



**HAL**  
open science

# Conception, synthèse et évaluation pharmacologique d'analogues simplifiés de métabolites marins, inhibiteurs de la kinase Aurora B, à visée anticancéreuse

Charlotte Juillet

## ► To cite this version:

Charlotte Juillet. Conception, synthèse et évaluation pharmacologique d'analogues simplifiés de métabolites marins, inhibiteurs de la kinase Aurora B, à visée anticancéreuse. Chimie thérapeutique. Université Paris-Saclay, 2020. Français. NNT : 2020UPASF019 . tel-02992052

**HAL Id: tel-02992052**

**<https://theses.hal.science/tel-02992052>**

Submitted on 6 Nov 2020

**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.

Conception, synthèse et évaluation  
pharmacologique d'analogues  
simplifiés de métabolites marins,  
inhibiteurs de la kinase Aurora B, à  
visée anticancéreuse

**Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay**

École doctorale n° 571 Sciences chimiques : molécules, matériaux,  
instrumentation et biosystèmes (2MIB)

Spécialité de doctorat: Chimie

Unité de recherche : Université Paris-Saclay, CNRS, Institut de Chimie des Substances  
Naturelles, UPR 2301, 91198, Gif-sur-Yvette, France

Référent : Faculté des sciences d'Orsay

**Thèse présentée et soutenue à Gif-sur-Yvette, le 21 octobre 2020, par**

**Charlotte JUILLET**

**Composition du Jury**

**Delphine JOSEPH**

Professeure, Université Paris-Saclay

Présidente

**Patricia MELNYK**

Professeure, Université de Lille

Rapporteuse & Examinatrice

**Sylvain ROUTIER**

Professeur, Université d'Orléans

Rapporteur & Examinateur

**Samir JEGHAM**

Docteur, Sanofi R&D

Examinateur

**Florence MAHUTEAU-BETZER**

Directrice de recherche, CNRS-Institut Curie

Examinatrice

**Sandrine RUCHAUD**

Directrice de Recherche, Station Biologique de Roscoff

Examinatrice

**Ali AL-MOURABIT**

Directeur de Recherche, CNRS-ICSN

Directeur de thèse



# Remerciements

Je souhaite remercier mon directeur de thèse Ali Al-Mourabit pour m'avoir accordé sa confiance pour mener à bien ce projet à l'ICSN dans son équipe. Un grand merci à Sandrine Ruchaud pour son implication dans le projet sur toute la partie biologie. Merci également pour l'accueil à la Station Biologique de Roscoff, le temps consacré à me former et me permettre d'aller plus loin dans la thèse. Merci à l'école doctorale 2MIB et à l'Université Paris-Saclay pour le financement de thèse et les formations proposées tout au long de la thèse.

J'adresse mes sincères remerciements aux membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail et d'y avoir consacré du temps :

- Patricia Melnyk, Professeure à Lille Neurosciences et Cognition, Université de Lille
- Sylvain Routier, Professeur à l'Institut de Chimie Organique et Analytique de l'Université d'Orléans
- Samir Jegham, Directeur de département de recherche scientifique à Sanofi R&D
- Delphine Joseph, Professeure de l'Université Paris-Saclay au laboratoire BioCIS
- Florence Mahuteau-Betzer, Directrice de recherche à l'Institut Curie, merci également pour votre disponibilité en tant que comité de suivi de thèse et les discussions enrichissantes.

Je remercie chaleureusement toutes les personnes ayant travaillé sur ce projet, sans qui ce travail n'aurait été possible :

- Les personnes de la plateforme KISSf à Roscoff, Blandine Baratte et Béatrice Josselin, ainsi qu'à l'ensemble de l'équipe pour leur accueil lors de mes deux passages à Roscoff, ce fut un réel plaisir.
- L'équipe de la plateforme CiBi avec Jérôme Bignon pour son investissement dans le projet et pour m'avoir formée à la culture cellulaire, mais aussi Héléve Levaïque, Maria Ahab Conception et Laurie Askenatzis.
- Bogdan Iorga et Hristo Nedev pour les études de modélisation moléculaire.

Je n'oublie pas Ludmila et Mohamed qui ont partagé un bout d'aventure avec moi au laboratoire. Merci à Céline et Capucine pour leur bonne humeur au sein de l'équipe 43. Je remercie aussi les membres du CEI, les étudiants avec qui j'ai partagé chaque déjeuner (les Dauban & les Marinetti) et Augustin qui a été présent et disponible lors de ma première année de thèse. Je remercie également les services communs de l'ICSN : Jean-François Gallard pour la RMN, Nicolas Elie pour la spectrométrie de masse et Pascal Retailleau pour le service RX.

J'adresse mes remerciements du fond du cœur à mes amis de « How I met » de Chimie Rennes, à Marion et à mes amis de prépa d'Orléans.

Un grand merci à toute la famille Hermès, pour m'avoir épaulée tout au long de l'aventure. Merci tout particulièrement à Élisabeth et Philippe qui ont toujours manifesté leur soutien et leurs encouragements.

Un immense merci à ma famille. Merci papa et maman pour tout, le soutien, l'extension du pack golden platinum (papa tu pourras bientôt m'appeler Herr Doktor). Merci à mes trois frères chéris et notamment à mon Kikix pour sa contribution lors de son stage de 3<sup>ème</sup>. Merci à Justine, et merci à Ninou pour son enthousiasme infaillible tout au long de la thèse.

Enfin, je tiens à remercier de tout mon cœur Bastien pour sa patience, son support indéfectible y compris dans les moments difficiles, pour avoir toujours cru en moi et aussi pour avoir partagé les joies de la thèse ensemble. Sans toi, tout ça n'aurait été possible.

# Table des matières

<b>Liste des Abréviations</b>	<b>8</b>
<b>Introduction générale</b>	<b>13</b>
<b>Chapitre I – Introduction et état de l’art</b>	<b>19</b>
<b>I. Le cancer</b>	<b>19</b>
1. Généralités sur la maladie	19
2. Approches thérapeutiques	20
<b>II. Le cycle cellulaire et ses acteurs</b>	<b>21</b>
1. Les phases du cycle de la division cellulaire	22
a. L’interphase	22
i. Phase G1	22
ii. Phase S	22
iii. Phase G2	23
b. La mitose	23
i. La prophase	23
ii. La prométaphase	24
iii. La métaphase	24
iv. L’anaphase	25
v. La télophase et la cytokinèse	25
2. Division cellulaire et cancer	26
<b>III. Les protéines kinases comme cibles thérapeutiques</b>	<b>26</b>
1. Les sérine/thréonine kinases Aurora	29
a. Structure des kinases Aurora	29
b. Aurora A	30
i. Maturation des centrosomes	30
ii. Séparation des centrosomes et mise en place du fuseau mitotique	30
iii. Entrée en mitose	31
c. Aurora B	31
i. Le CPC : fonction et localisation	32
ii. Bi-orientation des chromosomes	34
iii. Le point de contrôle SAC	38
iv. De l’anaphase à la cytokinèse	39
d. Aurora C	40
2. Les kinases Aurora et leurs rôles dans le cancer	41

a.	Aurora A	41
b.	Aurora B	42
c.	Aurora C	43
<b>IV.</b>	<b>Les inhibiteurs de kinases</b>	<b>43</b>
1.	Les inhibiteurs de kinases en oncologie	43
a.	Généralités	43
b.	Sélectivité et mode d'inhibition	44
i.	Structure des kinases	44
ii.	Les différents modes d'inhibition	46
2.	Les inhibiteurs des kinases Aurora	49
a.	Les inhibiteurs d'Aurora A	50
b.	Les inhibiteurs d'Aurora B	52
<b>V.</b>	<b>La famille des pyrroles-2-aminoimidazoles marins</b>	<b>57</b>
1.	Chimiodiversité marine	57
a.	Les océans comme source de molécules bioactives	57
b.	Les inhibiteurs de kinases d'origine marine	59
2.	Les pyrroles-2-aminoimidazoles (P-2-AIs)	60
a.	Généralités sur les pyrroles-2-aminoimidazoles	60
b.	Diversité structurale des pyrroles-2-aminoimidazoles	61
i.	Les monomères linéaires	61
ii.	Les monomères cycliques	62
iii.	Les dimères par une liaison	62
iv.	Les dimères à motif cyclobutane	62
v.	Les dimères cycliques à cinq chaînons	63
vi.	Les dimères cycliques à six chaînons	64
vii.	Les tétramères	64
3.	Les P-2-AI inhibiteurs de kinases	65
a.	L'hyménialdisine et analogues proches	65
b.	La dibromophakellstatine	65
c.	Les tauroacidines	65
d.	Les spongiacidines	65
e.	Les benzosceptrines	66
<b>VI.</b>	<b>Mise en évidence de l'analogue synthétique EL228 comme inhibiteur d'Aurora B</b>	<b>66</b>
1.	Simplification des produits naturels comme stratégie de <i>drug discovery</i>	66

2.	Simplification de la benzosceptrine C	67
3.	Axes d'études autour du produit EL228	68
a.	Synthèse de EL228	68
b.	Les pharmacomodulations envisagées	69
i.	Modulation sur la partie I	69
ii.	Modulation sur la partie II	70
iii.	Modulation sur la partie III	70
		<b>71</b>
	<b>Chapitre II – Pharmacomodulations de la partie I</b>	<b>73</b>
	<b>I. Introduction</b>	<b>73</b>
	<b>II. Synthèses des analogues</b>	<b>74</b>
1.	Introduction d'hétérocycles aromatiques variés	74
2.	Rappels bibliographiques sur le couplage de Sonogashira	75
3.	Modulations sur le noyau pyrrolique	76
a.	Nombre d'halogènes sur le pyrrole	76
b.	Nature des halogènes sur le pyrrole	77
c.	Substituants hydrophobes sur le pyrrole	78
i.	Rappels bibliographiques sur la construction du pyrrole	78
ii.	Synthèse du pyrrole diméthylé	80
4.	Introduction de cycles à 5 chaînons 4,5-dibromés	81
	<b>III. Évaluation biologique et discussion</b>	<b>82</b>
1.	Criblage primaire et IC <sub>50</sub> des composés les plus actifs	82
2.	Interprétation des résultats	84
3.	Rôles des halogènes en chimie médicinale	85
	<b>IV. Conclusion</b>	<b>87</b>
	<b>Chapitre III – Pharmacomodulations de la partie II</b>	<b>91</b>
	<b>I. Introduction</b>	<b>91</b>
	<b>II. Synthèses des analogues</b>	<b>91</b>
1.	Introduction d'hétérocycles aromatiques variés	91
2.	Modifications de l'imidazo[1,2-a]pyrimidine en imidazo[1,2-a]-N-pyridine	96
3.	Introduction d'une amine exo-cyclique	98
a.	Synthèses via la formation d'un azoture par substitution d'un halogène	98
b.	Synthèses à partir des diaminopyridines ou amino-nitropyridines	100
i.	Amine en position 8	100

ii.	Amine en position 5	102
iii.	Amine en position 6	103
4.	Introduction de divers substituants sur le noyau imidazo[1,2-a]pyridine	103
a.	Substituants halogénés et méthyles	103
b.	Groupements salifiables par couplage de Buchwald-Hartwig	105
<b>III.</b>	<b>Évaluation biologique et discussion</b>	<b>106</b>
1.	Criblage primaire et IC <sub>50</sub> des composés les plus actifs	106
2.	Interprétation des résultats	110
<b>IV.</b>	<b>Combinaison d'hétérocycles des parties I et II</b>	<b>112</b>
1.	Combinaison des hétérocycles 137-139 avec 85a-d	112
a.	Synthèses	112
b.	Activités biologiques	113
2.	Utilisation des pyrroles dichlorés et diodés	115
a.	Synthèses	115
b.	Activités biologiques	115
<b>V.</b>	<b>Conclusion</b>	<b>117</b>
<b>Chapitre IV – Pharmacomodulations de la partie III</b>		<b>121</b>
<b>I.</b>	<b>Introduction</b>	<b>121</b>
<b>II.</b>	<b>Synthèses des analogues</b>	<b>121</b>
1.	Linker alcène	121
a.	Par le couplage de Heck	122
i.	Voie A	122
ii.	Voie B	123
b.	Par le couplage de Suzuki-Miyaura : voie C	123
i.	Par réaction d'hydroboration	123
ii.	Par réaction d'hydrozirconation-hydroboration	124
2.	Linker aromatique	125
a.	Préparation des composés de la série b	126
i.	Préparations des anilines	126
ii.	Acylation par le dérivé 4,5-dibromopyrrole	127
b.	Préparation des composés des séries c et d	129
i.	Préparations des anilines	129
ii.	Acylation avec le 4,5-dibromopyrrole	129
3.	Linker saturé	130



4.	Linker triazole	133
a.	Hydroxyméthylation	134
i.	Formylation de Vilsmeier-Haack	134
ii.	Hydroxyméthylation directe au formaldéhyde	134
b.	Azidation	135
c.	Cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen	137
<b>III.</b>	<b>Évaluation biologique et discussion</b>	<b>138</b>
1.	Criblage primaire et IC <sub>50</sub> des composés les plus actifs	138
2.	Interprétation des résultats	139
<b>IV.</b>	<b>Conclusion</b>	<b>142</b>
<b>Chapitre V –</b>	<b>Évaluations pharmacologiques et étude du mode d'action</b>	<b>147</b>
<b>I.</b>	<b>Évaluations biologiques</b>	<b>147</b>
1.	Inhibition des kinases et bilan de la SAR	147
2.	Tests de viabilité sur lignées cellulaires	149
a.	Matériel et méthode	150
b.	Résultats	150
3.	Propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques	154
i.	Solubilité en milieu aqueux	154
ii.	Stabilité métabolique <i>in vitro</i>	156
<b>II.</b>	<b>Caractérisation du mode d'action du composé 194</b>	<b>158</b>
1.	Mode d'inhibition du composé 194 sur Aurora B	158
a.	Méthode	158
b.	Les différents modes d'inhibition réversible	159
i.	Inhibition compétitive	160
ii.	Inhibition incompétitive	161
iii.	Inhibition non-compétitive pure ou mixte	161
c.	Résultats	162
2.	Sélectivité	165
3.	Modélisation moléculaire	167
4.	Effets sur la progression du cycle cellulaire	170
a.	Méthode	170
b.	Résultats	171
5.	Mise en évidence de l'inhibition d'Aurora B par immunomarquage	173
a.	Inhibition de la phosphorylation de l'Histone H3 par le composé 194	173

b. Impact sur l'index mitotique	174
c. Mise en évidence du phénotype cellulaire avec l'inhibition d'Aurora B	175
<b>III. Conclusion</b>	<b>177</b>
<b>Conclusion Générale</b>	<b>183</b>
<b>Perspectives</b>	<b>188</b>
<b>Experimental part</b>	<b>190</b>
1. Chemical Synthesis	190
2. Biological assays	273
a. Protein kinase assays	273
b. ATP competition assay	274
c. Immunofluorescence	274
d. Cell Culture and Proliferation Assay	275
e. Cell cycle analysis	275
3. Molecular docking	276
<b>Annexes</b>	<b>276</b>
Annexe 1-A : Courbes de Michealis-Menten pour le composé 164	276
Annexe 1-B : Courbes de Lineweaver-Burk pour le composé 164	277
Annexe 2 : % d'inhibition du criblage complet des 82 composés sur le panel de kinases à 10 et 1 $\mu$ M	278
<b>Bibliographie</b>	<b>285</b>

# Liste des Abréviations

**δ** : Déplacement chimique

**ABL** : Abelson murine viral leukemia homolog protein

**Ac** : Acétyle

**ACN** : Acétonitrile

**ADN** : Acide Désoxyribonucléique

**ADP** : Adénosine Diphosphate

**AGC** : groupe nommé d'après les kinases A, G et C

**APAF** : Apoptotic Protease Activating Factor

**APC/C** : Anaphase promoting complex/cyclosome

**Ar** : Aryle

**ARN** : Acide RiboNucléique

**ATP** : Adénosine Triphosphate

**A549** : Lignée cellulaire humaine carcinome pulmonaire

**BAX** : Bcl-2-associated X

**9-BBN** : 9-borabicyclo[3.3.1]nonane

**BCR** : Breakpoint cluster region protein

**BIM** : Bcl-2-like protein 11

**Boc** : Tert-butoxycarbonyle

**Bu** : Butyle

**BUB1** : Budding uninhibited by benzimidazoles 1

**CAMK** : Calcium and Calmodulin-regulated kinases

**CDC** : Cycle de division cellulaire

**CDH** : Cadherin, calcium-dependent cell adhesion protein

**CDI** : 1,1'-carbonyldiimidazole

**CDK** : Kinases Dépendantes des Cyclines

**CCM** : Chromatographie sur couche mince

**CHK1** : Checkpoint kinase-1

**CK1** : Cell Kinase 1 ou Casein Kinase 1

**CLK** : Cdc2-like kinase

**CMGC** : Groupe nommé d'après les kinases CDK, MAPK, GSK et CLK

**Cp** : Cyclopentadiène

**CPC** : Chromosomal Passenger Complex

**CYP** : Cytochrome P450

**DAPI** : 4',6-diamidino-2-phénylindole

**DBU** : 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène

**DCM** : Dichlorométhane

**DIAD** : Diisopropyl azodicarboxylate

**DIPA** : Diisopropylamine

**DIPEA / DIEA** : N,N-Diisopropylethylamine

**DFG** : Aspartate-Glycine-Phénylalanine

**DMAP** : 4-diméthylaminopyridine

**DMF** : Diméthylformamide

**DMSO** : Diméthylsulfoxyde

**DMSO-*d6*** : Diméthylsulfoxyde deutéré

**DPPA** : Azoture de diphénylphosphoryle

**Dtbpf** : Di-*tert*-butylphosphino

**DYRK** : Dual specificity tyrosine phosphorylation regulated kinase

**EC<sub>50</sub>** : Concentration effective à 50%

**EDC** : 1-Éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide

**Eg5** : Kinesin-5

**EGF** : Epidermal Growth Factor

**EGFR** : Recepteur de l'EGF

**Eq** : Equivalent

**ErbB** : Erythroblastic leukemia viral oncogene B homolog

**ESI** : Electrospray ionisation

**Et** : Ethyle

**FACS** : Fluorescence Activated Cell Sorting

**FLT3** : Fms-like tyrosine kinase 3

**FDA** : Food and Drug Administration

**GAP** : GTPase-activating protein

**GFAP** : Glial fibrillary acidic protein

**GSK3** : Glycogène synthase kinase 3

**GTP** : Guanosine triphosphate

**HATU** : Hexafluorophosphate de (diméthylamino)-N,N-diméthyl(3H-[1,2,3]triazolo[4,5-b]pyridin-3-yloxy)méthaniminium

**HCT116** : Lignée cellulaire humaine cancer colorectal

**HRD** : His-Arg-Asp

**HeLa** : Lignée cellulaire humaine carcinome épithélial (Henrietta Lacks)

**HMD** : Hyménialdisine

**HOBt** : Hydroxybenzotriazole

**HRMS** : High resolution mass spectroscopy

**HURP** : Hepatoma up-regulated protein

**H3S10ph** : Histone H3 phospho Ser10

**IBX** : Ortho-iodoxybenzoïque

**IC<sub>50</sub>** : Concentration Inhibitrice à 50%

**INCENP** : Inner centromere protein

**IP** : Iodure de propidium  
**IPA** : Isopropanol  
**iPr** : Isopropyle  
**IR** : Infrarouge  
**J** : Constante de couplage  
**JAK** : Janus kinase  
**JNK** : c-Jun N-terminal kinase  
**Kin** : Kinase  
**KMN** : Knl1, Mis12 et Ndc80  
**KNL1** : Kinetochore null protein 1  
**K562** : Lignée cellulaire leucémie myéloïde chronique  
**LC-MS** : Liquid chromatography – mass spectrometry  
**M** : Mitose ou molarité  
**MAD1** : Mitotic arrest deficient 1  
**MAP** : Microtubule-associated protein  
**MAPK** : Mitogen-Activated protein Kinase  
**MCAK** : Mitotic centromere associated kinase  
**MCF7** : Lignée cellulaire humaine adénocarcinome du sein  
**Me** : Méthyle  
**MEK** : Mitogen-activated protein kinase kinase  
**MKLP** : Mitotic Kinesin-Like Protein  
**Ms** : Mésyle  
**Mps1** : Monopolar spindle 1  
**NADPH** : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate  
**NBS** : N-bromosuccinimide  
**NCS** : N-chlorosuccinimide  
**NEK** : NIMA-related protein kinase  
**NIS** : N-iodosuccinimide  
**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé  
**PBMC** : Peripheral blood mononuclear cells  
**PBS** : Phosphate-buffered saline  
**PFA** : Paraformaldéhyde  
**Ph** : Phényle  
**PIM** : Proviral insertion site in Moloney murine leukemia virus homolog  
**PKC** : Protein kinase C  
**PLK** : Polo-like kinase  
**Ppm** : Partie par millio,  
**PUMA** : p53 upregulated modulator of apoptosis  
**P-2-AI** : Pyrrole-2-aminoimidazole  
**Ras** : Rat sarcoma protein human homolog  
**RGC** : Receptor Guanylate Cyclases  
**RhoA** : Ras homolog family member A  
**RMN** : Résonance Magnétique Nucléaire  
**RNAi** : RNA interference  
**RPE1** : lignée cellulaire humaine immortalisée de l'épithélium pigmentaire rétinien  
**SAC** : Spindle assembly checkpoint  
**SAR** : Structure-activity relationship  
**Ser** : Sérine  
**SKOV3** : Lignée cellulaire humaine carcinome ovarien  
**SnAr** : Substitution nucléophile aromatique  
**SRC** : Proto-oncogene tyrosine-protein kinase  
**STE** : Stérile  
**STK** : Sérine/Thréonine Kinase  
**t.a.** : Température ambiante  
**TBAF** : Tetra-n-butylammonium fluoride  
**TBTU** : O-(1H-benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium tetrafluoroborate)  
**<sup>t</sup>Bu** : Tert-butyle  
**TFA** : Acide trifluoroacétique  
**THF** : Tétrahydrofurane  
**Thr** : Thréonine  
**TK** : Tyrosine kinase  
**TLK** : Tyrosine Kinase-Like  
**TPSA** : Total Polar Surface Area  
**TPX2** : Targeting protein for xenopus kinesine like protein 2  
**TRK** : Tropomyosin receptor kinase  
**Ts** : Tosyle  
**TSS** : Thr-Ser-Ser  
**Tyr** : Tyrosine  
**T<sub>3</sub>P** : Propylphosphonic anhydride  
**TURCs** : Tubulin ring complex  
**USP7** : Ubiquitin-specific protease  
**UV** : Ultraviolet  
**U-2OS** : Lignée cellulaire humaine ostéosarcome  
**VEGF** : Vascular Endothelial Growth Factor  
**VEGFR** : Recepteur au VEGF  
**XPhos** : 2-Dicyclohexylphosphino-2',4',6'-triisopropylbiphényl  
**XantPhos** : 4,5-Bis(diphénylphosphino)-9,9-diméthylxanthène  
**μM** : Micromolaire



# **Introduction Générale**



# Introduction générale

Le cancer est aujourd'hui l'une des maladies les plus meurtrières dans le monde avec plus de 9.5 millions de décès en 2018 et des estimations pour 2040 avoisinants 16.4 millions.<sup>1,2</sup> Il s'agit de la deuxième cause mondiale de décès, responsable d'un décès sur six en 2018 (World Health Organization). Bien que l'arsenal thérapeutique permette de ralentir efficacement la croissance tumorale de nombreux cancers et d'augmenter le taux de survie des patients, son efficacité peut être limitée par l'apparition de phénomènes de résistance, de récurrence ou encore de problèmes de toxicité.

Grâce aux progrès considérables réalisés depuis les vingt dernières années dans la compréhension des mécanismes cellulaires impliqués dans la tumorigénèse et la progression tumorale, les kinases de la famille Aurora (A, B et C) se sont avérées être des nouvelles cibles thérapeutiques potentielles à visée anticancéreuse.<sup>3,4</sup> Ces kinases jouent un rôle fondamental dans la division cellulaire tout au long de la mitose.<sup>5</sup> Elles sont surexprimées dans les cellules cancéreuses et leur inhibition constitue une approche thérapeutique très prometteuse pour concevoir de nouveaux agents anticancéreux. Les inhibiteurs des kinases Aurora ciblent spécifiquement les cellules en division et induisent des mitoses aberrantes, où les cellules sont finalement éliminées par apoptose.<sup>6</sup>

L'équipe d'Ali Al-Mourabit qui m'a accueillie à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN) consacre sa recherche à l'isolement et la détermination structurale de nouveaux métabolites secondaires bioactifs d'éponges marines. La synthèse biomimétique, la synthèse totale ainsi que la chimie médicinale autour des métabolites marins isolés au laboratoire constituent le deuxième axe de recherche du laboratoire. En effet la mer représente une source riche de produits naturels bioactifs mais encore peu exploitée. Malgré l'intérêt qu'ils suscitent, les fonds marins sont plus difficilement accessibles pour la collecte d'organismes et la reproduction en laboratoire de leurs écosystèmes complexes représente un défi pour les scientifiques.<sup>7</sup> Les avancées techniques ont permis d'isoler des produits naturels marins possédant des structures chimiques originales sans équivalent terrestre avec un large spectre d'activités pharmacologiques.<sup>8</sup> Les produits naturels marins présentent néanmoins des inconvénients : les structures sont souvent trop complexes pour être accessibles par synthèse totale et leur approvisionnement directement dans leur milieu naturel est bien souvent incompatible avec leur industrialisation à grande échelle. Ils peuvent également être particulièrement toxiques ou pas assez sélectifs. La simplification des produits naturels marins par synthèse organique est alors une stratégie permettant de valoriser et d'exploiter leur originalité structurale ainsi que leurs propriétés biologiques, tout en contournant les problèmes d'accès, de synthèse et d'activités biologiques indésirables.<sup>9</sup>

La benzoscéptrine C est une nouvelle molécule naturelle originale isolée de l'éponge marine *Agelas Dendromorpha* au sein du laboratoire et sur laquelle des travaux de synthèse totale et de simplification ont été menés. Ainsi, sur la base de ces travaux antérieurs, un hit analogue de

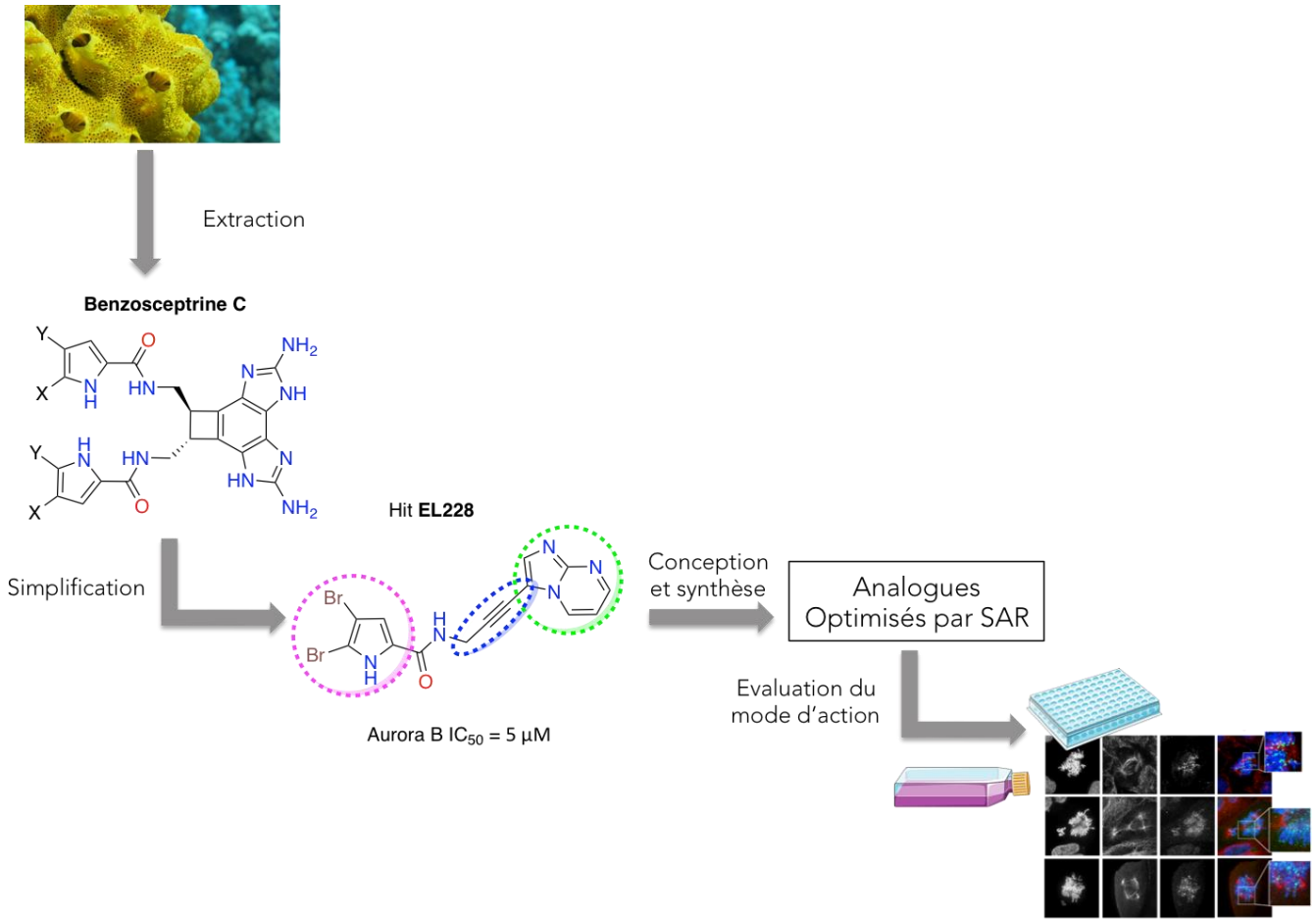


l'oroïdine (monomère de la benzoscéptrine C) a pu être identifié lors d'un criblage par nos collaborateurs de la Station Biologique de Roscoff. C'est l'analogue **EL228** qui s'est avéré être un inhibiteur sélectif de la kinase Aurora B avec une  $IC_{50}$  de 5  $\mu$ M.

Le sujet de la thèse a été de concevoir et synthétiser des analogues plus actifs à partir du hit initial, pour conduire à un potentiel candidat médicament ciblant la kinase Aurora B. L'objectif était également d'étudier le mode d'action biologique des meilleurs inhibiteurs sélectionnés.

Ainsi au cours de la thèse, nous avons préparé plus de quatre-vingt nouveaux analogues en nous basant sur l'étude des relations de structure-activité. Les évaluations pharmacologiques ont permis de mettre en évidence de nouveaux composés actifs sur la kinase Aurora B avec des  $IC_{50}$  de l'ordre du nanomolaire, jusqu'à 150 fois plus actif que le hit initial **EL228**. Les dérivés actifs se sont révélés être des inhibiteurs non-compétitifs mixtes vis-à-vis de l'ATP, ce qui n'a jusqu'alors été que très peu décrit pour cette kinase. Les études biologiques sur cellules ont également permis de valider leur mode d'action sur la cible biologique.

Après une brève introduction sur le cancer, le premier chapitre est consacré à la présentation des kinases et plus particulièrement des kinases Aurora, avec leurs rôles dans la division cellulaire et leurs intérêts en tant que cibles thérapeutiques anticancéreuses. Ce chapitre I porte aussi dans une deuxième partie sur les produits naturels marins à l'origine de ce projet de chimie médicinale. Les chapitres II, III et IV présentent les diverses modifications chimiques effectuées avec l'étude des relations de structure-activité par partie du squelette général. Ainsi, les modifications du noyau 4,5-dibromopyrrole sont traitées dans le chapitre II, puis se sont celles du noyau imidazo[1,2-a]pyrimidine dans le chapitre III. Enfin, les modifications du linker entre les deux noyaux hétérocycliques font l'objet du chapitre IV. Le cinquième et dernier chapitre est dédié aux évaluations biologiques et à l'exploration du mode d'action en utilisant les inhibiteurs les plus actifs.



**Figure 1**



# **Chapitre I**

## **Introduction**

### **et état de l'art**



# Chapitre I – Introduction et état de l’art

## I. Le cancer

### 1. Généralités sur la maladie

Avec l’accroissement de l’espérance de vie, le cancer est parmi les premières causes de mortalité prématurée en France avec les maladies cardiovasculaires. En 2018, ce ne sont pas moins de 382 000 nouveaux cas qui ont été dépistés en France et 157 400 décès. Selon l’OMS, le fardeau mondial du cancer en 2018 est estimé à 18.1 millions nouveaux cas et 9.5 millions de décès. Un homme sur cinq et une femme sur six dans le monde développeront un cancer au cours de leur vie. Un homme sur huit et une femme sur 11 succombent de cette maladie.<sup>10</sup>

Le cancer est un ensemble de maladies caractérisées par la prolifération rapide, anormale et anarchique de cellules de l’organisme, on parle de maladie de la division cellulaire. Au cours des divisions cellulaires successives, des mutations peuvent se produire de façon aléatoire et spontanée ou suite à l’exposition à des facteurs de risques (facteurs héréditaires ou facteurs environnementaux). Contrairement aux cellules saines qui sont détruites par l’organisme en cas de dommages, les cellules cancéreuses échappent aux différents mécanismes de contrôle, continuent de se développer, s’accumulent pour aboutir à des cellules cancéreuses. Elles acquièrent ainsi de nombreux avantages compétitifs par rapport aux tissus sains et vont alors se multiplier au moyen de processus dérégulés pour devenir immortelles. Le développement d’une tumeur passe par plusieurs grandes étapes au cours du temps : l’initiation, la prolifération, l’angiogenèse et la métastase.

D. Hanahan et R. A. Weinberg<sup>11</sup> ont mis en avant plusieurs grandes caractéristiques impliquées dans l’initiation puis la progression tumorale (Figure 2) :

- L’instabilité génomique
- La dérégulation des signaux de prolifération et suppresseurs de croissance
- La résistance à la mort cellulaire et au système immunitaire
- L’immortalité
- L’induction de l’angiogenèse
- La capacité à produire des métastases pour coloniser d’autres organes
- L’inflammation

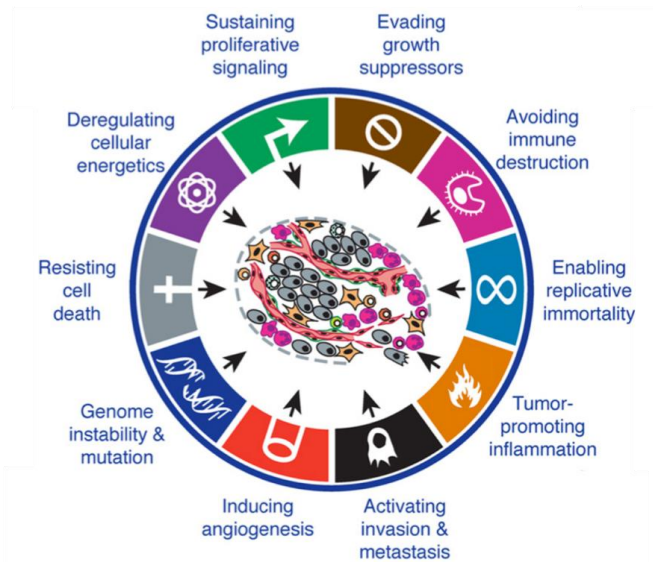


Figure 2 - Marqueurs de la tumeur<sup>11</sup>

L'organisme est doté de deux types de gènes qui assurent l'équilibre entre prolifération et mort cellulaire. Des mutations de ces gènes viennent briser l'équilibre et ainsi favoriser le développement cancéreux :

- les proto-oncogènes : participent à la croissance cellulaire, mais peuvent en cas de mutations promouvoir la formation de tumeurs, on parle d'oncogènes.<sup>12</sup>
- les gènes suppresseurs de tumeurs : inhibent la division cellulaire et favorisent la mort cellulaire, les mutants de ces gènes induisent une perte de fonction.<sup>13</sup>

Avec une population en constante augmentation, vieillissante et avec des modes de vie exposant davantage aux facteurs de risques environnementaux, le cancer est un problème de santé public majeur nécessitant de développer de nouveaux médicaments pour élargir l'arsenal thérapeutique.<sup>14</sup>

## 2. Approches thérapeutiques

Plusieurs approches thérapeutiques sont employées pour soigner les différents types de cancers : la chirurgie, la radiothérapie et les traitements médicamenteux.<sup>15</sup>

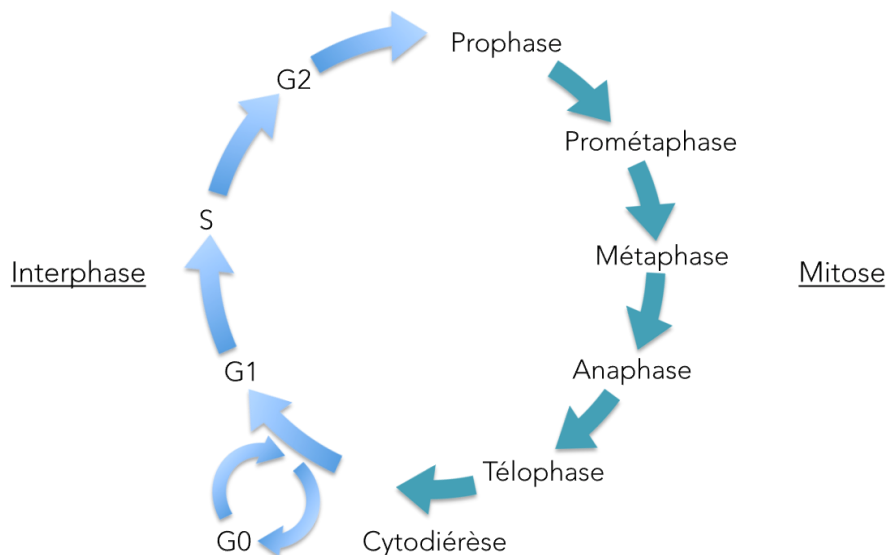
La chirurgie consiste à retirer la tumeur du patient si elle est bien localisée et encore de petite taille.<sup>15</sup> Généralement, cette intervention est accompagnée d'une chimiothérapie de prévention. Concernant les traitements médicamenteux, il existe deux grandes classes d'agents chimiothérapeutiques : les agents ciblant l'ADN et ceux qui ciblent la division cellulaire. Dans le premier cas, les molécules utilisées sont par exemple des agents intercalants ou alkylants de l'ADN, inhibant ainsi sa réplication. Dans le second cas, les molécules chimiques ciblent un ou plusieurs acteurs du cycle cellulaire, impactant alors la prolifération des cellules tumorales. Tout l'enjeu de cette thérapie est d'être en mesure de distinguer les cellules saines des cellules tumorales. Cette thérapie présente de nombreux effets secondaires pour les patients à cause du manque de spécificité de cette approche. La thérapie ciblée quant à elle, est dirigée contre des

récepteurs biologiques spécifiques de la tumeur.<sup>16</sup> On peut également citer l'immunothérapie qui consiste à diriger les défenses immunitaires contre la tumeur ou encore l'hormonothérapie pour les cancers hormono-dépendants comme autres stratégies thérapeutiques.<sup>15,17</sup> Pour finir, la radiothérapie est une méthode en externe ou en interne au niveau de la tumeur qui vise à détruire les cellules tumorales par irradiation. Ce n'est évidemment pas sans risque puisque les irradiations peuvent également endommager les tissus environnants.<sup>15</sup>

Il est bien souvent nécessaire d'utiliser plusieurs de ces traitements en combinaison pour parvenir à soigner un cancer. Néanmoins, il est nécessaire de développer encore de nouvelles alternatives ou synergies pour améliorer l'efficacité des traitements tout en limitant les effets secondaires, qui peuvent être responsable de l'inefficacité d'un traitement. Bien que de considérables progrès aient été réalisés et que le taux de mortalité pour certains cancers a pu diminuer significativement, il reste de nombreuses voies à explorer et bien des interrogations à lever pour les scientifiques.

## II. Le cycle cellulaire et ses acteurs

Le cycle cellulaire est un processus biologique essentiel, constitué d'un ensemble d'étapes minutieusement orchestrées, ayant pour objectif de diviser une cellule mère en deux cellules filles identiques.<sup>18</sup> Chez les cellules eucaryotes, on distingue deux grandes étapes : l'interphase (G1, S et G2), pendant laquelle le matériel génétique est dupliqué, et la mitose M, où la répartition du matériel génétique s'opère pour aboutir à deux cellules filles. Chacune de ces deux grandes étapes est subdivisées en plusieurs sous-étapes (Figure 3).



**Figure 3 - Les phases de la division cellulaire**

Chacune des phases du cycle est rigoureusement contrôlée par de nombreux acteurs protéiques. En effet, la répartition correcte de l'ADN au cours de la division cellulaire est cruciale pour la viabilité cellulaire ainsi que la stabilité génomique. Les kinases cyclines-dépendantes (Cdks) à sérines/thréonines jouent un rôle essentiel dans le bon déroulement et le contrôle de toute la division cellulaire.<sup>19</sup> Ces Cdks s'associent à une sous-unité régulatrice que l'on appelle



cycline. Les associations de Cdk-cyclines permettent d'orchestrer harmonieusement l'ensemble du cycle (Figure 4).<sup>20,21</sup> Leurs activités enzymatiques varient au cours du cycle avec des changements d'état de phosphorylation des protéines régulatrices du cycle cellulaire. L'activité des Cdks est régie par la synthèse et la dégradation des cyclines tout au long du cycle.

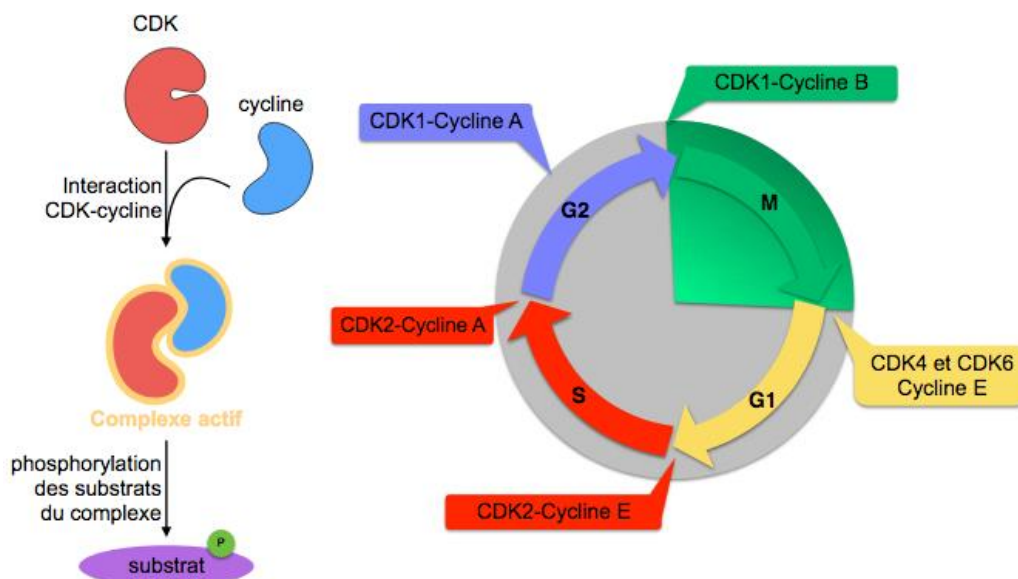


Figure 4 – Les complexes Cdk-Cyclines du cycle cellulaire<sup>20</sup>

En plus des Cdks, d'autres kinases jouent un rôle capital dont les kinases Aurora, NEKs et les PLKs (Polo-like kinases).<sup>22</sup> Elles sont contrebalancées par des phosphatases, pour le bon équilibre du cycle. Après un bref rappel sur les phases du cycle de la division cellulaire, cette étude bibliographique s'intéressera aux kinases, et plus particulièrement à celle de la famille Aurora.

## 1. Les phases du cycle de la division cellulaire

### a. L'interphase

#### i. Phase G1

Les cellules en G0 dites en quiescence (état non prolifératif), rentrent en division cellulaire sous l'action de divers signaux mitogènes. L'entrée en interphase débute par l'étape G1 de préparation à la réplication de l'ADN. C'est une étape de croissance cellulaire où l'ensemble de la machinerie protéique nécessaire est alors recrutée et synthétisée. La phase G1 est la plus longue du cycle cellulaire. Un premier point de contrôle intervient et autorise ou non le passage en phase S, si la croissance de la cellule le permet et si l'ADN n'est pas endommagé.

#### ii. Phase S

C'est au cours de la phase S que le matériel génétique est dupliqué ainsi que l'ensemble des composants de la cellule. La réplication de l'ADN aboutit fidèlement à deux copies identiques de chaque chromosome. Le contenu en ADN passe alors de  $2n$  à  $4n$ . Le centrosome est aussi dupliqué au cours de cette phase, il s'agit du principal centre organisateur des microtubules à partir duquel sont nucléés les microtubules.

### iii. Phase G2

La phase G2 constitue la dernière étape de l'interphase, c'est une phase de préparation à l'entrée en mitose. Les protéines nécessaires à l'entrée en mitose sont à ce moment synthétisées et activées. Il s'agit notamment du complexe Cdk1/CyclineB. La maturation des centrosomes s'opère également au cours de cette étape grâce à différentes kinases, comme PLK1, Cdk11 et Aurora A.<sup>23</sup> La cellule subit un second point de contrôle et permet l'arrêt du cycle avant l'entrée en mitose en cas de dommages à l'ADN notamment.

### b. La mitose

La mitose se découpe en cinq étapes : prophase, prométaphase, métaphase, anaphase et télophase, et s'achève avec la cytokinèse comme illustré sur la Figure 5.<sup>24</sup> Contrairement à l'interphase, la mitose est rapide et dure deux heures au plus. Elle est caractérisée par la répartition du matériel génétique en deux lots strictement identiques qui conduisent à la formation de deux cellules filles. Les cellules quittent ensuite le cycle de division en phase de quiescence G0. Chacune de ces phases est strictement régulée et rigoureusement contrôlée au moyen de checkpoints, ne pouvant commencer que lorsque la précédente étape est correctement terminée.

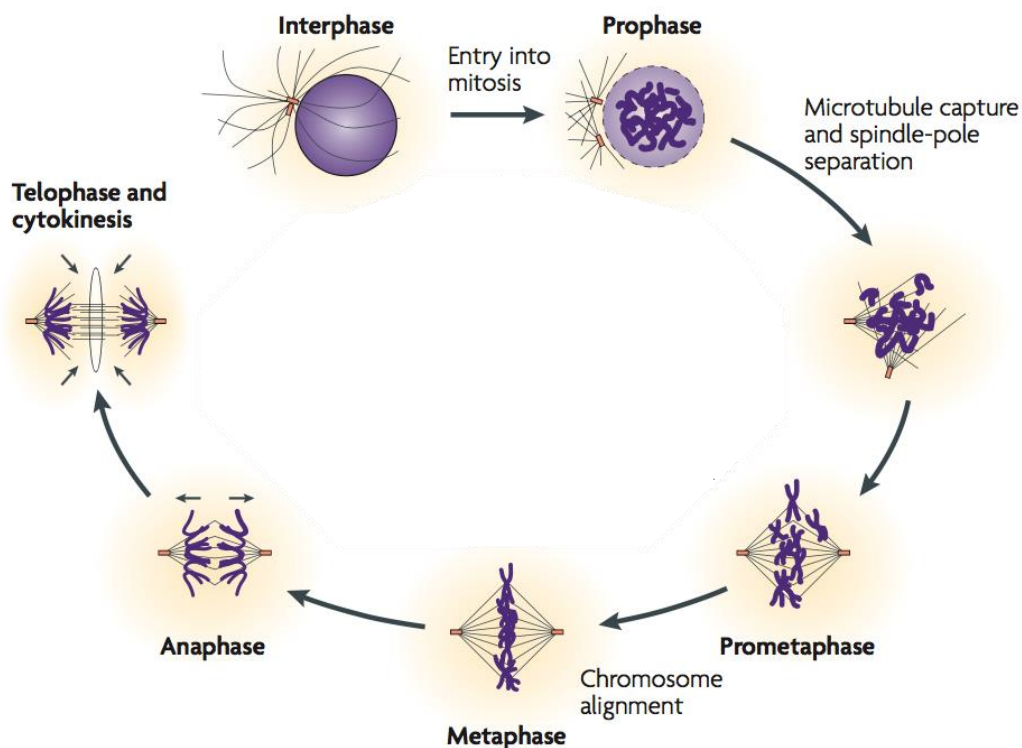
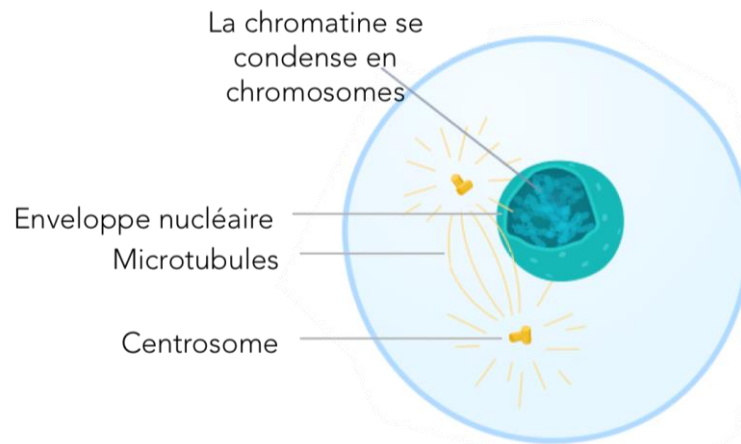


Figure 5 - Les étapes de la mitose (Adaptée de Jackson *et al*, 2008)<sup>24</sup>

### i. La prophase

L'entrée en mitose est induite par le couple Cdk1/CyclineB. Lors de la prophase, les chromosomes se condensent grâce aux condensines. Ces complexes permettent le superenroulement de l'ADN. La phosphorylation de l'histone H3 par la kinase Aurora B est également impliquée dans ce processus de condensation chromosomique. Les chromosomes compactés s'apparient en deux chromatides sœurs qui sont maintenues au niveau des

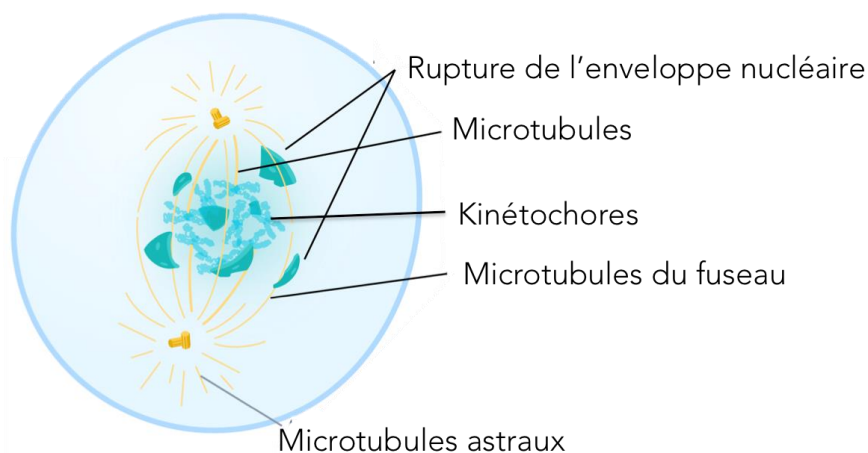
centromères par des cohésines. Il s'agit d'un complexe protéique de quatre partenaires que l'on peut qualifier de « colle à chromatides ».<sup>25</sup> Les centrosomes matures se séparent et débutent leur migration à chaque pôle de la cellule où peut commencer la nucléation des microtubules qui vont former le futur fuseau. Pour finir, l'enveloppe nucléaire commence à se rompre (Figure 6).



