CDK2 et CR8-CDK2 ont guidé la conception des nouvelles molécules. C'est ainsi que sur les structures biaryliques déjà connues, un groupement phénol a été greffé sur l'un des cycles conduisant ainsi à de nouveaux inhibiteurs de kinases. Ces molécules sont plus puissantes que les produits non hydroxylés. L'augmentation de l'activité est particulièrement sensible au niveau de la kinase CDK2 qui est impliquée notamment dans régulation du cycle cellulaire.

La seconde partie du travail porte sur la recherche de structures isostères des purines. Ainsi, le squelette thieno[3,2-d]pyrimidines a été développé de novo.

Deux types d'intermédiaires produits ont été préparés afin de permettre la diversification des structures. En premier temps la voie de synthèse via l'intermédiaire thiométhyle a été conduite, néanmoins cette voie présente certaines limites. Le deuxième intermédiaire trihalogéné a permis d'optimiser la préparation des molécules thieno[3,2-d]pyrimidines.

Les évaluations des produits préparés ne sont pas totalement terminées. Ces molécules sont moins puissantes que les purines sur les CDKs mais agissent au niveau d'autres kinases.

*Mots clés : Cyclin-Dependent-Kinase, CDK, essais cliniques, thieno[3,2-d]pyrimidines, hydroxybiaryl, cancer*