**Figure 6 - La prophase (Version fr par © Hawk-Eye)**

## ii. La prométaphase

Cette étape débute par la rupture complète de l'enveloppe nucléaire. C'est au cours de la prométaphase que se met en place le fuseau mitotique suite à la migration des centrosomes aux deux pôles de la cellule. La dynamique des microtubules est régie par les protéines associées aux microtubules (MAPs) et les protéines motrices qui articulent les différents stades : nucléation, élongation, rétrécissement et passage d'un état à l'autre.<sup>20</sup> Les chromosomes s'alignent petit à petit lors du phénomène dynamique de capture-relargage des microtubules aux kinétochores (Figure 7).



**Figure 7 - La prométaphase (Version fr par © Hawk-Eye)**

## iii. La métaphase

La métaphase correspond à l'étape où tous les chromosomes sont parfaitement alignés sur la plaque métaphasique, on parle de bi-orientation (Figure 8). C'est cet alignement qui est essentiel à la séparation homogène en deux lots strictement identiques. Le point de contrôle métaphase-

anaphase, appelé « *spindle assembly checkpoint* » (SAC) n'autorise le passage à l'anaphase que si tous les chromosomes sont effectivement alignés.<sup>26</sup>

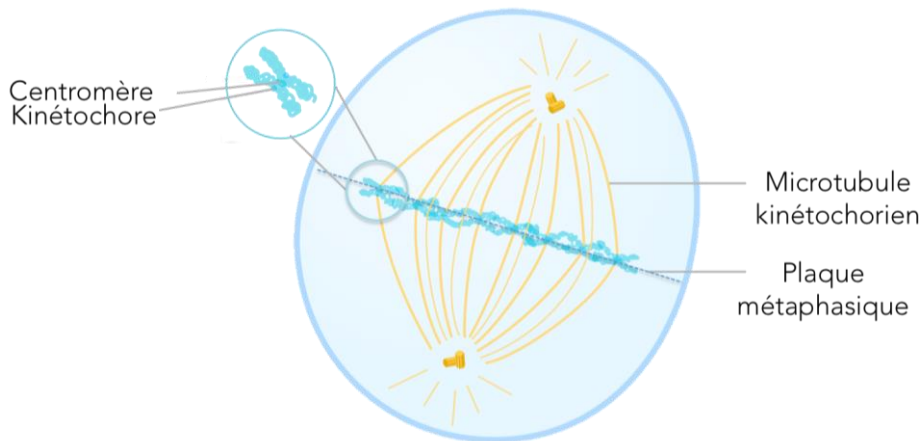


Figure 8 – La métaphase (Version fr par © Hawk-Eye)

#### iv. L'anaphase

La séparation des chromatides sœurs s'effectue au cours de l'anaphase. Les cohésines qui les maintiennent ensemble sont dégradées par les séparases. Le raccourcissement des microtubules kinétochoriens entraîne chaque chromatide aux pôles opposés par tractation (Figure 9).<sup>27</sup>

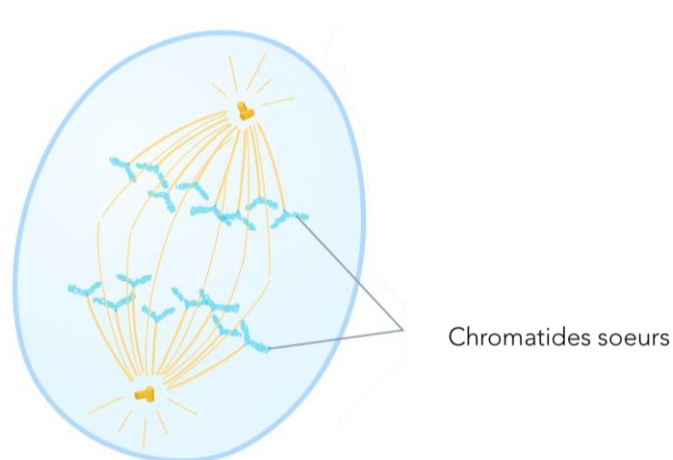


Figure 9 - L'anaphase (Version fr par © Hawk-Eye)

#### v. La télophase et la cytokinèse

Au cours de la télophase, les enveloppes nucléaires se reconstituent autour de chaque nouveau lot de chromatides qui se décondensent. Un anneau contractile d'actomyosine s'établit au niveau du sillon de division. La cytokinèse correspond à la séparation physique des deux cellules filles par la contraction de l'anneau contractile (Figure 10).<sup>18</sup> Le fuseau central se condense, ce qui a pour conséquence la concentration des protéines nécessaires à l'abscission en cette zone de division.<sup>18</sup> La mitose se termine par la formation de deux cellules filles qui entrent en phase G0. La majorité des cellules ne prolifèrent plus mais certaines peuvent de nouveau entrer en division.

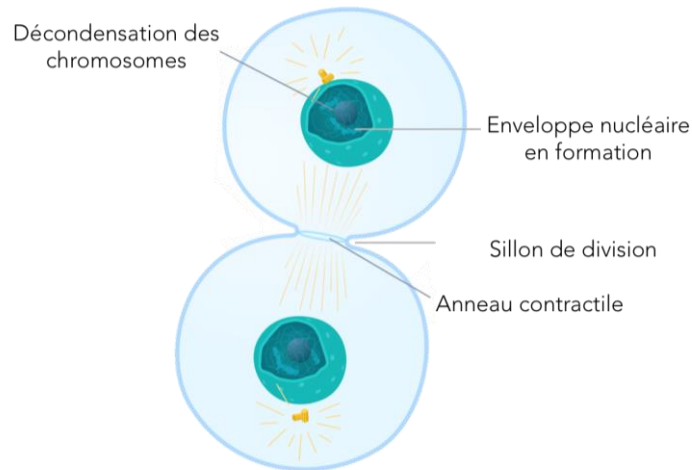


Figure 10 - Télophase & cytokinèse (Version fr par © Hawk-Eye)

## 2. Division cellulaire et cancer

L'intégrité génétique est transmise lors de la mitose, d'où le grand nombre d'acteurs impliqués dans cette étape. C'est la raison pour laquelle, un dysfonctionnement à ce niveau d'un ou plusieurs de ces acteurs induit des dommages considérables sur la stabilité génomique. Les dérégulations des facteurs du cycle peuvent conduire à la formation d'un fuseau mitotique monopolaire, à la ségrégation anormale des chromosomes ou encore à des défauts de cytotélerèse. Ces défauts de mitose conduisent à des cellules aneuploïdes, contenant des chromosomes en plus ou en moins, et ainsi potentiellement plusieurs copies de gènes oncogènes. L'instabilité chromosomique et l'aneuploïdie sont associées à la tumorigenèse, bien qu'il ne soit pas tout à fait clair si les erreurs mitotiques sont une cause ou une conséquence de la tumorigenèse.<sup>28,29</sup>

C'est pour ces raisons que les principaux acteurs de la division cellulaire ont été largement étudiés, afin de mieux comprendre les mécanismes biologiques associés et de pouvoir les cibler judicieusement pour apporter de nouvelles solutions thérapeutiques. Les kinases sont une famille de protéines largement impliquées dans les processus physiologiques dont la division cellulaire. En effet, la progression dans le cycle cellulaire est orchestrée et réalisée grâce à des étapes de phosphorylation et déphosphorylation de protéines. Les kinases suscitent un vif intérêt dans la mise au point de nouvelles molécules thérapeutiques.

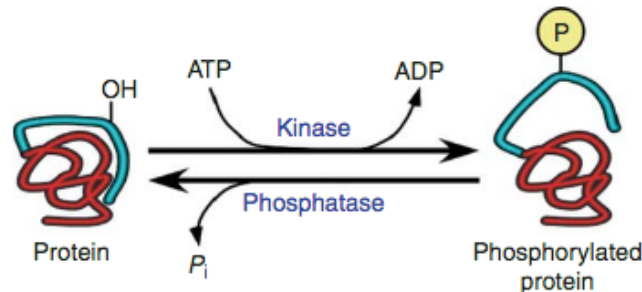
## III. Les protéines kinases comme cibles thérapeutiques

De nombreux processus physiologiques et voies de signalisation cellulaire sont régis et régulés par les phosphotransférases, appelées kinases.<sup>30,31</sup> On dénombre quatre grandes classes de kinase : les sérine/thréonine kinases, les tyrosines kinases, les kinases duales et les lipides kinases. Elles catalysent le transfert du phosphate de l'adénosine triphosphate (ATP) vers un résidu hydroxylé d'une cible substrat (Figure 11). Le substrat de la kinase une fois reconnu, se voit transférer ce groupement phosphate de façon covalente. Cette modification permet :

- l'induction de changements de conformation,

- la stabilisation ou la déstabilisation du substrat protéique,
- le changement de localisation,
- l'activation ou l'inhibition de l'activité enzymatique
- le changement d'interactions avec d'autres partenaires

Les phosphatases quant à elles, jouent le rôle inverse et catalysent l'hydrolyse du groupement phosphate afin d'assurer un bon équilibre.<sup>32,33</sup>



**Figure 11 – Schéma de phosphorylation d'une protéine par une kinase<sup>32</sup>**

On dénombre au moins cinq cent trente-huit kinases dans le kinome humain (Figure 12), couvrant de très nombreux domaines physiologiques et représentent la plus grande famille d'enzymes chez l'Homme avec 2 % de génome humain.<sup>30</sup> Près de 90 % de ces enzymes sont des kinases à sérine/thréonine. Les kinases sont à ce jour les deuxièmes cibles biologiques les plus visées dans le domaine pharmaceutique après les récepteurs couplés aux protéines G.<sup>34</sup>

On distingue deux grandes catégories : les kinases eucaryotes et les kinases atypiques. Les kinases du premier groupe ont été subdivisées en neuf sous-groupes (AGC, CAMK, CMGC, CK1, RGC, TK, TKL, STE et autres) selon leur similarité. Les kinases sont particulièrement étudiées puisqu'elles sont par leur diversité, impliquées dans de nombreuses pathologies. Ce faisant, elles représentent des cibles à fort potentiel dans le développement de nouvelles approches thérapeutiques, et plus particulièrement en oncologie.<sup>31,35</sup>

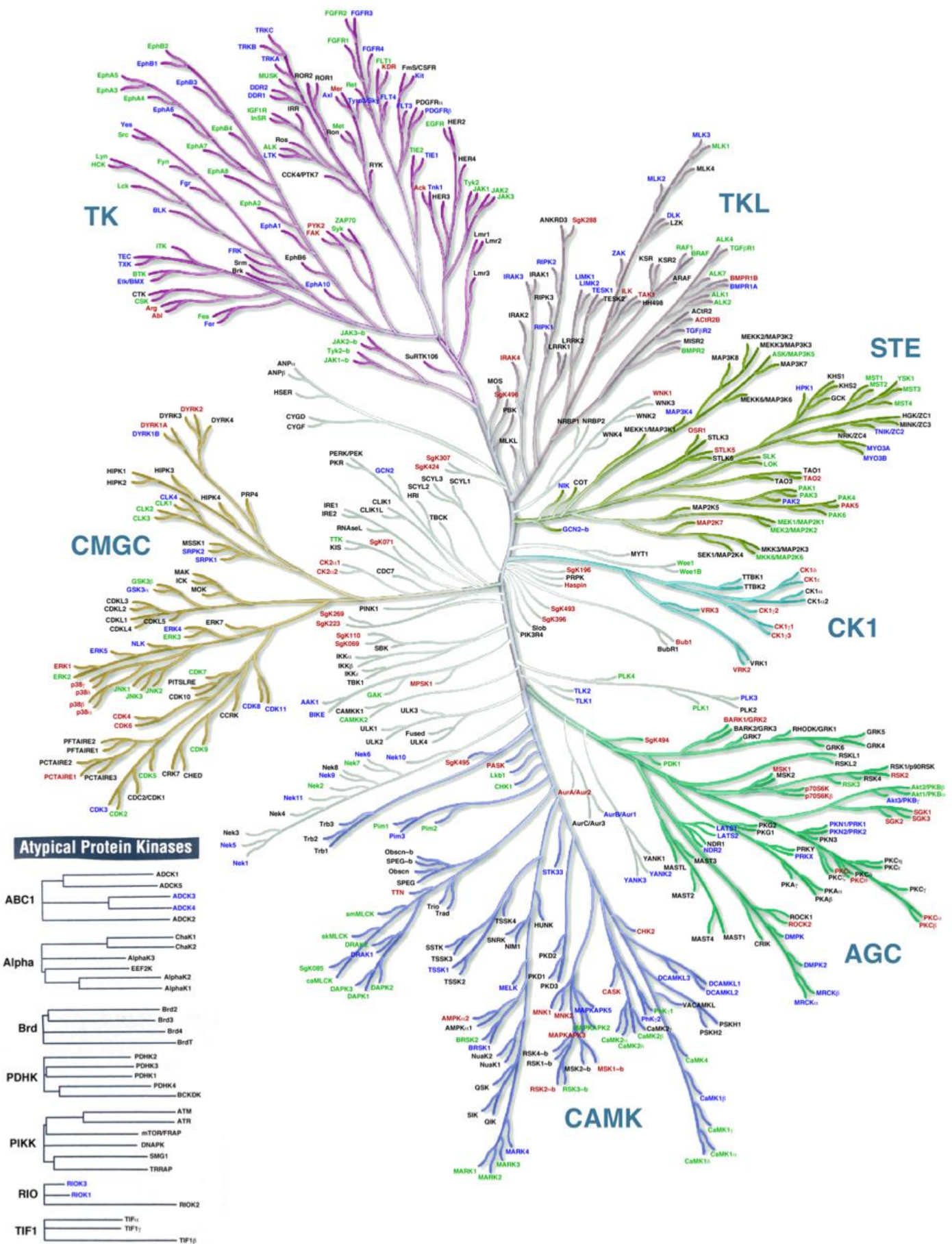


Figure 12 – Arbre phylogénétique du Kinome humain<sup>36</sup>

## 1. Les sérine/thréonine kinases Aurora

Les kinases Aurora appartiennent à la classe des kinases à sérine/thréonine. La première kinase Aurora fut décrite chez un mutant de drosophile en 1995 par David Glover.<sup>37</sup> Il y a à ce jour 3 membres au sein de cette famille : Aurora A, B et C.<sup>38</sup> Leur nom provient de leur localisation au niveau des pôles du fuseau mitotique d'après les phénomènes d'aurores polaires qui surviennent dans les régions proches des pôles magnétiques.<sup>39</sup> Ces kinases sont exprimées lors de la division cellulaire et y jouent un rôle crucial.

### a. Structure des kinases Aurora

Elles sont toutes les trois constituées de deux lobes : un domaine régulateur N-terminal et d'un domaine catalytique hautement conservé C-terminal (Figure 14).<sup>40</sup> Les éléments structuraux principaux sont décrits dans la Figure 13 et seront plus détaillés ultérieurement (voir page 44). Ces deux lobes sont reliés par une région charnière (*hinge*) responsable de la conformation active où l'on retrouve la poche à ATP.<sup>41</sup> Le domaine régulateur N-terminal est responsable des interactions protéine-protéine unique de chacune des kinases Aurora. Elles possèdent une boucle d'activation (T-loop) qui change de conformation lorsqu'elle est phosphorylée sur un résidu clé : thr288 pour Aurora A, thr232 pour Aurora B et thr198 pour Aurora C.<sup>42</sup> Ce changement de conformation permet l'accès des substrats dans la poche catalytique pour le transfert du groupement phosphate de l'ATP vers le substrat. Aurora B est liée au niveau de son lobe N-terminal à INCENP par le motif INbox de sa partie C-terminale.

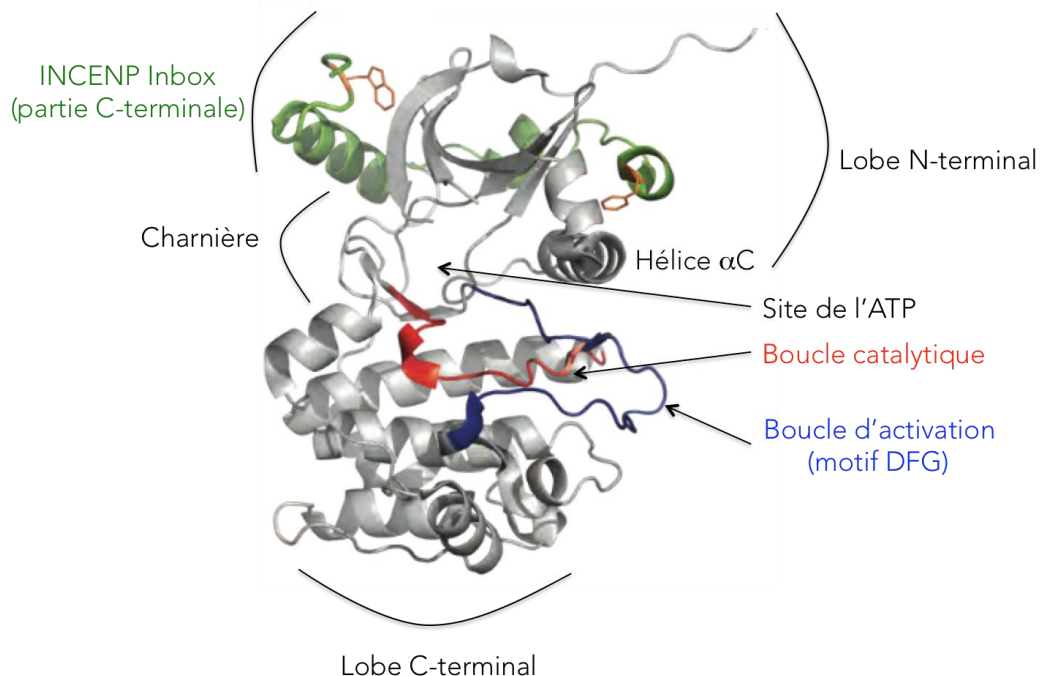


Figure 13 – Le domaine kinase avec la structure d'Aurora B

Aurora A et B régulent de nombreuses fonctions lors de la mitose, avec un domaine catalytique présentant un haut degré d'homologie de 71 % entre les deux. Il a été montré que le changement d'un seul acide aminé chez Aurora A permet d'obtenir une fonction Aurora B-like.<sup>43</sup> Malgré ce haut degré de conservation entre les deux kinases, elles possèdent toutefois chacune des rôles bien distincts. Aurora C est quant à elle impliquée dans la spermatogénèse, avec un rôle



similaire à celui d'Aurora B.<sup>41</sup> Leurs rôles dans la division cellulaire et leur implication dans le cancer vont être abordés au cours des paragraphes suivants.

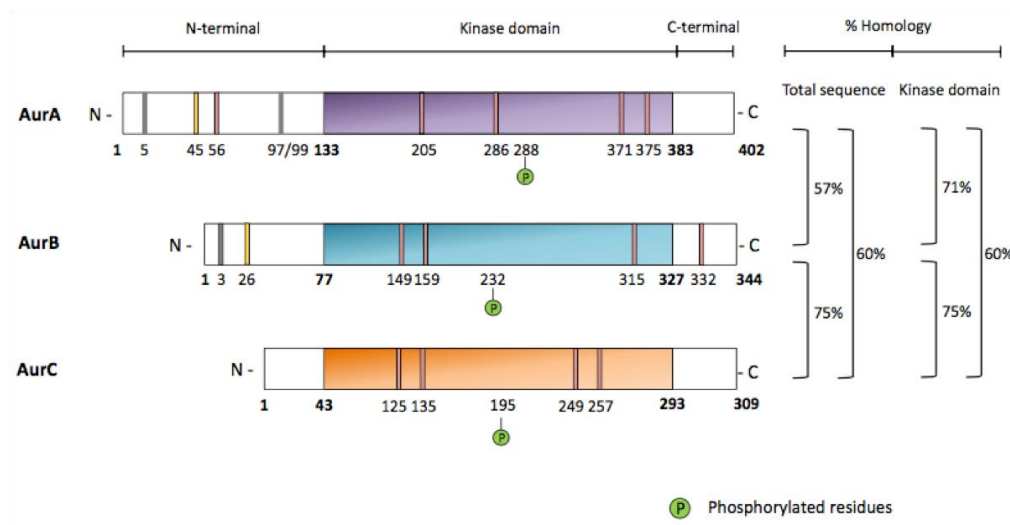


Figure 14 - Structures des kinases Aurora (Adapté de Willems *et al.* 2018)

## b. Aurora A

Aurora A, codée par le gène *STK15*, est impliquée dans l'entrée en mitose, la maturation des centrosomes, et la mise en place du fuseau bipolaire.<sup>3</sup> Son taux d'expression est au maximal en phase G2/M et chute au cours de la sortie de mitose et G1.<sup>38</sup>

### i. Maturation des centrosomes

Le centrosome est un organite de la cellule à partir duquel le réseau de microtubules du fuseau s'organise.<sup>44</sup> Il est constitué de deux centrioles, constitués de courts microtubules. Les deux centrioles sont entourés du matériel péricentriolaire. Après leur duplication, les centrosomes recrutent différentes protéines pour leur maturation. Ceci implique l'activité de plusieurs protéines dont Aurora A.<sup>39</sup>

Aurora A phosphoryle la protéine Ajuba située sur les centrosomes, ce qui permet de l'activer par autophosphorylation.<sup>3</sup> Ajuba est nécessaire pour le bon positionnement initial d'Aurora A en phase G2 sur les centrosomes (voir Figure 16 pour les différentes localisations au cours de la mitose).<sup>45</sup> L'activation d'Aurora A permet le recrutement de la protéine centrosomine, qui régule les complexes  $\gamma$ -TURCs ( $\gamma$ -tubulin ring complexes) nécessaires à l'élongation des microtubules par nucléation.

### ii. Séparation des centrosomes et mise en place du fuseau mitotique

Après leur maturation, les centrosomes migrent en fin de G2 aux deux pôles de la cellule, initiant la formation du fuseau mitotique bipolaire. Cette bipolarité est nécessaire pour le processus de capture des chromosomes. La GTPase Ran-GTP (Ran-Guanosine TriPhosphate) est nécessaire pour la bipolarité, la mise en place de l'enveloppe nucléaire et du fuseau mitotique.

Au cours de la prométaphase, Ran-GTP libère TPX2 qui peut se lier à Aurora A.<sup>39</sup> TPX2 (Targeting protein for xenopus kinesine like protein 2) est un cofacteur d'Aurora A essentiel à son activation.<sup>46,47</sup> La partie N-terminale de TPX2 se lie à Aurora A induisant un changement de conformation permettant le mouvement de sa boucle d'activation dans son site catalytique. Ainsi grâce à l'auto-phosphorylation sur la position Thr288, Aurora A s'active par une boucle d'activation positive.<sup>41</sup> L'association entre TPX2 et Aurora A s'effectue au niveau de deux sites clés.<sup>48 49</sup>

TPX2 est nécessaire pour permettre dans un second temps à Aurora A de se lier aux microtubules du fuseau à proximité des centrosomes. L'interaction avec TPX2 permet également de protéger la thréonine 288 d'Aurora A d'être déphosphorylée par la phosphatase PP1.<sup>3</sup> La liaison entre Aurora A et TPX2 est impliquée dans le recrutement de nombreuses protéines qui participent à la morphogénèse du fuseau mitotique, comme Eg5 et HURP.<sup>3</sup>

### iii. Entrée en mitose

L'entrée en mitose est permise par l'activation du complexe Cdk1/CyclineB, supportée par Aurora A (Figure 15).<sup>5</sup> Aurora A active la kinase Plk1, par l'intervention du cofacteur Bora, qui rend accessible la boucle d'activation de Plk1. Ensuite la kinase Plk1 active à son tour la phosphatase Cdc25B et dégrade la kinase Wee1 qui maintient Cdk1 inactive. Aurora A active elle aussi directement Cdc25B. Cette dernière finalement active Cdk1 par déphosphorylation au cours de la transition G2/M.<sup>3,50-52</sup>

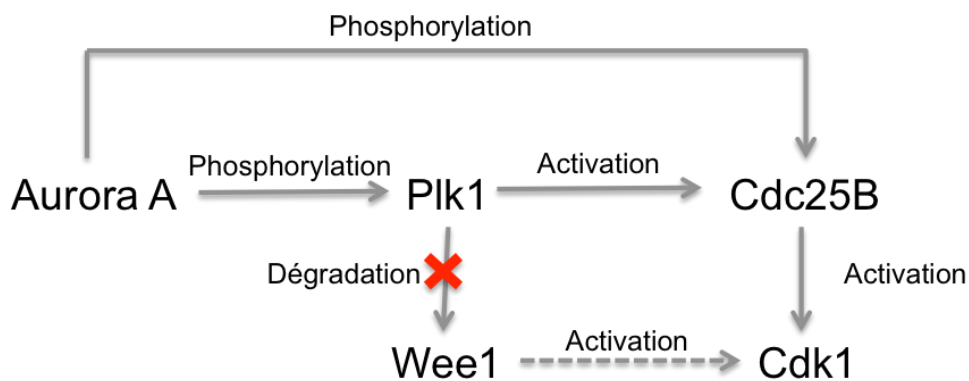


Figure 15 - Entrée en mitose via Aurora A

Aurora A est aussi impliquée dans d'autres cascades de signaux au cours des étapes suivantes mais ses rôles principaux sont davantage centrés sur le début de la mitose.

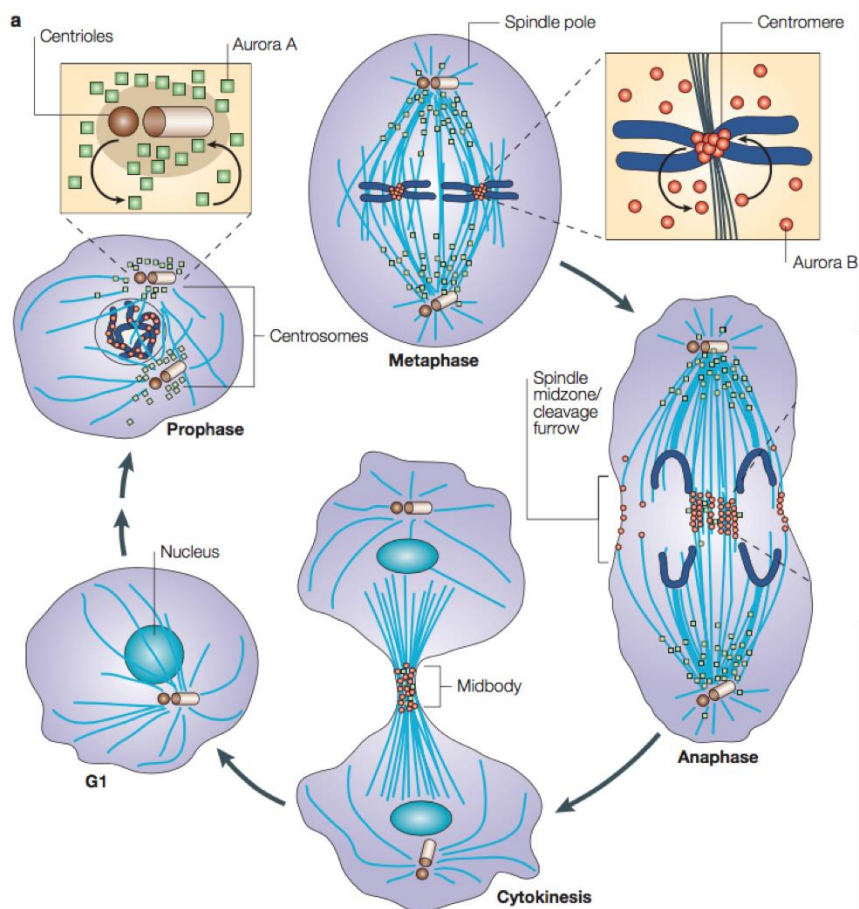
### c. Aurora B

Aurora B, codée par le gène *STK12*, fait partie du « Chromosomal Passenger Complex » abrégé CPC, qui est composé de quatre sous-unités : Aurora B, Boréoline, Survivine et INCENP (INner CENtromere Protein).<sup>53</sup> Comme Aurora A, son taux d'expression atteint son pic maximal en phase G2/M.

Aurora B est essentielle pour la condensation des chromosomes, le bon appariement des microtubules aux kinétochores (bi-orientation kinétochores-microtubules), l'alignement de

l'ensemble des chromosomes sur la plaque métaphasique, et également pour le checkpoint permettant ensuite de poursuivre en anaphase.<sup>54</sup> Aurora B est finalement essentielle à la cytokinèse.

L'activation d'Aurora B est un processus complexe et multi-étapes qui impliquent plusieurs partenaires. Une cinquantaine de substrats d'Aurora B ont pu être identifiés, incluant INCENP, l'histone H3 et MCAK par exemple.<sup>55</sup> En début de mitose Aurora B phosphoryle l'histone H3 sur les sérines 10 et 28, ce qui favoriserait le processus de condensation des chromosomes par le recrutement des condensines.<sup>56</sup> Cependant, ce résultat n'est pas confirmé par toutes les expériences mises en oeuvre.<sup>39</sup> Aurora B est située sur les bras des chromosomes puis se concentre aux centromères en début de mitose. Elle est transférée sur la zone équatoriale en deuxième partie de mitose comme illustré sur la Figure 16, d'où son nom de *passenger*.<sup>39</sup>



**Figure 16 - Localisation des kinases Aurora A et B au cours de la mitose (de Carmena et Earnshaw, 2003)<sup>39</sup> ; Aurora A est représentée par les carrés verts et Aurora A par les ronds rouges.**

### **i. Le CPC : fonction et localisation**

Le CPC est composé de quatre membres dont Aurora B, qui est la seule protéine ayant une activité enzymatique. Sa composition et son organisation sont représentées sur la Figure 17.<sup>53</sup>

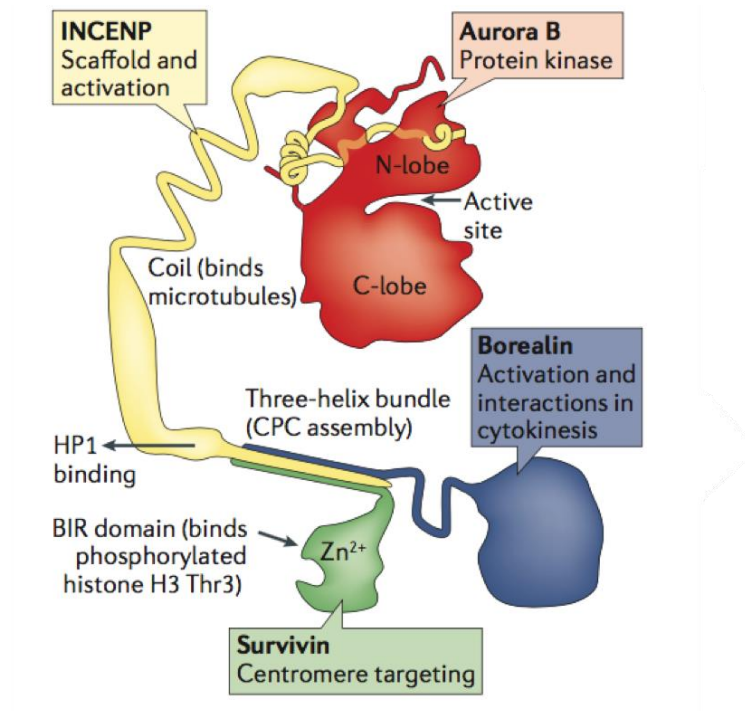


Figure 17 - Structure du CPC (de Carmena et al, 2012)<sup>53</sup>

Le CPC peut être divisé en deux modules:<sup>53</sup>

- Module de fonction : Aurora B et la partie C-terminale de INCENP
- Module de localisation : partie N-term d'INCENP, Survivine et Boréaline

INCENP est un cofacteur essentiel et nécessaire à l'activation d'Aurora B,<sup>57</sup> qui est lié à Aurora B par sa partie C-terminale IN box. C'est à la fois un substrat et un régulateur positif d'Aurora B. Il sert également de squelette au CPC, et fait le lien entre tous les partenaires au moyen d'un faisceau de trois hélices qui unit Survivine et Boréaline. Au cours de la prophase, Aurora B phosphoryle INCENP sur le motif Thr-Ser-Ser (TSS) (Figure 18).<sup>58</sup> Cela active l'auto-phosphorylation d'Aurora B sur la Thr232 ce qui induit un changement de conformation nécessaire à son activité enzymatique.<sup>5,59</sup> Ce mode d'activation est similaire à celui qui s'opère entre TPX2 et Aurora A. D'autres kinases activent aussi Aurora B, comme la kinase checkpoint 1 Chk1 sur la Ser311.<sup>53</sup>

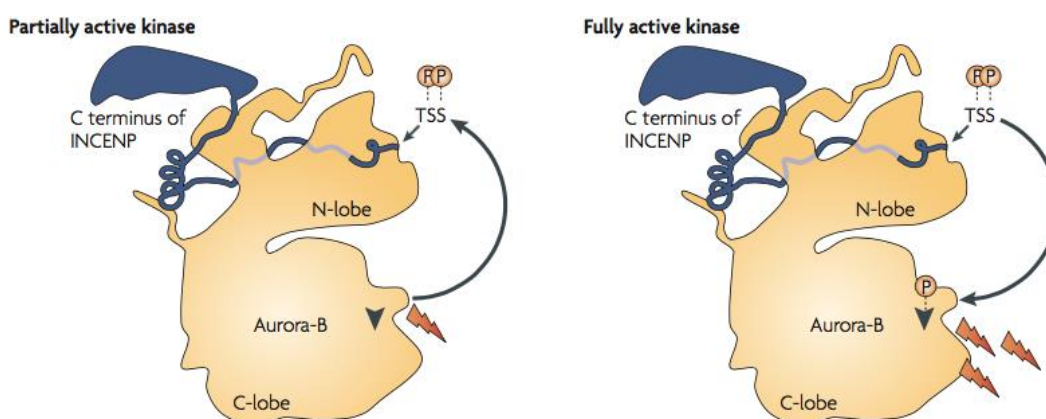
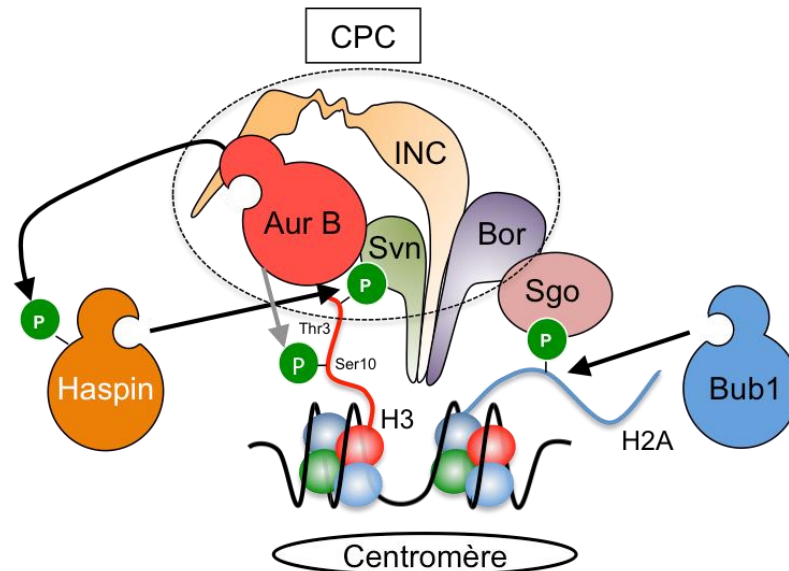


Figure 18 - Interaction de INCENP avec Aurora B & activation<sup>58</sup>

La protéine Survivine est responsable de la localisation et de la mobilité de l'ensemble du CPC lors du passage des chromosomes aux centromères en début de mitose.<sup>60</sup> Cette mobilité est sous le contrôle de la kinase Haspine. L'histone H3 phosphorylée sur la Thr3 par la kinase Haspine est reconnue par la Survivine, jouant le rôle d'ancrage au niveau des centromères. Cette étape est cruciale pour le recrutement du CPC aux centromères (Figure 19).<sup>33</sup> Aurora B phosphoryle ensuite Haspine, ce qui, grâce à une boucle d'activation positive, permet d'activer Haspine qui recrute davantage de CPC aux centromères et ainsi de suite.<sup>61</sup> Ce processus permet notamment de concentrer le CPC aux centromères en début de mitose.



**Figure 19 : Recrutement du CPC par Haspine et Bub1 (adaptée de Feizbakhsh *et al.* 2017)<sup>61</sup>**

Le recrutement du CPC aux centromères passe aussi par d'autres mécanismes. Une voie parallèle implique la phosphorylation de l'histone H2A sur la Thr120 par Bub1 (Figure 19).<sup>55</sup> Cette phosphorylation crée un site de liaison pour la protéine Shugoshine. Cette dernière a un rôle de protection de la cohésion centromérique. Elle se lie directement à la protéine Boréoline, recrutant ainsi le CPC aux centromères.<sup>61,62</sup> Pour résumer, Haspine et Bub1 permettent toutes deux de recruter le CPC aux centromères comme il est illustré sur la Figure 19.<sup>63</sup>

Boréoline en plus d'intervenir dans la stabilisation du complexe INCENP-survivine,<sup>60</sup> contribue à l'activation d'Aurora B. En effet, elle subit une phosphorylation par la kinase Mps1 (monopolar spindle 1), ce qui semble être aussi nécessaire à la bonne activation d'Aurora B.<sup>64</sup>

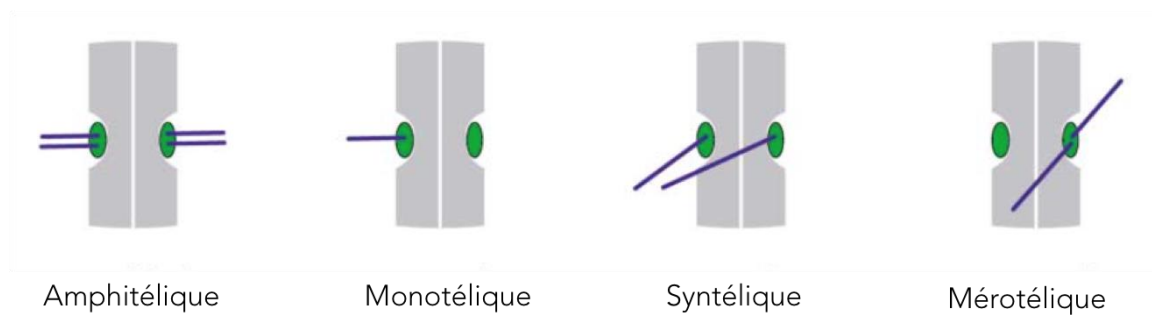
En tout début de mitose, le CPC se situe le long des bras chromosomiques puis se concentre dès la prométaphase jusqu'à la métaphase aux centromères internes.<sup>53</sup> Il se délocalise ensuite sur les microtubules du fuseau central de l'anaphase à la cytokinèse suite à la séparation des chromatides sœurs. Il se situe là où sera mis en place l'anneau contractile où Aurora B phosphoryle différents substrats permettant d'organiser le sillon de division (Figure 16).<sup>53</sup>

## ii. Bi-orientation des chromosomes

Un des rôles fondamentaux d'Aurora B est de promouvoir la bi-orientation des chromosomes afin qu'ils soient tous alignés sur la plaque équatoriale en métaphase par un processus d'erreur-

correction.<sup>65</sup> Chaque chromosome doit être attaché de chaque côté (par les kinétochores) aux microtubules du pôle correspondant, on parle d'attachement amphitélique. Le processus d'attachement étant dynamique et aléatoire, les chromosomes ne se trouvent pas de suite correctement attachés aux microtubules, il se passe une phase d'essais-erreurs qui dure tant que tous les chromosomes ne sont pas correctement appariés. Les différents types de fixation (Figure 20) sont caractérisés de la manière suivante :

- Amphitélique : les deux kinétochores sont reliés aux deux pôles du côté correspondant
- Monotélique : un seul kinétochore est attaché
- Synthélique : les deux kinétochores sont reliés au même pôle
- Mérotélique : un seul kinétochore est relié aux deux pôles

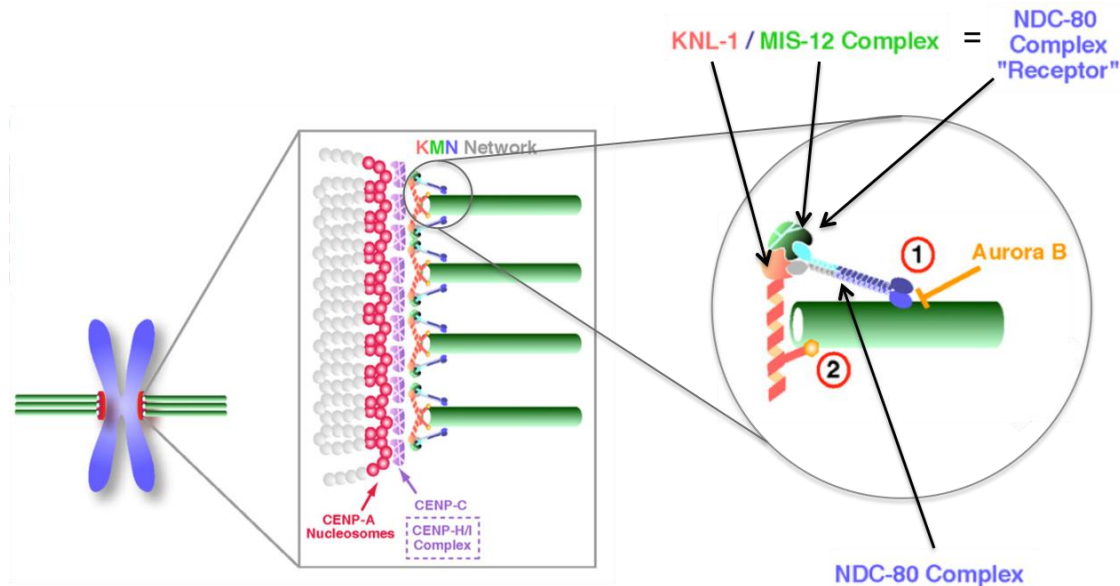


**Figure 20 - Les différents types d'attachement des kinétochores aux microtubules (de Hauf et Wataneb, 2004)<sup>65</sup>**

Deux mécanismes permettent de contrôler l'attachement des microtubules aux kinétochores. On distingue le processus de correction locale et le point de contrôle du passage métaphase/anaphase (SAC).

La capture des kinétochores par les microtubules est un phénomène dynamique et stochastique, ce qui nécessite de corriger toutes les erreurs induites aléatoirement. Aurora B a pour mission de déstabiliser activement l'interaction qui s'établit entre les microtubules et les kinétochores qui s'apparient. Aurora B assure ainsi la dépolymérisation des microtubules au voisinage des attachements qui ne sont pas amphitéliques. Ceci libère les chromosomes mal appariés pour recommencer le processus jusqu'à satisfaction.

Les kinétochores sont constitués d'un ensemble de protéines comprenant le réseau KMN (Knl1, Mis12 et Ndc80) qui est essentiel dans les interactions entre microtubules et kinétochores (Figure 21).<sup>66</sup> Le réseau KMN est situé sur la partie externe des kinétochores. On retrouve sur la partie interne CENP-A qui a un rôle de plateforme pour le recrutement des différentes protéines du kinétochore interne.<sup>63</sup> La liaison aux microtubules s'opère sur deux sites distincts et synergiques via Knl1 et Ndc80 (Figure 21).<sup>66</sup> La partie N-term chargée positivement de Ndc80 interagit avec la queue C-term chargée négativement des microtubules. La déstabilisation de l'attachement kinétochore-microtubule par Aurora B s'opère par phosphorylation du complexe Ndc80. En effet, cette phosphorylation déstabilise cette interaction, diminuant l'affinité du complexe Ndc80 pour les microtubules ce qui conduit à leur détachement.<sup>66-68</sup>



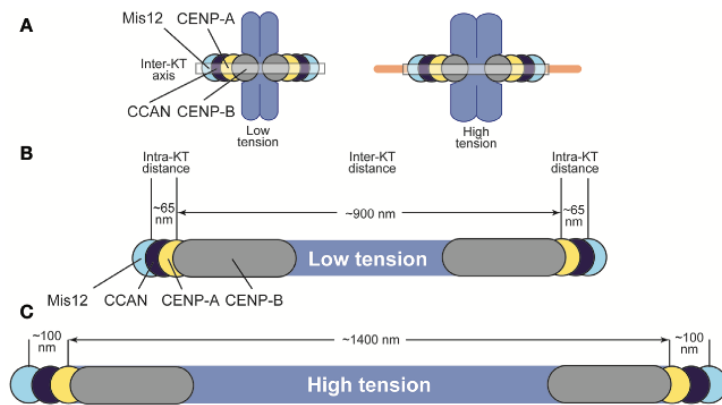
**Figure 21 - Le réseau KMN comme site d'accroche des microtubules (adapté de Cheeseman et al. 2006)**

Aurora B corrige également les accroches défectueuses par la régulation de la kinase MCAK.

La kinase MCAK (mitotic centromere associated kinase) est un membre de la famille Kin I des kinésines et induit la dépolymérisation des microtubules attachés aux kinétochores.<sup>69</sup> Aurora B régule sa localisation aux centromères ainsi que son activité de dépolymérisation par phosphorylation de la Ser196.<sup>69</sup> La phosphorylation de MCAK par Aurora B inhibe son action dépolymérisante de MCAK.<sup>65</sup> Un équilibre entre Aurora B et ses antagonistes, PP1 et ICIS (inner centromere protein) permettrait d'ajuster finement le contrôle des attachements erronés.<sup>69</sup> La façon dont MCAK régule les accroches défectueuses n'est cependant pas encore bien élucidée.<sup>70</sup>

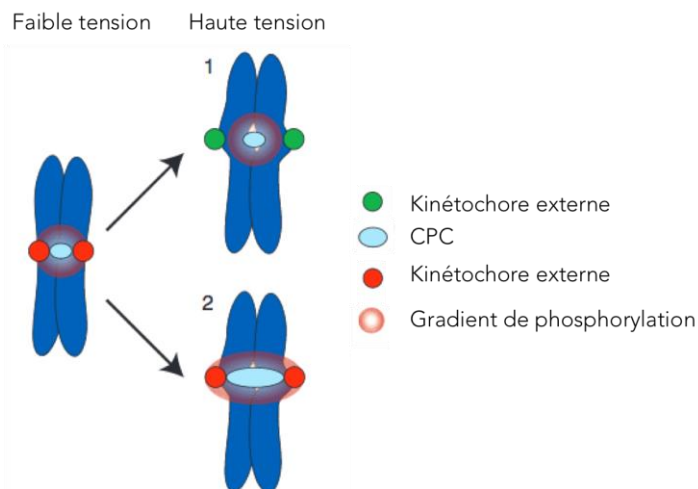
Lorsque l'appariement est productif, une tension s'établit alors de part et d'autre du centromère, étirant physiquement les kinétochores. L'explication la plus largement répandue repose sur l'éloignement des substrats d'Aurora B, qui se trouve alors trop éloignée de sa zone d'action. C'est ainsi que sont stabilisés les chromosomes bi-orientés (de façon amphitélrique).<sup>5</sup> En effet, Aurora B est localisée sur la partie interne des centromères, une tension due à un attachement amphitélrique écarte suffisamment le cœur des centromères des kinétochores. Les chromosomes mal attachés ne peuvent être étirés et Aurora B reste à proximité des protéines substrats qu'elle phosphoryle, entraînant le détachement des microtubules.

A titre d'exemple, chez les cellules HeLa, la distance qui sépare les deux kinétochores internes des chromatides sœurs est d'environ 0.9  $\mu\text{m}$  en l'absence de microtubules, c'est-à-dire sans tension, tandis qu'en cas d'un attachement amphitélrique en métaphase, la distance est de l'ordre de 1.4  $\mu\text{m}$ .<sup>63</sup> Ceci illustre que la tension induite par un attachement amphitélrique provoque des changements conformationnels dans cette zone (Figure 22).<sup>63</sup>



**Figure 22 - Effets de la tension sur les kinétochores et centromères<sup>63</sup>**

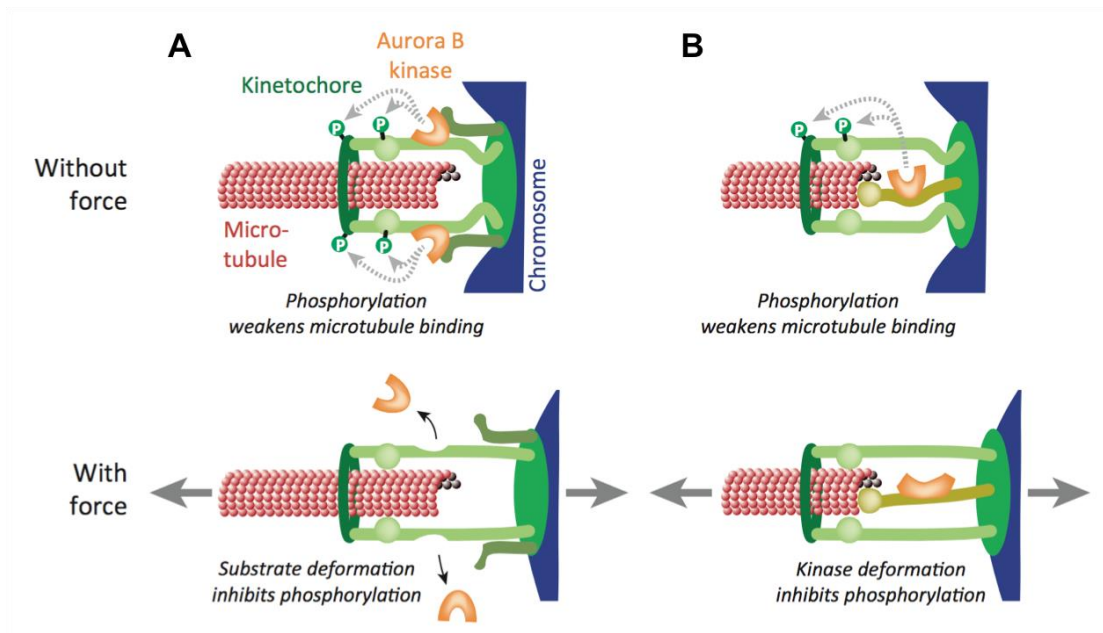
Néanmoins, la façon dont est détectée la tension reste un sujet de recherche et plusieurs modèles sont proposés.<sup>71</sup> Dans le cas expliqué précédemment et illustré sur la Figure 22, la tension impose l'élongation du centromère conduisant à un gradient d'Aurora B. C'est ce modèle qui est illustré sur la Figure 23-1 et qui représente le modèle le plus largement admis pour expliquer la détection de la tension. Cependant certaines expériences ont pu montrer que la tension induit également une extension du centromère, ce qui ne permet pas l'éloignement d'Aurora B de ses substrats, comme présenté sur la Figure 23-2.<sup>72</sup> Ceci suggère qu'il existe d'autres mécanismes plus complexes que simplement la séparation physique d'Aurora B de ses substrats sous l'action de la tension.<sup>63</sup>



**Figure 23 - Étirement du centromère sous la tension des microtubules<sup>72</sup>**

Sarangapani et Asbury<sup>71</sup> ont avancé plusieurs hypothèses. Ils proposent notamment l'idée que la tension effectuée aux kinétochores déforme les substrats d'Aurora B, qui n'est alors plus en mesure de les phosphoryler (Figure 24-A). Une autre hypothèse serait que la tension déformerait Aurora B elle-même ou son activateur INCENP, l'empêchant ainsi d'exercer une activité destabilisatrice (Figure 24B).





**Figure 24 – Hypothèses expliquant la stabilisation des attachements amphitéliques<sup>71</sup>**

Bien que le processus général de l'attachement kinétochores-microtubules soit largement abordé, les mécanismes sous-jacents précis qui s'opèrent pour détecter les erreurs d'appariements sont plus opaques et complexes. Néanmoins, les grands aspects ont pu être ici abordés.

### iii. Le point de contrôle SAC

Le « Spindle Assembly Checkpoint » (SAC) est un mécanisme qui empêche le passage à l'anaphase tant que tous les chromosomes ne sont pas bien attachés et alignés sur la plaque équatoriale. Aurora B assure le recrutement des protéines clés de ce checkpoint qui sont Mps1, Bub1, BubR1, Mad1 et Mad2, et joue un rôle dans la détection des erreurs d'appariements.<sup>63</sup> Un seul chromosome non apparié suffit à retarder l'avancée du cycle cellulaire.

Au cours du point de contrôle, si tous les chromosomes ne sont pas sous tension par un accrochage amphitéliquement aux microtubules, les acteurs du SAC, comme Mad2 et BubR1, empêchent l'activation du complexe APC/C.<sup>73, 74</sup> Si toutes les conditions sont remplies, le point de contrôle est levé et l'APC/C est activé permettant la poursuite du cycle en anaphase.

L'APC/C est le complexe de dégradation appelé « *anaphase promoting complex/cyclosome* », il s'agit d'une ubiquitine ligase E3 constituée de dix-neuf sous-unités, qui permet d'activer le passage à l'anaphase.<sup>75</sup> L'APC/C est activé par l'association de protéines activatrices : Cdc20 et Cdh1. En métaphase, APC-Cdc20 déclenche la dégradation de la sécurine et de la cycline B par ubiquitination comme illustré sur la Figure 25.<sup>25,27</sup> La dégradation de la sécurine libère la séparase qui peut alors cliver les complexes de cohésine, permettant la séparation des chromatides-soeurs.<sup>3,39</sup> La dégradation de la cycline B par APC-Cdc20 inactive la Cdk1 autorisant la poursuite du cycle cellulaire (Figure 25).

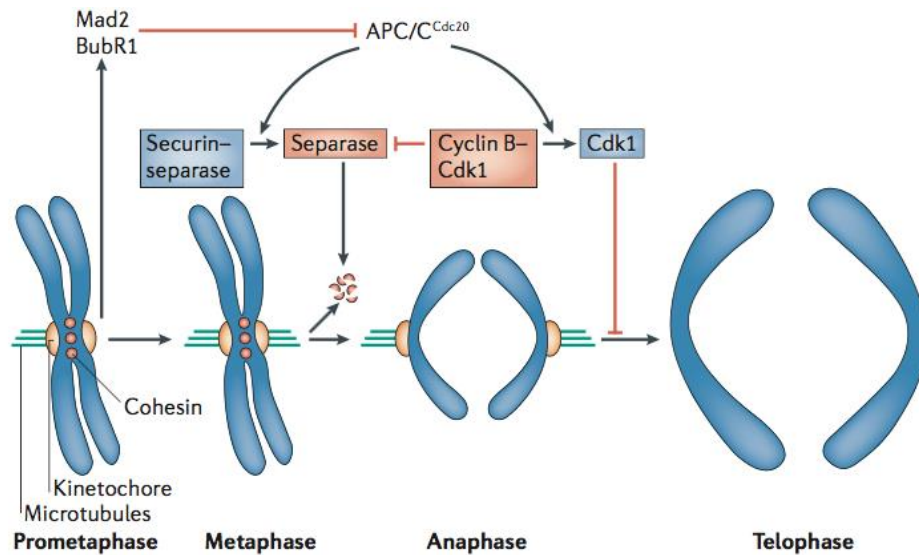


Figure 25 - Régulation de l'anaphase et de la sortie de mitose par APC/C<sup>75</sup>

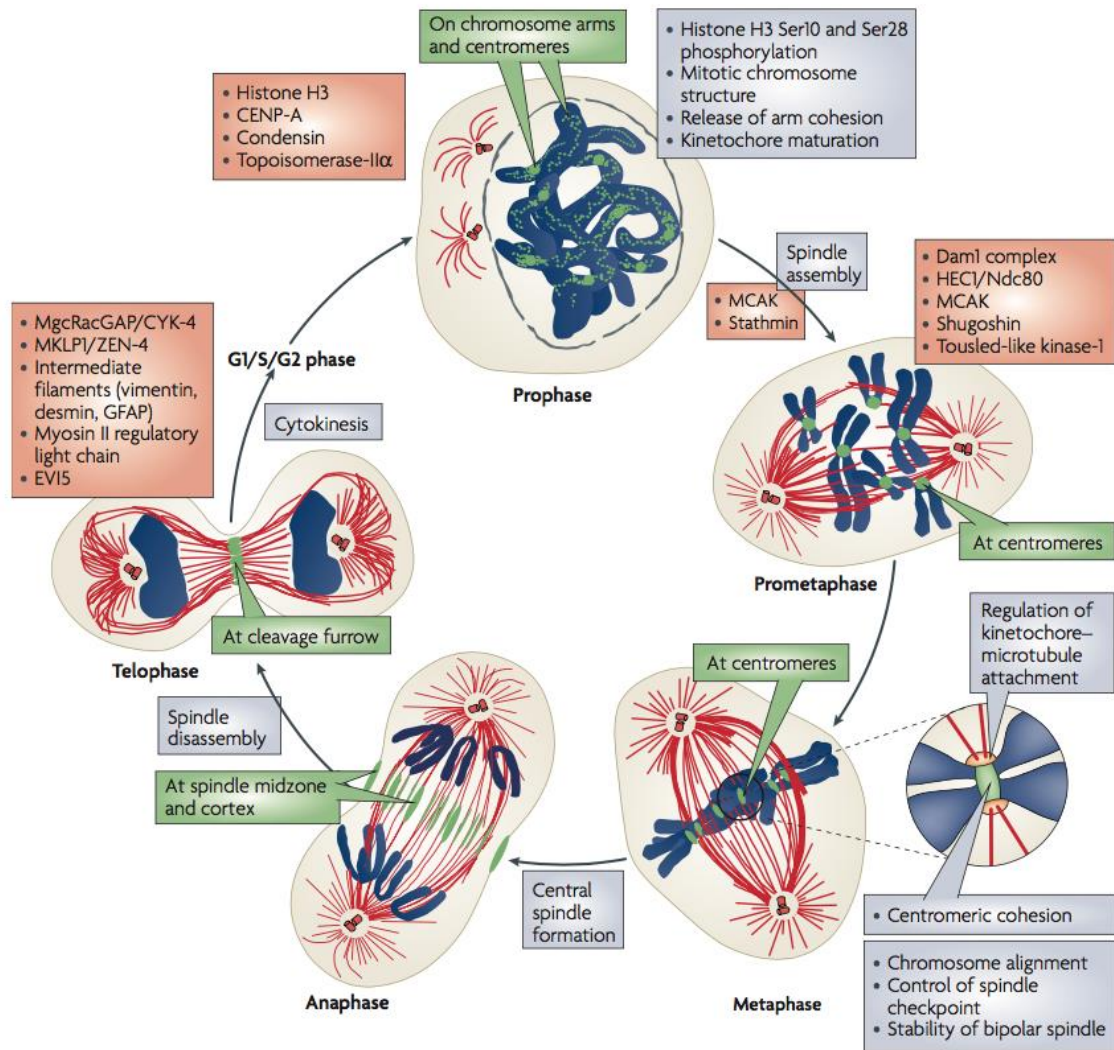
#### iv. De l'anaphase à la cytokinèse

A partir de l'anaphase, le CPC se concentre au niveau de la future zone de clivage sur le fuseau central et joue un rôle crucial lors de cette dernière étape. La chute de l'activité du complexe Cdk1-Cyclin B déclenche la translocation du CPC des centromères au fuseau central.<sup>55</sup> Il semble que cette fois-ci, INCENP et Aurora B soient responsables de l'ancrage du CPC aux microtubules notamment par les interactions Aurora B-MKLP2 et INCENP-microtubules.<sup>76</sup>

Toute une cascade de signaux permet la contraction de l'actomyosine au niveau du sillon de division qui délimite la future séparation entre les deux cellules filles. Aurora B a un rôle sur la fonction du complexe centralspindlin et son recrutement au niveau du fuseau central.<sup>53</sup> Il s'agit d'un hétérotétramère constitué de deux sous-unités en double MKLP1 et MgcRacGAP. Ce complexe est très fortement impliqué dans l'abscission des deux cellules filles au niveau du sillon de division. Il est nécessaire à la localisation et l'activation de RhoA.<sup>3</sup> Il s'agit d'une GTPase qui contribue à la maturation de l'anneau contractile, stimule la polymérisation de l'actine et l'activation de la myosine II.

De nombreux autres substrats d'Aurora B sont impliqués dans la cytokinèse. La phosphorylation de la protéine vimentine sur la sérine 72 par Aurora B permet le bon déroulement de la séparation physique des deux cellules filles.<sup>78</sup> D'autres cibles peuvent également être citées comme la chaîne légère régulatrice de la myosine 2,<sup>79</sup> la desmine et la protéine acide fibrillaire gliale (GFAP).<sup>80</sup> En toute fin de mitose, le complexe APC-Cdh1 induit quant à lui la dégradation de protéines telles que les protéines kinases Plk et Aurora. Ces dégradations sont nécessaires à l'achèvement de la cytotéiérèse et la sortie de mitose.<sup>20,75</sup>

La Figure 26 résume les différentes localisations du CPC, ses rôles majeurs ainsi que les partenaires principaux impliqués tout au long de la division cellulaire.



**Figure 26 - Schéma bilan de la localisation et du rôle du CPC tout au long du cycle de division cellulaire, en vert est indiquée la position du CPC, en gris son rôle à chaque étape et en rouge ses partenaires.<sup>58</sup>**

Nous avons vu que le CPC orchestre la mitose à plusieurs niveaux afin d'assurer la distribution strictement identique du matériel génétique entre les deux cellules filles générées. Le CPC intervient principalement sur la régulation des attachements microtubules-kinétochores, le point de contrôle SAC et sur la cytotéière. De nombreux substrats et partenaires sont liés à l'enchaînement de toutes ces actions, ce qui rend la compréhension de tous ces événements complexes.

#### **d. Aurora C**

Aurora C, codée par le gène *STK13*, est le dernier membre de la famille Aurora découvert en 1998 par Tsen et al.<sup>81</sup> Aurora C présente 75 % d'homologie avec Aurora B et 60 % avec Aurora A. Elle a été initialement trouvée dans les testicules et est impliquée dans la spermatogénèse. Elle régule la ségrégation chromosomique au cours de la méiose de la même façon que le fait Aurora B.<sup>82</sup> Elle se trouve sur les chromosomes de la prophase à la métaphase puis sur la zone équatoriale de l'anaphase à la télophase. Aurora C phosphoryle les mêmes substrats qu'Aurora B, fait partie aussi du CPC et est soumise à des facteurs similaires de régulation.

Il a été montré plus récemment qu'Aurora C pouvait également être présente dans d'autres tissus et pourrait même prendre le relais d'Aurora B en cas de délétion.<sup>83,84 85</sup> Cette kinase reste néanmoins la moins étudiée des trois.

## 2. Les kinases Aurora et leurs rôles dans le cancer

Après avoir détaillé les différentes étapes clés de la division cellulaire ainsi que le rôle des kinases Aurora dans ce cycle, nous nous intéressons aux liens qu'ils existent entre la dérégulation de ces kinases au cours du cycle et la cancérogénèse. En effet, la cancérogénèse résulte d'erreurs dans les voies de signalisation aussi bien de la division cellulaire que de la mort cellulaire.<sup>86</sup> Les trois kinases de la famille sont trouvées surexprimées dans les cellules cancéreuses.

### a. Aurora A

Aurora A étant, comme nous l'avons énoncé précédemment, impliquée dans la mise en place et la stabilisation du fuseau mitotique, la surexpression de son activité est fortement liée à la formation et la propagation de cellules tumorales.<sup>87</sup> Cette surexpression a été détectée dans de nombreux types de cancers comme la prostate, les ovaires, la vessie, les intestins, le pancréas et les seins.<sup>47</sup> Aurora A est localisée en 20q13, région correspondant à un amplicon fréquemment rencontré dans les tumeurs malignes comme les cancers du sein, de la vessie et colorectaux.<sup>88</sup> Pour les cancers du sein, près de 6 à 18 % des tumeurs primaires et 40 % des lignées cellulaires tumorales présentent cette amplification de gène.<sup>89</sup> La protéine est surexprimée dans 94 % des carcinomes mammaires invasifs primaires. Aurora A est considérée comme une protéine oncogène. En effet, il a été montré qu'Aurora A interagissait avec la protéine anti-apoptotique p53 par phosphorylation sur les sérines 215 et 315, induisant alors sa dégradation par ubiquitinylation par Mdm2 et inhibant aussi ses liaisons avec l'ADN.<sup>90,91</sup> Ce dernier est un gène suppresseur de tumeurs, il en résulte une diminution de l'apoptose. La phosphorylation par Aurora A de p53 favorise l'apparition de tumeur, la réparation de l'ADN endommagé étant inhibée.<sup>38,92</sup>

Le gène codant pour la kinase Aurora A se trouve dans une région fréquemment amplifiée par les cellules cancéreuses, ce qui explique dans un premier temps sa surexpression.<sup>93</sup> Une autre possibilité pour expliquer ce phénomène, réside dans la surexpression non pas de la kinase en elle-même mais de ses activateurs. Le cofacteur principal d'Aurora A, TPX2 est également trouvé surexprimé dans les cellules tumorales, ce qui exacerbe la suractivité d'Aurora A.<sup>47</sup>

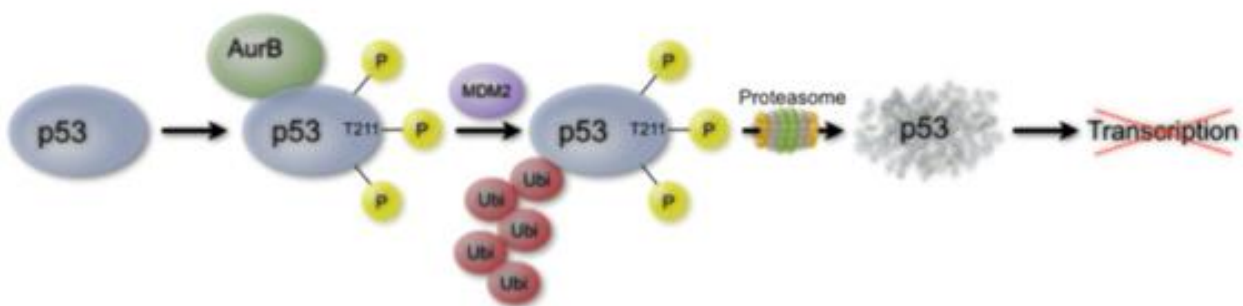
Les phénotypes observés suite à la surexpression d'Aurora A se caractérisent par la présence de fuseaux multipolaires, une amplification des centrosomes due à des défauts de cytokinèse notamment, une instabilité chromosomique avec des cellules aneuploïdes, une résistance à l'apoptose et des points de contrôles affaiblis.<sup>94-96</sup> La surexpression d'Aurora A perturbe non seulement sa localisation dans le noyau mais également au-delà. L'aneuploïdie est présente dans environ 70 % des tumeurs.<sup>97</sup> C'est une conséquence des erreurs de ségrégations des

chromosomes. Ce phénomène est responsable de l'instabilité chromosomique qui conduit à la tumorigénèse.<sup>98</sup> La surexpression d'Aurora A dans les cellules cancéreuses prédit souvent un mauvais pronostic vital chez les patients.

En plus de p53, Aurora A module des protéines anti-apoptotiques comme Bcl2, Mcl1 et pro-apoptotiques comme Bax, Bim, Puma et Apaf.<sup>6</sup> Ceci confère alors aux cellules des capacités de survie avantageuses par rapport aux cellules saines. De nombreuses voies de signalisation se voient perturbées favorisant la tumorigénèse.<sup>6</sup>

## b. Aurora B

Aurora B, tout comme Aurora A, est retrouvée très fréquemment surexprimée dans les cellules cancéreuses. Il a été récemment démontré qu'Aurora B interagissait aussi avec p53 par phosphorylation à trois positions différentes (Figure 27).<sup>99</sup> Ces interactions, qu'elles soient directes ou indirectes, entraînent la dégradation de p53 par la voie polyubiquitylation-protéasome et ainsi impactent l'ensemble des substrats de p53 impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose (p21 et Puma).



**Figure 27 - Impact de la surexpression d'Aurora B sur l'expression de p53.<sup>99</sup>**

La suractivité d'Aurora B dans les cellules cancéreuses n'est pas seulement due à la surexpression de son gène codant mais aussi due à la surexpression des protéines du CPC.<sup>38</sup> INCENP est surexprimée dans des cellules de cancers colorectaux, s'accompagnant alors d'une suractivité d'Aurora B.<sup>88</sup> Par ailleurs, la Survivine, par son rôle au sein du CPC en mitose mais également par sa fonction anti-apoptotique, est devenue une cible thérapeutique très étudiée.<sup>101,102</sup> Son expression a une valeur diagnostique pour bon nombre de cancers et sa surexpression est signe de mauvais pronostic.<sup>103-106</sup>

Lorsqu'Aurora B est surexprimée, elle ne remplit plus correctement sa fonction de corrections des erreurs d'appariements, le SAC se trouve affaibli et le cycle cellulaire se poursuit en anaphase avec de lourdes erreurs. Les chromosomes ne sont plus équitablement répartis en deux lots, ce qui conduit à la formation de cellules filles aneuploïdes. En effet, l'hyperactivité d'Aurora B empêche la stabilisation des attachements amphitéliques kinétochores-microtubules.<sup>98</sup> Les chromosomes mettant beaucoup plus de temps à l'étape d'attachement et alignement, que les complexes protéiques peuvent en partie se dégrader ce qui a pour conséquence l'affaiblissement du point de contrôle. De plus, des défauts de cytokinèse peuvent survenir, empêchant ces deux cellules filles de se séparer en fin de mitose donnant lieu à une cellule tétraploïde contenant deux centrosomes ou plus. Ce dernier point a pour conséquence la

formation de cellules multipolaires et polyploïdes lors de la prochaine mitose. La Figure 28 illustre le devenir des cellules soumises à la surexpression d'Aurora B lors de la division cellulaire. Ces cellules sont malgré tout suffisamment stables pour entrer de nouveau en mitose. Les cellules ont également plus de chances d'aboutir à des combinaisons de chromosomes qui leur permettent d'acquérir des caractéristiques compétitives et de poursuivre leur croissance.<sup>107</sup>

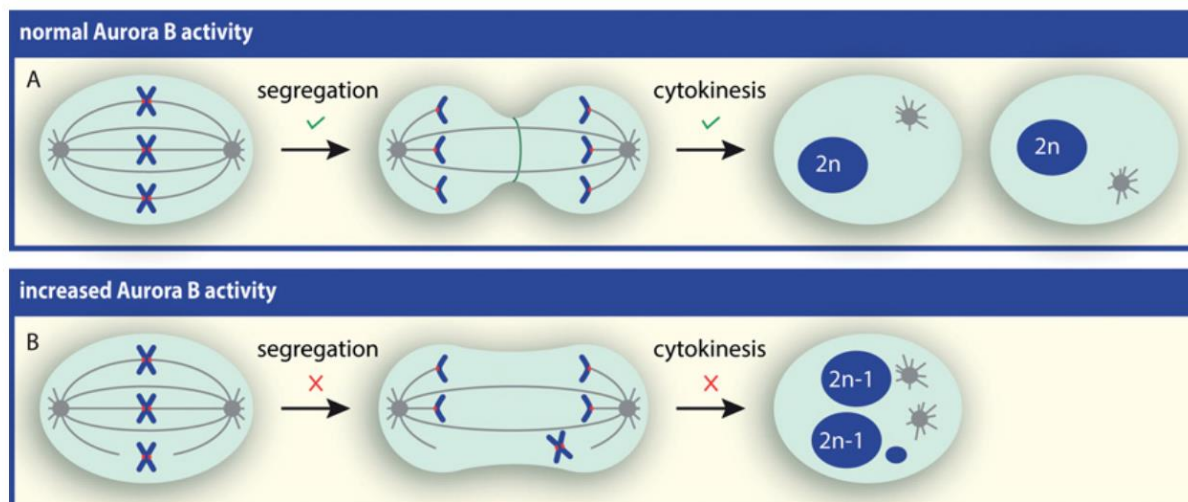


Figure 28 - Devenir de la cellule en division lors d'une suractivité d'Aurora B<sup>98</sup>

### c. Aurora C

Aurora C a été retrouvée surexprimée de façon aberrante dans des cellules cancéreuses de la thyroïde, de carcinome ou du colon.<sup>108</sup> Aurora C induit une amplification des centrosomes et de la multi-nucléation.<sup>109</sup> Une étude mentionne l'expression de la protéine dans soixante-dix-huit cancers colorectaux.<sup>110</sup> Etant donné la présence d'Aurora C dans les gamètes, son expression anormale conduit à des gamètes aneuploïdes, responsables d'infertilité génétique.<sup>111,112</sup>

## IV. Les inhibiteurs de kinases

### 1. Les inhibiteurs de kinases en oncologie

#### a. Généralités

Cette grande famille d'enzyme est devenue depuis les vingt dernières années l'une des plus ciblée puisque les kinases interviennent dans les dérégulations et dysfonctionnements responsables de nombreuses pathologies. Le cancer est à l'heure actuelle le domaine thérapeutique le plus dynamique quant à la recherche d'inhibiteurs de kinases.

L'utilisation de petites molécules inhibitrices de kinases a débuté avec l'autorisation par la FDA de la mise sur le marché de l'imatinib (Gleevec®, Novartis) en 2001, pour le traitement de la leucémie myéloïde chronique qui cible la tyrosine kinase Bcr-Abl responsable de la prolifération

de ces cellules tumorales. Ce premier succès ouvrit la voie à de nouvelles recherches dans le domaine de la santé. Depuis, le nombre de médicaments mis sur le marché ciblant les protéines kinases ne cesse de croître.<sup>113</sup> A ce jour, une cinquantaine d'inhibiteurs de kinases (cinquante-trois en janvier 2020) ont été autorisées par la FDA et plusieurs centaines sont actuellement en phases préclinique et clinique.<sup>114</sup> L'inhibition des kinases s'est également montrée pertinente dans de nombreuses pathologies autres que le cancer, comme les maladies inflammatoires, neurodégénératives, auto-immunes, les maladies du système nerveux central etc.<sup>115</sup> On estime que presque 30 % de la recherche de médicaments est dirigée sur les kinases.<sup>116</sup>

## **b. Sélectivité et mode d'inhibition**

Malgré les succès rencontrés par les inhibiteurs de kinases, de nombreux défis doivent encore être relevés, comme notamment la sélectivité. En effet, la grande majorité des inhibiteurs de kinase interagissent avec le site de fixation de l'ATP, or ce site est très largement conservé au sein du kinome humain. La plupart des inhibiteurs ne ciblent alors pas une mais plusieurs kinases avec différents niveaux de sélectivité, on parle d'inhibiteurs multi-cibles.<sup>117,118</sup> Le manque de sélectivité est responsable d'effets secondaires indésirables et de toxicité qui sont souvent responsables de l'échec des candidats-médicaments en phase clinique. Cependant, dans le cadre du cancer spécifiquement, il n'est pas nécessairement délétère qu'un inhibiteur ne soit pas exclusif à une kinase, par notamment la complexité des cascades de signaux impliquées dans la propagation des cellules tumorales. En revanche, pour d'autres pathologies non cancéreuses, le succès des inhibiteurs de kinases est plus limité.

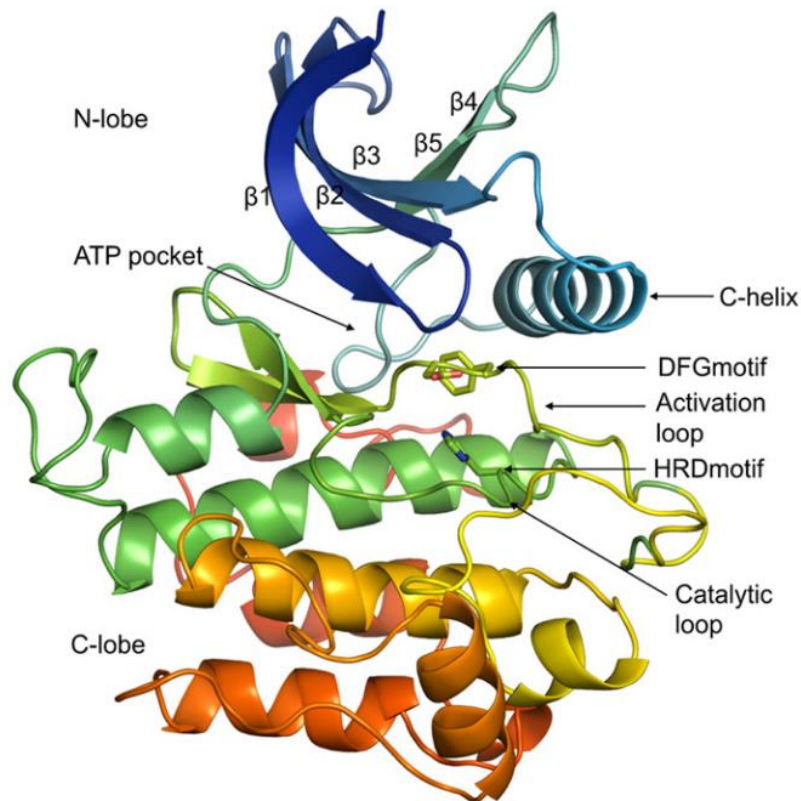
### **i. Structure des kinases**

Les kinases sont toutes constituées d'un petit lobe N-terminal et d'un large lobe C-terminal reliés par une région charnière.<sup>119</sup> Le lobe N-term est constitué de cinq feuillets  $\beta$  antiparallèles et d'une hélice  $\alpha$  ( $\alpha$ -C) qui peut se trouver en conformation « in » ou « out ». Ce lobe joue un rôle dans l'interaction et l'orientation de l'ATP. Le lobe C-term quant à lui est impliqué dans la reconnaissance et la fixation avec le substrat protéique.<sup>120,121</sup> Il est constitué de huit hélices  $\alpha$  et quatre brins  $\beta$ .

La charnière est la jonction flexible entre les deux lobes, qui forme un sillon catalytique profond où se lie l'ATP pour le transfert du phosphate (Figure 31). Une boucle P riche en glycine se situe sur le lobe N-term et interagit avec la partie phosphate de l'ATP.<sup>119</sup> L'ATP est d'ailleurs stabilisé par plusieurs interactions comme des ponts salins qui s'établissent entre deux acides aminés et les phosphates  $\alpha$  et  $\beta$  de l'ATP. Deux ion  $Mg^{2+}$  viennent également chélater les phosphates  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  afin de les stabiliser et d'orienter le phosphate terminal  $\gamma$  pour son transfert.

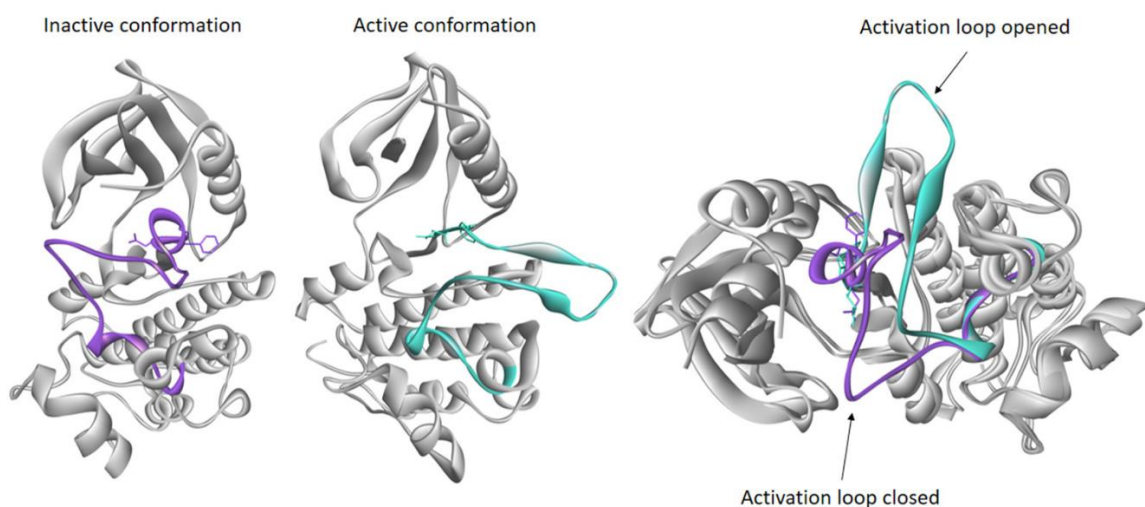
Le lobe C contient la boucle d'activation constituée d'une trentaine de résidus qui se trouve en conformation ouverte ou fermée. On y retrouve au début de cette boucle le motif DFG.<sup>114</sup> Les kinases ont plusieurs états, un état activé ou des états inactifs. Dans la conformation active, la boucle d'activation forme un sillon permettant l'entrée du substrat protéique, on parle alors de motif DFG-in (Asp-Phe-Gly). Tandis qu'en conformation inactive, la boucle d'activation bloque

l'entrée du substrat, et dans ce cas le motif est dit DFG-out.<sup>122,123</sup> Dans la forme active de la kinase, le substrat peptidique établit des interactions avec la boucle catalytique, sur le motif HRD (His-Arg-Asp) (Figure 29).



**Figure 29 - Les principaux éléments structuraux constitutifs des kinases<sup>122</sup>**

Comme représenté sur la Figure 30, la boucle d'activation (en violet) en conformation inactive est fermée (DFG-out) et bloque l'accès du site catalytique au substrat. Dans la forme active (DFG-in), la boucle d'activation (en turquoise), se trouve à l'extérieur et autorise l'accès au site catalytique.

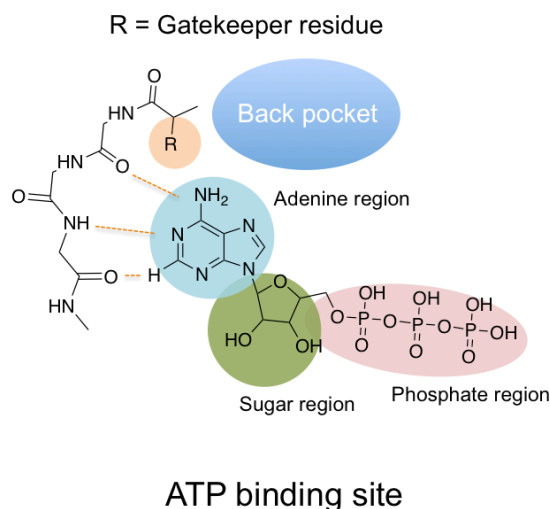


**Figure 30 - Formes active et inactive de la kinase EGFR avec les différentes positions de la boucle d'activation et superposition des deux états avec une vue du dessus sur la troisième image.<sup>114</sup>**

L'ATP se lie au domaine kinase au niveau de la cavité située entre les deux lobes reliés par la charnière (Figure 31). L'adénine établit essentiellement trois liaisons hydrogènes avec les acides



aminés de la charnière. Le ribose est stabilisé par des liaisons hydrogène des résidus du lobe C-term. La boucle P permet le positionnement du phosphate  $\gamma$  de l'ATP pour son transfert vers la cible. Le motif HRD de la boucle catalytique joue le rôle d'accepteur pour le transfert du phosphate  $\gamma$ . Enfin, la boucle d'activation positionne le groupement hydroxyle du substrat qui se lie au niveau de l'hélice F du lobe C-term lorsque la boucle d'activation est en position ouverte (DFG-in).<sup>124</sup>



**Figure 31 - Structure de la poche ATP**

## ii. Les différents modes d'inhibition

Les kinases étant des structures larges et complexes, plusieurs sites d'interactions sont possibles pour les inhibiteurs. Ces différents modes d'inhibition sont répertoriés en plusieurs groupes selon leur mécanisme, et présentent chacun des caractéristiques propres qui en font leur spécificité, et également leurs limitations.<sup>116,125</sup>

Type I: ligand purement ATP-compétitif qui se lie à la kinase dans sa conformation activée, c'est à dire avec le motif DFG de la boucle d'activation en conformation « in ». Les molécules miment les interactions de la partie adénine de l'ATP en se liant à la charnière par une à trois liaisons hydrogènes d'une part, et les interactions hydrophobes d'autre part (Figure 32).

Type II: ligand ATP-compétitif qui se lie à la kinase non-phosphorylée inactivée en conformation DFG-out. Le motif DFG de la boucle d'activation effectue une rotation ce qui ouvre l'accès à une cavité hydrophobe allostérique adjacente au de site ATP.<sup>126</sup> Les inhibiteurs ciblent la poche ATP au niveau de la charnière par des liaisons hydrogènes comme le type I mais exploitent en plus ce site allostérique. Ce mode offre une meilleure sélectivité en comparaison au type I (Figure 32).

Type I<sup>1/2</sup>: ligand ATP-compétitif qui se lie à la conformation active DFG-in et qui cible une partie des résidus allostériques accessibles dans le type II. Le ligand n'a pas accès à la totalité de la cavité allostérique et donc pénètre moins profondément que l'inhibiteur de type II. Il s'agit d'un mode intermédiaire, puisque l'on retrouve les mêmes interactions que pour le type I dans la poche ATP tout en ciblant d'autres résidus comme le type II en exploitant la conformation DFG-in. La taille de la cavité hydrophobe naturellement non occupée par l'ATP est contrôlée par la taille et la

nature du résidu du « *gatekeeper* ». Il s'agit du résidu N-terminal de la charnière. Plus le résidu est petit (Thr par exemple) plus l'accès à la cavité est important.<sup>126</sup> Cette classe peut être divisée en deux selon la conformation de l'hélice  $\alpha$ -C in ou out (types I<sup>1/2</sup> A et I<sup>1/2</sup> B).

Type III : ligand non compétitif qui ne se lie qu'au site allostérique adjacent au site de l'ATP (Figure 32).<sup>34</sup>

Type IV : ligand non compétitif qui se lie à un site allostérique éloignée du site de l'ATP (Figure 32). Sa localisation dépend de chaque kinase.<sup>34</sup>

Type V : ligand ambivalent « bi-substrat » qui se lie à deux zones différentes de la kinase en même temps.<sup>127</sup>

Type VI : le ligand se lie de façon covalente au site catalytique avec un accepteur de Michael électrophile sur l'inhibiteur pour former une liaison covalente avec un résidu cystéine de la kinase.<sup>34</sup>

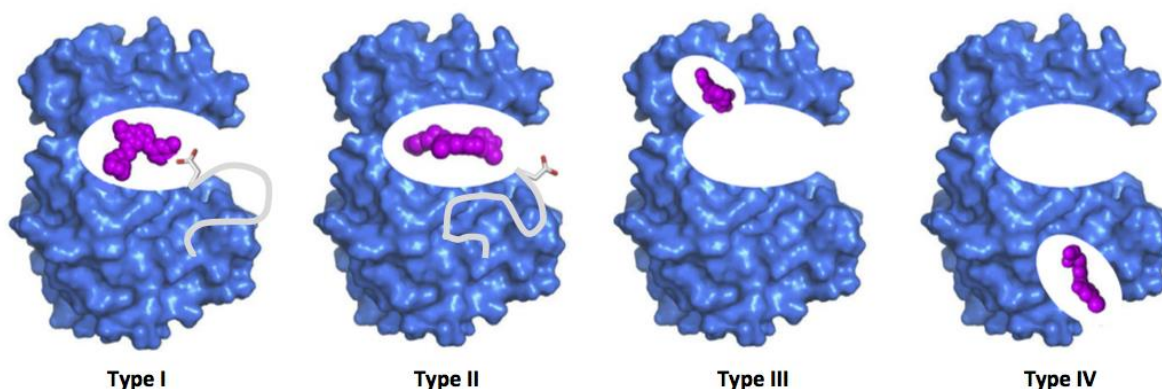


Figure 32 - Représentation schématique des types d'inhibition I, II, III et IV<sup>128</sup>

Le premier inhibiteur de kinase mis sur le marché, l'Imatinib, est un inhibiteur de type II. Ce n'est qu'en 2013 qu'a été autorisé le premier inhibiteur allostérique de type III, le Trametinib. Un certain degré de sélectivité est tout de même possible avec les inhibiteurs ATP-compétitif, en utilisant les caractéristiques structurales de la kinase présentes autour de la poche ATP. Il existe quelques inhibiteurs allostériques sur le marché qui sont le Trametinib, Cobimetinib, Afatinib, Ibrutinib.<sup>116</sup> Le plus gros challenge dans le développement d'inhibiteurs allostériques de type III est la difficulté à identifier ces sites potentiels de fixation. Bien souvent se sont des analyses cristallographiques qui donnent accès à ces sites par sérendipité. Ces sites peuvent être cachés dans des conformations plus hautes en énergie, moins accessibles.

Un autre problème se pose pour les inhibiteurs de types I<sup>1/2</sup> et II qui est l'apparition de résistance des cellules cancéreuses suite à la mutation du résidu du *gatekeeper*. Ce résidu permettant l'interaction de l'inhibiteur avec la « back-pocket », le changement d'un seul acide aminé suffit à modifier complètement l'affinité de la kinase pour l'inhibiteur.<sup>34</sup> L'exemple de l'Imatinib illustre ce phénomène puisqu'à la suite de la mutation de la thréonine du *gatekeeper* en isoleucine sur la position 315 de Bcr-Abl, de la résistance a été observée avec ce médicament

(illustration sur la Figure 88). Il est alors intéressant de chercher à cibler d'autres sites de la protéine que celui de l'ATP.

Le Tableau 1 récapitule les inhibiteurs de kinases autorisés par la FDA avec leurs cibles biologiques, leur mode d'inhibition et la pathologie pour laquelle ils sont utilisés.<sup>113,116,129</sup>

**Tableau 1 - Liste des inhibiteurs de kinase sur le marché, mise à jour en janvier 2020**

Nom (année autorisation FDA)	Kinase ciblée	Mode d'inhibition	Pathologie - Indication
Sirolimus (macrocycle) (1999)	mTOR	IV	Immunosuppresseur (Transplantation rénale)
Imatinib (2001)	BCR-Abl, PDGFR, KIT, RET	II	Leucémie myéloïde chronique, tumeur stromale gastro-intestinale
Gefitinib (2003)	ErbB1, EGFR, PDGFR	I	Cancer du poumon non à petites cellules
Erlotinib (2004)	EGFR	I	Cancer du poumon non à petites cellules, pancréas
Sorafenib (2005)	VEGFR, FGFR, PDGFR, RAF, FLT3, KIT, RET	II	Cancer rénal, carcinome hépatocellulaire
Dasatinib (2006)	BCR-Abl, SRC, LCK, FYN, KIT, PDGFR	I / I ½	Leucémie myéloïde chronique
Sunitinib (2006)	VEGFR, PDGFR, KIT, FLT3, RET	I ½ / II	Cancer rénal, tumeur stromale gastro-intestinale
Nilotinib (2007)	BCR-Abl, PDGFR, KIT	II	Leucémie
Temsirolimus (macrocycle) (2007)	mTOR	IV	Cancer rénal
Lapatinib (2007)	EGFR, ErbB2	I / I ½	Cancer du sein
Pazopanib (2009)	VEGFR, PDGFR, KIT, FGFR	I	Cancer rénal, sarcome des tissus mous
Everolimus (macrocycle) (2009)	mTORC1	IV	Cancer rénal, Cancer du sein, immunosuppresseur
Ruxolitinib (2011)	JAK1-2	I	Myélofibrose
Crizotinib (2011)	ALK, MET, ROS1, MST1R	I / I ½	Cancer du poumon non à petites cellules
Vemurafenib (2011)	B-Raf	I ½	Cancer thyroïde, mélanome
Vandetanib (2011)	VEGFR, EGFR, RET	I	Cancer endocrinien
Ponatinib (2012)	BCR-Abl, KIT, RET, FGFR, SRC, VEGFR, PDGFR	II	Leucémie myéloïde chronique, leucémie aiguë lymphoblastique
Cabozantinib (2012)	MET, VEGFR, RET, Kit, TrkB, Flt3, Axl, Tie2	II	Cancer thyroïde
Tofacitinib (2012)	JAK1-3	I	Polyarthrite rhumatoïde
Regorafenib (2012)	VEGFR, PDGFR, FGFR, RAF, KIT, RET, BCR-Abl, B-Raf, Tie2, Eph2A	II	Cancer colorectal, tumeur stromale gastro-intestinale
Bosutinib (2012)	BCR-Abl, SRC, LYN, HCK	I / II	Leucémie myéloïde chronique
Axitinib (2012)	VEGFR1-3, KIT, PDGFR	II	Cancer rénal
Ibrutinib (2013)	Bruton tyrosine kinase	VI	Leucémie lymphoïde chronique, lymphomes des cellules du manteau
Afatinib (2013)	ErbB2-4, EGFR	VI	Cancer du poumon non à petites cellules
Dabrafenib (2013)	B-Raf	II	Mélanome
Trametinib (2013)	MEK1, MEK2	III	Mélanome BRAF V600E or V600K mutant
Nintedanib (2014)	VEGFR, EGFR, PDGFR, FGFR1/2/3, Flt3, Lck	II	Fibrose pulmonaire idiopathique
Idelalisib (2014)	PI3Kδ (Lipid kinase)	II	Leucémie lymphoïde chronique, lymphome <i>non hodgkinien</i>
Ceritinib (2014)	ALK	I ½	Cancer du poumon non à petites cellules ALK+
Lenvatinib (2015)	VEGFR2, VEGFR3	I ½	Cancer de la thyroïde

	FGFR1/2/3/4, PDGFR, Kit, RET		
Palbociclib (2015)	CDK4, CDK6	I	Cancer du sein
Osimertinib (2015)	EGFR	VI	Cancer du poumon non à petites cellules
Cobimetinib (2015)	MEK1-2	III	Mélanome BRAF V600E ou V600K mutation
Brigatinib (2017)	ALK, ROS1, IGF-1R, Flt3, EGFR	I	Cancer du poumon non à petites cellules ALK+
Alectinib (2017)	ALK, RET	I ½	Cancer du poumon non à petites cellules
Ribociclib (2017)	CDK4/6	I ½	Cancer du sein
Abemaciclib (2017)	CDK4/6	I ½	Cancer du sein
Acalabrutinib (2017)	Bruton tyrosine kinase	-	Lymphomes des cellules du manteau, leucémie chronique lymphoblastique
Dacomitinib (2017)	EGFR	VI	Cancer du poumon non à petites cellules EGFR-mutant
Neratinib (2017)	ErbB2	-	Cancer du sein HER2+
Baricitinib (2018)	JAK1/2/3 & Tyk	-	Polyarthrite rhumatoïde
Binimetinib (2018)	MEK1/2	I ½	Mélanome
Encorafenib (2018)	B-Raf	I ½	Mélanome
Fostamatinib (2018)	Syk	I	Thrombopénie
Gilteritinib (2018)	Flt3	-	Leucémie aigüe myéloïde
Larotrectinib (2018)	TRK	-	Tumeur solide
Lorlatinib (2018) (macrocycle)	ALK	-	Cancer du poumon non à petites cellules ALK+
Netarsudil (2018)	ROCK1/2	-	Glaucome
Erdafitinib (2019)	FGFR1/2/3/4, VEGFR	I ½	Carcinome urothélial
Cabozantinib (2019)			Carcinome hépatocellulaire
Entrectinib (2019)	TrkA, TrkB, TrkC, ROS1	I ½	Cancer du poumon non à petites cellules
Pexidartinib (2019)	SF1R, RY, CSF1R, Kit	II	Cancer des ovaires
Fedratinib (2019)	JAK2	-	Myélofibrose
Zanubrutinib (2019)	Bruton tyrosine kinase	VI	Lymphomes des cellules du manteau
Ruxolitinib (2019)	JAK1/2	I	Maladie du greffon contre l'hôte réfractaire aux stéroïdes, myélofibrose
Upadacitinib (2019)	JAK1	-	Polyarthrite rhumatoïde
Avapritinib (2020)	PDGFR, Kit	-	Tumeur stromale gastro-intestinale

Comme exposé dans le Tableau 1, la plupart des inhibiteurs se répartissent entre les types I, I ½ et II, soit des inhibiteurs ATP-compétitif. Il est important de multiplier les stratégies pour contrer les problèmes de sélectivité et de mutations qui peuvent exister. Les inhibiteurs allostériques semblent être une bonne piste pour développer de nouvelles thérapies efficaces.<sup>34</sup>

## 2. Les inhibiteurs des kinases Aurora

Les kinases de la famille Aurora suscitent un vif intérêt dû à leur fort potentiel thérapeutique. En effet, leur association avec l'instabilité génétique et leur surexpression dans les tumeurs en font des cibles pertinentes dans la découverte de nouveaux médicaments. Ces kinases étant impliquées dans plusieurs événements du cycle cellulaire et dans de nombreux types de cellules

tumorales, un nombre important de molécules sont entrées en phase préclinique et clinique, mais à ce jour aucune n'a encore été autorisée sur le marché.<sup>130</sup>

### a. Les inhibiteurs d'Aurora A

Plusieurs dizaines d'inhibiteurs d'Aurora A sont reportés dans la littérature,<sup>130</sup> la plupart ciblant le site actif de l'ATP, mais plusieurs exemples sont aussi allostériques. Janeček *et al*/ont développé AurkinA, un inhibiteur allostérique inhibant *in vitro* l'interaction protéine-protéine entre Aurora A et son cofacteur principal, TPX2.<sup>131</sup> Un dérivé du résorcinol a été également identifié comme non-ATP compétitif sur Aurora A avec une IC<sub>50</sub> de 40 µM.<sup>132</sup> A ce jour, sept composés sont en cours d'évaluation ou ont été évalués en phase cliniques (Tableau 2).

Ces composés induisent des défauts du fuseau bipolaire et les cellules traitées avec ces inhibiteurs quittent prématurément la mitose donnant lieu à des cellules aneuploïdes présentant des centrosomes non séparés (Figure 33). Ces caractéristiques sont semblables à celles observées par élimination d'Aurora A par RNAi.<sup>133</sup>

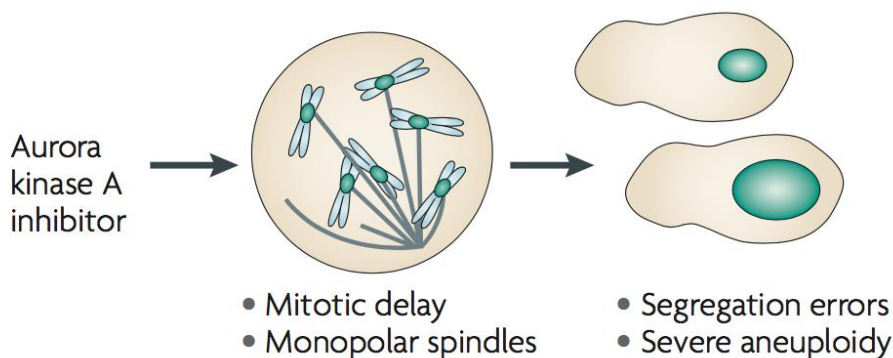
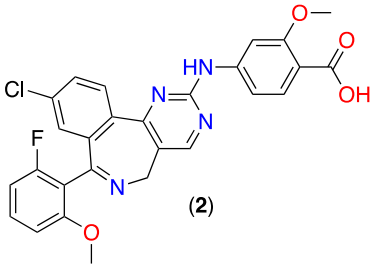
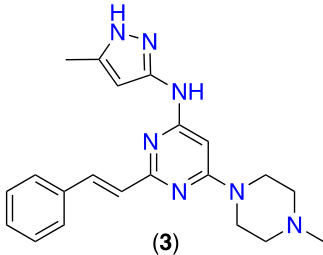
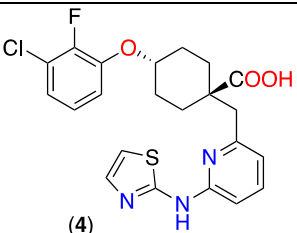
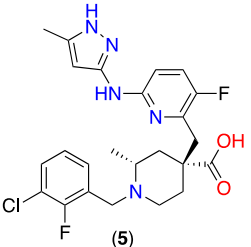


Figure 33 - Phénotype des cellules traitées avec un inhibiteur d'Aurora A<sup>134</sup>

Les efforts sont à poursuivre pour évaluer si l'utilisation de petites molécules inhibant Aurora A représente un traitement efficace pour les patients. Il reste aussi à élucider s'il faut mieux privilégier des inhibiteurs très sélectifs ou bien des inhibiteurs à plus large spectre. Par ailleurs, le développement d'inhibiteurs non-ATP-compétitifs, qui sont peu représentés, est une piste à explorer.

**Tableau 2 - Les molécules inhibitrices d'Aurora A en phase clinique sont indiquées en noir pour les essais qui sont en cours, en vert ceux qui sont en cours de recrutement, en rouge ceux qui se sont arrêtés prématurément et qui ne reprendront pas, et pour finir, en bleu sont ceux qui se sont terminés convenablement jusqu'au bout.\***

Molécule	Structure	Activité	Phase clinique
<b>MLN8054</b> (Millenium) Ref. : 92,130,135,136	 (1)	IC <sub>50</sub> (AurA) = 4 nM IC <sub>50</sub> (AurB) = 172 nM  Inhibiteur ATP compétitif Toxicité : Somnolence	Tumeurs solides (sein, côlon, pancréas, vessie) - Phase I (NCT00249301)  Tumeur maligne avancée - Phase I (NCT00652158)

<p><b>Alisertib -</b> MLN8237 (Millenium) <i>Ref.:</i> 130,136,137</p>	 <p>(2)</p>	<p>IC<sub>50</sub> (AurA) = 1.2 nM IC<sub>50</sub> (AurB) = 397 nM</p> <p>Inhibiteur ATP compétitif</p> <p>Toxicité : Neutropénie</p>	<p>Tumeur solides et cancer du sein – Phase I (NCT02719691)</p> <p>Tumeurs solides et lymphome – Phase I (NCT01898078, NCT02214147, NCT01512758, NCT01714947)</p> <p>Lymphome – Phase I (NCT02700022)</p> <p>Cancer des poumons – Phase II (NCT02293005)</p> <p>Lymphome – Phase III (NCT01482962)</p> <p>Leucémie aigüe myéloïde – Phase II (NCT02560025)</p> <p>Mélanome – Phase II (NCT01316692)</p> <p>Cancer du poumon à petites cellules avec Paclitaxel – Phase II (NCT02038647)</p>
<p><b>ENMD-2076</b> (EntreMed) <i>Ref.:</i> 138</p>	 <p>(3)</p>	<p>IC<sub>50</sub> (AurA) = 14 nM IC<sub>50</sub> (AurB) = 350 nM</p> <p>Inhibe aussi FGFR3, PDGFR, VEGFR1 et FLT3</p>	<p>Cancer des ovaires – Phase II (NCT01914510 et NCT01104675)</p> <p>Sarcome des tissus mous – Phase II (NCT01719744)</p> <p>Carcinome fibrolamellaire – Phase II (NCT02234986)</p> <p>Cancer du sein – Phase II (NCT01639248)</p> <p>Hématologie maligne – Phase I (NCT00904787)</p> <p>Myélome multiple – Phase I (NCT00806065)</p> <p>Cancer avancé – Phase I (NCT00658671)</p>
<p><b>MK-5108</b> (VX-689) (Vertex/Merck) <i>Ref.:</i> 130</p>	 <p>(4)</p>	<p>IC<sub>50</sub> (AurA) = 0.064 nM</p> <p>Inhibiteur ATP compétitif</p>	<p>Tumeurs solides – Phase I (NCT00543387)</p>
<p><b>LY3295668</b> (Eli Lilly)</p>	 <p>(5)</p>	<p>IC<sub>50</sub> (AurA) = 0.8nM IC<sub>50</sub> (AurB) = 1038 nM</p>	<p>Cancer du poumon – Phase II (NCT03898791)</p> <p>Neuroblastome – Phase I (NCT04106219)</p> <p>Cancer du sein – Phase I (NCT03955939)</p> <p>Tumeurs solides – Phase II (NCT03092934)</p>
<p><b>TAS-119</b> (Taiho Pharmaceutical)</p>	<p>Pas de structure publiée</p>	<p>Inhibe sélectivement Aurora A</p>	<p>Tumeurs solides avec Paclitaxel – Phase I (NCT02134067)</p>

<b>TT-00420</b> (TransThera Biosciences)	Pas de structure publiée	Inhibe les kinases Aurora A et B, ainsi que JAK/Stat, CSF1	Cancer du sein – Phase I (NCT03654547)
---	--------------------------	--	---

\* Statuts des phases cliniques mis à jour le 8 avril 2020 sur ClinicalTrials.gov

## b. Les inhibiteurs d'Aurora B

Bien que le rôle d'Aurora B dans la tumorigénèse soit encore source de débat, l'utilisation d'inhibiteurs de cette kinase s'est rapidement montrée intéressante. Les premiers inhibiteurs décrits furent Hesperadin, ZM447439 et VX-680. Les études *in vitro* ont montré que la déficience en Aurora B interférait bien avec le cycle cellulaire. Le traitement des cellules avec ces molécules conduit à des erreurs d'attachements et donc de ségrégation des chromosomes avec des défauts du checkpoint. La phosphorylation de l'histone H3 sur le Ser 10 est nettement diminuée et les cellules montrent les signes d'échec de la cytokinèse avec des cellules polyploïdes (Figure 34).<sup>139,140</sup>

Ces molécules ne sont donc pas des agents anti-mitotiques puisqu'ils n'empêchent pas la progression du cycle cellulaire. En revanche, ils conduisent à des mitoses suffisamment aberrantes pour induire la mort des cellules par apoptose de façon p53 dépendante. L'effet des molécules avec des expositions prolongées semble malgré tout lignée-dépendant ; certaines lignées deviennent massivement polyploïdes à la suite de divisions cellulaires anormales successives et d'autres sont soumises à l'apoptose dès la première division.<sup>4</sup> Ces différences sont dues à l'expression de p53 dans les lignées cellulaires.

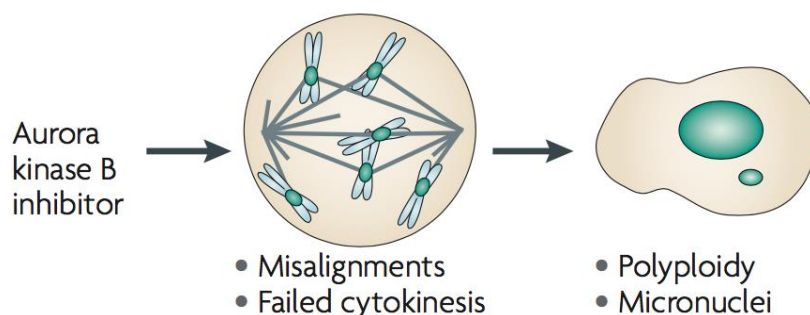


Figure 34 - Phénotype des cellules avec inhibiteurs d'Aurora B<sup>134</sup>

Le traitement des cellules avec Hesperadin montre que les chromosomes sont orientés de façon syntéliques.<sup>141</sup> *In vitro* ZM447439 et VX-680 tuent sélectivement les cellules tumorales et induisent une nette régression tumorale.<sup>142</sup> *In vivo*, VX-680 a montré des effets notables sur la régression tumorale chez des modèles de souris greffées avec une bonne tolérance.<sup>142</sup> Cependant, les effets cliniques ont été stoppés en phase II contre la leucémie myéloïde chronique. Il a pu être également montré que ZM447439 n'affecte pas les cellules saines non prolifératives.<sup>4</sup> La majorité des cellules du corps ne proliférant pas rapidement, les inhibiteurs de kinases Aurora semblent avoir un meilleur index thérapeutique que les agents cytotoxiques non spécifiques tels que les agents alkylants de l'ADN.<sup>133</sup> Toutefois, les essais biologiques ont déjà pu montrer l'apparition de

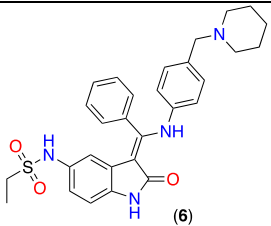
phénomène de résistance d'Aurora B face à certaines molécules, comme ZM447439, VX-680, Hesperadin et MLN8054.<sup>143</sup>

Plusieurs inhibiteurs d'Aurora B ou pan-Aurora ont avancé jusqu'en phase clinique. Plusieurs d'entre eux sont maintenant utilisés comme outils de recherche en biologie. Les inhibiteurs en phase clinique sont résumés dans le Tableau 3, et de nombreux autres composés sont en cours d'évaluation préclinique.<sup>144</sup> Borisa et Bhatt ont publié une revue des différents inhibiteurs des kinases Aurora de façon globale.<sup>130</sup> De nombreuses entreprises pharmaceutiques se sont également positionnées en brevetant de nombreux composés présentant des activités inhibitrices sur les kinases Aurora.<sup>145</sup> La très grande majorité des inhibiteurs d'Aurora B sont ATP-compétitifs, seuls quelques exemples diffèrent. Une équipe a décrit en 2014 l'utilisation de peptidomimétiques cycliques non-ATP-compétitifs capables d'inhiber l'interaction entre Aurora B et INCENP.<sup>146</sup> Enfin, l'inhibiteur dérivé du résorcinol décrit précédemment pour Aurora A semble aussi être non-compétitif à l'ATP pour Aurora B avec une IC<sub>50</sub> de 47 μM, mais dont la modélisation indique néanmoins une interaction sur les résidus de la charnière très proches du site ATP.<sup>132</sup>

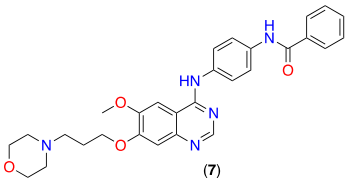
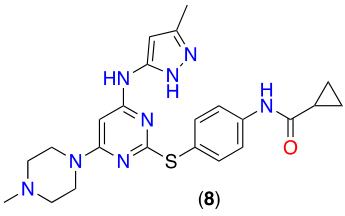
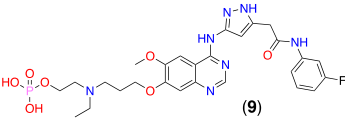
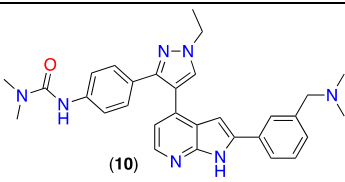
L'inhibition d'Aurora B en synergie avec d'autres types d'agents chimiothérapeutiques est également étudiée en phase clinique.<sup>147</sup> La combinaison du docétaxel avec le tozasertib a été testée et l'utilisation d'AZD1152 s'est montrée efficace avec des médicaments comme le docétaxel, la vinorelbine, la gemcitabine ou encore l'oxaliplatine. L'utilisation combinée d'inhibiteurs d'Aurora B avec de la radiothérapie est également évaluée.<sup>148</sup>

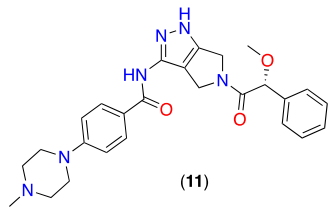
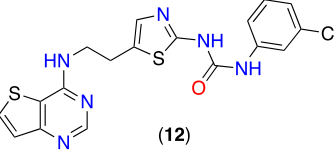
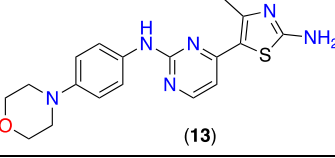
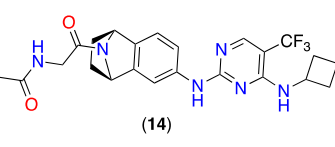
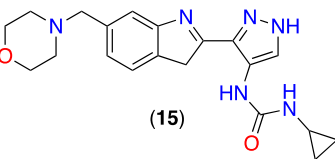
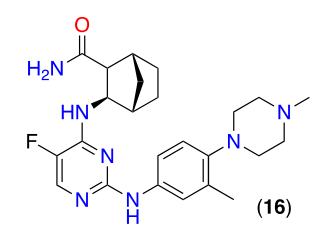
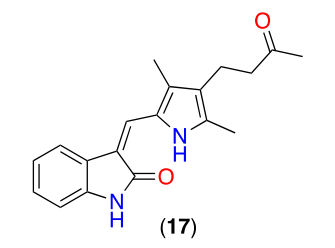
Les premiers résultats des essais cliniques qui sont les plus prometteurs concernent les cancers hématologiques qui sont des tumeurs dites liquides, en comparaison aux tumeurs solides. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que les tumeurs solides prolifèrent moins vite que les tumeurs liquides. Les inhibiteurs d'Aurora ont un effet à la suite de plusieurs cycles de division cellulaire, ainsi plus les cellules se divisent, plus elles sont affectées par les inhibiteurs. Les résultats sont donc relativement décevants pour les tumeurs solides.<sup>137</sup> Dans la plupart des phases I, les inhibiteurs sont globalement bien tolérés mais les patients présentent une neutropénie réversible, les inhibiteurs provoquant des dommages collatéraux au niveau de la moelle osseuse.<sup>148</sup>

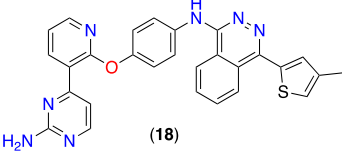
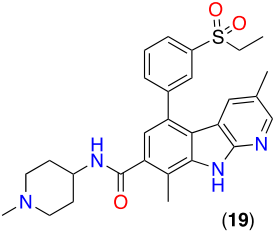
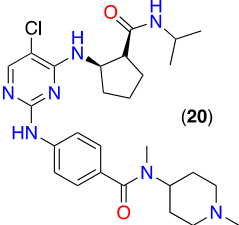
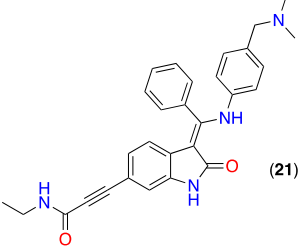
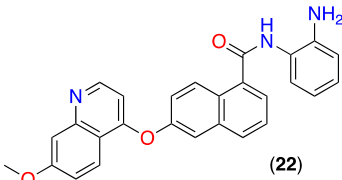
**Tableau 3 - Les molécules inhibitrices d'Aurora B en phase clinique sont indiquées en noir pour les essais cliniques qui sont en cours, en vert pour ceux qui sont en cours de recrutement, en rouge pour ceux qui se sont arrêtés prématurément et qui ne reprendront pas, et pour finir en bleu, sont ceux qui se sont terminés convenablement jusqu'au bout.\***

Molécule	Structure	Activité	Phase clinique
<b>Hesperadin</b> (Boehringer Ingelheim)  Ref.: 135,138,149		IC <sub>50</sub> (AurB) = 250 nM  Inhibe aussi CHK1, LCK, MAPKAP- K1, MKK1, PHK and AMPK  Inhibiteur ATP compétitif	Outil de recherche biologique (Pas de résultats satisfaisants en phase clinique)



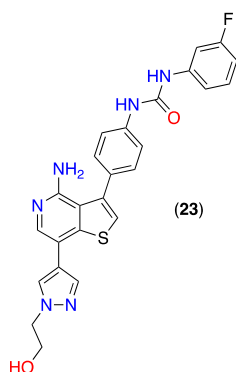
<b>ZM447439</b>	(AstraZeneca)	 <p>(7)</p>	<p>IC<sub>50</sub> (AurA) = 110 nM  IC<sub>50</sub> (AurB) = 130 nM</p>	<p>Outil de recherche  biologique</p>
Ref.: 135			<p>Inhibiteur ATP compétitif</p>	
<b>Tozasertib</b> - VX-680	(=MK0457)	 <p>(8)</p>	<p>IC<sub>50</sub> (AurA) = 0.6 nM  IC<sub>50</sub> (AurB) = 18 nM  IC<sub>50</sub> (AurC) = 4.6 nM</p>	<p>Tumeur solide – Phase I  (NCT02532868)  Cancer colorectal –  Phase I (NCT00099346)  Leucémie chronique  myéloïde – Phase II  (NCT00405054)  Leucémie– Phase I  (NCT00111683)  Carcinome, Cancer du  poumon non à petites  cellules – Phase II  (NCT00290550)  Leucémie aigüe  myéloïde – Phase I  (NCT00500006)</p>
Ref.: 135, 147			<p>Inhibe aussi Flt3, BCR-ABL  T315I mutant</p>	
			<p>Toxicité: Neutropénie</p>	
<b>Barasertib</b> -	AZD1152	 <p>(9)</p>	<p>IC<sub>50</sub> (AurA) = 1369 nM  IC<sub>50</sub> (AurB) = 0.36 nM  IC<sub>50</sub> (AurC) = 17 nM</p>	<p>Lymphome – Phase II  (NCT01354392)  Leucémie aigüe  myéloïde – Phase I  (NCT00530699 et  NCT01019161)  Tumeurs malignes  solides – Phase I  (NCT00338182)  Tumeurs malignes  solides – Phase I  (NCT00497731 et  NCT00497679)  Leucémie myéloïde –  Phase I (NCT00497991)  Leucémie aigüe  myéloïde – Phase I et II  en combinaison avec  des faibles doses de  Cytosine Arabinoside  (NCT00952588 et  NCT00926731)  Leucémie aigüe  myéloïde – Phase I  (NCT03217838)</p>
Ref.: 92,130,147			<p>Toxicité: Neutropénie</p>	
			<p>Prodrug converti <i>in vivo</i> en  barasertib-HQPA</p>	
<b>GSK1070916</b>	(GlaxoSmithKline)	 <p>(10)</p>	<p>IC<sub>50</sub> (AurA) = 1259 nM  IC<sub>50</sub> (AurB) = 5 nM  IC<sub>50</sub> (AurC) = 6.5 nM</p>	<p>Tumeurs solides –  Phase I (NCT01118611)</p>
Ref.: 130,150			<p>Inhibiteur ATP compétitif  Aurora kinase C inhibition.</p>	

<p><b>Danuserib</b> - PHA739358 (Nerviano/Pfizer) Ref.: 135,92</p>	 <p>(11)</p>	<p>IC<sub>50</sub> (AurA) = 13 nM IC<sub>50</sub> (AurB) = 79 nM IC<sub>50</sub> (AurC) = 61 nM Inhibe aussi FGFR1, TRKA, ABL et RET</p>	<p>Myélome multiple – Phase II (NCT00872300)  Cancer de la prostate – Phase II (NCT00766324)</p>
<p><b>SNS-314 Mesylate</b> (Sunesis) Ref.: 130,135</p>	 <p>(12)</p>	<p>Toxicité: Neutropénie IC<sub>50</sub> (AurA) = 9 nM IC<sub>50</sub> (AurB) = 31 nM IC<sub>50</sub> (AurC) = 3.4 nM Inhibiteur ATP compétitif Toxicité : Neutropénie</p>	<p>Tumeurs solides –Phase I (NCT00519662)</p>
<p><b>CYC116</b> (Cyclacel) Ref.: 130,144</p>	 <p>(13)</p>	<p>IC<sub>50</sub> (AurA) = 44 nM IC<sub>50</sub> (AurB) = 19 nM IC<sub>50</sub> (AurC) = 65 nM Inhibe aussi Flt3 et VEGFR2</p>	<p>Tumeurs solides – Phase I (NCT00560716)</p>
<p><b>PF-03814735</b> (Pfizer) Ref.: 130</p>	 <p>(14)</p>	<p>IC<sub>50</sub> (AurA) = 5 nM IC<sub>50</sub> (AurB) = 0.8 nM  Inhibiteur ATP compétitif  Side effect: Neutropénie</p>	<p>Tumeurs solides – Phase I (NCT00424632)</p>
<p><b>AT9283</b> (Astex) Ref.: 92,135</p>	 <p>(15)</p>	<p>IC<sub>50</sub> (AurA) ≈ 3 nM IC<sub>50</sub> (AurB) ≈ 3 nM  Inhibe aussi Inhibe aussi JAK1, JAK2, Flt3, STAT3, Tyk2, VEGF et Abl (T315I) Inhibiteur ATP compétitif Toxicité : Neutropénie et Fatigue</p>	<p>Myélome multiple – Phase II (NCT01145989) Lymphome non Hodgkinien – Phase I (NCT00443976) Leucémie jeunes patients – Phase I (NCT01431664) Leucémie – Phase II (NCT00522990) Tumeurs solides infantiles – Phase I (NCT00985868)</p>
<p><b>Cenisertib</b> - AS703569 (R763) (Merck Seron) Ref.: 135,151</p>	 <p>(16)</p>	<p>IC<sub>50</sub> (AurA) = 4 nM IC<sub>50</sub> (AurB) = 4.8 nM IC<sub>50</sub> (AurC) = 6.8 nM ABL1, AKT, VEGFR, STAT5 et FLT3 Inhibiteur ATP compétitif Toxicité : Neutropénie, diarrhée</p>	<p>Cancer du pancréas en combinaison avec gemcitabine – Phase I (NCT01097512) Hémopathie maligne – Phase I (NCT01080664) Tumeur solide – Phase I (NCT00391521)</p>
<p><b>Orantinib</b> - SU6668 (Pfizer) Ref.: 130,152</p>	 <p>(17)</p>	<p>IC<sub>50</sub> (AurA) = 850 nM IC<sub>50</sub> (AurB) = 35 nM IC<sub>50</sub> (AurC) = 210nM Inhibe également plusieurs récepteurs de la tyrosine kinase Inhibiteur ATP compétitif</p>	<p>Tumeurs solides – Phase II (NCT00024206) Carcinome hépatocellulaire – Phase III (NCT01465464) Carcinome hépatocellulaire – Phase II (NCT00784290)</p>

<p><b>AMG-900</b> (Amgen)  Ref.: <sup>130</sup></p>	 <p>(18)</p>	<p>IC<sub>50</sub> (AurA) = 5 nM IC<sub>50</sub> (AurB) = 4 nM IC<sub>50</sub> (AurC) = 1 nM</p>	<p>Tumeurs solides – Phase I (NCT00858377) Leucémie aigüe myéloïde – Phase I (NCT01380756)</p>
<p><b>TAK-901</b> (Millennium/Takeda)  Ref.: <sup>130</sup></p>	 <p>(19)</p>	<p>IC<sub>50</sub> (AurA) = 21 nM IC<sub>50</sub> (AurB) = 15 nM</p>	<p>Cancer hématologique – Phase I (NCT00807677) Tumeurs solides et lymphome – Phase I (NCT00935844)</p>
<p><b>BI811283</b> (Boehringer Ingelheim) Ref.: <sup>138</sup></p>	 <p>(20)</p>	<p>Inhibiteur IC<sub>50</sub> (AurB) = 9 nM Inhibiteur ATP compétitif</p>	<p>Leucémie aigüe myéloïde avec Cytarabine – Phase I (NCT00632749) Tumeurs solides – Phase I (NCT0070132)</p>
<p><b>BI-847325</b> (Boehringer Ingelheim) Ref.: <sup>153</sup></p>	 <p>(21)</p>	<p>IC<sub>50</sub> (AurA) = 25 nM IC<sub>50</sub> (AurB) = 3 nM IC<sub>50</sub> (AurC) = 15 nM Inhibiteur ATP compétitif  Inhibe aussi MEK1 et 2 (IC<sub>50</sub> = 25 et 4 nM)</p>	<p>Néoplasme – Phase I (NCT01324830)</p>
<p><b>Chiauranib -</b> CS2164 (Chipscreen Biosciences)</p>	 <p>(22)</p>	<p>IC<sub>50</sub> (AurB) = 9 nM Inhibe VEGFR2, VEGFR1, VEGFR3, PDGFR et c-Kit</p>	<p>Cancer des ovaires – Phase II (NCT03166891) Tumeurs solides – Phase I (NCT02122809) Lymphome non Hodgkinien – Phase I (NCT03074825) Cancer des ovaires – Phase II (NCT03901118) Carcinome hépatocellulaire – Phase I (NCT03245190) Lymphome non Hodgkinien – Phase I (NCT03974243) Cancer du poumon à petites cellules – Phase I (NCT03216343)</p>

**Ilorasertib** (ABT-348)  
(Abbott)

Ref.: <sup>154</sup>



IC<sub>50</sub> (AurA) = 120 nM  
IC<sub>50</sub> (AurB) = 7 nM  
IC<sub>50</sub> (AurC) = 1 nM  
  
Inhibe aussi VEGFR  
Inhibiteur ATP compétitif

Tumeurs solides –  
phase II (NCT02478320)  
Tumeurs solides  
métastatiques – Phase I  
(NCT02540876)  
Tumeurs malignes  
hématologiques en  
combinaison aussi avec  
azacitidine –  
(NCT01110473)  
Tumeurs solides en  
combinaison aussi avec  
carboplatin et  
docétaxel – Phase I  
(NCT01110486)

\* Statuts des phases cliniques mis à jour le 8 avril 2020 sur [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov)

Après la présentation autour de la cible biologique d'intérêt, nous présentons à présent les composés bioactifs d'origine marine et plus spécifiquement ceux de la famille des pyrroles-2-aminoimidazole qui constituent le point de départ de ce projet de thèse.

## V. La famille des pyrroles-2-aminoimidazoles marins

### 1. Chimiodiversité marine

#### a. Les océans comme source de molécules bioactives

La nature est une source infinie d'inspiration pour la découverte de nouveaux médicaments. On estime que 60 % des médicaments sur le marché ont pour origine un produit naturel.<sup>7</sup> Dans le domaine du cancer plus spécifiquement, entre les années 40 et 2014, 49 % des médicaments autorisés sont des produits naturels ou des analogues synthétiques.<sup>155</sup> Les motifs issus de la nature sont extrêmement variés et couvrent un très large espace chimique : peptides, alcaloïdes, terpènes, acides gras etc. Les océans représentent 70 % de la surface de la planète, et offrent ainsi des ressources vastes de molécules bioactives. Certaines zones, comme les récifs coralliens possèdent une biodiversité bien plus dense que les forêts tropicales.<sup>156</sup> Les organismes marins sont très diversifiés et sont autant de sources différentes que de métabolites secondaires; on dénombre plus de 20 000 produits naturels marins isolés à ce jour.<sup>8,156</sup> Comme sources de molécules originales, on peut citer les éponges, les mollusques, les coraux, les algues, les microorganismes associés comme les champignons, les cyanobactéries et les actinomycètes. Ces métabolites secondaires jouent des rôles clés dans la défense du territoire face à des prédateurs, dans la communication, la reproduction etc. La diversité des conditions environnementales aquatiques (nutriments, profondeur, température, lumière, salinité) influent également dans la diversité structurale des métabolites.

Malgré la richesse des produits naturels marins, cette source est la moins d'exploitée. Ceci s'explique aisément par les défis techniques et logistiques que requièrent l'exploration et l'exploitation des fonds marins. De plus, l'approvisionnement est un facteur très limitant, les quantités de produits qui peuvent être extraites sont très faibles. Par exemple, pour la trabectédine, une tonne de tuniciers est nécessaire pour isoler 1 g de principe actif.<sup>7</sup> La mise en culture des organismes marins n'est pas aussi aisée qu'elle peut l'être pour des organismes terrestres (plantes, animaux etc.). Ainsi la synthèse organique est une solution clé pour le développement de métabolites marins en chimie médicinale.

Plusieurs composés issus de produits naturels marins ont été approuvés<sup>7</sup>, dont certains n'ont subi aucune modification chimique (Figure 35) :

- **L'éribuline mésylate 76** (Halaven®) est un analogue simplifié du macrolide halichondrine B (**75**), isolé en 1986 de l'éponge *Halichondria Okadai* au Japon (Figure 48).<sup>157</sup> Il est autorisé depuis 2010 pour le traitement du cancer du sein métastasé.
- La **cytarabine** (Aracytine®) est indiquée dans le traitement des cancers hématologiques depuis 1969 aux Etats-Unis et 2001 en Europe.<sup>157</sup> Il s'agit d'un dérivé de nucléosides, isolés de l'éponge *Cryptotethia* de Floride au début des années 50.
- La **trabectédine** (Yondélis®) est isolée du tunicier *Ecteinascidia turbinata*.<sup>157</sup> Sa découverte remonte à 1990 et est autorisée depuis 2007 en Europe notamment dans le traitement du sarcome avancé des tissus mous. Ce médicament est commercialisé par PharmaMar par hémisynthèse à partir d'un métabolite obtenu par fermentation.
- Le **brentuximas védotine** (Adcetris®) est un anticorps monoclonal conjugué à la monométhylauristatine E, dérivé de la dolastatine 10 isolée du mollusque *Dolabella auricularia*. Il est commercialisé depuis le début des années 2010 par la société Takeda.
- La **vidarabine** (Vira-A®) est un antiviral dérivé de nucléosides naturels isolés dans les années 50 de l'éponge *Cryptotethya crypta*.<sup>157</sup>
- Le **ziconotide** (Prialt®) est un peptide utilisé comme analgésique prescrit dans le traitement de douleurs sévères.<sup>157</sup> Il est issu de la modification de la conotoxine provenant du venin du coquillage *Conus Magus*.
- Enfin, un mélange de deux **esters éthyliques d'acides gras oméga-3** (Lovaza®) provenant des huiles de poisson est commercialisé par GSK depuis 2004 aux Etats-Unis pour le traitement de l'hypertriglycémie.

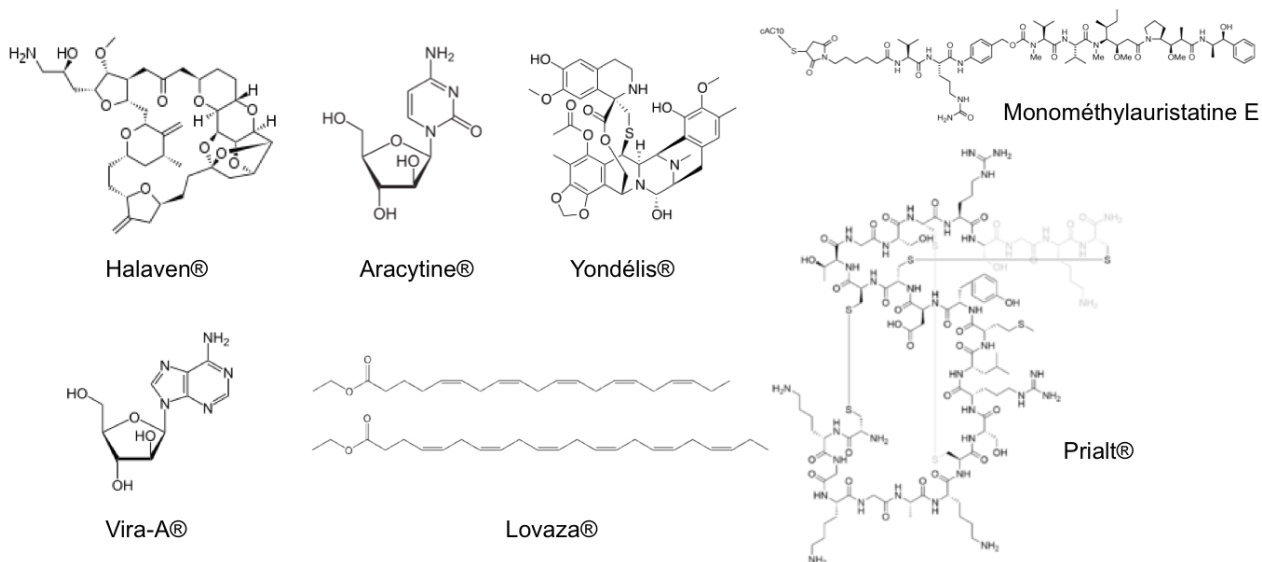
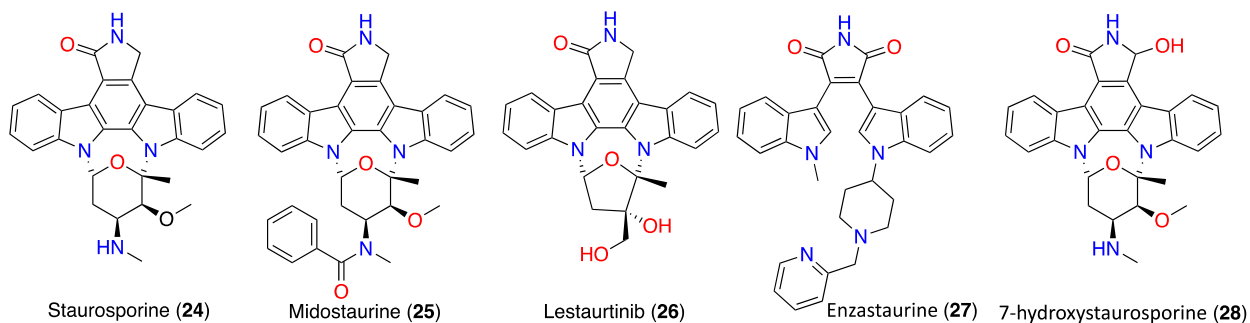


Figure 35 – Structures des médicaments d'origine marine

## b. Les inhibiteurs de kinases d'origine marine

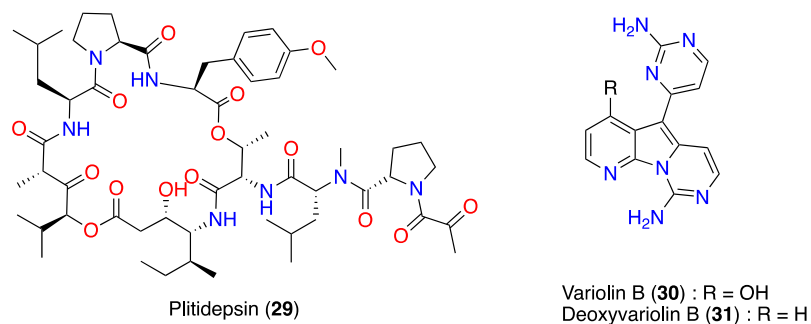
Dans la littérature de nombreux produits naturels d'origine marine et leurs analogues synthétiques sont reportés pour leurs diverses activités *in vitro* sur les kinases.<sup>156</sup> La rapamycin (sirolimus) a été initialement découverte comme antifongique chez *Streptomyces hygroscopicus*, souche provenant du sol.<sup>158</sup> Des efforts pour améliorer sa solubilité ont conduit à la synthèse du temsirolimus qui inhibe la kinase mTOR et qui est autorisé depuis 2007 par la FDA pour le traitement des patients atteint de carcinome rénal.

La staurosporine **24** est un alcaloïde indolocarbozole isolé en 1977 de la bactérie *Streptomyces staurosporeus*. Plusieurs dizaines de ses dérivés ont par la suite été découverts.<sup>158,159</sup> La staurosporine **24** interagit avec de nombreuses cibles biologiques, dont des kinases à Ser/Thr et à Tyr ciblant le site actif de l'ATP. Ce sont ses activités cytotoxiques et antifongiques qui ont attiré l'attention. Bien que trop toxique, cette molécule a donné lieu à la synthèse de nombreux dérivés ayant des profils pharmacologiques plus sélectifs. Les pharmacomodulations par hémisynthèse faites sur la staurosporine **24** ont permis l'identification de plusieurs composés actifs testés en phase clinique. La midostaurine **25** est un analogue dont l'amine est sous la forme de benzamide et cible les kinases Flt-3, PKC et VEGFRs (Figure 36). Elle est actuellement engagée dans une cinquantaine d'essais cliniques de phases I à III, notamment contre la leucémie aiguë myéloïde. Le remplacement du noyau tetrahydropyrane par un furane donna lieu à la préparation du composé lestaurtinib **26** qui inhibe les kinases Flt-3, JAK-2, Trk-A, Trk-B, and Trk-C (Figure 36).<sup>160,161</sup> En 2006, la FDA a donné au lestaurtinib **26** le statut de médicament orphelin pour le traitement de la leucémie aiguë myéloïde. L'enzastaurine **27** est également un analogue modifié de la staurosporine **24** qui inhibe PKC- $\beta$  avec une  $IC_{50}$  de 6 nM.<sup>162</sup> En 2007, c'est à l'enzastaurine **27** que le statut de médicament orphelin est accordé pour le traitement des lymphome diffus à grandes cellules B par l'Agence Européenne des Médicaments (Figure 36).<sup>156</sup> Le 7-hydroxystaurosporine **28**, inhibe les kinases Cdk2, 4, et 6 avec des  $IC_{50}$  de 42, 32, et 58 nM, respectivement (Figure 36).<sup>156</sup> Il est actuellement en essai clinique pour différents cancers comme le cancer du pancréas, du sein et le lymphome.



**Figure 36 - Médicaments orphelins avec le squelette staurosporine**

La plitidepsine (Aplidin®) **29** est un depsipeptide cyclique extrait du tunicier méditerranéen *Aplidium albicans* (Figure 37).<sup>157</sup> Il est développé par la société PharmaMar et est actuellement en essais clinique (11 études terminées à ce jour) pour ses activités anticancéreuses et commercialisé en Australie.<sup>163</sup> Il cible les kinases EGFR, Src, JNK, et p38 MAPK et induit l'apoptose des cellules cancéreuses. En juillet 2003 il a reçu le statut de médicament orphelin par l'Agence Européenne des Médicaments dans le traitement de la leucémie aiguë lymphoblastique. Cependant, en 2018, le Comité des médicaments à usage humain a refusé son autorisation de mise sur le marché en Europe. Plus récemment la société PharmaMar a annoncé qu'elle allait tester ce produit comme anti-infectieux contre le Covid-19.<sup>164</sup>



**Figure 37 – Plitidepsin et analogues de la Variolin B**

La varioline B **30** a été isolée de l'éponge *Kirkpatrickia variolosa* provenant de l'Antarctique et possède des propriétés pro-apoptotiques mises à profit en oncologie (Figure 37). Cette molécule cible les kinases Cdk1 et Cdk2 et est aussi un intercalant de l'ADN.<sup>165</sup> PharmaMar poursuit ses essais précliniques sur le dérivé synthétique déoxyvarioline B **31** qui présente un meilleur profil pharmacocinétique.

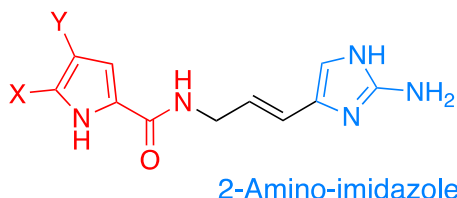
## 2. Les pyrroles-2-aminoimidazoles (P-2-AIs)

### a. Généralités sur les pyrroles-2-aminoimidazoles

Les pyrroles-2-aminoimidazoles (P-2-AIs) sont des alcaloïdes issus exclusivement des éponges marines, essentiellement des familles *Agelasidae*, *Halichondridae*, *Scopalinidae* et *Axinellidae*.<sup>166,167</sup> Ces métabolites secondaires représentent une famille avec des structures variées et originales. Ils se sont montrés avoir des activités biologiques très larges comme antibiotiques, antivirales, antifouling, cytotoxiques, inhibitrices de kinases etc.<sup>168</sup> D'un point de vue biosynthétique, la clathrodine **32**,<sup>169</sup> l'hyménidine **33**<sup>170</sup> et l'oroïdine **34**<sup>171</sup> constituent les trois monomères principaux de l'ensemble des molécules de cette famille (Figure 38). Ils sont

constitués d'un noyau pyrrole-2-carboxamide, qui peut être dibromé ou monobromé et d'un noyau 2-aminoimidazole, reliés par une chaîne amine allylique. Les cyclisations intra et intermoléculaires entre ses différents *building blocks* apportent une diversité moléculaire conséquente à cette famille avec plus de deux cent vingt dérivés isolés.<sup>166,172</sup>

### Pyrrole-2-carboxamide



X = Y = H : Clathrodine (**32**)  
 X = H, Y = Br : Hyménidine (**33**)  
 X = Y = Br : Oroïdine (**34**)

### 2-Amino-imidazole

Figure 38 - Structures des monomères de base

On distingue plusieurs sous-catégories au sein des P-2-Ais : les monomères acycliques, les monomères cycliques, les dimères acycliques, les dimères cyclisés par un cycle à quatre, à cinq, à six chaînons et enfin les tétramères. Ces molécules complexes polycycliques se forment par différents modes comme la tautomérisation, la formation de liaisons C-C ou C-N, la cyclisation, les réarrangements en cascade et les changements de degrés d'oxydation.<sup>166,173,174</sup> Ces différentes catégories vont être abordées de façon non exhaustive afin d'illustrer la richesse de la diversité structurale au sein de cette famille.

## b. Diversité structurale des pyrroles-2-aminoimidazoles

### i. Les monomères linéaires

L'oroïdine **34**, isolée en 1971 de l'éponge marine *Agelas oroides* par Forenza *et al* est la plus abondante des P-2-AIs (Figure 39).<sup>171</sup> Le rôle écologique de l'oroïdine **34** a été identifié en 1996 comme antiappétant pour se protéger des prédateurs, principalement des poissons. Ces propriétés de défenses sont essentielles aux éponges qui sont des animaux immobiles sans moyen de défense physique.<sup>173</sup> L'oroïdine **34** possède aussi des propriétés antibiofilms qui ont donné lieu à plusieurs études SAR.<sup>175,176</sup> La dispacamide A **35** a été isolée en 1996 de l'éponge *Agelas Dispar* (Figure 39).<sup>177</sup> La partie aminoimidazole de l'oroïdine est alors oxydée en alkylidène glycoamidine. Cette molécule possède également des propriétés antiappétantes<sup>178</sup> et antihistaminiques.

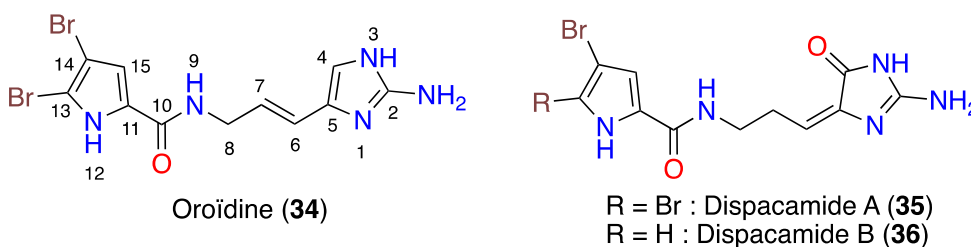


Figure 39 - Monomères P-2-AIs linéaires



## ii. Les monomères cycliques

Parmi ces monomères cycliques, on retrouve le (Z)-hyménialdisine (Z-HMD) **37** qui a été initialement extrait des éponges des genres *Hymeniacidon*, *Acanthella*, *Axinella*, and *Pseudoaxinyssa*, tandis que son homologue débromé **38** provient de l'éponge *Phakellia* (Figure 40).<sup>179,180</sup> Ils partagent un noyau pyrrolo-azépinique lié au noyau glycoxyamidine par une double liaison (Figure 40). Ils proviennent de la liaison entre les positions C6 et C15. Les composés de configurations Z et E ont tous deux été isolés, bien que le composé Z soit le plus stable thermodynamiquement et donc le plus abondant.<sup>181</sup> Des dérivés proches comme les (Z)-axinohydantoïne **39** et (Z)-débromoaxinohydantoïne **40** ont été isolés de l'éponge *Aurantium* (Figure 40).<sup>182</sup> La (-)-dibromophakellstatine **41** est un monomère tétracyclique isolé de l'éponge *Phakellia mauritiana* qui a montré des activités intéressantes sur différentes lignées cellulaires cancéreuses (Figure 40).<sup>183</sup> Plusieurs composés des agelastatines comme les composés **42** et **43** à structure tétracyclique dense ont été isolés dans les années 90 des éponges *Agelas dendromorpha* et *Cymbastela sp* (Figure 40).<sup>184</sup>

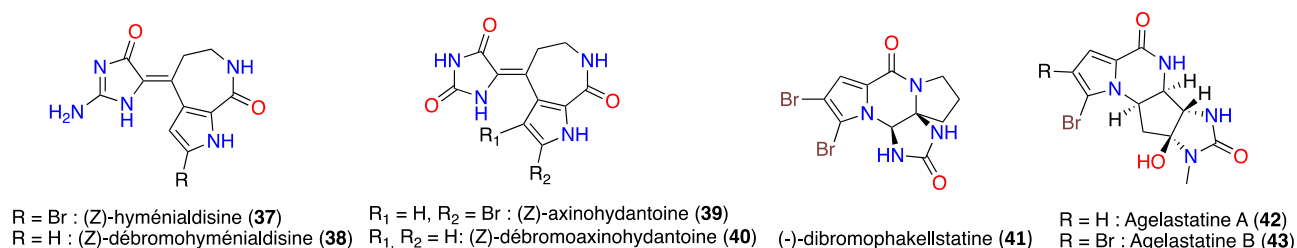


Figure 40 - Les monomères Cycliques

## iii. Les dimères par une liaison

Les dimérisations diffèrent selon la position où elles ont lieu sur le monomère. La mauritiamine **44**,<sup>185</sup> la nagélamide P **45**<sup>186</sup> et la citrinamine A **46**<sup>187</sup> sont issues d'une connexion C4-C5' (Figure 41). L'analogue nagélamide C **47** résulte d'une dimérisation C4-C6'.<sup>188</sup> Certains dimères linéaires résultent de la formation d'une liaison C-N. Par exemple, le stylissazole A **48** possède une liaison C4-N3' entre les motifs hyménidine et (Z)-débromohyménialdisine (Figure 41).<sup>189</sup>

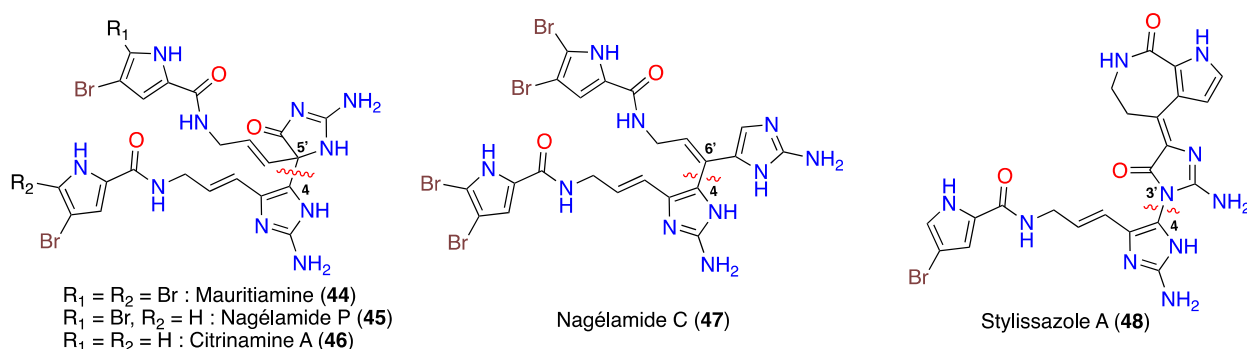


Figure 41 - Exemples de dimères acycliques

## iv. Les dimères à motif cyclobutane

La sceptrine **49** a été isolée en 1981 d'*Agelas Sceptrum*, bien qu'on la retrouve dans d'autres éponges du type *Agelas*.<sup>190,191</sup> Il s'agit d'un dimère de deux unités hyménidine formé via la



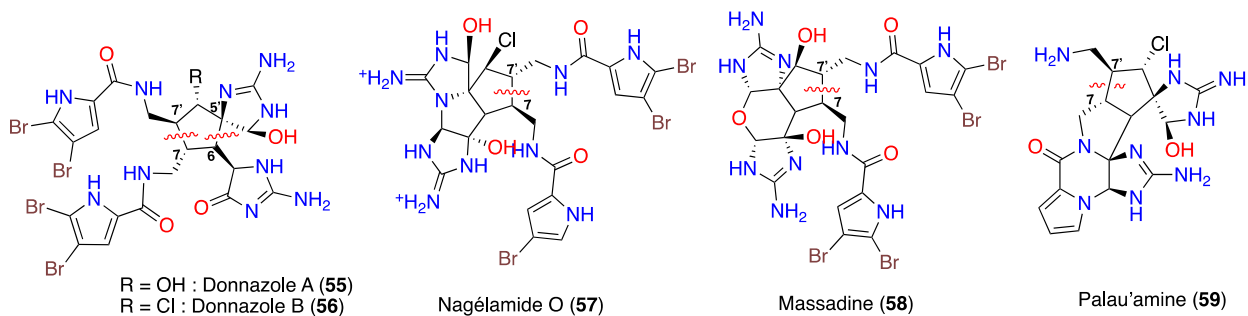


Figure 44 - Exemples de dimères cycliques à 5 chaînons

### vi. Les dimères cycliques à six chaînons

Les nagélamides E **60**, F **61** et G **62** possèdent un cycle à 6 chaînons de type cyclohexène provenant des cyclisations C7-C7' et C4-C6.<sup>188</sup> Les agéliférines **63-65** diffèrent par la configuration du centre 6' (Figure 45).<sup>192</sup>

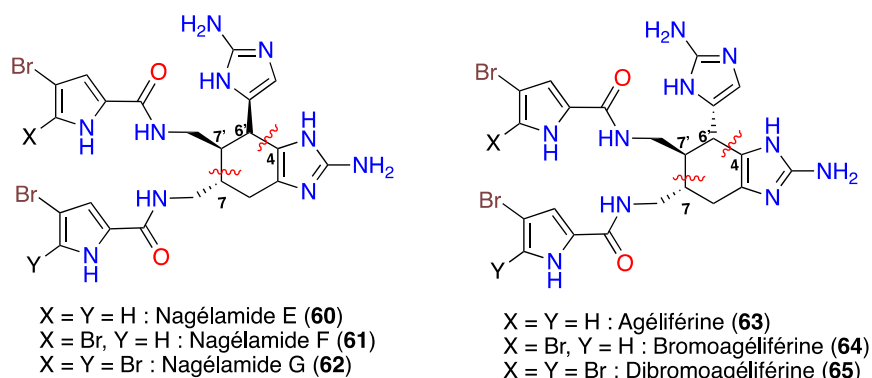


Figure 45 - Structures des Nagélamides E-G et Agéliférines

### vii. Les tétramères

Les stylissadines A **66** et B **67** sont les seules membres tétramériques à ce jour des P-2-AIs, isolées des éponges *Stylissa caribica* et *Stylissa flabellata*. Elles sont constituées de deux unités massadines reliées par un pont éther (Figure 46).<sup>202</sup>

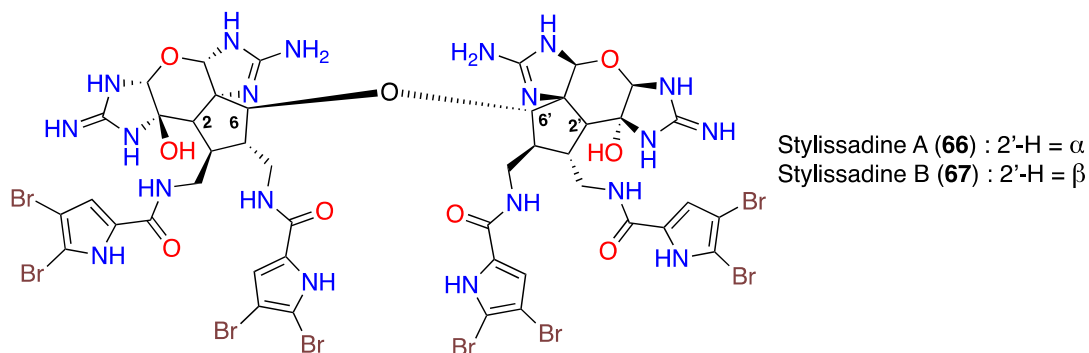


Figure 46 - Structures des stylissadines

### 3. Les P-2-AI inhibiteurs de kinases

Un grand nombre de molécules marines et leurs dérivés ont été criblés pour différentes activités. Les molécules de la famille des P-2-AIs ont montré des activités inhibitrices de kinases intéressantes. Quelques exemples non exhaustifs sont reportés dans cette partie.

#### a. L'hyménialdisine et analogues proches

L'hyménialdisine (Z)-HMD **37** est un inhibiteur ATP-compétitif de Cdk1 et l'inhibe avec une  $IC_{50}$  de 22 nM. Elle inhibe aussi Cdk-2/cycline A ( $IC_{50}$  = 70 nM), Cdk-2/cycline E ( $IC_{50}$  = 40 nM), Cdk-5/p25 ( $IC_{50}$  28 nM), la glycogène synthase kinase 3 (GSK-3 $\beta$ ,  $IC_{50}$  = 10 nM) et la caséine kinase 1 (CK1,  $IC_{50}$  = 35 nM).<sup>203,204</sup> Le potentiel thérapeutique du (Z)-HMD **37** et de ses analogues concerne le cancer mais aussi les maladies neurodégénératives, les pathologies inflammatoires et le diabète de type 2.<sup>205</sup> Plusieurs études de relations structure-activité se sont concentrées sur ce squelette.<sup>206-209</sup> L'hyménialdisine **37** et la débromohyménialdisine **38** ont présenté des activités sur la cascade de signalisation Ras/MEK/MAPK avec des  $IC_{50}$  de 3.0 et 6.0 nM respectivement sur MEK.<sup>204</sup> L'aldisine **68**, la 2-bromoaldisine **69**, l'hyménine **70** et l'oroïdine **34** inhibent aussi cette voie avec des  $IC_{50}$  allant de 3 à 1300 nM (Figure 47).<sup>210</sup> Cette voie de signalisation Ras/MEK/MAPK permet la communication cellulaire. La forme oncogénique de Ras est associée à 30 % des cancers et représente alors une cible thérapeutique antitumorale. Le (Z)-axinohydantoïne **39** présente des activités kinases intéressantes de l'ordre du micromolaire sur les kinases C ( $IC_{50}$  = 9  $\mu$ M), GSK-3 $\beta$  ( $IC_{50}$  = 3  $\mu$ M), Cdk1/cyclin B ( $IC_{50}$  = 4  $\mu$ M), CK1 ( $IC_{50}$  = 4.5  $\mu$ M) et CDC5/p25, ( $IC_{50}$  = 7  $\mu$ M).<sup>182,203,211</sup>

#### b. La dibromophakellstatine

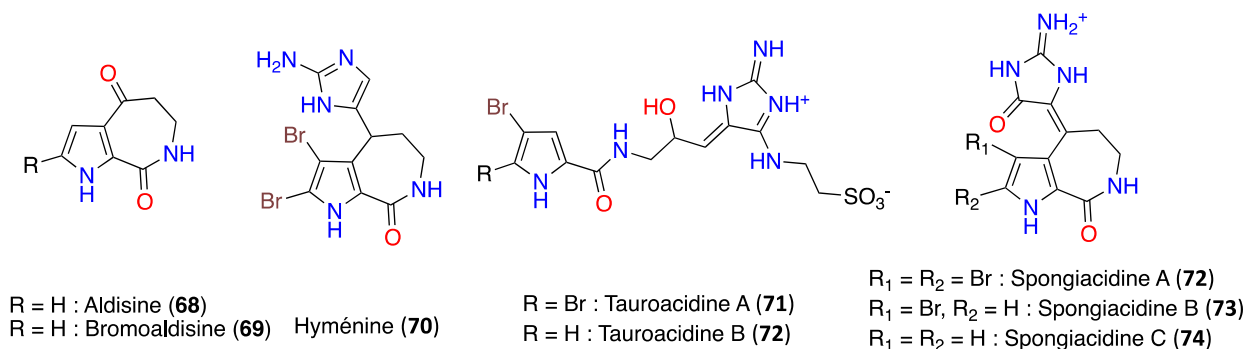
La dibromophakellstatine **41** racémique a été testée sur un panel de trente-six lignées cellulaires cancéreuses et s'est montrée active sur des lignées cancéreuses ovariennes ( $IC_{50}$  = 0.60  $\mu$ M), de glioblastomes ( $IC_{50}$  = 0.93  $\mu$ M), pulmonaires ( $IC_{50}$  = 0.96  $\mu$ M) et utérines ( $IC_{50}$  = 1.21  $\mu$ M). Seul l'énantiomère (-) a montré une activité antitumorale.<sup>183,212</sup>

#### c. Les tauroacidines

Parmi les kinases à tyrosines, les récepteurs de l'EGF (Epidermal Growth Factor), notamment erbB-1, erbB-2, erbB-3, and erbB-4 régulent la croissance cellulaire. Les membres de cette famille sont impliqués dans la progression tumorale et de nombreuses études ont été menées pour identifier des inhibiteurs. Les tauroacidines A **71** et B **72** qui sont des métabolites de l'éponge *Hymeniacidon sp.* ont des activités sur la kinase erbB-2 (Figure 47).<sup>211,213</sup>

#### d. Les spongiacidines

Les spongiacidines A **72** et B **73** ont été isolées de *Hymeniacidon sp.* et ont montré des activités inhibitrices de erbB-2 et de Cdk4 (Figure 47). La spongiacidine C **74** est un inhibiteur sélectif de USP7 (ubiquitin-specific protease).<sup>167</sup>



**Figure 47 - P-2-AIs possédant des activités inhibitrices de kinases**

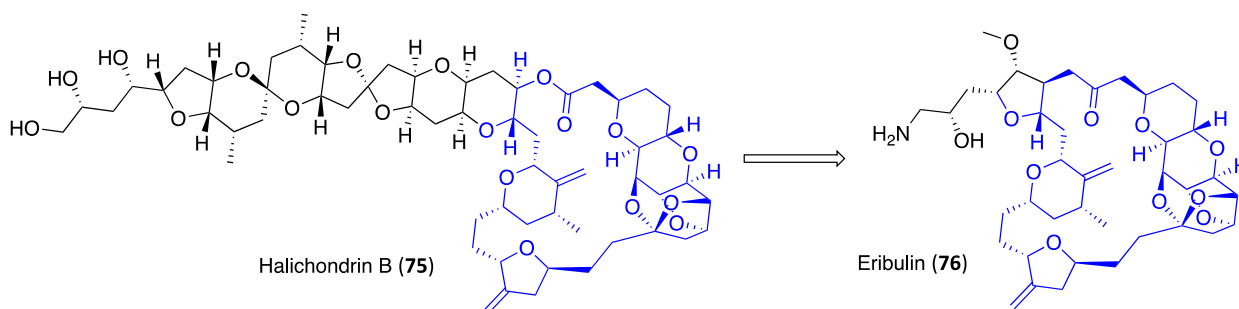
### e. Les benzosceptrines

La benzosceptrine B **53** possède une activité inhibitrice de la kinase CK1 avec une IC<sub>50</sub> de 0.68 μM (résultat du laboratoire non publié), tandis que son homologue la benzosceptrine C **54** possède des propriétés antibactérienne et anti-fongique.<sup>214</sup>

## VI. Mise en évidence de l'analogue synthétique **EL228** comme inhibiteur d'Aurora B

### 1. Simplification des produits naturels comme stratégie de *drug discovery*

Les produits naturels sont une source importante pour la mise en évidence de composés chefs de file et la découverte de médicaments. Cependant, au-delà des difficultés d'approvisionnement, la complexité structurale de ces produits sont sources de difficultés en termes de synthèse organique, mais aussi en termes de profil pharmacocinétique. Par conséquent, la simplification de ces structures naturelles, stratégie largement utilisée, consiste à chercher les fragments nécessaires à l'activité biologique et à en faire des analogues. Ainsi cette approche permet d'éviter ou d'atténuer ces problèmes et d'augmenter le taux de succès des molécules d'intérêt.<sup>9</sup> L'éribuline mésylate **76** (Halaven®) comme abordé précédemment illustre bien cette stratégie (Figure 48).



**Figure 48 - Simplification structurale de l'halicondrine B**

C'est pour cette raison qu'il a été envisagé au laboratoire d'utiliser la benzosceptrine C et ses monomères comme source d'inspiration afin de préparer des fragments plus simples de cette

structure complexe, peut compatible avec un programme de chimie médicinale. De plus, la faible quantité extraite de l'éponge marine correspondante ne permet pas les pharmacomodulations par hémisynthèse. Les activités biologiques préliminaires des benzosceptrines (**52-54**), notamment sur la kinase CK1, ont laissé penser que des analogues simplifiés et intermédiaires de sa synthèse totale pouvaient être des hits potentiels.

## 2. Simplification de la benzosceptrine C

Dans une stratégie de synthèse totale et de simplification de cette molécule, différents intermédiaires de constructions ont été préparés. Ces intermédiaires constituent des fragments simplifiés de la benzosceptrine C **54** et sont des synthons de choix pour évaluer leurs activités biologiques. Ils ont été évalués sur un panel de kinases à la Station Biologique de Roscoff, qui s'intéresse aux activités biologiques des kinases et aux produits d'origine marine. Le panel est composé d'une dizaine de kinases impliquées dans des processus biologiques importants dont les dérégulations conduisent à des pathologies de types cancers, maladies inflammatoire et neurodégénératives.

Ainsi, le criblage des dérivés de pyrrole-2-aminoimidazoles précurseurs et fragments de ces alcaloïdes marins a permis l'identification de touches inhibitrices spécifiques de ces kinases. Plus spécifiquement, les composés **EL228**, **AV123** et **TMQ0153** se sont révélés actifs sur les kinases Aurora B, RIPK1 et RIPK3 (Figure 49).

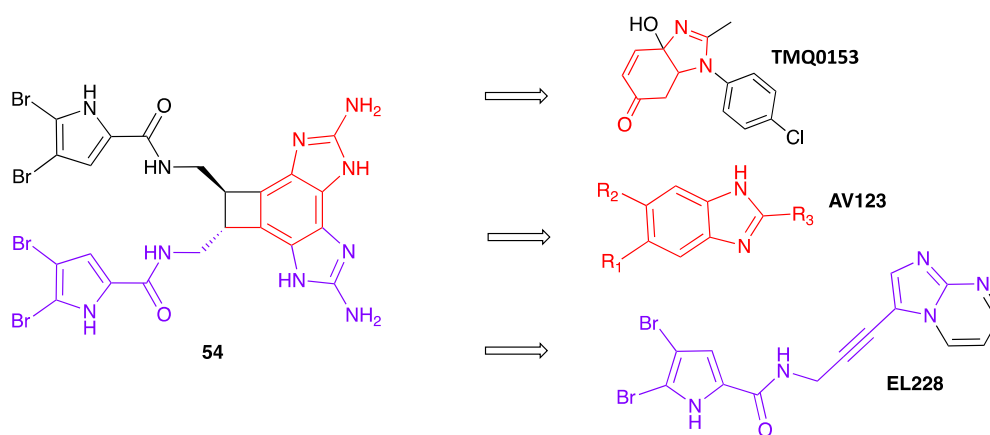
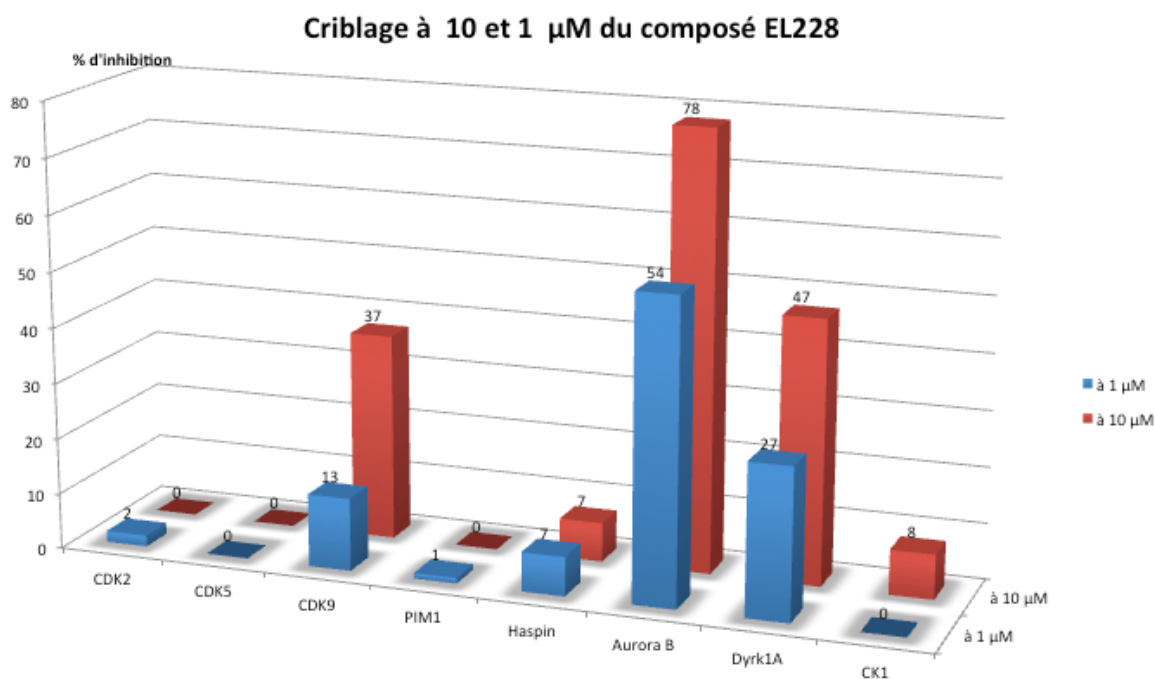


Figure 49 - Hits issus du screening des fragments de la benzosceptrine C

Le composé **AVI123** et ses dérivés sont actifs sur la kinase RIPK1, impliquée dans le processus de nécroptose.<sup>215</sup> Le composé **TMQ0153** et ses dérivés<sup>216-218</sup> ont montré *in vitro* leur capacité à faire basculer la cellule d'un type de mort cellulaire à un autre en fonction de la concentration testée. Ces différents composés ont fait l'objet d'un autre projet de chimie médicinale sur les maladies inflammatoires et neurodégénératives. Le composé **EL228** présente une IC<sub>50</sub> de 5 µM sur Aurora B avec une sélectivité intéressante vis-à-vis du panel évalué comme illustré sur la Figure 50.

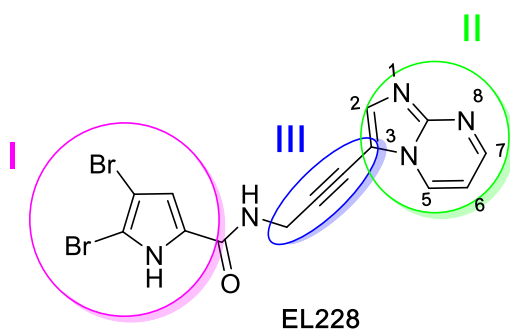


**Figure 50 - Criblage primaire d'EL228**

### 3. Axes d'études autour du produit EL228

#### a. Synthèse de EL228

Le produit **EL228** (Figure 51), fragment simplifié d'un produit naturel marin et analogue de l'oroïdine a suscité notre intérêt puisqu'il possède une activité sur la kinase Aurora B avec un profil assez sélectif. Ce composé s'inscrit dans la stratégie de valorisation des produits naturels marins isolés au laboratoire. Comme il a été mis en avant précédemment, la kinase Aurora B est une cible attractive dans le développement de traitement anti-cancéreux. L'objectif est d'entreprendre un travail de chimie médicinale à partir de cette première touche.



**Figure 51 - Structure du composé EL228**

**EL228** est constitué de trois parties modifiables :

- Partie I : un noyau 4,5-dibromopyrrole
- Partie II : un noyau imidazo[1,2-a]pyrimidine substitué en position 3
- Partie III : un linker acétylénique

La synthèse de la partie II se fait à partir du 2-amino-pyrimidine **77** qui après cyclisation au chloroacétaldéhyde est iodé sélectivement au N-iodosuccinimide en position 3. La partie pyrrolique alcyinique **83** est préparée à partir du trichloroacétylpyrrole **80** qui est dibromé avec  $\text{Br}_2$  en milieu acide. L'intermédiaire **81** est acylé avec la propargylamine **82** pour obtenir l'alcyne terminal **83**. L'étape clé de la synthèse est le couplage pallado-catalysé de Sonogashira avec l'hétérocycle **79** pour obtenir **EL228** en cinq étapes avec un rendement global de 24 % (Figure 52).

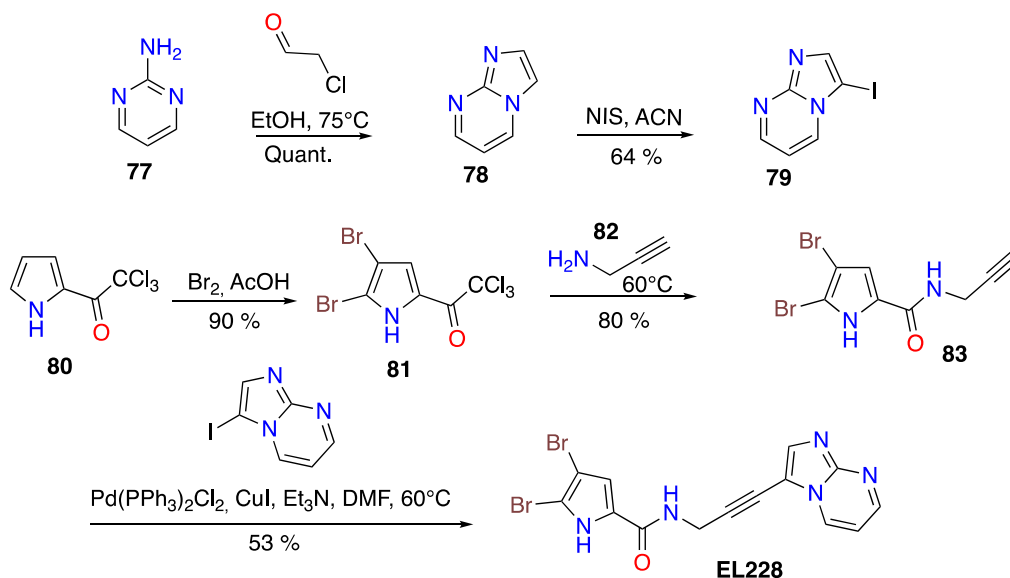


Figure 52 - Synthèse d'EL228

## b. Les pharmacomodulations envisagées

Nous avons envisagé de réaliser les pharmacomodulations en modifiant successivement les parties I, II et III de la molécule pour d'une part augmenter l'activité inhibitrice et d'autre part optimiser la sélectivité sur la kinase d'intérêt, Aurora B.

### i. Modulation sur la partie I

Nous avons choisi d'introduire différents hétérocycles aromatiques sur cette partie, comme les indoles et des thiophènes. Il est également envisagé de modifier le pyrrole par différentes substitutions et en variant la nature des halogènes et leur position. La stratégie synthétique consiste à préparer les produits finaux de type **84** soit à partir de l'intermédiaire **86** soit à partir de l'intermédiaire **87** (Figure 53).

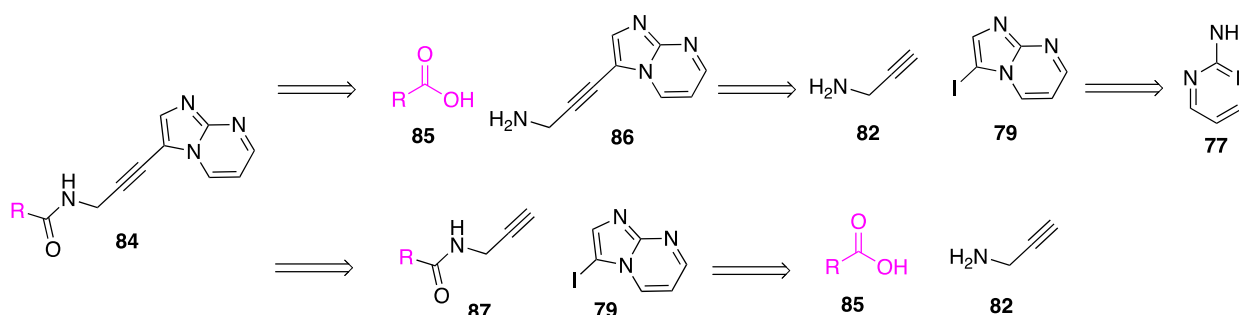


Figure 53 - Rétrosynthèse envisagée des produits de modulations de la partie I



## ii. Modulation sur la partie II

Les modifications du noyau imidazo[1,2-a]pyrimidine par des hétérocycles variés (indoles, azaindoles, pyridine, thiophène etc.) ont été envisagées ainsi que l'introduction d'hétérocycles bicycliques en faisant varier la position de l'azote en position 8 et en y ajoutant des substituants. L'objectif est de pouvoir mettre en avant les relations de structure-activité afin de concevoir des modifications pertinentes. La synthèse des composés **88** s'effectue entre l'alcyne **83** et les hétérocycles iodés de type **84** (Figure 54).

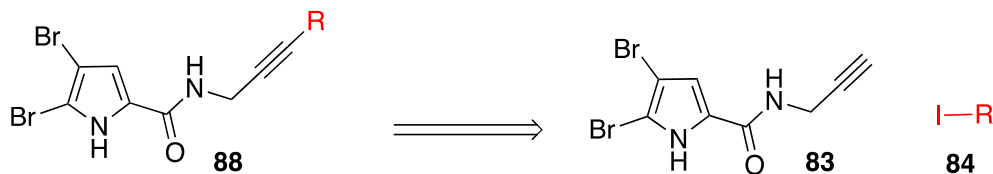


Figure 54 - Rétrosynthèse envisagée des produits de modulations de la partie II

## iii. Modulation sur la partie III

Pour finir, nous prévoyons de modifier le linker acétylénique par des linkers alcénique, benzénique, saturé ou encore triazole (Figure 55). L'objectif de ces variations est d'apporter de la diversité quant à la flexibilité, la rigidité, la longueur et l'encombrement stérique du linker afin d'en mesurer l'impact sur l'activité et de sélectionner le plus optimal.

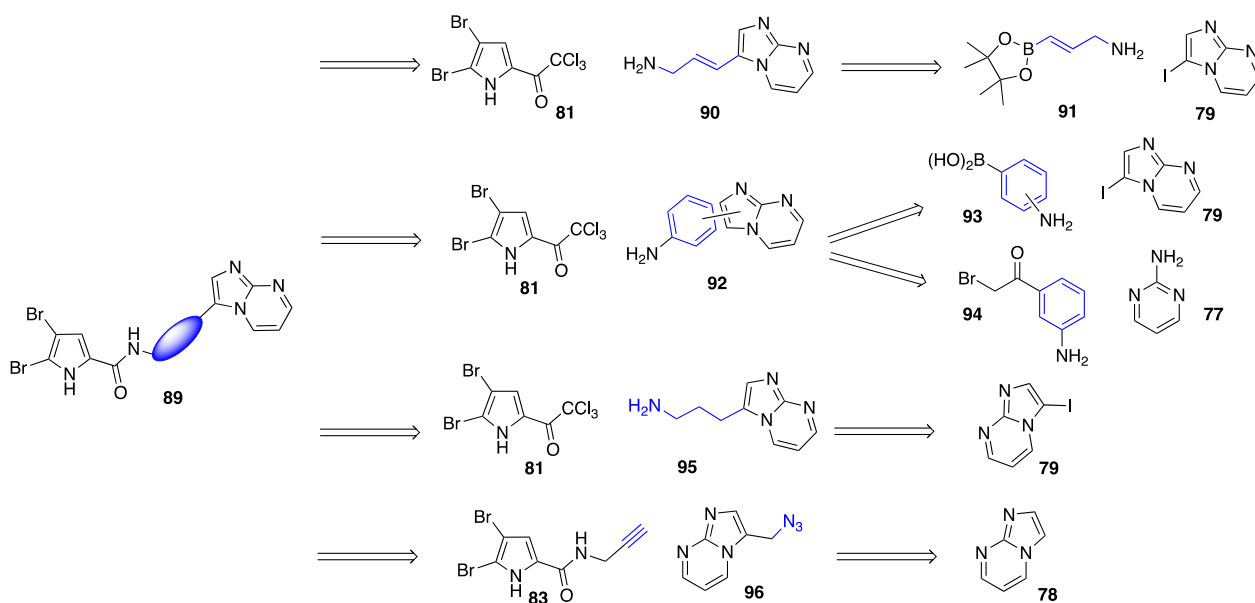


Figure 55 - Rétrosynthèse envisagée des produits de modulations de la partie III

# **Chapitre II**

# **Pharmacomodulations**

# **de la partie I**



# Chapitre II – Pharmacomodulations de la partie I

## I. Introduction

Le travail présenté dans ce chapitre concerne les modifications chimiques effectuées sur la partie I du hit initial, **EL228** (Figure 56). Nous cherchons à identifier les éléments structuraux favorables à l'inhibition et à la sélectivité vis-à-vis de la kinase Aurora B afin d'optimiser les pharmacophores de la molécule.

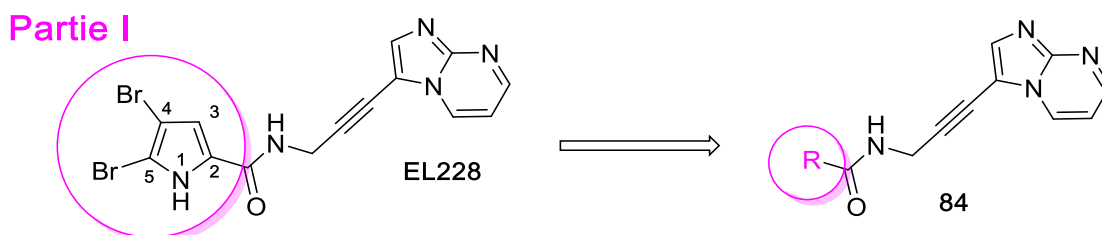


Figure 56 - Modifications de la partie I

Deux voies synthétiques ont été utilisées pour procéder à l'ensemble des pharmacomodulations (Schéma 1) :

- Préparation de la plateforme **86** par couplage de Sonogashira puis acylation de l'amine primaire avec les différents hétérocycles porteurs d'une fonction acide carboxylique **85**
- Préparation de l'alcyne **87** par acylation de l'amine primaire **82** avec chacun des hétérocycles puis couplage de Sonogashira avec **79**

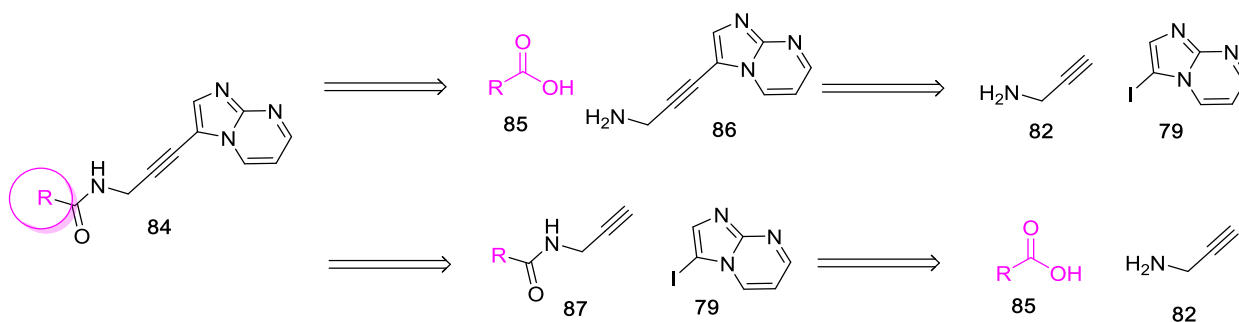


Schéma 1 - Approches synthétiques pour les modifications de la partie I (R)

De manière exploratoire en termes d'activité biologique, divers hétérocycles aromatiques ont été introduits à la place du pyrrole. Dans un second temps nous avons évalué l'importance des halogènes présents sur le pyrrole. Pour finir, nous nous sommes intéressés au rôle du pyrrole comme accepteur et donneur de liaison hydrogène sur le NH, en le remplaçant par d'autres hétérocycles à cinq chaînons dibromés.

## II. Synthèses des analogues

### 1. Introduction d'hétérocycles aromatiques variés

La molécule plateforme **86** a été préparée à partir de la propargylamine protégée **97** (Schéma 2)<sup>219</sup> par couplage de Sonogashira avec le dérivé iodé **79** puis déprotection en milieu acide pour obtenir l'alcyne **86** avec un rendement global de 78 %.

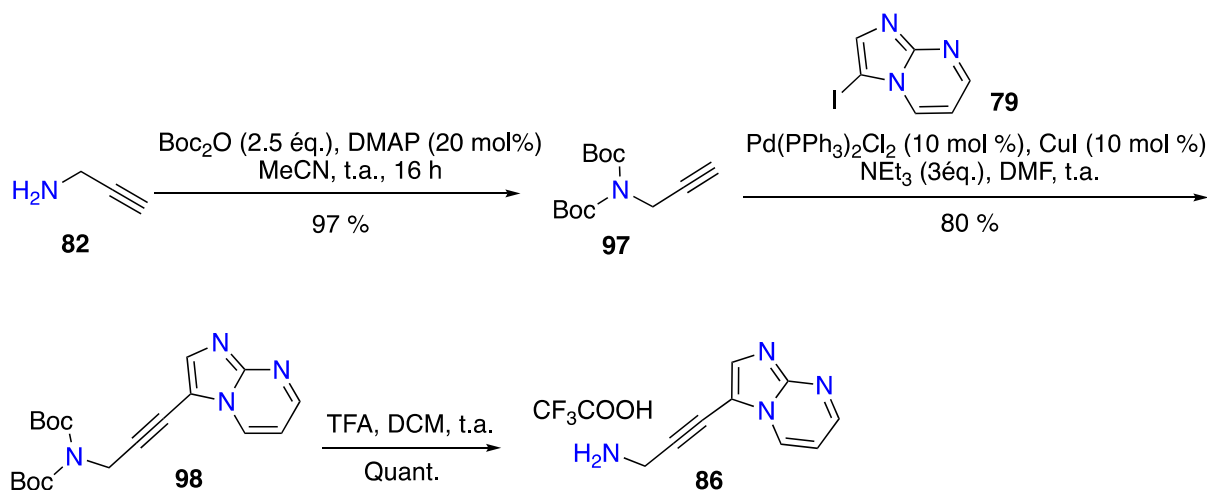


Schéma 2 – Synthèse de l'alcyne **86**

Le deuxième synthon, le 3-iodoimidazo[1,2-a]pyrimidine **79** est obtenu à partir du composé **78**, lui-même obtenu quantitativement par condensation du chloroacétaldéhyde dans l'éthanol à reflux pendant 24 heures.<sup>220</sup> Le mécanisme de la formation de **78** (Schéma 3) commence par l'attaque de l'azote endo-cyclique, le plus nucléophile de **77**, sur le carbone en  $\alpha$  du chloroacétaldéhyde. L'azote exo-cyclique réagit ensuite sur l'aldéhyde pour conduire à la fermeture du bicyclique. Le composé subit finalement une élimination d'une molécule d'eau pour s'aromatiser.<sup>221</sup>

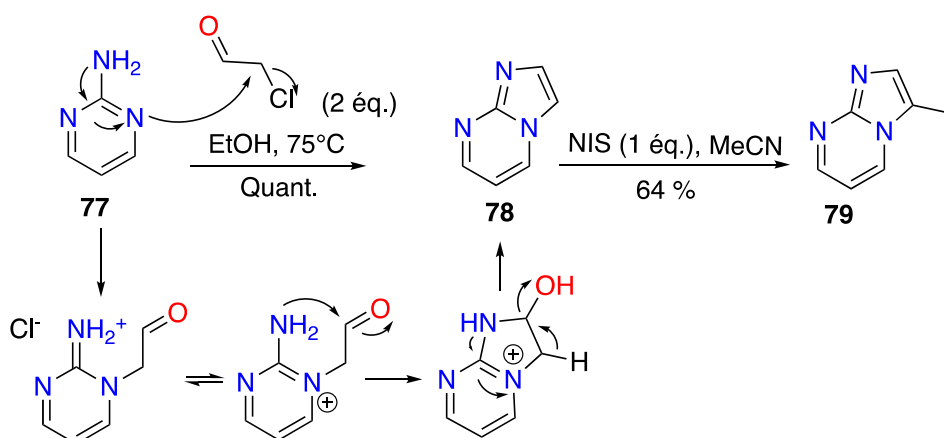
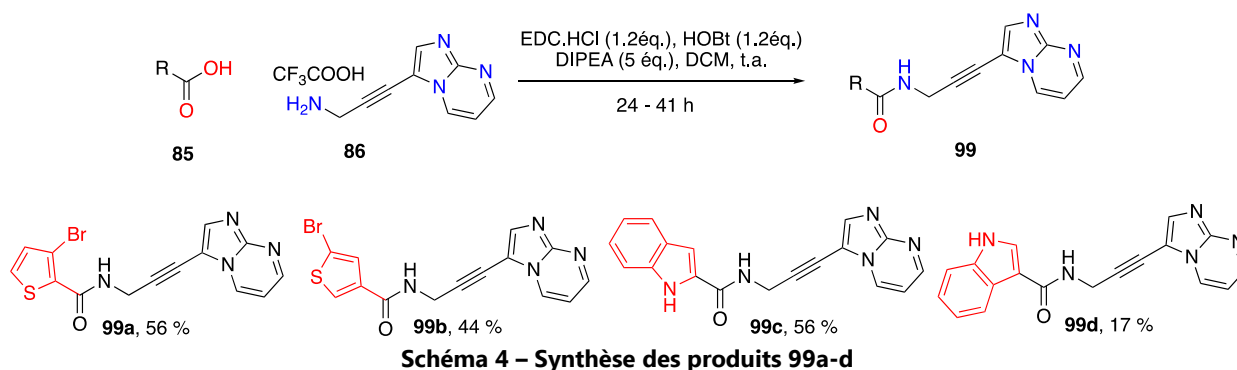


Schéma 3 - Préparation du 3-iodoimidazo[1,2-a]pyrimidine **79** et mécanisme de la cyclisation

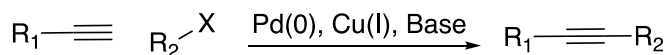
L'étape finale dans la préparation des composés **99a-99d** est l'amidation à l'aide de l'agent de couplage EDC.HCl avec les hétérocycles acides carboxyliques **85a-85d** (Schéma 4). Les conditions mises en œuvre sont celles classiquement utilisées avec HOBT en présence d'un excès de base pour neutraliser le sel **86** dans le dichlorométhane pendant 24 à 41 h. Les rendements obtenus sont plutôt modestes. Ceci s'explique en partie par la relativement mauvaise solubilité

des composés qui rend les étapes de traitement et de purification plus délicates. Bien que la réaction avec l'acide indole-2-carboxylique **85c** ait globalement bien fonctionné, la réaction avec son homologue l'acide indole-3-carboxylique **85d** a conduit à la formation de nombreux produits secondaires faisant chuter le rendement de la réaction en **99d** à 17 %.



## 2. Rappels bibliographiques sur le couplage de Sonogashira

L'introduction de la fonction alcyne par le couplage de Sonogashira est une étape clé dans la préparation de nos dérivés. Il s'agit d'une réaction de couplage carbone-carbone pallado-catalysée entre un halogénure d'aryle et un alcyne terminal à l'aide d'une base et de cuivre (I) comme co-catalyseur pour former l'alcyne disubstitué (Schéma 5). Cette réaction a été publiée en 1975 par Kenkichi Sonogashira, Yasuo Tohda et Nobue Hagihara,<sup>222</sup> inspirés notamment des travaux de Stephens et Castro datant de 1963.<sup>223</sup> Le couplage de Sonogashira présente l'avantage d'utiliser le cuivre en quantité catalytique dans des conditions relativement douces.



R<sub>1</sub> = aryle, vinyle, alkyle  
 R<sub>2</sub> = aryle, vinyle  
 X = I, Br, Cl, OTf

**Schéma 5 – Réaction générale du couplage de Sonogashira**

Le mécanisme général de la réaction est décrit sur le Schéma 6 et comprend deux cycles catalytiques. Le cycle au palladium débute par l'addition oxydante à partir de l'espèce catalytique active Pd<sup>0</sup>L<sub>2</sub>, c'est-à-dire l'insertion du Pd<sup>0</sup> dans la liaison C-X pour former l'intermédiaire [Pd<sup>II</sup>L<sub>2</sub>R<sub>1</sub>X]. S'en suit une étape de transmétallation de l'alcyne du cuivre au palladium, puis une étape d'élimination réductrice (avec une étape d'isomérisation *cis/trans* du complexe) pour libérer l'entité catalytique et le produit avec les deux fragments R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> couplés à l'alcyne. L'espèce organométallique cuivrée est formé *in situ* au cours du deuxième cycle catalytique, à partir du cuivre en quantité catalytique et d'une base, généralement une amine.<sup>224</sup> L'amine participe à la formation du complexe acétylure de cuivre en déprotonant le complexe π-alcyne, qui rend le proton plus acide.

La réactivité du groupe R<sub>2</sub> dans le couplage suit l'ordre suivant : iodure de vinyle > triflate de vinyle > bromure de vinyle > chlorure de vinyle > iodure d'aryle > triflate d'aryle > bromure

d'aryle >> chlorure d'aryle. La présence d'un groupe électroattracteur tend à augmenter la réactivité.<sup>224</sup> Les complexes de palladium (0) et (II) sont utilisés. Les complexes Pd<sup>II</sup> sont des pré-catalyseurs qui doivent être réduits en Pd<sup>0</sup> dans le milieu réactionnel par une amine ou un ligand phosphine par exemple.<sup>225</sup> Les bases employées sont généralement des amines secondaires comme la pipéridine, la morpholine ou la diisopropylamine ou des amines tertiaires comme la triéthylamine. Des bases inorganiques sont également utilisées. Les solvants classiques pour cette réaction sont des solvants polaires soit aprotiques comme le DMF ou le THF, soit protiques.<sup>226,227</sup>

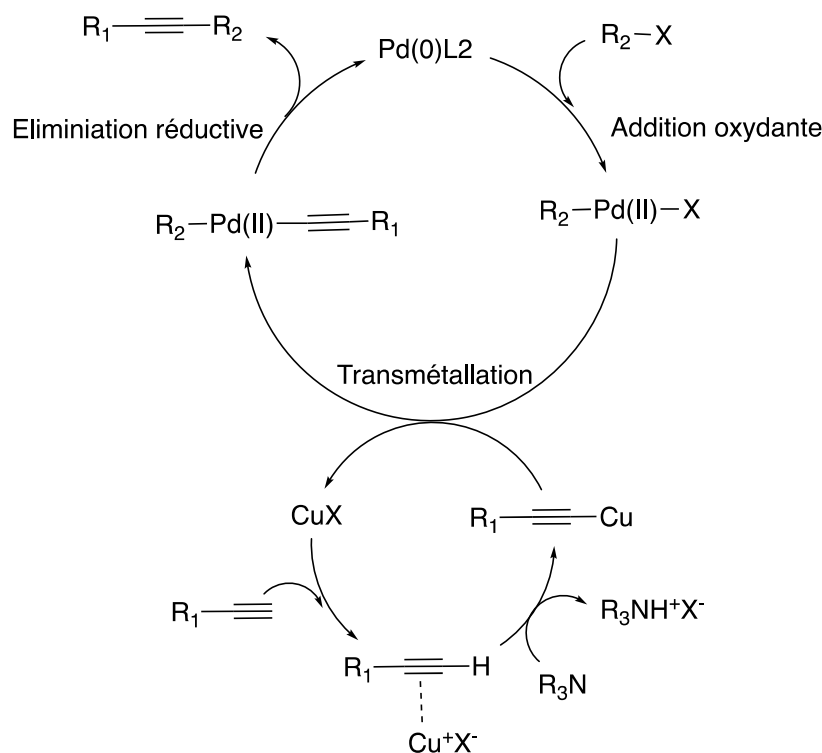


Schéma 6 – Mécanisme réactionnel général du couplage de Sonogashira

Cette réaction est l'une des plus importantes en synthèse organique pour la formation de liaison C-C entre un carbone sp et un carbone sp<sup>2</sup> et trouve de nombreuses applications.<sup>225</sup> Des variations de cette réaction existent, notamment sans le co-catalyseur cuivre. En effet, bien que le cuivre soit bénéfique au système catalytique en termes de réactivité, il peut être aussi responsable d'inconvénients comme la formation du produit d'homocouplage, décrit comme la réaction de Glaser, dû notamment à la présence de dioxygène dans le milieu réactionnel.<sup>228</sup> Dans notre cas, nous utiliserons la version classiquement utilisée avec 2 à 5 % de Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 4 à 10 % de CuI en présence de triéthylamine (2-3 éq.). La réaction se fait généralement dans le DMF ou le THF anhydres préalablement dégazés. Selon les substrats, les réactions sont effectuées à température ambiante ou 50°C, dans quelques cas jusqu'à 100°C.

### 3. Modulations sur le noyau pyrrolique

#### a. Nombre d'halogènes sur le pyrrole

Le pyrrole du hit initial **EL228** porte deux atomes de bromes sur les positions 4 et 5. Nous avons cherché à sonder leur importance en synthétisant les composés ne portant soit aucun

brome soit qu'un seul brome (Schéma 7). Le composé pyrrolique **100** ne portant qu'un halogène a été préparé de la même façon que celui portant deux bromes mais avec un seul équivalent de Br<sub>2</sub>. Ce composé bromé en position 4 a pu être obtenu de manière régiosélective et de façon quantitative. Ensuite, la même séquence de couplage amidique avec la propargylamine puis couplage C-C de Sonogashira a été utilisée pour synthétiser les alcynes **103** et **104**.<sup>229,230</sup> Bien que nous n'ayons pas observé de réactions secondaires sur les bromes du pyrrole, leur présence semble avoir un impact sur la réaction puisque le rendement du produit **104** sans les bromes est de 86 % contre 72 % avec un seul brome (**103**) et 53 % pour le pyrrole dibromé **EL228**.

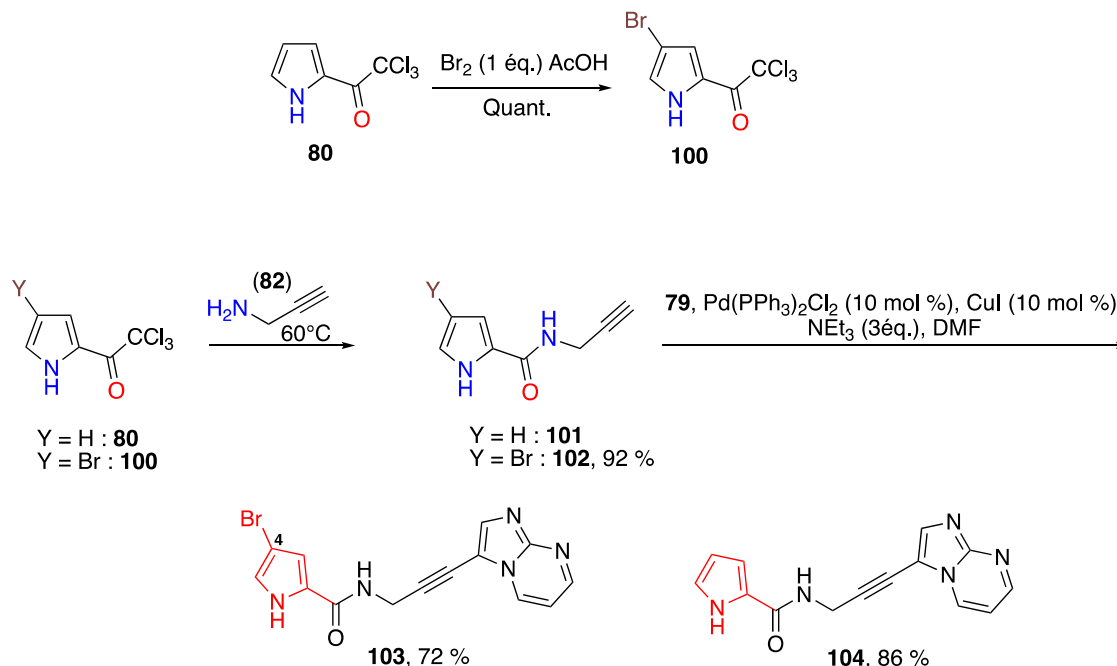


Schéma 7 – Préparation des analogues monobromé **103** et débromé **104**

## b. Nature des halogènes sur le pyrrole

Les deux atomes de bromes portés par le pyrrole d'**EL228** ont été remplacés par deux atomes de chlore pour le composé **109** et deux atomes d'iode pour le composé **110**. Nous avons préparé le dichloro-trichloroacétylpyrrole **105** à partir de **80** en utilisant le chlorure de sulfuryle (SO<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) à température ambiante (Schéma 8).<sup>231-233</sup> Le chlorure de sulfuryle se décompose *in situ* pour générer Cl<sub>2</sub> et SO<sub>2</sub>. C'est un réactif plus pratique à manipuler que le Cl<sub>2</sub> gazeux. Le couplage avec la propargylamine permet ensuite l'obtention de l'alcyne terminal **106** avec un bon rendement de 86 %.

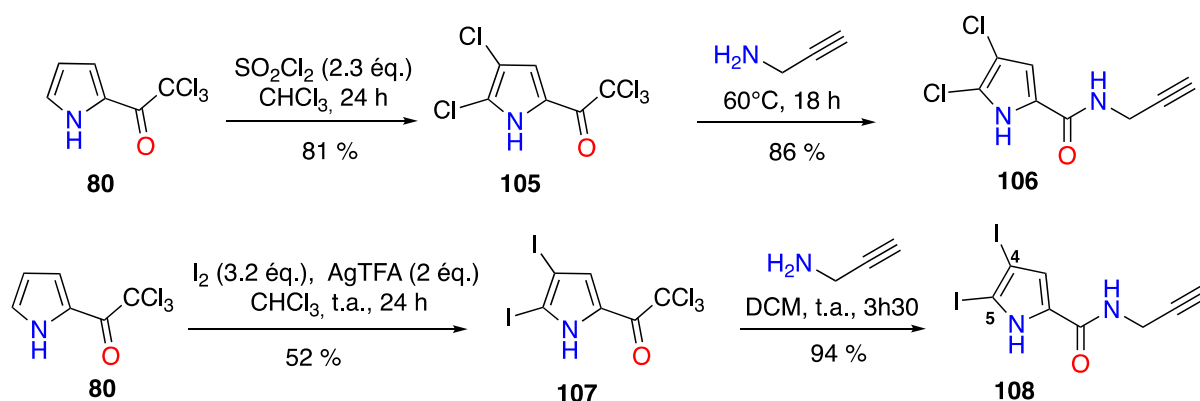


Schéma 8 - Introduction de deux atomes d'halogène sur le pyrrole



L'analogue diiodé **108** a été préparé suivant la même séquence que son homologue dichloré **106** (Schéma 8).<sup>231,234</sup> La réaction de diiodation s'est déroulée avec un excès de diiode en présence de triflate d'argent. Le rendement modeste de 52 % de la réaction peut s'expliquer par le fort encombrement stérique des atomes d'iode. La réaction d'acylation avec la propargylamine a été réalisée à température ambiante, puisque lors d'un essai à 60 °C, nous avons noté la disparition de l'atome d'iode en position 4, probablement par proto-iodation. Les alcynes **106** et **108** ont finalement pu être engagés dans le couplage de Sonogashira avec le produit **79** (Schéma 9).

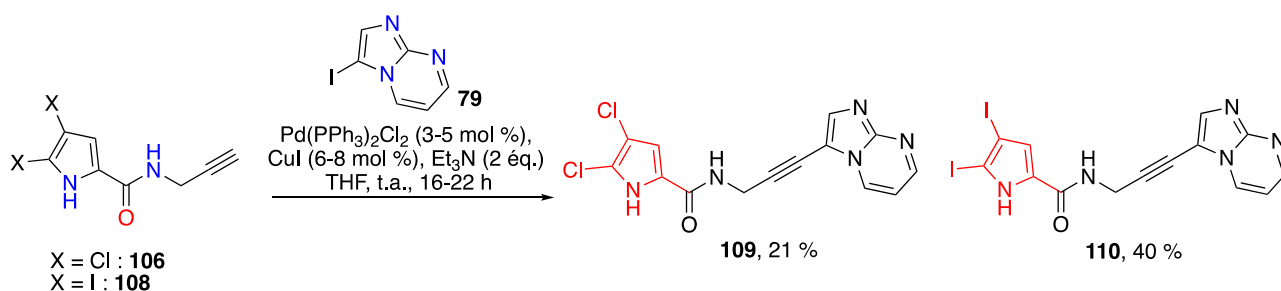


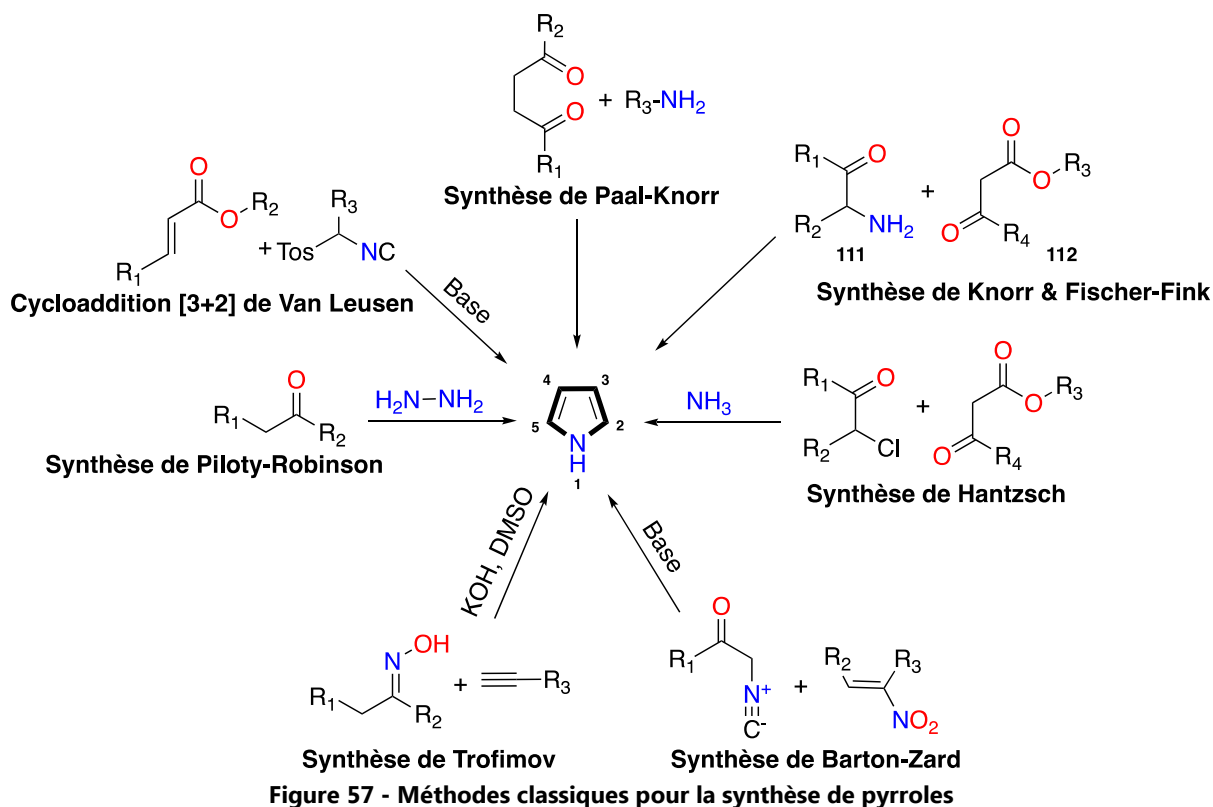
Schéma 9 – Produits **109** et **110** du couplage de Sonogashira

### c. Substituants hydrophobes sur le pyrrole

Nous nous sommes attachés à déterminer le rôle des deux bromes situés sur le pyrrole, à savoir notamment s'ils étaient impliqués dans des interactions purement hydrophobes avec la kinase. Pour cette raison nous avons envisagé la synthèse d'un pyrrole diméthylé en position 4 et 5 pour comparer son activité avec son équivalent dibromé. Dans la littérature, assez peu de synthèses à partir du pyrrole non substitué sont reportées. Il a donc été nécessaire de construire le noyau pyrrolique avec les substituants d'intérêts.

#### i. Rappels bibliographiques sur la construction du pyrrole

Les pyrroles substitués sont des hétérocycles très importants en biologie. Ils sont largement répandus dans les produits naturels comme les porphyrines, les P-2-Ais mais aussi les molécules synthétiques bioactives. Ils sont un pharmacophore particulièrement intéressant en chimie médicinale, en effet on retrouve ce motif dans un grand nombre de produits à visée antibactérienne, anti-fongique, anti-inflammatoire, anti-cancéreuse etc.<sup>235,236</sup> Plusieurs voies d'accès chimiques ont ainsi été développées depuis de nombreuses années. On retrouve parmi les réactions les plus classiques les réactions de Paal-Knorr<sup>237-239</sup>, Knorr<sup>240</sup>, Fischer-Fink<sup>241</sup>, Hantzsch<sup>242</sup>, Barton-Zard<sup>243</sup>, Trofimov<sup>244</sup>, Piloty-Robinson<sup>245</sup> et Van Leusen<sup>246</sup> (Figure 57). De multiples autres réactions sont également décrites dans la littérature pour accéder aux pyrrole substitués.<sup>237,240,245,247</sup>



Pour la préparation du produit diméthylé, nous nous sommes intéressés à la synthèse de Fischer-Fink.<sup>241</sup> Il s'agit d'une réaction compétitive à la réaction de Knorr qui met en jeu classiquement une  $\alpha$ -amino-cétone **111** et d'un carbonyle **112** portant un groupe attracteur en  $\alpha$ .<sup>240</sup> Un comparatif des deux mécanismes est détaillé sur le Schéma 10.<sup>248</sup> Le mécanisme commence par une condensation de l'amine **111a** sur le dicarbonyle **112a**, suivie d'une condensation aldolique intramoléculaire de Knoevenagel qui permet la fermeture du cycle. Pour finir, l'élimination de l'hydroxyle et d'un groupe acyle puis l'isomérisation des doubles liaisons conduisent au pyrrole final. Il est à noter aussi que si le composé **112a** est asymétrique, la condensation de l'amine peut se faire sur les deux positions. Une expérience de radiomarquage au <sup>14</sup>C par Harbuck et Rapoport a permis de déterminer le ratio de chacun des trois produits qui est de 43.8 : 1.2 pour **113b** et **113a** avec moins de 1% du produit **113c**. En effet, l'élimination d'un groupe acyle est plus favorable que celle d'un groupe alcoyle.<sup>248,249</sup>

La réaction de Fischer-Fink est favorisée lorsque l'amine **111** est un dicarbonyle, ce qui accentue l'acidité du proton en  $\alpha$  qui rentre en compétition avec celui en position 3. De plus, lorsque la dicétone 2,4-dicarbonyle **112** porte un groupement alkyl en position 3 la voie Fischer-Fink devient également compétitive avec la voie Knorr.<sup>240</sup> Ceci peut s'expliquer par l'acidité légèrement moins forte du proton énolisable du dicarbonyle méso-substitué et également par la géométrie moins favorable de l'intermédiaire énamine, défavorisant la cyclisation 3- $\beta$ .<sup>250</sup>

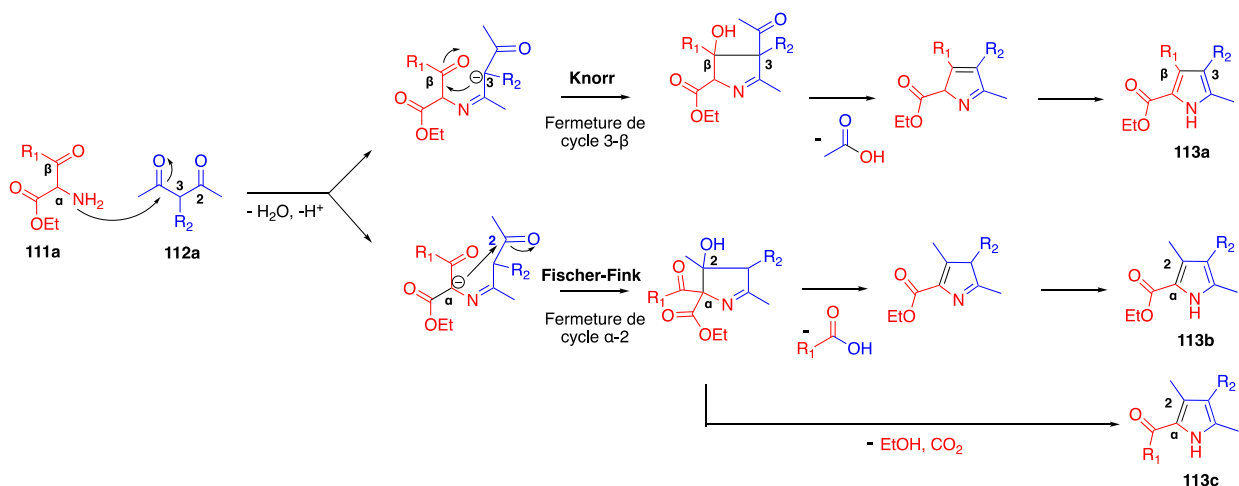


Schéma 10 - Mécanismes des réactions compétitives de Knorr et Fischer-Fink

## ii. Synthèse du pyrrole diméthylé

La synthèse du pyrrole diméthylé **119** portant une fonction ester en position 2 est décrite dans la littérature à partir de l'oxime **118** et du 2-méthyl-3-oxobutanal **117** sous forme de sel de sodium (Schéma 11). L'oxime **118** a été synthétisée avec un bon rendement de 81 % avec du nitrite de sodium en milieu acide.<sup>251-254</sup> En parallèle, le produit **117** a été préparé à partir de l'éthyl formate **115** et de la 2-butanone **116** en présence d'une solution de méthanoate de sodium.<sup>253,255-257</sup> Les composés **117** et **118** ont pu être engagés dans la réaction de Fischer-Fink pour obtenir le pyrrole **119** avec un rendement de 66 %.<sup>253,257,258</sup>

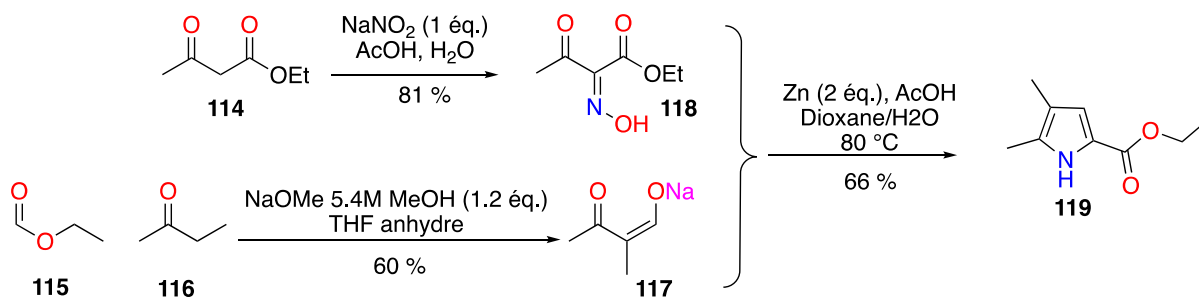
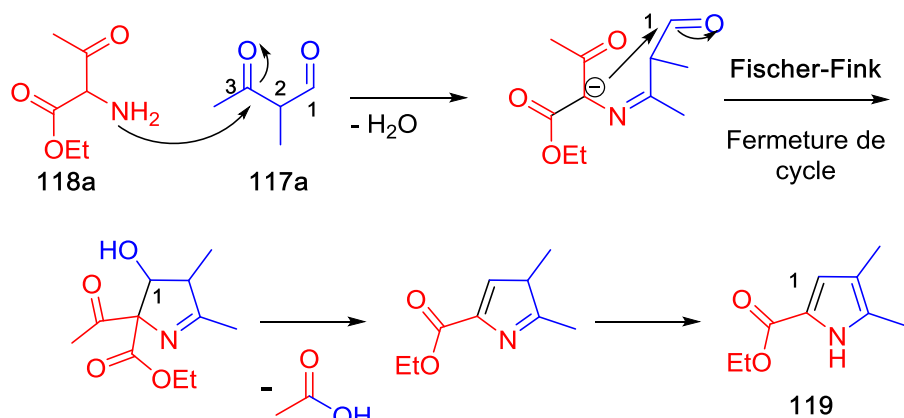
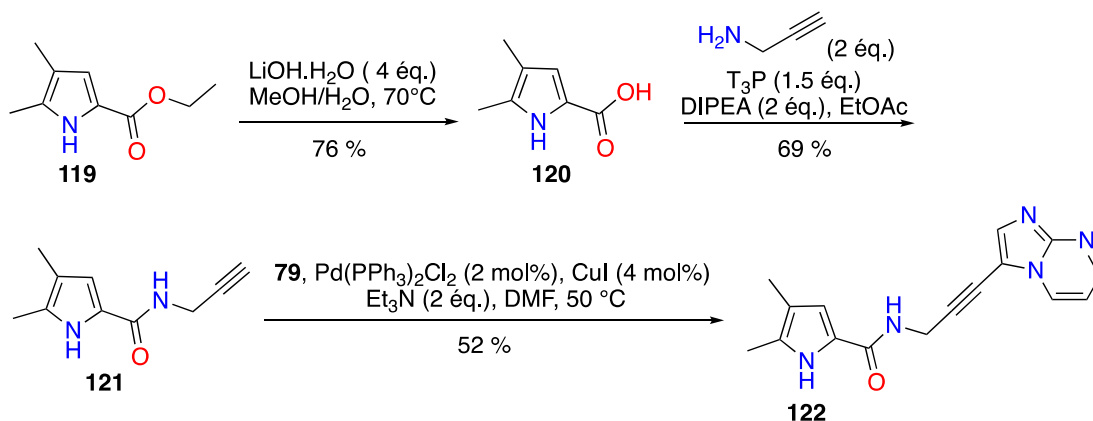


Schéma 11 - Préparation du pyrrole diméthylé

Le mécanisme de formation du pyrrole **119** passe par la condensation de l'amine **118a** sur la cétone **117a** en position 3 (Schéma 12). L'intermédiaire kétimine réagit ensuite suivant une cyclisation α-1. Enfin, la perte de l'acyle conduit à l'obtention du pyrrole final.<sup>259</sup>



L'ester **119** est ensuite hydrolysé avec de l'hydroxyde de lithium puis acylé à la propargylamine en présence de l'agent de couplage T<sub>3</sub>P (Schéma 13). L'alcyne **121** est engagé dans le couplage de Sonogashira pour fournir le produit désiré diméthylé **122**.



#### 4. Introduction de cycles à 5 chaînons 4,5-dibromés

Afin d'évaluer le rôle du pyrrole et d'explorer l'apport d'autres hétérocycles aromatiques, nous l'avons remplacé par deux hétérocycles à cinq chaînons 4,5-dibromés. Les acides 4,5-dibromothiophène-2-carboxylique **123** et 4,5-dibromofuran-2-carboxylique **124** ont ainsi été utilisés pour préparer les alcynes **125** et **126** avec de très bons rendements par un couplage avec la propargylamine assisté par le T<sub>3</sub>P (Schéma 14). Ces alcynes intermédiaires ont été couplés au composé iodé **79** dans les mêmes conditions que précédemment. Bien que les conversions soient totales lors du contrôle par CCM, les produits **127** et **128** n'ont été isolés qu'avec des rendements de 40 et 48 % respectivement.

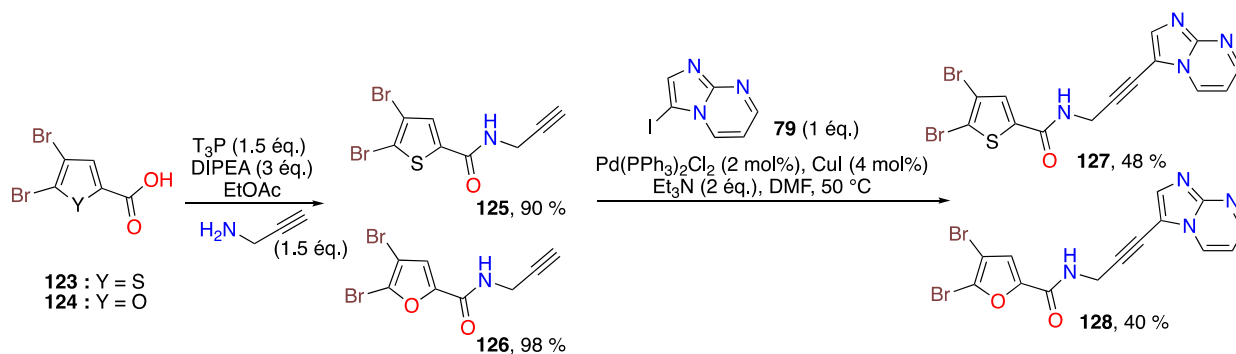


Schéma 14 – Préparation des dérivés thiophène 127 et furane 128

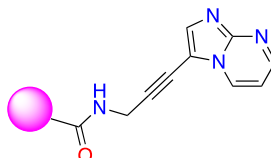
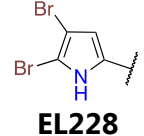

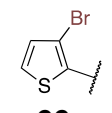
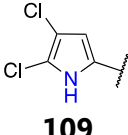
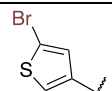
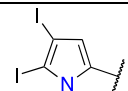
### III. Évaluation biologique et discussion

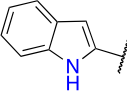
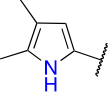
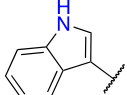
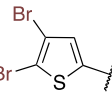
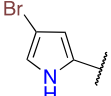
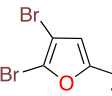
#### 1. Criblage primaire et IC<sub>50</sub> des composés les plus actifs

Toutes les molécules synthétisées ont été criblées à 10  $\mu$ M et 1  $\mu$ M sur Aurora B et sur un panel d'une dizaine de kinases. Ces kinases ont été sélectionnées par nos collaborateurs de la Station Biologique de Roscoff pour leurs implications dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques. Les IC<sub>50</sub> ont ensuite été déterminées pour les molécules présentant une activité inhibitrice significative à 1  $\mu$ M sur la kinase Aurora B.

Les valeurs d'inhibition à 10 et 1  $\mu$ M sont présentées dans le Tableau 4. L'intégralité du criblage est disponible en annexe 2. Les seuls composés actifs à l'issue de ce criblage sont **EL228** et le composé dichloré **109**. L'IC<sub>50</sub> de ce dernier est de 1.6  $\mu$ M sur Aurora B, contre 5  $\mu$ M pour **EL228**. Il présente également une activité inhibitrice de 59 % à 10  $\mu$ M et 18 % à 1  $\mu$ M sur la kinase GSK3 $\beta$ .

Tableau 4 - Résultats du criblage primaire sur Aurora B des analogues issus de la modification de la partie I

Produit	% d'inhibition à 10 $\mu$ M	% d'inhibition à 1 $\mu$ M	Produit	% d'inhibition à 10 $\mu$ M	% d'inhibition à 1 $\mu$ M
					
 <b>EL228</b>	78	54	 <b>104</b>	7	2
 <b>99a</b>	0	1	 <b>109</b>	70	25
	21	1		60	21

<b>99b</b>			<b>110</b>		
 <b>99c</b>	32	9	 <b>122</b>	3	8
 <b>99d</b>	0	0	 <b>127</b>	0	0
 <b>103</b>	15	4	 <b>128</b>	25	0

La Figure 58 représente le pourcentage d'inhibition à 10  $\mu$ M de chacun des composés de cette série sur les six kinases communes aux criblages. Les hétérocycles de la partie I sont représentés sur l'axe des abscisses et le pourcentage d'inhibition sur l'axe des ordonnées. Les six kinases évaluées communes sont indiquées sur l'histogramme le long de l'axe de profondeur, avec la kinase Aurora B en orange. Le graphe montre les kinases impliquées dans la division cellulaire comme l'Haspine, les CDK2, CDK5 et CDK9 qui orchestrent les différentes étapes de la division cellulaire. Pour rappel, la kinase Haspine est étroitement liée à Aurora B, comme nous l'avons expliqué dans le premier chapitre. Pour finir, la kinase à sérine/thréonine Pim1 est un proto-oncogène qui intervient principalement dans la progression du cycle cellulaire, l'apoptose et l'activation transcriptionnelle. Le graphe révèle que nos produits sont assez spécifiques d'Aurora B d'une part (à 10  $\mu$ M), et que celles partiellement inhibées sont également impliquées dans la division cellulaire.

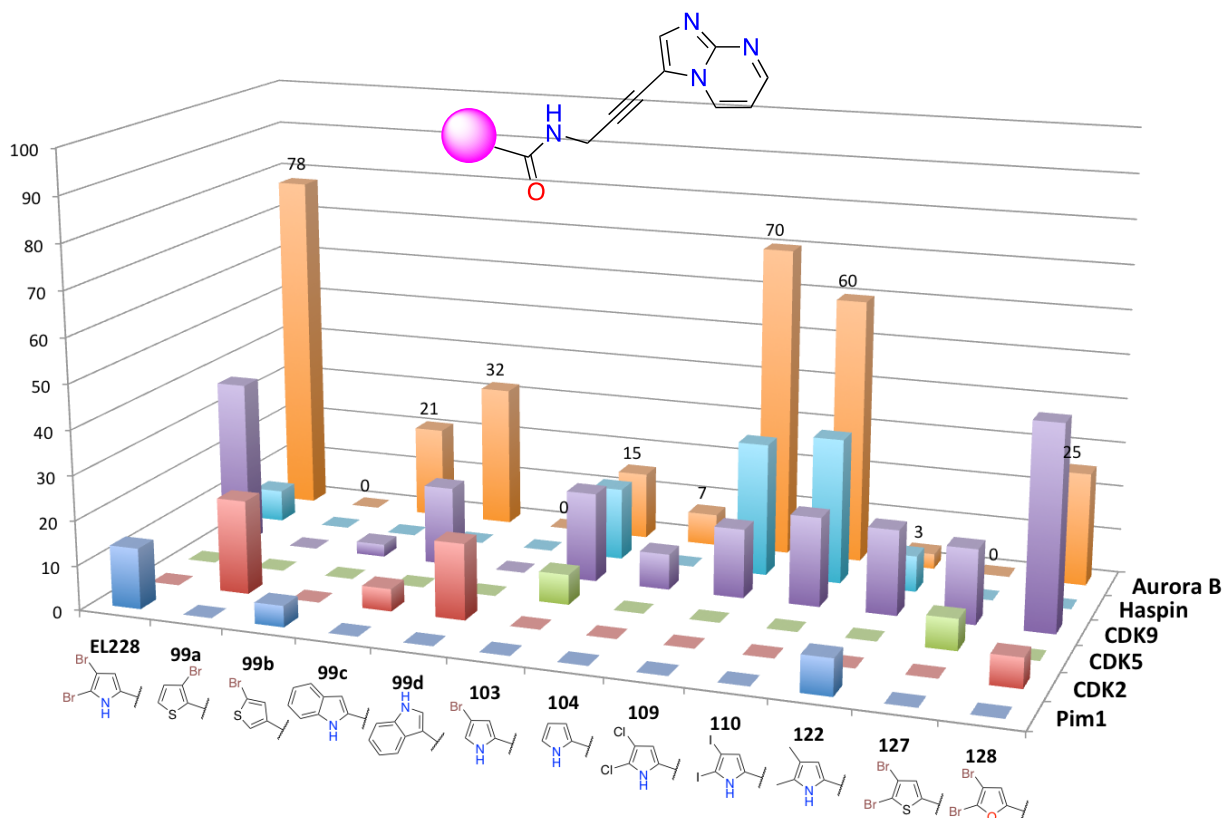


Figure 58 - Graphe représentant les pourcentages d'inhibition à 10 µM

## 2. Interprétation des résultats

Nous avons cherché dans un premier temps à rationaliser les effets des différents substituants d'après les résultats du criblage primaire. Il est évident que ce paramètre ne doit pas être le seul pris en compte pour la mise au point d'un candidat-médicament, mais à ce stade préliminaire nous nous sommes basés uniquement sur les activités et sélectivités déterminées par tests enzymatiques pour nous guider dans le design des inhibiteurs. Les résultats biologiques obtenus nous permettent de d'esquisser les premières conclusions quant aux effets des différents hétérocycles (Figure 58).

Tout d'abord, l'utilisation des hétérocycles de type thiophène et indole ne permet pas d'améliorer l'activité sur la kinase Aurora B. En effet, les composés **99a**, **99b**, **99c** et **99d** n'ont quasiment pas d'activité ni sur Aurora B ni sur l'ensemble du panel de kinases évalué dans le cadre de cette étude. Ensuite, il apparaît que les deux atomes de brome ont leur importance puisque le seul brome en position 4 du composé **103** ne suffit pas à maintenir l'activité. Il serait pertinent de préparer le composé monobromé en position 5 uniquement pour valider à 100 % cette conclusion. Le composé pyrrolique débromé **104** ne présente pas non plus activité inhibitrice. Les composés dichloré **109** et diiodé **110** viennent confirmer l'importance des halogènes sur ces positions du pyrrole. L'IC<sub>50</sub> du composé dichloré déterminée est de 1.6 µM, ce qui est du même ordre de grandeur que celle d'**EL228** à 5 µM. Les halogènes peuvent être responsables de liaisons halogènes mais aussi établir des interactions hydrophobes. C'est dans cette optique que le composé diméthylé **122** a été préparé, mais n'a présenté aucun effet sur Aurora B. Le composé **99c** avec le phényle sur le noyau pyrrolique apporte également un encombrement hydrophobe à

cette position. Pourtant, il n'a également présenté aucune activité sur les kinases. Ceci souligne d'autant plus l'importance des halogènes sur le pyrrole.

Concernant la substitution du pyrrole, le thiophène **127** et le furane **128** qui présentent les deux bromes s'avèrent moins actifs sur Aurora B. Ceci nous permet de bien comparer les effets du cycle à cinq chaînons comme donneur de liaison hydrogène versus les cycles à cinq chaînons accepteur de liaison hydrogène pour le furane **128**. Les résultats obtenus lors du criblage primaire soulignent l'importance du NH comme accepteur et donneur de liaison hydrogène pour le bon maintien de l'activité enzymatique. Le pyrrole doit établir les liaisons favorables entre le NH et la protéine, permettant l'interaction au site actif.

### 3. Rôles des halogènes en chimie médicinale

Bien qu'initialement les atomes d'halogène aient été peu utilisés en chimie médicinale, excepté le fluor, ils ont suscité un intérêt croissant et se sont avérés importants pour les interactions ligand-protéine. En effet, les molécules naturelles étant bien souvent des sources d'inspiration, celles issues des plantes ne présentent que très rarement des halogènes. En revanche, les produits naturels marins se sont avérés être largement halogénés, amenant ainsi les chimistes médicaux à davantage incorporer des halogènes de type Cl et Br dans les molécules.<sup>260</sup> La présence d'halogènes dans les produits naturels marins s'expliquent par la plus grande disponibilité des ions chlorure et bromure dans l'eau de mer que sur terre.<sup>261</sup> Curieusement, le brome est le plus couramment incorporé dans les produits naturels marins bien que sa concentration dans l'eau soit plus faible que celle des ions chlorures (19 000 mg/L versus 65 mg/L).<sup>262</sup> Des haloperoxydases permettent l'incorporation des halogènes lors de la biosynthèse des métabolites secondaires, celles-ci sont essentiellement trouvées chez les organismes marins.<sup>263</sup> Nous présentons ici les grandes caractéristiques des halogènes qui en font des atomes aux multiples facettes en chimie médicinale.

Tout d'abord, leur caractère hydrophobe facilite la pénétration membranaire. C'est une stratégie employée pour l'absorption et l'administration des molécules à la cible. L'hydrophobicité est importante pour le passage de la barrière hématoencéphalique dans le cas des molécules ciblant le système nerveux central par exemple.

Les iodes, bromes et chlores sont des atomes larges et stériquement encombrants. L'atome de chlore est comparable à un méthyle, tandis que le brome est comparable en termes de taille à un groupement isopropyle. Cette caractéristique trouve son utilité pour remplir des cavités des cibles biologiques. Ceci permet dans certains cas, d'accéder à des poches profondes difficiles d'accès et d'augmenter l'affinité et la sélectivité.<sup>264</sup>

Les halogènes sont des atomes versatiles de forte densité électronique. Le point remarquable de ces atomes réside dans le fait que leur densité électronique est anisotropique.<sup>265</sup> Ainsi, ils sont



à la fois attracteur et donneur d'électrons (Figure 59).<sup>266</sup> Les halogènes qui sont liés de façon covalente à une molécule présentent deux régions :

- Une région de forte densité électronique perpendiculaire à la liaison covalente où le potentiel électrostatique  $\delta^-$  est négatif
- Une région de faible densité électronique (trou  $\sigma$ ) de potentiel positif  $\delta^+$  due à la polarisabilité des atomes d'halogènes (notamment pour l'iode et le brome) qui joue le rôle d'acide de Lewis

Nucleophilic halogen bond acceptor

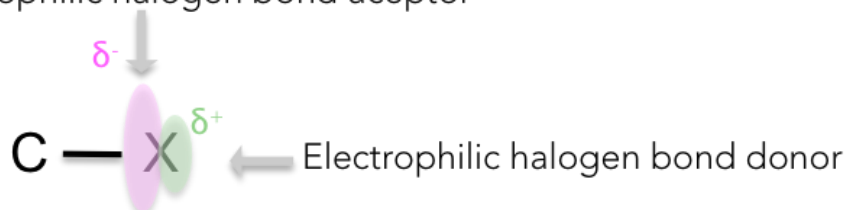


Figure 59 - Schéma de la répartition électronique autour de l'atome d'halogène

La région polarisée  $\delta^+$  établit des interactions avec des sites riches en électron. C'est cette interaction entre l'atome d'halogène et une base de Lewis que l'on appelle liaison halogène, que l'on notera XB. Elle est analogue aux liaisons hydrogènes puisque dans les deux cas, il s'agit d'une interaction entre un donneur d'électron et un accepteur d'électron.<sup>265</sup> La liaison XB est directionnelle, généralement orientée dans le prolongement de la liaison covalente avec un angle idéal de  $180^\circ$  (Figure 60). La capacité des halogènes à agir comme donneur XB suit l'ordre  $\text{At} > \text{I} > \text{Br} > \text{Cl} > \text{F}$ . Ceci s'explique par le trou  $\sigma$  qui augmente avec la polarisabilité et diminue avec l'électronégativité. Le fluor est ainsi nettement moins concerné par ce type d'interaction que les autres atomes de sa colonne. Plus le carbone auquel est lié l'halogène est hybridé, plus il est électroattracteur, ce qui augmente la force de la liaison XB :  $\text{C}(\text{sp})\text{-X} > \text{C}(\text{sp}^2)\text{-X} > \text{C}(\text{sp}^3)\text{-X}$ .<sup>265</sup> La présence de groupements fortement électroattracteurs sur la molécule qui porte l'halogène renforce le trou  $\sigma$ , rendant l'interaction XB plus forte. Plus les groupements électroattracteurs sont proches, plus l'effet est fort. En résumé, la force de l'interaction XB dépend de la nature de l'halogène, de l'hybridation sp du carbone portant le donneur XB et de la présence d'électroattracteurs à proximité de l'halogène en question. La région polarisée  $\delta^-$  permet quant à elle d'établir des liaisons halogènes mais avec des sites donneurs (Figure 60). C'est-à-dire que l'halogène joue ici le rôle de base de Lewis qui est accepteur de liaison H ou de liaison XB.

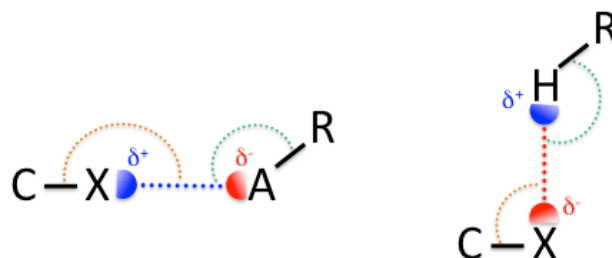


Figure 60 - Représentation 2D de l'interaction d'un halogène X avec un accepteur de liaison halogène (A) et un donneur de liaison halogène

Près de 20 % des médicaments sur le marché ou en essais cliniques sont halogénés. Ce chiffre montre clairement leur rôle clé dans les interactions biologiques.<sup>265,267</sup> De nombreux

exemples mettent en avant les liaisons XB comme responsable de la liaison entre des molécules inhibitrices et les kinases.<sup>265</sup> La majorité des molécules halogénées portent des atomes de fluor, suivi du chlore. Les atomes de brome sont moins courants et les molécules iodées très limitées.<sup>264</sup> On ne retrouve des atomes d'iode que dans les hormones thyroïdiennes. De plus, la liaison C-I est très polarisable donc relativement peu stable. La prédominance du fluor s'explique par sa nature très électronégative qui lui confère la capacité d'être un accepteur faible de liaisons H sans être impliqué dans les liaisons XB.<sup>268</sup> L'introduction d'un fluor sur une molécule permet la modulation de sa lipophilie sans trop en modifier ses autres caractéristiques. C'est un biosystème des hydrogènes et méthyles largement utilisé. Il n'est qu'environ 20 % plus large sur l'hydrogène. De plus, le fluor permet de jouer sur l'acidité des molécules en diminuant le pKa. Des modifications du pKa ont de nombreux impacts sur la solubilité, l'affinité avec la cible, l'absorption, la perméabilité et la métabolisation.<sup>269</sup> Le premier médicament halogéné autorisé en 1955 est d'ailleurs fluorée, il s'agit du corticostéroïde fludrocortisone.<sup>268</sup>

L'introduction d'halogènes sur une molécule à visée thérapeutique est aussi une stratégie pour limiter la métabolisation par les cytochromes p450 *in vivo*.<sup>268</sup> Les liaisons C-X sont moins facilement touchées et constituent une stratégie pour bloquer des positions particulièrement sensibles aux oxydations par les cytochromes.<sup>264</sup>

En résumé, l'introduction d'halogènes sur une molécule a divers effets dans le développement d'un candidat-médicament. Les atomes d'halogènes améliorent l'absorption, la perméabilité, la stabilité chimique et métabolique. Ils établissent également des liaisons halogènes avec la cible biologique ce qui améliore l'activité et la sélectivité du composé. L'encombrement stérique est aussi un facteur qui permet d'améliorer l'affinité.

## IV. Conclusion

Au cours de cette partie, nous nous sommes attachés à modifier la partie I de notre hit initial **EL228**. Les modifications et variations apportées sur cette partie du squelette nous ont amené à synthétiser onze nouveaux composés.

La préparation des composés repose sur la réaction clé du couplage pallado-catalysé de Sonogashira. Certains des hétérocycles introduits ont été synthétisés, comme les différents pyrroles halogénés avec **103**, **109** et **110** et diméthylé avec **122**.

Les résultats obtenus à l'issue du criblage de cette première série nous donnent des éléments préliminaires pour l'étude des relations de structure-activité (Figure 61). Le noyau pyrrolique est le plus actif vis-à-vis de la kinase Aurora B et les halogènes sur le pyrrole en position 4 et 5 sont essentiels au maintien de l'inhibition enzymatique. Néanmoins, les composés dichloré **109** et diiodé **110** présentent de bonnes activités également. Pour autant, nous avons privilégié les atomes de brome par rapport aux atomes d'iode. En effet, ces derniers sont décrits dans la littérature comme peu stables et généralement destinés à cibler la thyroïde. Nous vérifierons

ultérieurement sur d'autres analogues si le pyrrole 4,5-dibromé est bien la partie la plus active par rapport au pyrrole 4,5-dichloré.

Bien que les modifications n'aient pas amené de nouvelles structures plus actives, elles nous ont confirmé que le pyrrole 4,5-dibromé du hit **EL228** est le plus actif. Ainsi, pour les modifications qui vont suivre des parties II et III, nous avons décidé de maintenir le pyrrole 4,5-dibromé sur la partie I de nos analogues.

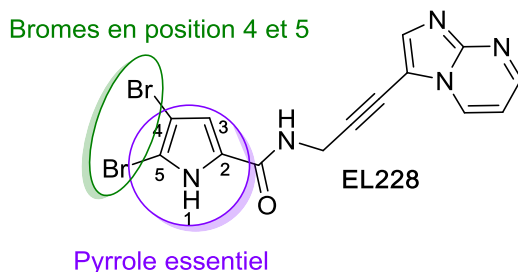


Figure 61 - Premiers éléments de l'étude SAR

# **Chapitre III**

## **Pharmacomodulations**

### **de la partie II**



# Chapitre III – Pharmacomodulations de la partie II

## I. Introduction

La modification de la partie II du hit **EL228** (Figure 62) pour les études de relations structure-activité sur Aurora B est un objectif important de ce projet. Les pharmacomodulations réalisées sur cette partie de la molécule sont présentées dans ce chapitre. Au vu des résultats biologiques présentés dans le chapitre II, nous avons choisi de conserver la partie 4,5-dibromopyrrole qui s'est montrée parmi les deux plus actives lors des modifications de la partie I du hit. Nous avons ainsi introduit divers hétérocycles aromatiques pour explorer cette position.

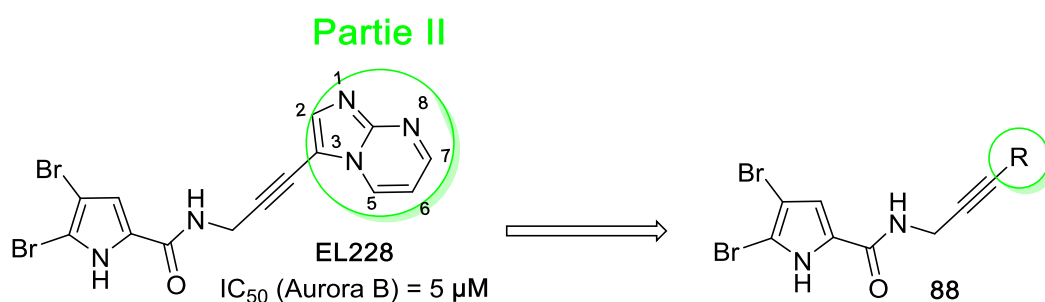


Figure 62 – Modifications de la partie II

La synthèse des composés comporte en dernière étape le couplage de Sonogashira des hétérocycles halogénés avec l'alcyne de la propargylamine acylée **83**, dont la synthèse a été précédemment présentée (Figure 63). Nous avons introduit des hétérocycles de tailles différentes comme la pyridine, l'imidazole, le thiophène, l'indole etc., mais également des bicycles similaires au noyau imidazo[1,2-a]pyrimidine, que l'on notera imidazo[1,2-a]N-pyridine, et parfois substitués.

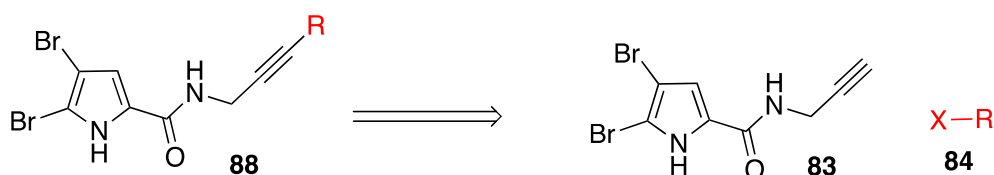
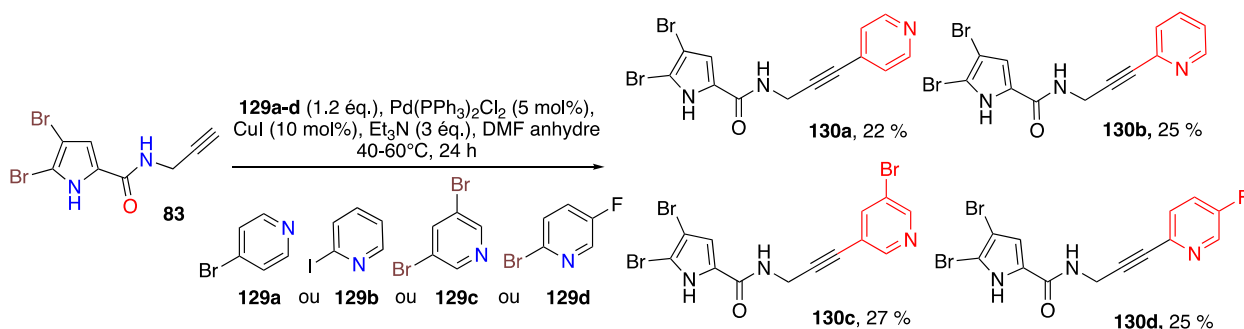


Figure 63 – Rétrosynthèse des produits de type 88

## II. Synthèses des analogues

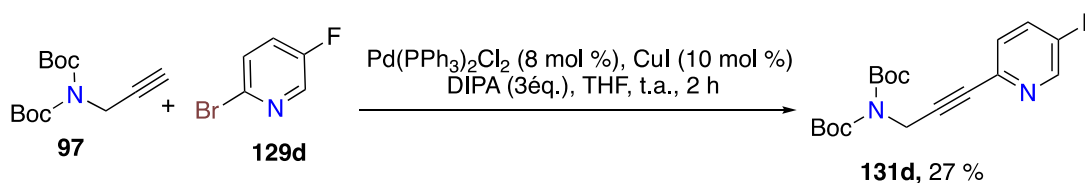
### 1. Introduction d'hétérocycles aromatiques variés

Une première série de dérivés fut préparée au laboratoire à partir de dérivés de la pyridine halogénés **129a-d** et du 4-iodo-imidazole **133**. Les substrats halogénés **129a-d** ont été engagés dans le couplage de Sonogashira dans le DMF anhydre. Les rendements en produits isolés sont globalement faibles en raison de leur mauvaise solubilité qui a rendu les purifications souvent laborieuses (Schéma 15).



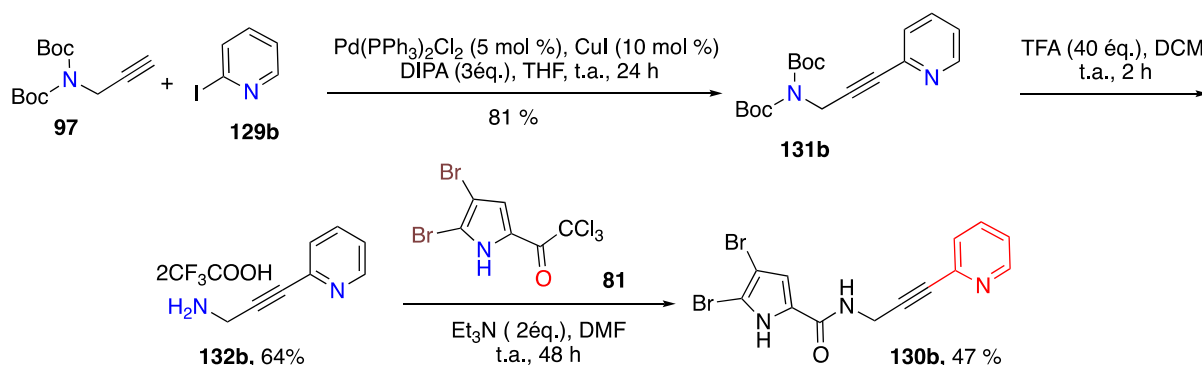
**Schéma 15 - Préparation des composés 130a-d par couplage de Sonogashira**

Pour tenter d'améliorer les rendements, nous avons testé la voie visant à d'abord procéder au couplage de Sonogashira avec la propargylamine protégée **97** et les hétérocycles halogénés pour ensuite acyler avec le pyrrole acide carboxylique. Cette approche a été testée tout d'abord avec la 2-bromo-5-fluoropyridine (**129d**) (Schéma 16). Le rendement du couplage de Sonogashira du composé **131d** n'est que de 27 %.



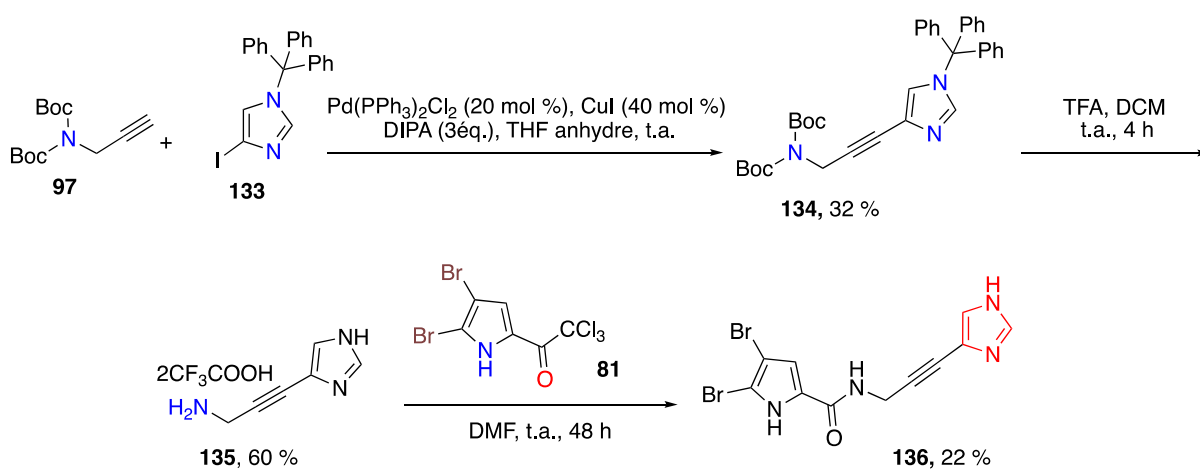
**Schéma 16 – Deuxième stratégie de synthèse du produit 131d par couplage de Sonogashira avec la propargylamine protégée**

La même réaction testée sur le 2-iodopyridine **129b** (Schéma 17) donne un rendement de 81 %, bien supérieur à celui obtenu pour **130b** (25 %). L'alcyne **131b** est ensuite déprotégé en **132b** avec du TFA puis couplé avec le pyrrole **81** pour obtenir le produit final **130b** avec 47 % de rendement. En termes de rendement et de nombre d'étapes, la seconde voie présentée sur le Schéma 17 comporte quatre étapes et un rendement global de 24 %, tandis que la stratégie précédemment employée comporte trois étapes et un rendement global de 18 %. Bien que le rendement soit légèrement supérieur, cette approche n'est pas la plus efficace puisqu'il faut systématiquement trois étapes successives pour chacun des hétérocycles. A l'exception de certains cas, la stratégie présentée sur le Schéma 15 est celle qui sera de préférence utilisée. L'alcyne **83** peut être préparé en grande quantité et la diversification peut se faire grâce à une seule étape de façon divergente.



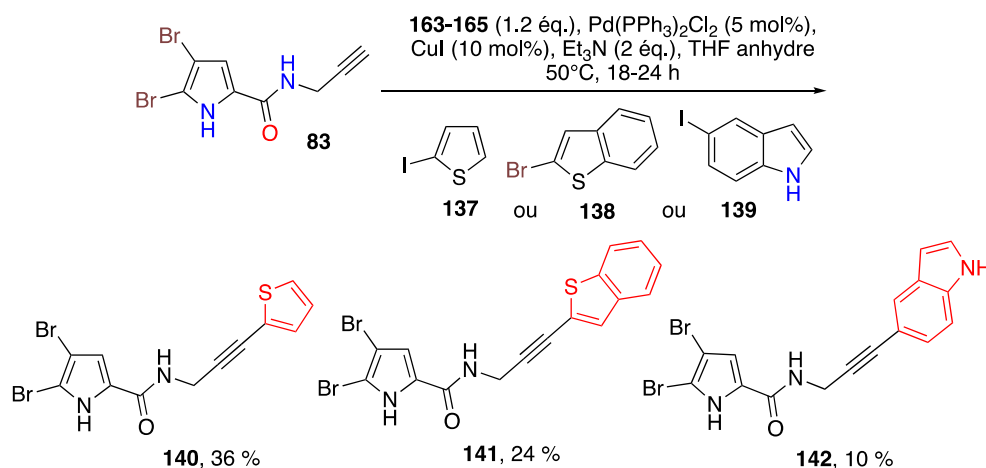
**Schéma 17 – Synthèse du produit 130b par la deuxième stratégie**

L'approche consistant à utiliser le couplage de Sonogashira en première étape a tout de même été utilisée pour introduire un noyau imidazole (Schéma 18), l'autre stratégie n'ayant pas été fructueuse avec l'imidazole protégé **133**. C'est donc avec un rendement global faible que le produit **136** a été obtenu.



**Schéma 18 - Synthèse du dérivé imidazolique 136 par la deuxième stratégie**

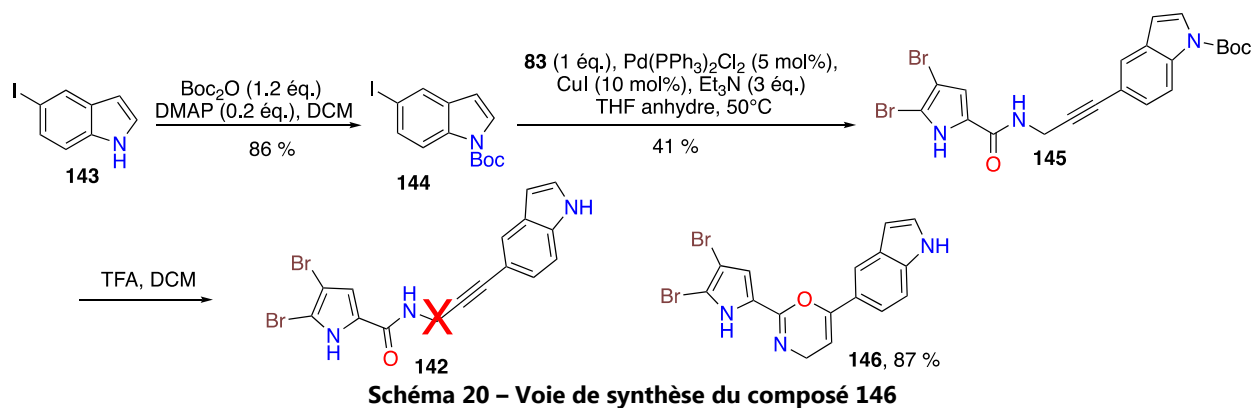
Nous avons ensuite utilisé l'iodothiophène **137**, le bromobenzothiophène **138** et l'iodoindole **139** dans un couplage de Sonogashira avec l'alcyne **83** (Schéma 19). Nous avons obtenu les trois dérivés thiophène **140**, benzothiophène **141** et indole **142**. Le composé **142** fut obtenu avec un rendement très faible de 10 % nous laissant penser qu'il est nécessaire de protéger l'azote de l'indole **165**.



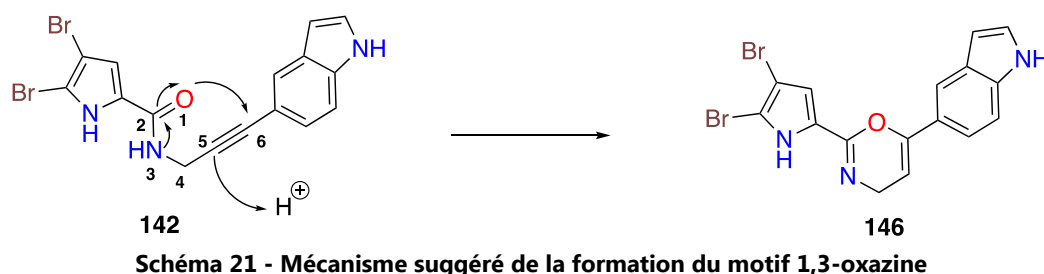
**Schéma 19 - Synthèse des produits 140-142**

Afin d'améliorer le rendement, l'indole **143** a été protégé avec un groupement Boc<sup>270</sup> puis mis en réaction avec l'alcyne **83** (Schéma 20). Le produit **145** du couplage de Sonogashira a été obtenu avec un meilleur rendement de 41 % au lieu de 10 %. Cependant la réaction de déprotection de **145** en milieu acide n'a pas donné le composé attendu **142** mais le produit de réarrangement **146**, issu de la cyclisation intramoléculaire, que nous avons pu identifier par analyse RMN.

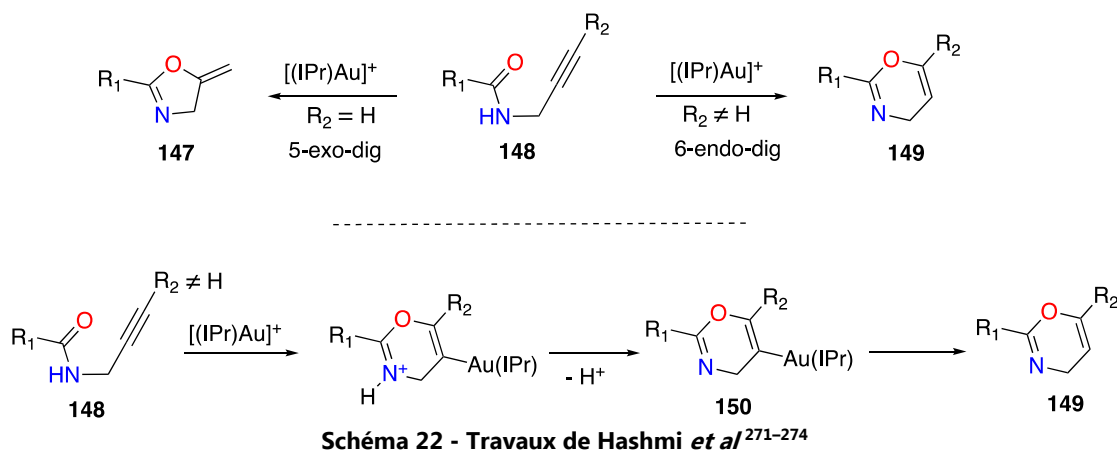




Le produit 1,3-oxazine **146** est issu de la cyclisation 6-endo-dig du produit de couplage déprotégé **142** entre le carbonyle et la triple liaison. Le mécanisme possible serait l'activation de l'alcyne en milieu acide, puis addition nucléophile de l'oxygène de l'amide sur la position 6 (Schéma 21).



Ce même motif a été décrit par Hashmi *et al.* en utilisant des catalyseurs à l'or Au (I) (Schéma 22).<sup>271-274</sup> Son équipe a développé une méthodologie pour accéder au composé alkylidene oxazoline **147** à partir de l'alcyne terminal **148** ( $R_2 = H$ ) avec des catalyseurs à l'or. Cependant, en utilisant des alcynes disubstitués, seul le composé oxazine **149** a pu être isolé avec des catalyseurs Au (I), avec des rendements allant jusqu'à 95 % après optimisation. Il peut cependant paraître surprenant que nous obtenions ce motif oxazine sans catalyseur, d'autant plus que le produit **146** a été obtenu avec un très bon rendement de 87 %. Néanmoins, ce type de cyclisation au cours d'un couplage de Sonogashira, d'une fonction carboxyle sur la triple liaison pour conduire à des cycles furanes a déjà été observé.<sup>275</sup>



Nous avons également utilisé le 7-bromo-2-méthyl-1H-indole **151** pour accéder au dérivé **152** (Schéma 23). Nous nous sommes heurtés à un problème de réactivité, puisque le couplage

de Sonogashira entre l'alcyne pyrrolique **83** et la propargylamine protégée ne nous a pas permis d'obtenir le produit. Aucune conversion n'est observée même en augmentant le temps de réaction et la température ; les réactifs finissent par se dégrader. La protection du N-H de **151** avec un groupement Boc a également été infructueuse, conduisant à un mélange complexe. Ces difficultés de synthèse sont probablement dues à la gêne stérique entre l'azote et l'atome de brome. Nous n'avons ainsi pas poursuivi nos efforts avec ce substrat.

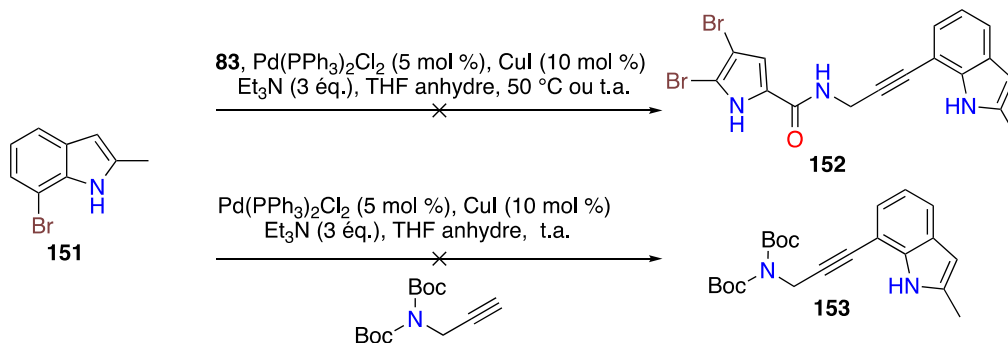


Schéma 23 – Tentatives d'accès aux produits **152** et **153**

Le composé 7-azaindole **156** a été préparé à partir du produit de départ **154** (Schéma 24). Une première étape d'iodation nous a permis d'obtenir le 7-azaindole iodé **155**<sup>276,277</sup> qui a ensuite été engagé dans un couplage de Sonogashira. Malheureusement, la réaction n'a conduit qu'à la dégradation des produits de départ dans le milieu réactionnel. Nous avons alors pensé que la protection par le groupement Boc était nécessaire. Le produit protégé **157**<sup>277</sup> ainsi préparé a donné le produit **158** quantitativement. Malheureusement, la déprotection de **158** en milieu acide avec le TFA dans le dichlorométhane ou avec du K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> dans le méthanol à température ambiante<sup>278</sup> ne nous ont pas permis d'isoler le produit **156** souhaité, seule de la décomposition a pu être observée.

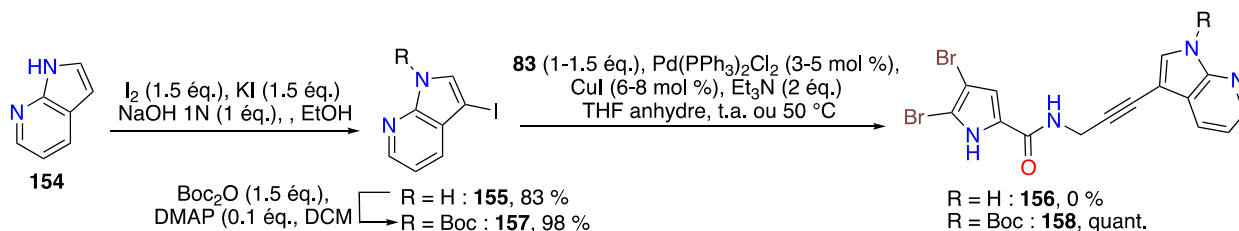


Schéma 24 – Synthèse du produit protégé **158** à partir du 7-azaindole

Nous avons alors utilisé le groupement protecteur benzènesulfonyle.<sup>276,279,280</sup> La protection de **155** en **159** est alors obtenue avec un très bon rendement de 98 %. Le couplage avec l'alcyne **83** a donné **160** avec 60 % de rendement. Pour finir, l'utilisation du TBAF a conduit à l'alcyne déprotégé **156** avec un rendement de 61 %.<sup>276</sup>

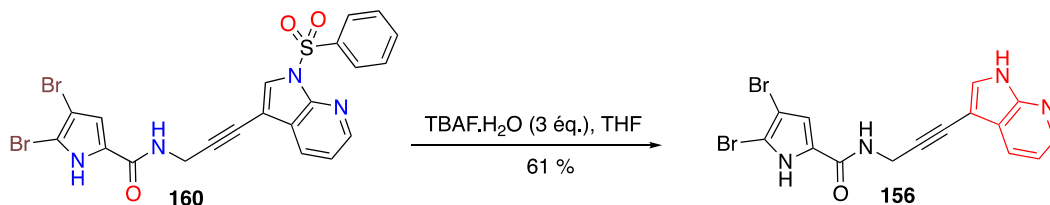
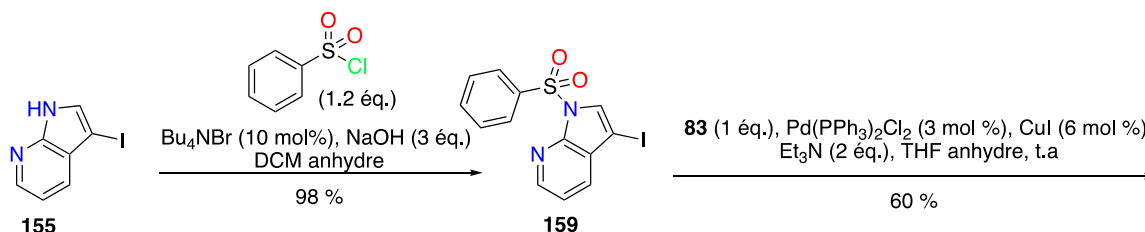


Schéma 25 – Synthèse du produit azaindolique 156

## 2. Modifications de l'imidazo[1,2-a]pyrimidine en imidazo[1,2-a]-N-pyridine

Après avoir modifié la partie II avec divers hétérocycles, nous avons décidé de modifier le bicyclic imidazolique en faisant varier la position de l'azote pour obtenir des analogues de imidazo[1,2-a]-N-pyridine (Figure 64). Nous avons envisagé la préparation des produits portant les bicyclics imidazo[1,2-a]-N-pyridine largement retrouvés dans les molécules bioactives,<sup>281</sup> que sont les noyaux imidazo[1,2-a]pyrazine **161**,<sup>282-284</sup> pyrimidine **162**, pyridazine **163**<sup>285</sup> et pyridine **164**.<sup>286</sup>

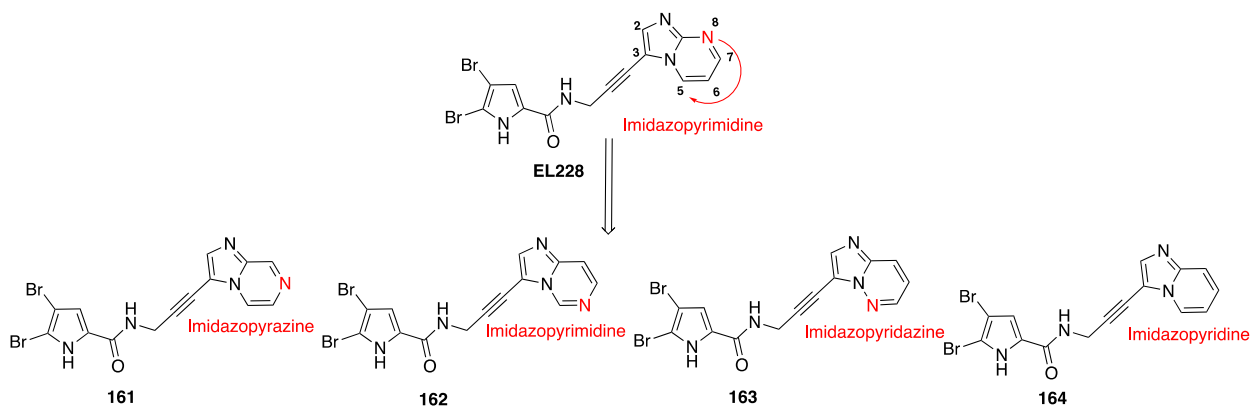


Figure 64 – Produits envisagés pour cette série

Les bicyclics iodés **167**<sup>287,288</sup>, **169**<sup>289</sup> et **172**<sup>288,290</sup> ont été préparés suivant les modes opératoires de la littérature par condensation des cycles aromatiques **165**, **168** ou **170** avec le chloroacétaldéhyde à reflux dans l'éthanol. La réaction d'iodation est réalisée avec du diiode dans la pyridine ou avec le N-iodosuccinimide dans l'acétonitrile (Schéma 26). Le bicyclic iodo-imidazopyridazine **169** a pu être préparé de façon séquentielle *one-pot*. L'halogénéation se fait de façon sélective en position C-3, compte tenu des formes de résonance qui favorise cette position pour les substitutions électrophiles aromatiques.<sup>291</sup>

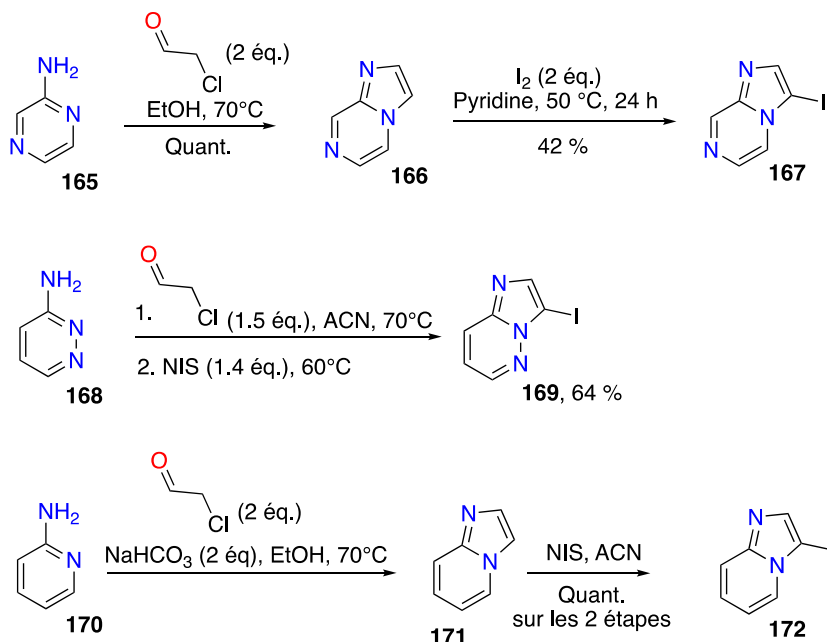


Schéma 26 - Préparation des bicycles iodés

Les intermédiaires iodés **167**, **169** et **172** ont été engagés dans le couplage de Sonogashira avec l'alcyne **83** (Schéma 27).<sup>292</sup> Le produit **163** s'est avéré particulièrement peu soluble dans les solvants organiques utilisés, expliquant le faible rendement en produit isolé.

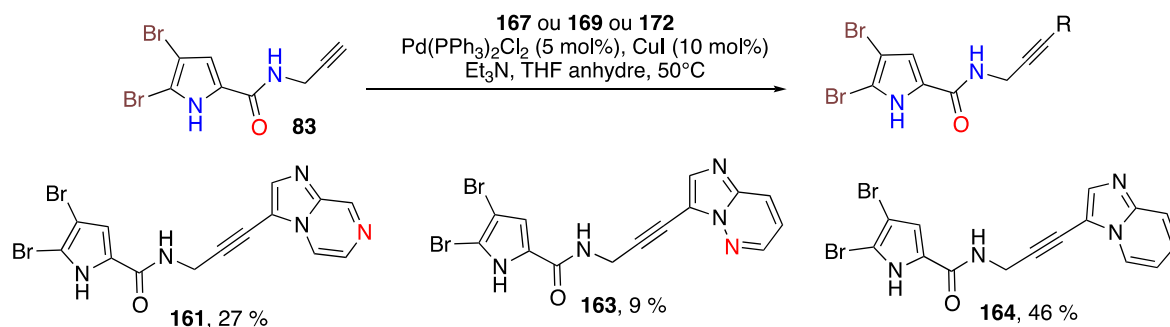


Schéma 27 - Préparation des produits **161**, **163** et **164** par couplage de Sonogashira

Pour résumer, nous avons préparé pour cette série trois composés présentant le même bicyclic que le chef de file **EL228** en variant la position de l'azote pour les composés imidazopyrazine **161** et imidazopyridazine **163**, et en remplaçant cet azote par un CH pour le composé imidazopyridine **164**. Seul le produit **162** n'a pu être préparé dû à un problème d'accès à la 4-aminopyrimidine **175a** (Schéma 28). Sa synthèse est décrite dans une publication de Linz *et al*<sup>293</sup> à partir du 3-éthoxyacrylonitrile **173** et de l'acétate de formamidine **174** en présence du méthanolate de sodium à 75°C. Malgré de nombreux essais en se basant sur le mode opératoire décrit (Tableau 5), nous n'avons pas été en mesure de préparer le produit **175**. Le réactif **173** était retrouvé quasi-systématiquement après des temps de réactions allant jusqu'à 55 h de réaction.

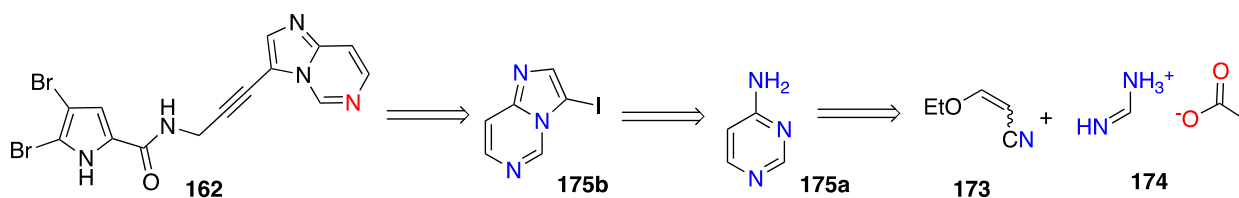


Schéma 28 – Rétrosynthèse du composé 162

Tableau 5 – Conditions de synthèse testées pour la préparation de 175a

Entrée	Conditions
1	NaOMe (1.8 équ.), Isopropanol, 80°C, 28 h
2	NaOMe (2.5 équ.), Isopropanol, 100°C, 26 h
3	NaOMe (2.0 équ.), MeOH anhydre, 80°C, 55 h
4	NaOMe (2.0 équ.), MeOH anhydre, reflux, 24 h
5	NaOMe (2.0 équ.), Pyridine, 90°C, 16 h
6	DBU (2.0 équ.), Pyridine, 90°C, 24 h

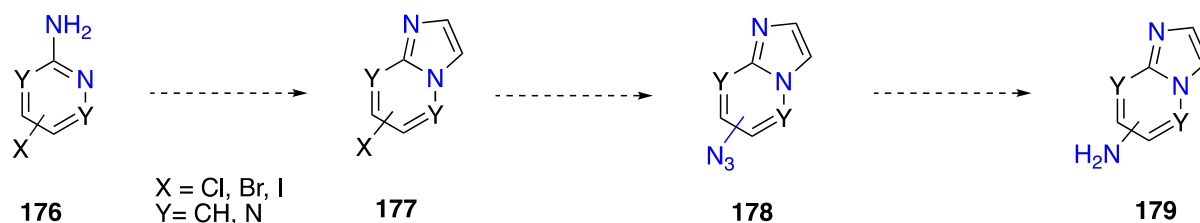
### 3. Introduction d'une amine exo-cyclique

#### a. Synthèses via la formation d'un azote par substitution d'un halogène

Le bicyclic d'**EL228**, présente en position 8 un azote accepteur de liaison hydrogène. De la même façon, les composés **161** et **163** présentent cet atome accepteur de liaison hydrogène en position 5 et 7, tandis que le composé **164** en est dépourvu. Il nous a semblé intéressant d'introduire un groupement cette fois-ci donneur de liaison hydrogène sur ces mêmes positions. Ces interactions pourraient avoir leur importance dans l'affinité de l'inhibiteur avec la protéine. Le remplacement d'un accepteur de liaison H par un donneur peut permettre une augmentation de l'activité inhibitrice des composés. Nous avons décidé de préparer les composés **179** portant une fonction amine primaire, elle-même susceptible d'être modifiée par acylation.

Une première approche a consisté à synthétiser les produits **179** à partir des cycles halogénés **176** correspondants (Schéma 29). Cette approche synthétique repose sur la substitution

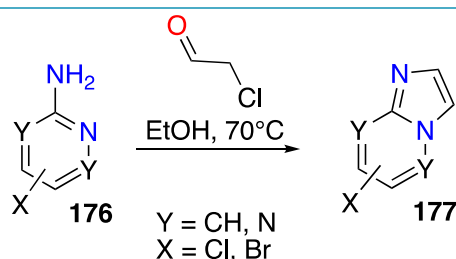
nucléophile aromatique de l'halogène **177** par l'azoture de sodium puis sur une réduction de Staudinger pour obtenir les produits de type **179**.



**Schéma 29 - Stratégie de synthèse de 179 à partir des cycles halogénés correspondants puis par azidation**

Divers noyaux halogénés de type 2-aminopyridine **176a-d**, 2-aminopyrimidine **176e** et 2-aminopyridazine **176f** ont été cyclisés pour donner les six produits **177a-f** avec de très bons rendements (Tableau 6).

**Tableau 6 – Synthèse des produits cyclisés 177a-f**



Réactif	Produit <sup>Ref.</sup>	Rendement	Réactif	Produit <sup>Ref.</sup>	Rendement
	<sup>294</sup>	88 %		<sup>295</sup>	Quant.
	<sup>296</sup>	Quant.		<sup>297</sup>	95 %
	<sup>298</sup>	Quant.		<sup>285</sup>	98 % (Réaction dans le n-butanol à 100°C)

L'étape suivante est une réaction de substitution nucléophile aromatique (S<sub>N</sub>Ar) sur l'halogène. Dans la littérature, la conversion d'halogène en amine primaire sur ce type de squelette se fait dans des conditions drastiques comme l'utilisation d'ammoniaque gazeux, peu commodes à mettre en place au laboratoire.<sup>299–301</sup> C'est pour cette raison que l'approche avec l'azoture de sodium dans le DMF nous a semblé plus facile à mettre en œuvre.<sup>302–304</sup> Malgré les nombreux essais en variant le solvant de réaction et la température, avec notamment du cuivre ou du NH<sub>4</sub>Cl,<sup>305</sup> nous n'avons pas réussi à obtenir les produits azidés **178**. Les essais ont été menés aussi bien sur les produits cyclisés **177** que sur les produits de départ **176**, sans résultats. L'utilisation

de différents substrats pour faire varier la réactivité n'a pas permis la formation de l'azoture désiré et aucune conversion n'a été observée. La présence de groupements électroattracteurs sur le bicyclic semble nécessaire pour améliorer la réactivité.<sup>302</sup>

L'approche d'azidation par substitution nucléophile au  $\text{NaN}_3$  ne nous ayant pas permis d'accéder aux produits désirés, nous avons souhaité utiliser la réaction d'azidation électrophile par le tosyl-azide ou son homologue le 2,4,6-triisopropylbenzenesulfonyl azide comme source de « $\text{N}_3^+$ » après échange de l'halogène par le lithium à l'aide du  $n\text{-BuLi}$ .<sup>306,307</sup> De la même manière, les essais n'ont montré que de la dégradation des produits de départ. Devant ces tentatives infructueuses, nous avons envisagé d'autres approches pour accéder aux produits souhaités **179**.

## b. Synthèses à partir des diaminopyridines ou amino-nitropyridines

L'introduction d'une fonction amine n'étant pas aisée sur des cycles de type aminopyridines à partir des halogénures correspondants, nous nous sommes tournés vers les réactifs commerciaux possédant une fonction amine ou nitro déjà installées. La Figure 65 montre les trois produits de départ **180-182** correspondants à nos critères pour synthétiser les intermédiaires **183-185**.

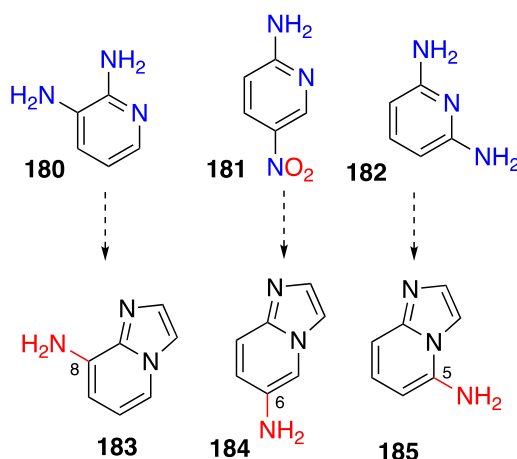
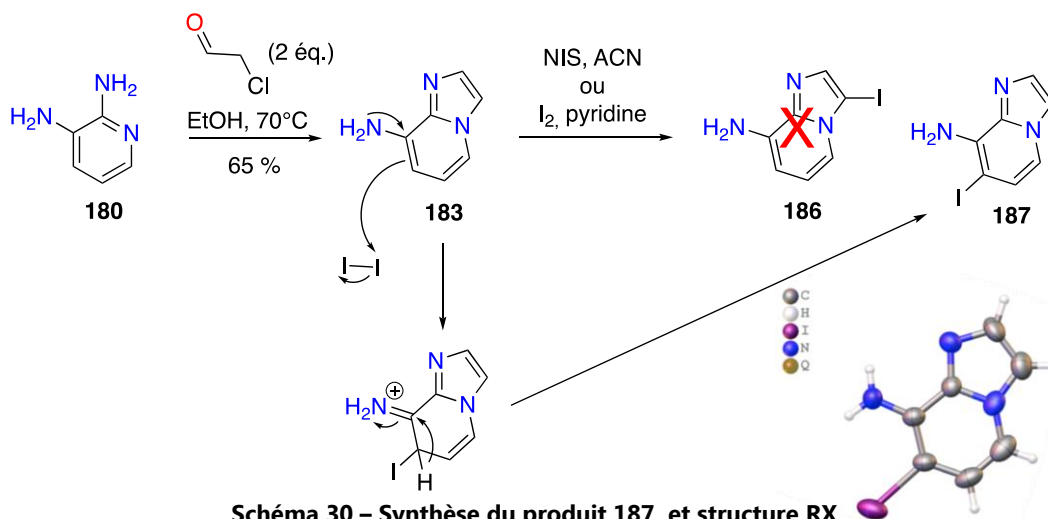


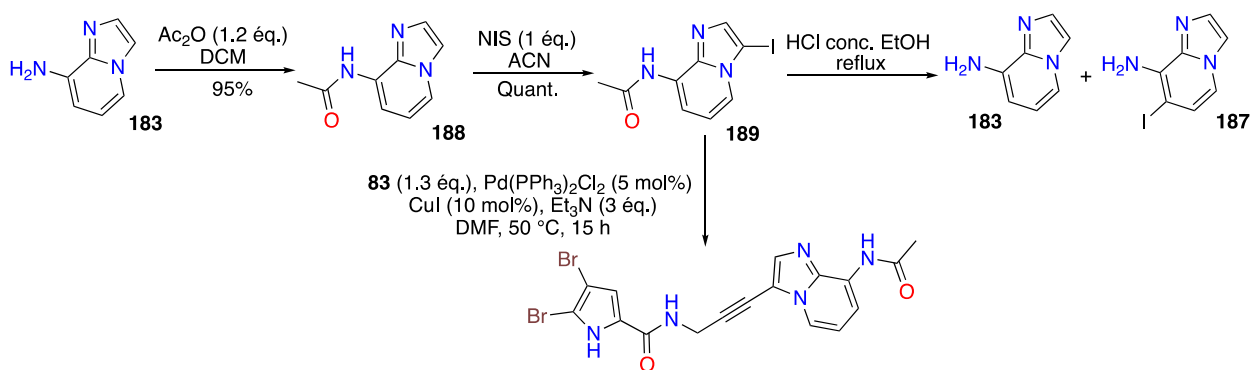
Figure 65 – Réactifs commerciaux permettant l'accès aux dérivés portant une amine exo-cyclique

### i. Amine en position 8

Le réactif 2,3-diaminopyridine **180** a été cyclisé dans les conditions précédemment utilisées pour obtenir le bicyclic **183**.<sup>301,308</sup> Ensuite, plusieurs essais d'iodation par le N-iodosuccinimide ou avec le diiode dans la pyridine ont été mis en œuvre pour obtenir le produit souhaité **186**. Cependant au cours de nos divers tests, les analyses par spectrométrie de masse ont montré la formation du produit iodé et du produit diiodé. Bien que leur séparation ne fût pas évidente, l'analyse RMN du produit mono-iodé nous a révélé la formation du produit régioisomère non désiré **187**. Ce produit **187** étant cristallin, sa structure a pu être confirmée par analyse RX. L'amine non protégée oriente l'iodation de façon régiosélective en  $\alpha$ .



La régiosélectivité de l'iodation n'étant pas celle désirée, nous avons protégé l'amine sous forme d'acétamide pour désactiver son effet d'orientation en ortho. Selon la littérature, l'iodation de **188** se fait de façon sélective et quantitative vers le régioisomère **189**.<sup>309</sup> Les essais de déprotection effectués sur l'intermédiaire iodé **189** en milieu acide trop drastiques entraînent la perte de l'iode avec la formation de **183** et la régioisomérisation en **187**, suite à l'attaque de l'iode libéré dans le milieu en ortho de l'amine déprotégée *in situ*. Nous avons néanmoins engagé le produit acylé **189** dans le couplage de Sonogashira avec l'alcyne **83** pour obtenir le produit **190**, afin d'apporter de la diversité à cette série avec un amide.<sup>309</sup>



Des groupements protecteurs Boc ont été utilisés pour protéger l'amine **183** afin d'orienter la régiosélectivité de l'iodation du composé **191** (Schéma 32).<sup>309</sup> Le produit **193** issu du couplage de Sonogashira a été obtenu avec un bon rendement. Sa déprotection au TFA fournit le produit déprotégé **194** fut obtenu avec un rendement de 70 %. Aucun produit de type 1,3-oxazine (comme **146**, Schéma 20) n'a été détecté dans le milieu réactionnel.



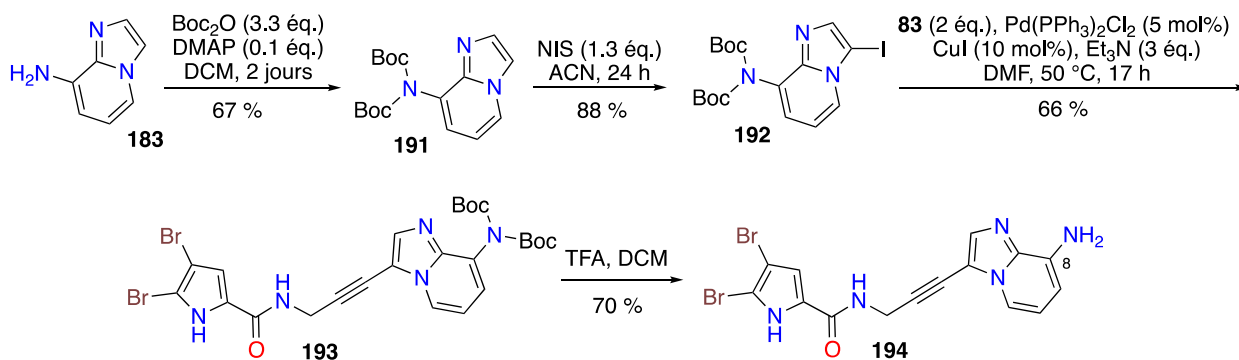


Schéma 32 – Synthèse du produit 194 via la protection au Boc

## ii. Amine en position 5

Le produit cyclisé et protégé **195** fut préparé à l'aide de la séquence réactionnelle décrite dans la littérature à partir de la 2,6-diaminopyridine **182**.<sup>310</sup> La réaction d'iodation n'a pas permis d'obtenir le produit désiré **196**. En effet, malgré l'utilisation de divers agents d'halogénéation (NIS, I<sub>2</sub> et NBS) dans différentes conditions (Tableau 7), la position d'iodation semble gênée par l'encombrement stérique des deux groupements Boc conduisant à de nombreux produits secondaires observés en CCM mais pas le produit **196**. Le bicyclic mono-protégé **197** a alors été préparé selon la littérature<sup>311</sup> pour n'avoir qu'un seul groupement Boc moins encombrant. Son iodation a conduit au même résultat que dans le cas de **187**, il semble que l'amine ne soit pas suffisamment désactivée et oriente aussi l'iodation en ortho, puisque seul le produit **198** a été isolé. Les problèmes de régiosélectivité de l'iodation du produit non protégé et le manque de réactivité du produit protégé **202** ne nous ont pas permis de poursuivre nos efforts sur le produit aminé en position 5 **185**.

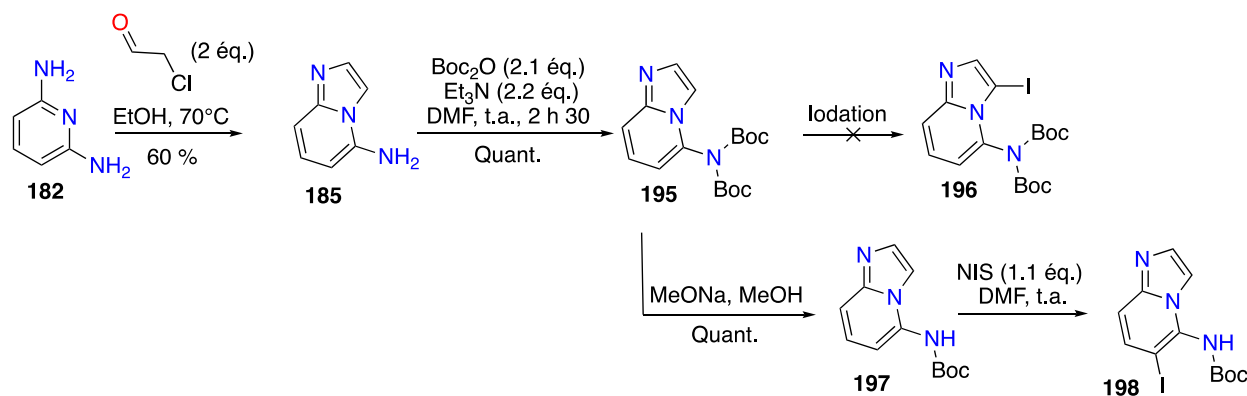


Schéma 33

Tableau 7 - Conditions d'iodation du produit 196

Entrée	Agent d'halogénéation	Solvant	Conditions
1	NIS (1.1 équ.)	DCM	t.a., 2 jours
2	NIS (1.2 équ.)	ACN	t.a., 4 h
3	NIS (1.3 équ.)	CHCl <sub>3</sub>	Reflux
4	I <sub>2</sub> (1.1 équ.)	Pyridine	t.a., 16 h

<b>5</b>	I <sub>2</sub> (1.1 éq.) + AgTFA (1.1 éq.)	DCM	t.a., 20 h
<b>6</b>	NBS (1.2 éq.)	ACN	t.a., 16 h

### iii. Amine en position 6

Comme la synthèse du produit **194** portant l'amine en position 8, nous avons préparé le produit **202** substitué en position 6 (Schéma 34). Le produit de départ nitré **181** fut d'abord cyclisé avant d'être réduit par du chlorure d'étain(II).<sup>312,313</sup> L'amine **184** est ensuite protégée avec des groupements Boc puis iodée de façon régiosélective. Le couplage de Sonogashira suivie d'une déprotection au TFA donnent accès au produit **202**.

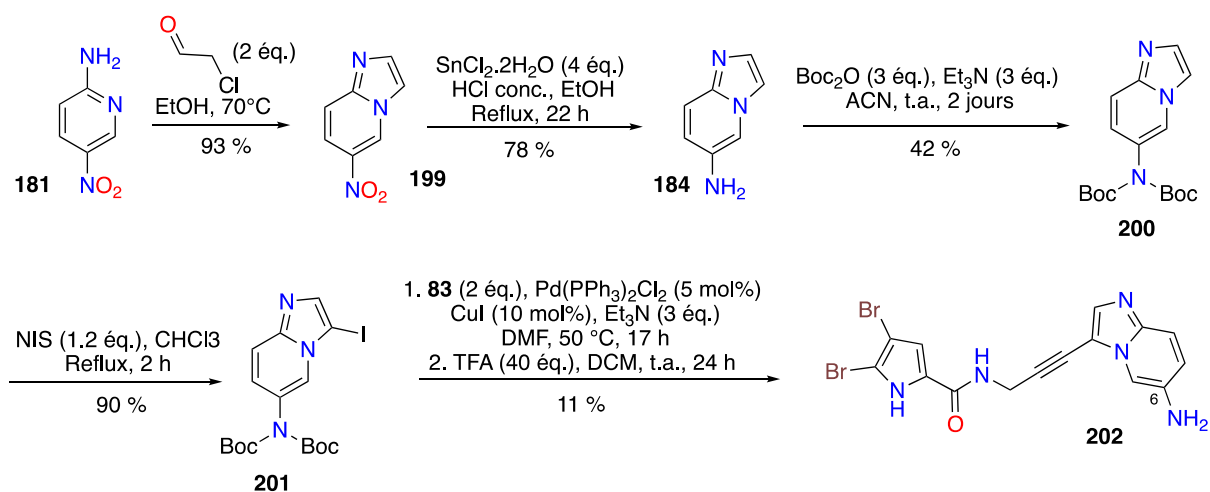


Schéma 34 – Synthèse du dérivé 202

Pour conclure sur cette partie, l'introduction d'une amine exo-cyclique sur le noyau bicyclique a posé des problèmes de réactivité et de sélectivité. Plusieurs approches synthétiques ont été testées comme la substitution nucléophile aromatique d'un halogène par un azoture ou l'utilisation de cycles possédant une amine ou une fonction nitro. En conclusion, nous avons pu obtenir trois produits avec une amine exocyclique pour les évaluations biologiques (Figure 66). Les composés **190** et **194** possèdent une amine en position 8, libre ou acétylée, et le composé **202** une amine libre en position 6.

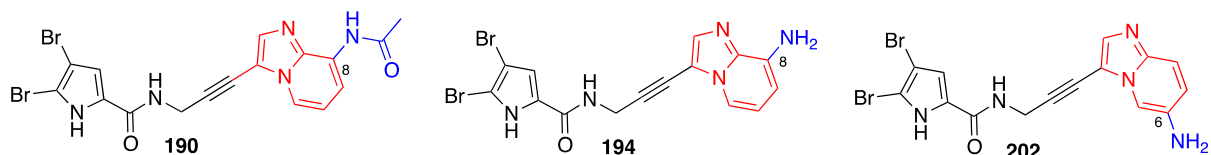


Figure 66 – Produits synthétisés 190, 194 et 202 avec une amine exo-cyclique primaire ou secondaire

## 4. Introduction de divers substituants sur le noyau imidazo[1,2-a]pyridine

### a. Substituants halogénés et méthyles

Nous avons préparé une série de composés portant une substitution sur le bicyclic imidazo[1,2-a]pyridine pour en étudier les effets. L'objectif était d'évaluer si ce noyau peut tolérer des substitutions en termes d'activité biologique afin d'explorer de nouveaux espaces chimiques sur ses positions. Les résultats de la préparation d'une librairie d'imidazo[1,2-a]pyridines substituées en utilisant la même séquence que précédemment sont présentés dans le Tableau 8.

**Tableau 8 – Rendements de synthèse des intermédiaires substitués cyclisés puis iodés (205)**

Produit de départ	Produit cyclisé <sup>Ref.</sup>	Produit iodé <sup>Ref.</sup>	Produit de départ	Produit cyclisé <sup>Ref.</sup>	Produit iodé <sup>Ref.</sup>
 <b>203a</b>	 <b>204a</b> <sup>314</sup> (79 %)	 <b>205a</b> <sup>315</sup> (93 %)	 <b>176b</b>	 <b>177b</b> <sup>296</sup> (Quant.)	 <b>205f</b> <sup>296</sup> (87 %)
 <b>203b</b>	 <b>204b</b> <sup>316</sup> (Quant.)	 <b>205b</b> <sup>317</sup> (79 %)	 <b>203g</b>	 <b>204g</b> <sup>317</sup> (90 %)	 <b>205g</b> <sup>317</sup> (68 %)
 <b>203c</b>	 <b>204c</b> <sup>316</sup> (Quant.)	 <b>205c</b> <sup>317</sup> (89 %)	 <b>203h</b>	 <b>204h</b> <sup>318</sup> (92 %)	 <b>205h</b> (65 %)
 <b>176c</b>	 <b>177c</b> <sup>298</sup> (Quant.)	 <b>205d</b> <sup>298</sup> (94 %)	 <b>176d</b>	 <b>177d</b> <sup>295</sup> (Quant.)	 <b>205i</b> <sup>295</sup> (97 %)
 <b>203e</b>	 <b>204e</b> <sup>319</sup> (33 % avec l'étape de protection)	 <b>205e</b> <sup>319</sup> (97 %)			

Les intermédiaires iodés nous ont permis d'obtenir par couplage de Sonogashira avec **83** les produits finaux **206-214** (Schéma 35). Ces neuf nouveaux produits possèdent des halogènes ou des méthyles sur les positions 6, 7 ou 8.

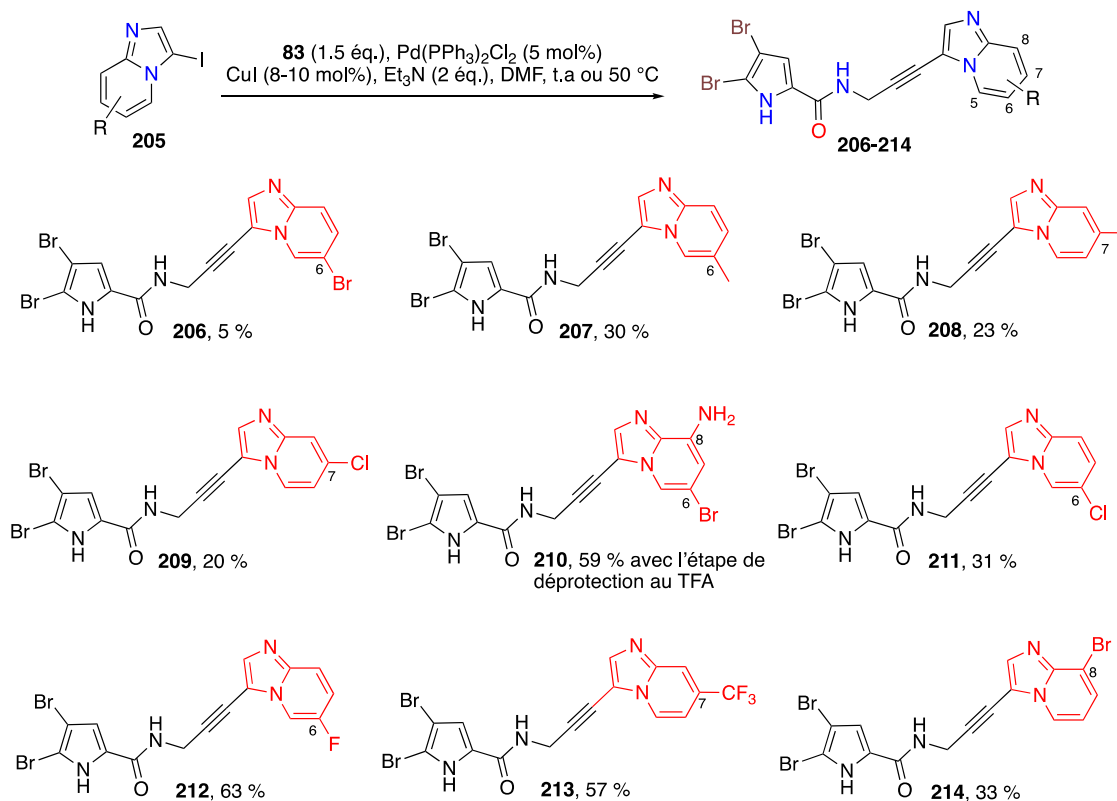


Schéma 35 – Synthèse des produits 206-214

## b. Groupements salifiables par couplage de Buchwald-Hartwig

Nous avons souhaité introduire des groupements salifiables pour améliorer la solubilité en milieu aqueux. L'idée est d'évaluer si ce type de groupes peut être bien toléré pour l'activité et s'il est en mesure d'influer sur les caractéristiques physicochimiques des produits. N'ayant à ce stade que peu d'informations sur le mode d'action, nous avons décidé d'introduire les groupes morpholine et pipérazine, qui sont deux noyaux basiques salifiables classiquement utilisés pour les inhibiteurs de kinases.<sup>320</sup>

Le Schéma 36 présente la voie de synthèse permettant l'introduction de la morpholine et de la pipérazine en position 6 du bicyclic imidazo[1,2-a]pyridine. La première étape à partir des composés halogénés **204a** et **204g** est une réaction de Buchwald-Hartwig catalysée par le tris(dibenzylidèneacétone)dipalladium en présence de 10 mol% de ligand XPhos.<sup>321,322</sup> Les produits de couplage sont ensuite iodés par le N-iodosuccinimide pour obtenir les intermédiaires **216** et **219**.<sup>323</sup> Finalement, le couplage avec l'alcyne **83** fournit le produit pipérazine protégé **220** qui est déprotégé en milieu acide pour donner le produit désiré **221**.

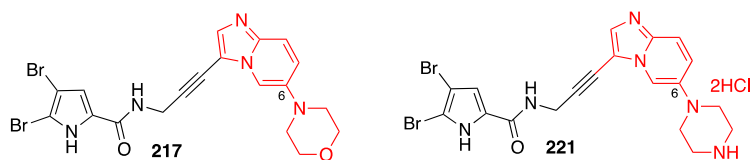
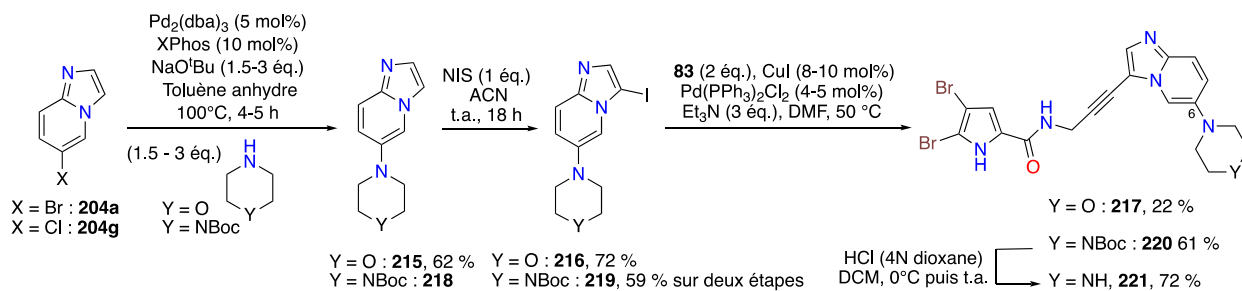


Schéma 36 – Synthèse des produits **217** et **221**

Nous avons également tenté de préparer les régioisomères de **217** et **221** substitués en position 7. Nous étions surpris de ne pas être en mesure de coupler les intermédiaires iodés convenablement substitués en position 7 avec l'alcyne **83**. Seuls les réactifs dé-iodés ont été isolés à l'issue du couplage de Sonogashira. Il serait intéressant de chercher à expliquer la raison de cet échec, mais nous avons choisi d'orienter nos recherches vers d'autres priorités.



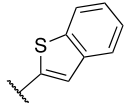
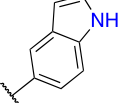
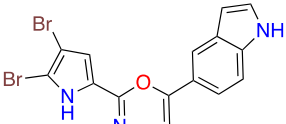
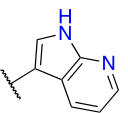

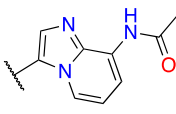
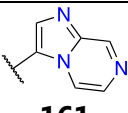
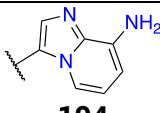

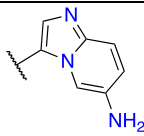
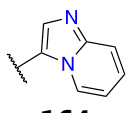
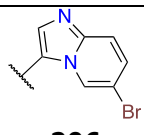
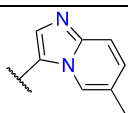
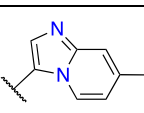
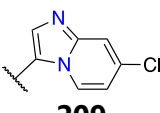
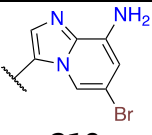
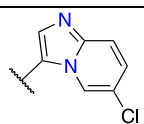
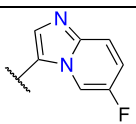
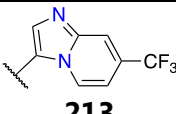
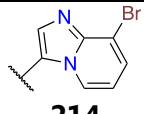
### III. Évaluation biologique et discussion

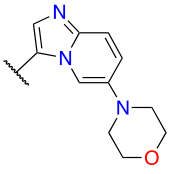
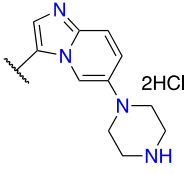
#### 1. Criblage primaire et IC<sub>50</sub> des composés les plus actifs

Comme dans le chapitre précédent, l'ensemble des vingt-huit nouvelles molécules finales synthétisées de ce chapitre ont été évaluées à 10 μM et 1 μM sur un panel d'une dizaine de kinases dont Aurora B. Pour les molécules présentant une activité inhibitrice intéressante à 1 μM sur la kinase Aurora B, les IC<sub>50</sub> ont été déterminées. Les valeurs d'inhibition à 10 et 1 μM sont présentées dans le Tableau 9. L'intégralité du criblage est disponible en annexe 2.

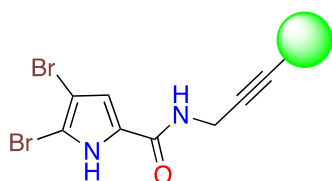
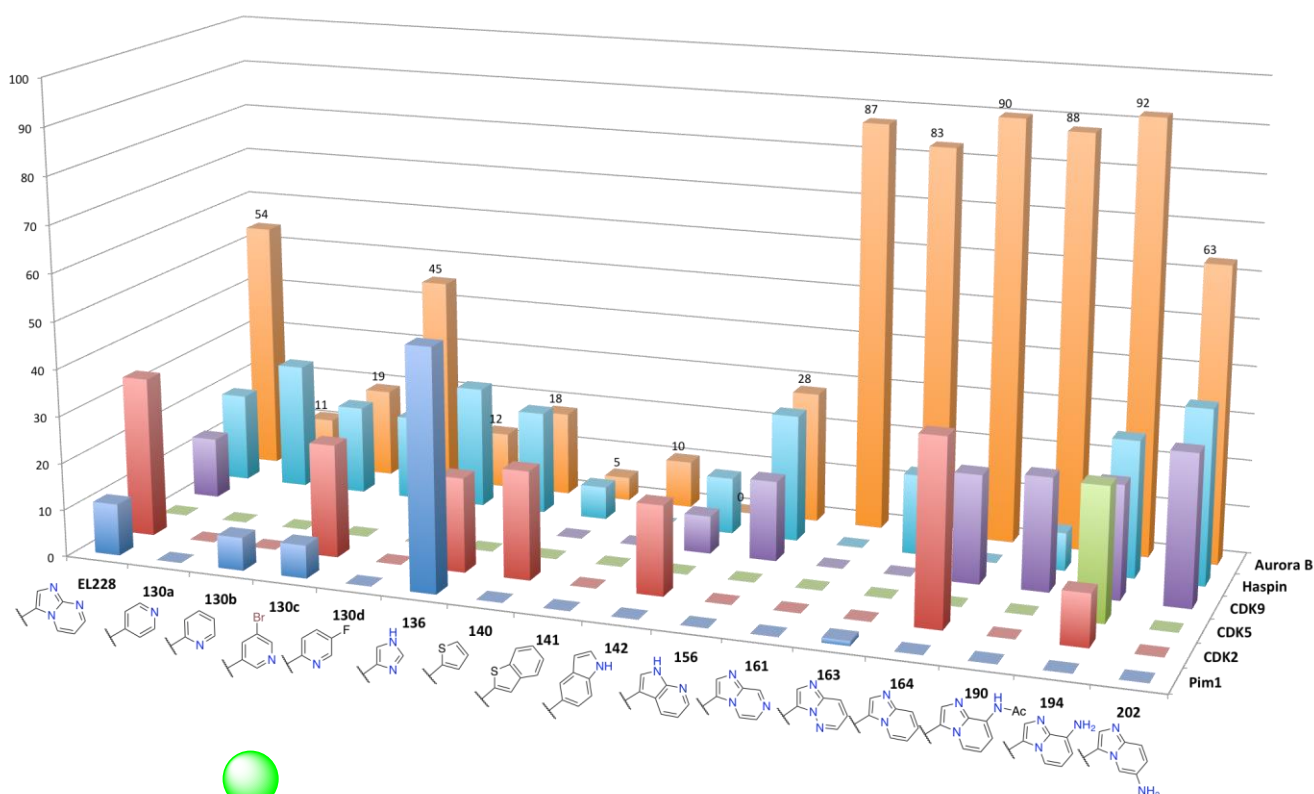
Tableau 9 – Résultats du criblage primaire sur Aurora B des analogues issus de la modification de la partie II

Produit	% d'inhibition à 10 μM	% d'inhibition à 1 μM	Produit	% d'inhibition à 10 μM	% d'inhibition à 1 μM
	11	11		3	19
<b>130a</b>			<b>130b</b>		
	42	45		10	12
<b>130c</b>			<b>130d</b>		

 <b>136</b>	25	18	 <b>140</b>	5	5
 <b>141</b>	6	10	 <b>142</b>	7	0
 <b>146</b>	11	8	 <b>156</b>	19	28
 <b>160</b>	0	0	 <b>190</b>	94	88
 <b>161</b>	97	87	 <b>194</b>	97	92
 <b>163</b>	95	83	 <b>202</b>	94	63
 <b>164</b>	83	90	 <b>206</b>	77	48
 <b>207</b>	86	78	 <b>208</b>	73	81
 <b>209</b>	77	85	 <b>210</b>	77	72
 <b>211</b>	61	61	 <b>212</b>	92	83
 <b>213</b>	88	49	 <b>214</b>	10	8

 <b>217</b>	73	59	 <b>221</b>	93	81
---	----	----	--	----	----

Pour plus de clarté et afin de faciliter la comparaison des activités des produits, les résultats des pourcentages d'inhibition à 1  $\mu\text{M}$  ont été présentés sous forme d'histogramme pour les six kinases communes dans la Figure 67. La kinase Aurora B est indiquée par les barres orange. La Figure 68 représente les  $\text{IC}_{50}$  qui ont été déterminées pour les composés les plus actifs et les courbes d'inhibition des produits **EL228**, **164**, **194** et **207** sont présentées sur la Figure 69.



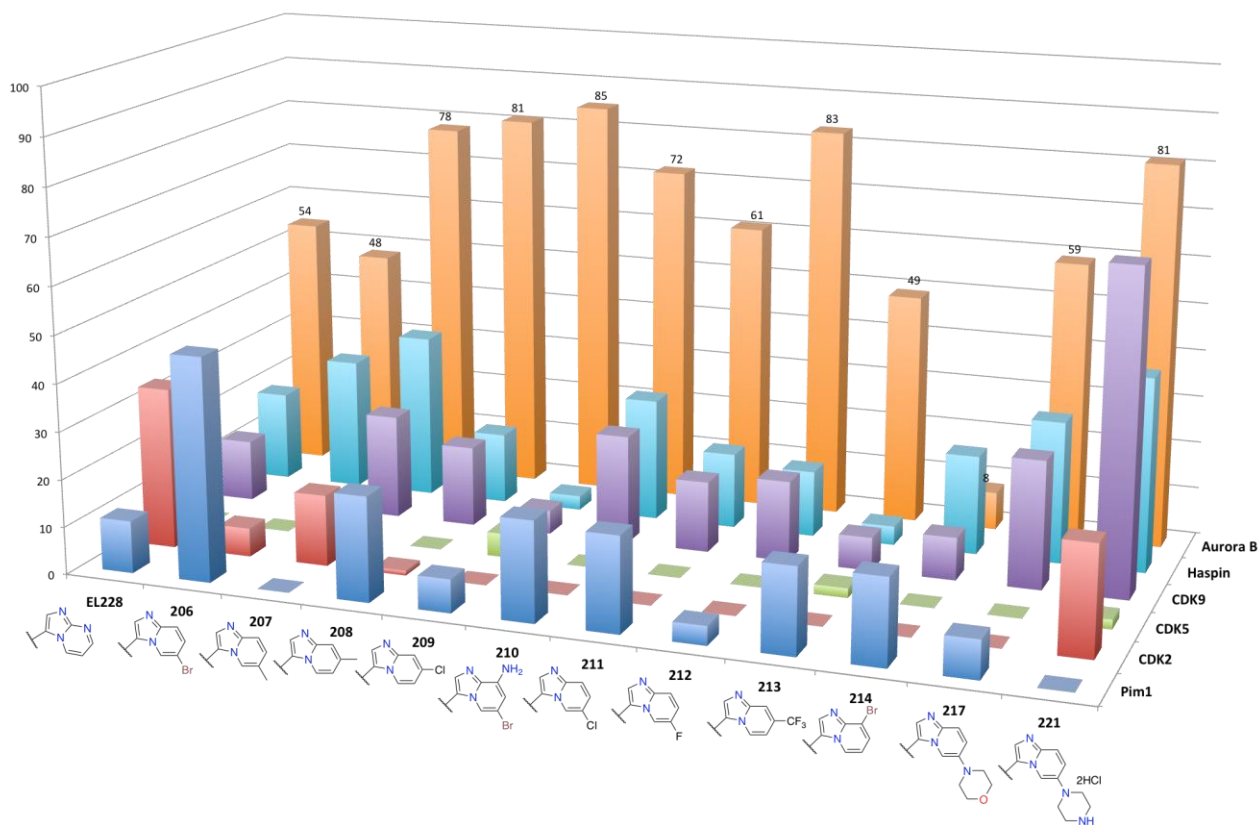


Figure 67 - Histogrammes des pourcentages d'inhibition à 1  $\mu$ M sur Aurora B et cinq autres kinases évaluées

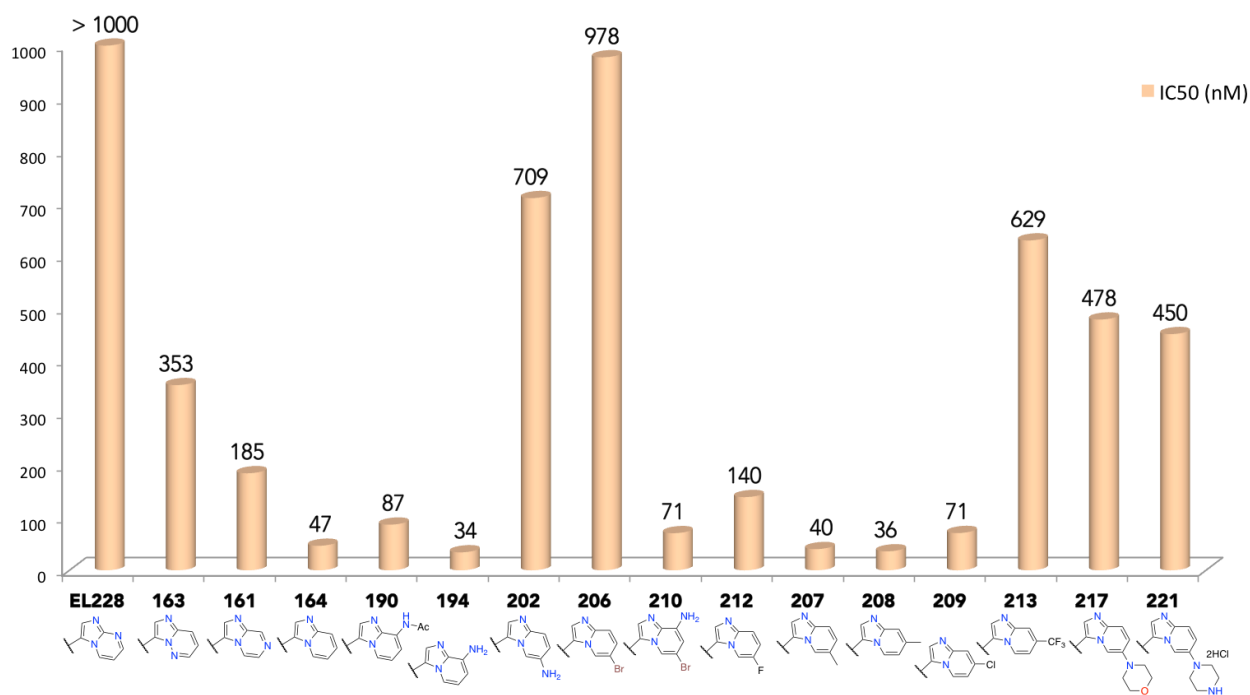


Figure 68 - IC<sub>50</sub> des composés les plus actifs en nM sur Aurora B. Pour des raisons d'échelle ; la valeur d'IC<sub>50</sub> d'EL228 est plafonnée à 1000 mais l'IC<sub>50</sub> réelle est de 5000 nM



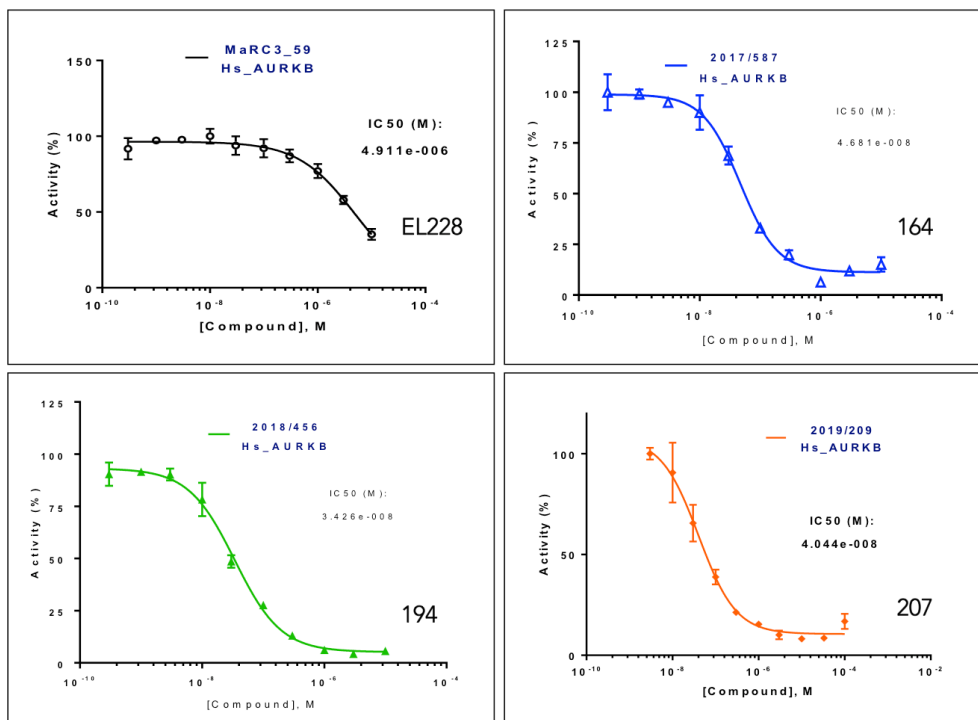


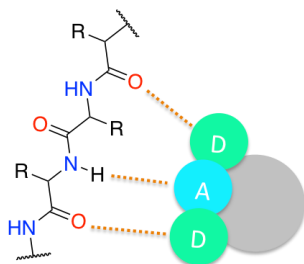
Figure 69 - Courbes d'inhibition d'Aurora B des produits EL228, 164, 194 et 207

## 2. Interprétation des résultats

L'introduction d'hétérocycles de type pyridine avec **130a-d**, imidazole avec **136**, thiophène avec **140**, benzothiophène avec **141** et indole avec **142** n'ont pas permis d'améliorer l'activité (Figure 67). En revanche, ces hétérocycles montrent des activités inhibitrices sur d'autres kinases comme Pim1 ou CDK2.

Les bicycles de types imidazo[1,2-a]pyridine possédant un azote endo-cyclique en position 7 et 5 se sont avérés bien plus actifs que **EL228** dont l'azote est en position 8 (Figure 67). Le simple déplacement de cet azote de la position 8 à la position 7 avec le composé **161** a permis de passer d'une IC<sub>50</sub> de 5 µM à 0.185 µM soit 27 fois plus actif (Figure 68). De la même façon, le composé imidazo[1,2-a]pyridazine **163** possède une IC<sub>50</sub> de 0.353 µM, soit une activité 14 fois meilleure. Le produit imidazo[1,2-a]pyridine **164**, ne possédant pas ce troisième azote, est le plus actif des trois entre **161**, **163** et **164**, avec une IC<sub>50</sub> de 47 nM, soit 106 fois plus actif. Le remplacement d'un azote par un carbone dans le cycle aromatique à six chaînons a plusieurs impacts, notamment sur la distribution électronique et sur la lipophilie qui est augmentée.<sup>324</sup> Ce résultat nous suggère que la présence d'un azote accepteur de liaison hydrogène sur le cycle n'est pas le plus favorable. Les produits **190** et **194** possédant des azotes exo-cycliques présentent des activités avec des IC<sub>50</sub> de 87 nM et 34 nM respectivement, soit un gain de 150 par rapport à **EL228**. Ceci indique que l'introduction d'un groupement pouvant être donneur de liaison hydrogène est largement bénéfique à l'interaction entre la kinase et l'inhibiteur. Néanmoins, le produit **202** qui possède également une amine primaire en position 6 n'est pas aussi actif, avec une IC<sub>50</sub> de 709 nM. La position idéale semble donc être la position 8 pour avoir la meilleure activité. Le produit **214** bromé en position 8 vient appuyer notre hypothèse, puisque l'utilisation d'un atome de brome à la place de l'amine fait complètement chuter l'activité sur Aurora B.

A ce stade nous n'avons pas d'information quant au site d'interaction de nos inhibiteurs avec Aurora B, nous pouvons penser que cette amélioration de l'activité inhibitrice est due à la séquence accepteur et donneur de liaison hydrogène classique, que l'on retrouve dans les inhibiteurs ATP-compétitif de kinase (Figure 70). En effet, ce motif mime les interactions de l'adénine de l'ATP au niveau de la charnière de la kinase.<sup>126</sup> Il est également intéressant de noter que le composé azaindolique **156** qui présente cet enchaînement accepteur – donneur de liaison hydrogène mais dans l'ordre inverse de **194** (Figure 67) n'est que très peu actif sur Aurora B. Le positionnement de ces éléments s'avère être optimal chez le composé **194**.



**Figure 70 - Interactions au niveau du site actif de l'ATP des kinases ; D = donneur de liaison hydrogène, A = accepteur de liaison hydrogène**

Concernant les différentes substitutions du noyau imidazo[1,2-a]pyridine, hormis les composés **214**, **206** et **213**, tous les produits imidazo[1,2-a]pyridines substitués sont plus actifs qu'**EL228**. Les moins bonnes activités des composés **206** (brome en position 6) et **213** (CF<sub>3</sub> en position 7) suggèrent que ces substitutions sont trop encombrantes pour maximiser l'affinité kinase-inhibiteur. Le groupe CF<sub>3</sub> est équivalent à un groupe isopropyle en termes de taille.<sup>325</sup> Malgré l'atome de brome en position 6, le produit **210** est très actif (IC<sub>50</sub> de 7 nM) ce qui peut être expliqué par la présence du NH<sub>2</sub> qui jouerait un rôle clé dans l'interaction avec Aurora B. En s'intéressant de plus près aux valeurs d'IC<sub>50</sub> (Figure 68), on constate que les groupements les mieux tolérés sont les substituants de types chlore et fluor en position 6 et 7 (**212**, **207**, **208** et **209**) qui sont des groupes électroattracteurs inductifs -I et mésomères donneurs +M, ce qui peut augmenter l'acidité du proton en position 8 et donc favoriser la liaison hydrogène. Les substitutions par un méthyle qui est groupe électrodonneur inductif +I sont également très bien tolérées, les activités étant très bonnes pour ces composés.<sup>325</sup> Malgré leur plus grande taille, les produits substitués par des groupes morpholine et pipérazine **217** et **221** sont tout de même actifs avec des IC<sub>50</sub> de 478 et 450 nM respectivement.

Concernant la sélectivité, les molécules sont globalement sélectives puisque les quelques autres kinases inhibées ne le sont que de l'ordre du µM. Ces kinases étant impliquées dans la division cellulaire, les effets sur ces différentes kinases peuvent être synergiques dans le cadre de molécules à visée anticancéreuse.

Le produit 1,3-oxazine **146** issu de la cyclisation non désirée a été également testé, mais n'a montré aucune activité sur Aurora B. Néanmoins, il s'est révélé actif sur les kinases CDK9/Cyclin T et CLK1 avec des IC<sub>50</sub> respectives de 5.7 et 4.6 µM, et cela peut constituer une nouvelle piste de recherche. De plus, ce linker pourrait être utilisé en introduisant sur la partie II un bicycle identifié comme parmi les plus actifs comme l'imidazopyridine.

## IV. Combinaison d'hétérocycles des parties I et II

### 1. Combinaison des hétérocycles 137-139 avec 85a-d

#### a. Synthèses

Afin de diversifier nos composés et de vérifier diverses combinaisons des parties I et II reliées par un alcyne, nous avons préparés plusieurs analogues combinant des nouveaux hétérocycles sur les parties I et II simultanément. Une première série utilise les acides carboxyliques **85a-d** pour préparer les produits **223a-d**, **224a-d** et **225a-d** avec les hétérocycles halogénés **137-139**. La voie de synthèse générale est présentée en Schéma 37, les produits de départ **85a-d** ont été utilisés pour acyler la propargylamine en **222a-d** puis engagés dans un couplage de Sonogashira. Nous avons ainsi obtenu douze nouveaux produits **223a-d**, **224a-d** et **225a-d**.

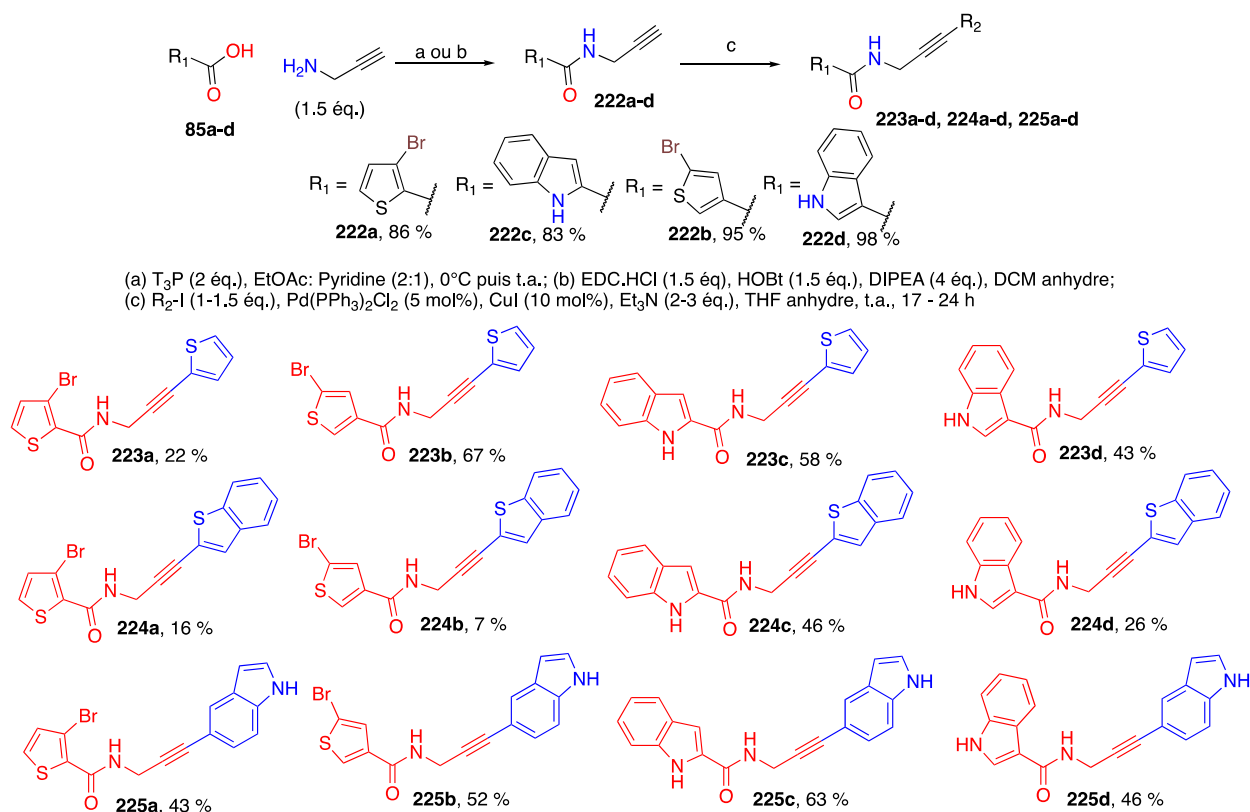


Schéma 37 – Synthèses des produits combinés **223a-d**, **224a-d** et **225a-d**

Une seconde série a combiné les alcynes pyrroliques **121**, **125**, **126** et indolique **222c** avec les hétérocycles bicycliques **167**, **169**, **172** et **192** dans un couplage de Sonogashira pour obtenir les huit nouveaux composés **226-233** (Schéma 38). Les produits portant une amine protégée en position 8 ont été déprotégé avec du TFA dans le dichlorométhane. Au cours de la réaction de synthèse de **226**, le produit **226a** qui résulte de l'homocouplage de Glaser de l'alcyne **121** a été isolé à hauteur de 46 % (Figure 71). Cette réaction compétitive à la réaction de Sonogashira est

très probablement due à la présence de dioxygène dans le milieu réactionnel, soulignant l'importance du dégazage à l'argon des solvants utilisés pour les couplages de Sonogashira.<sup>228</sup>

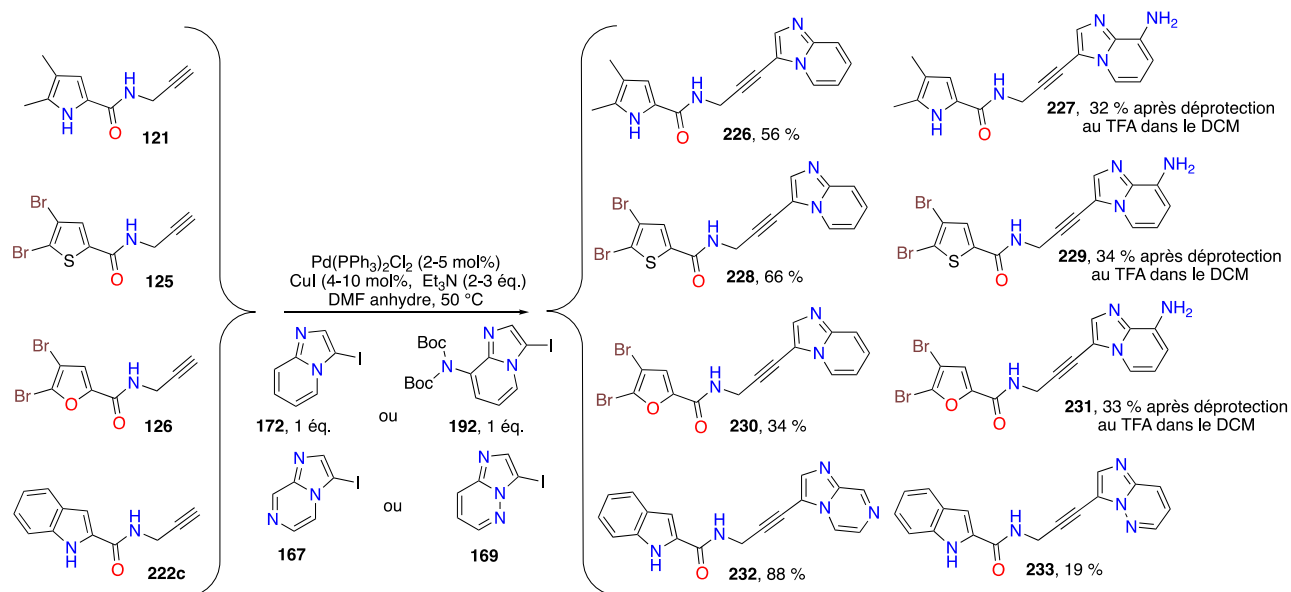


Schéma 38 - Préparation des composés 226-233

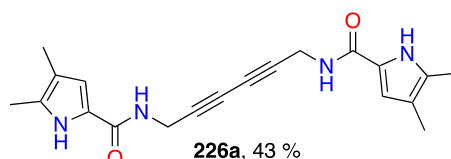


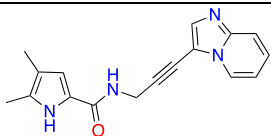
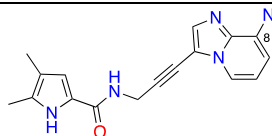
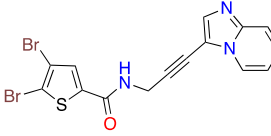
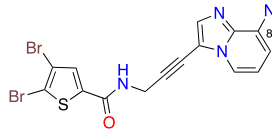
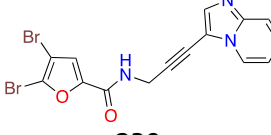
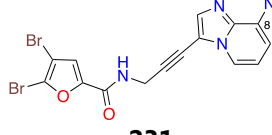
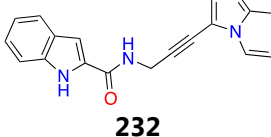
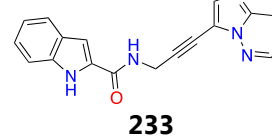
Figure 71 - Produit de l'homocouplage de Glaser 226a

## b. Activités biologiques

Les douze produits issus de la première série des combinaisons des deux parties I et II ont été évalués sur les mêmes panels de kinases. C'est sans surprise qu'ils n'ont montré aucune activité vis-à-vis des kinases Aurora B, Haspine, CDK2, CDK5, CDK9, CK1 $\epsilon$ , GSK3 $\beta$ , Pim1 et Dyrk1A, puisque ces hétérocycles n'avaient déjà pas présenté d'activité séparément lors des précédents criblages.

Concernant les huit autres produits issus de la deuxième série, les bicycles de la partie II utilisés sont ceux parmi les plus actifs. Bien que homologues avec le bicyclic imidazo[1,2-a]pyrimidine (**99c**, **122**, **127** et **128**) n'aient montré aucune activité, les produits **226-233** se sont avérés actifs sur Aurora B (Figure 72 et Tableau 10). Une nouvelle fois, le bicyclic imidazo[1,2-a]pyridine substitué par une amine en position 8 se montre le plus actif. Malgré l'introduction de cette amine, le composé diméthylé **227** ( $IC_{50}$  = 1.0  $\mu$ M) ne montre pas une amélioration suffisante par rapport au hit **EL228** ( $IC_{50}$  = 5  $\mu$ M) et encore moins vis-à-vis de son homologue dibromé ( $IC_{50}$  = 34 nM). Il en est de même pour les produits 4,5-dibromothiophènes **228** et **229** et indoliques **232** (Figure 72 et Tableau 10) **233**. Bien que les deux analogues **230** et **231** portant l'hétérocycle 4,5-dibromofurane soient les plus actifs de cette série, ils confirment également que le 4,5-dibromopyrrole est le plus actif. Le criblage des produits **229** et **230** montre une moins bonne sélectivité pour Aurora B, notamment avec Pim1 et CDK9.

Tableau 10 – Résultats du criblage primaire et IC<sub>50</sub> des produits 226-233 sur Aurora B

Produit	% d'inhibition à 10 μM et 1 μM		IC <sub>50</sub> (μM)	Produit	% d'inhibition à 10 μM et 1 μM		IC <sub>50</sub> (μM)
	10 μM	1 μM			10 μM	1 μM	
 <b>226</b>	71	29	2.1	 <b>227</b>	72	38	1.0
 <b>228</b>	28	12	>10	 <b>229</b>	71	13	2.59
 <b>230</b>	88	69	0.34	 <b>231</b>	87	64	0.52
 <b>232</b>	90	55	0.83	 <b>233</b>	90	57	1.39

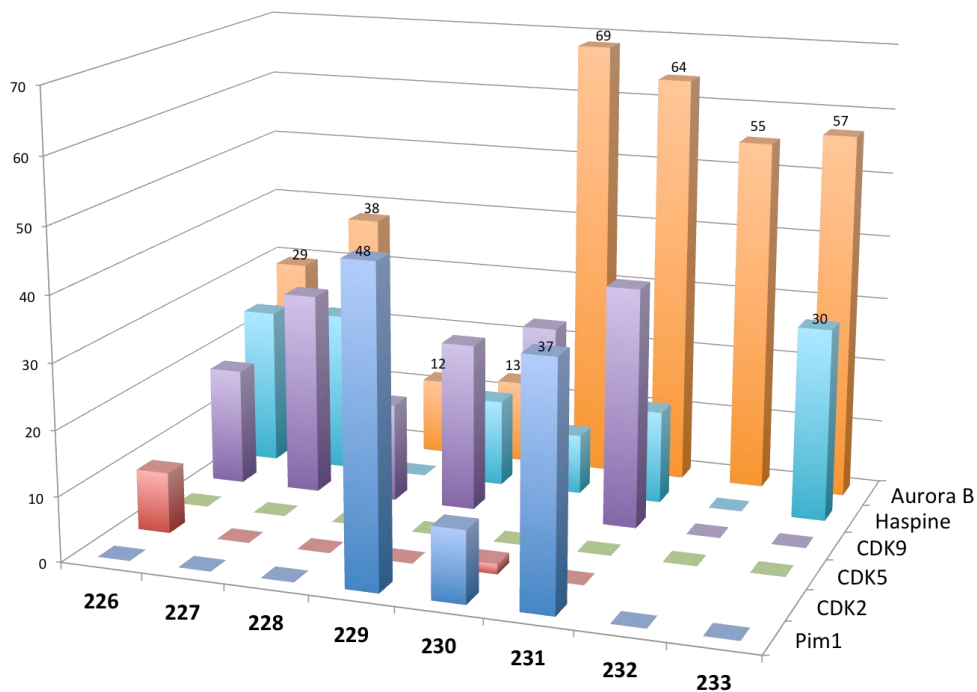


Figure 72 – Activité et sélectivité des inhibiteurs 226-233 à 1 μM

## 2. Utilisation des pyrroles dichlorés et diodés

### a. Synthèses

Lors du précédent chapitre nous avons constaté que les pyrroles dichloré **109** et diodé **110** présentaient une activité tout à fait comparable à **EL228**. Bien que le pyrrole 4,5-dibromé ait été choisi pour la préparation des produits de modulation de la partie II, nous avons vérifié s'il était effectivement bien le groupement le plus adapté. Les alcynes **106** et **108**<sup>231</sup> ont été ainsi couplés avec trois des hétérocycles les plus actifs, le 3-iodoimidazo[1,2-a]pyrazine **167**, 3-iodoimidazo[1,2-a]pyridine **172** et di-*tert*-butyl(3-iodoimidazo[1,2-a]pyridin-8-yl)carbamate **192** (Schéma 39). Les produits **234-239** ont été obtenus avec des rendements allant de 33 à 66 % et 25 à 41 % sur deux étapes pour les produits portant une amine en position 8, déprotégés avec du TFA.

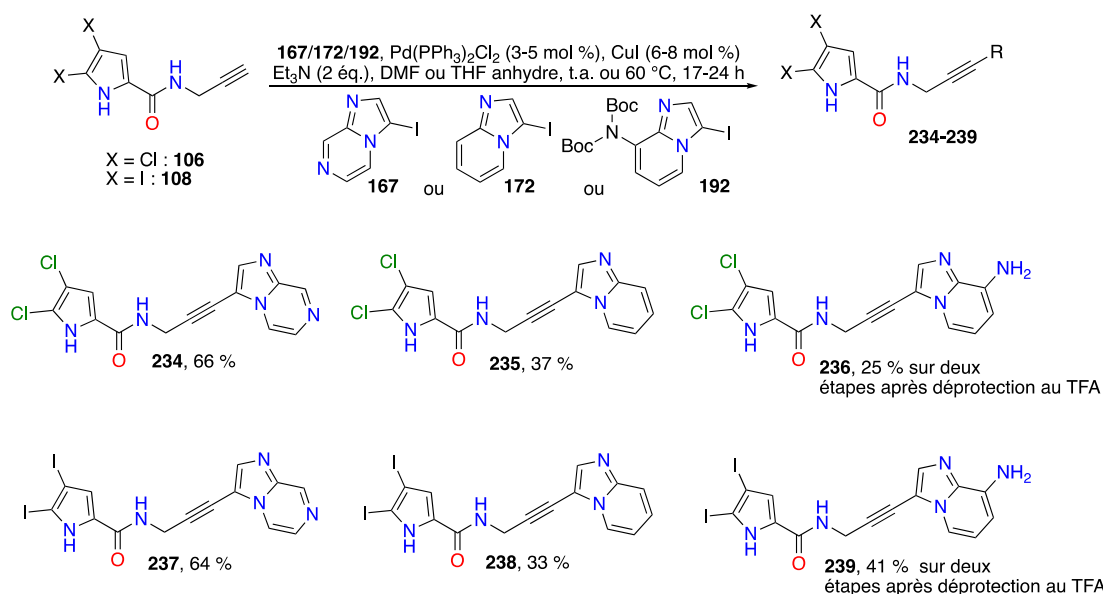
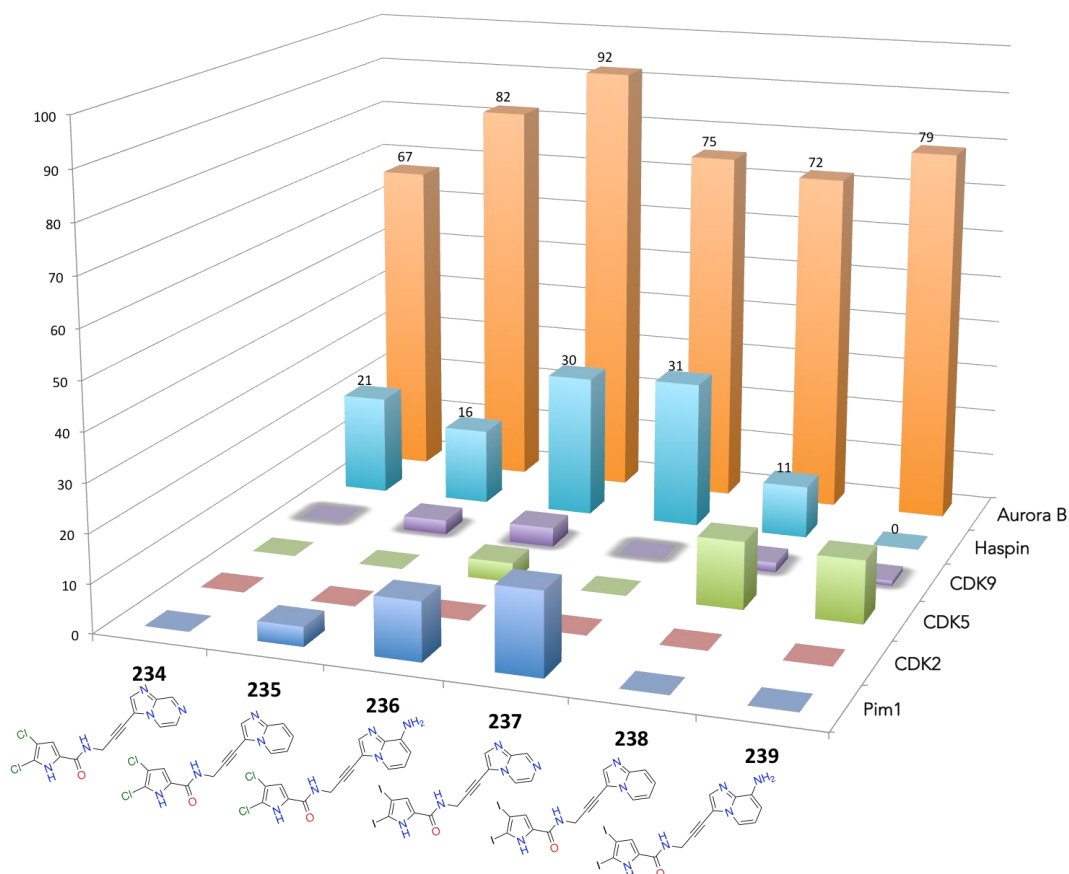


Schéma 39 – Préparation des produits **234-239** portant les pyrroles dichlorés et diodé avec les hétérocycles les plus actifs identifiés précédemment

### b. Activités biologiques

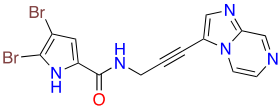
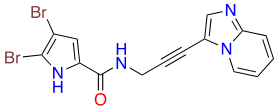
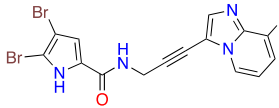
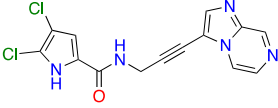
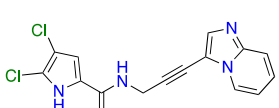
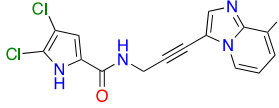
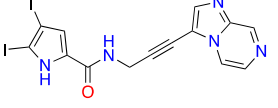
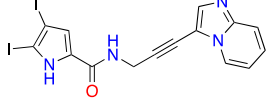
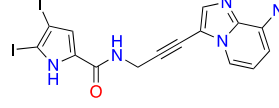
La Figure 73 présente les pourcentages d'inhibition des six produits **234-239**. Ce graphe nous indique que les composés qui étaient actifs avec le 4,5-dibromopyrrole le sont aussi lorsque les halogènes du pyrrole sont remplacés par les chlores ou les iodes. Une faible activité est aussi détectée pour la kinase Haspine avec une sélectivité S = 0.33 pour **236** et 0.41 pour **237**, mais la sélectivité reste globalement bonne.



**Figure 73 - % d'inhibition à 1  $\mu$ M des produits 234-239 sur six kinases du panel**

Le Tableau 11 nous permet de comparer les  $IC_{50}$  des produits où chaque colonne correspond à un hétérocycle de la partie II fixé. Pour le noyau imidazo[1,2-a]pyrazine, le pyrrole 4,5-dibromé **161** est presque quatre fois meilleur que son homologue dichloré **234** et deux fois plus actif que le composé diiodé **237**. On retrouve ces ordres de grandeur pour les noyaux imidazo[1,2-a]pyridine et 8-amino-imidazo[1,2-a]pyridine. Le pyrrole 4,5-dibromé se montre à chaque fois supérieur quant à l'activité inhibitrice, tandis que les pyrroles 4,5-chlorés sont alternativement soit moins actifs soit plus actifs que les pyrroles 4,5-diiodés. Néanmoins notre choix du pyrrole 4,5-dibromé est bien confirmé. Il sera ainsi maintenu pour les autres pharmacomodulations.

**Tableau 11 – Comparaison des IC<sub>50</sub> sur Aurora B des différents pyrroles halogénés selon les noyaux bicycliques de la partie II**

Produit	IC <sub>50</sub> (nM)	Produit	IC <sub>50</sub> (nM)	Produit	IC <sub>50</sub> (nM)
 <b>161</b>	190	 <b>164</b>	47	 <b>194</b>	34
 <b>234</b>	682	 <b>235</b>	160	 <b>236</b>	77
 <b>237</b>	350	 <b>238</b>	140	 <b>239</b>	130

## V. Conclusion

À l'issue de ce troisième chapitre qui visait à modifier la partie II du hit initial **EL228**, nous avons préparé cinquante-quatre analogues. Concernant l'espace chimique, des hétérocycles à cinq ou six chaînons de natures différentes ont été introduits. On retrouve par exemple des cycles de type pyridine, thiophène, imidazole ou indole. De plus, dix-neuf de ces produits présentent un bicyclic imidazo[1,2-a]N-pyridine. Ils diffèrent par la présence d'un troisième azote en positions 5, 7 ou 8 ou de substituants sur la partie pyridine. Vingt molécules résultent de la combinaison de différentes parties I et II. Enfin, six composés ont été préparés en utilisant les hétérocycles identifiés comme les plus actifs (décrits dans ce chapitre) combinés avec les pyrroles portant les atomes d'iode et de chlore (décrits dans le chapitre II précédent). Ceci nous a permis de comparer l'influence des différents halogènes sur le pyrrole.

Pour les synthèses, nous avons rencontré plusieurs difficultés, notamment lors des étapes de déprotection. La déprotection du produit **158** 7-azaindole protégé par un groupement Boc n'a fourni que des produits de dégradation. Ce problème a pu être contourné par l'utilisation du groupement protecteur benzènesulfonamide qui a été déprotégé plus aisément par le TBAF, conduisant au produit souhaité **156**. C'est également au cours d'une étape de déprotection, que nous avons abouti au produit **146**, résultant d'une cyclisation intramoléculaire. Ce squelette original n'a pas montré d'activité lors du criblage sur la kinase Aurora B.

Certains produits (Figure 74) n'ont pas pu être synthétisés comme le produit pyrimidin-4-amine **175a** ou les bicyclics azoturés **178**. Le produit **196** présentant une amine primaire en position 5 n'a pu être préparé dû à l'encombrement stérique entre l'amine protégée et le site



d'iodation. Enfin, les groupements salifiables basiques morpholine et pipérazine n'ont pu être introduits qu'en position 6, la position 7 ayant présenté des difficultés de synthèse (**232**).

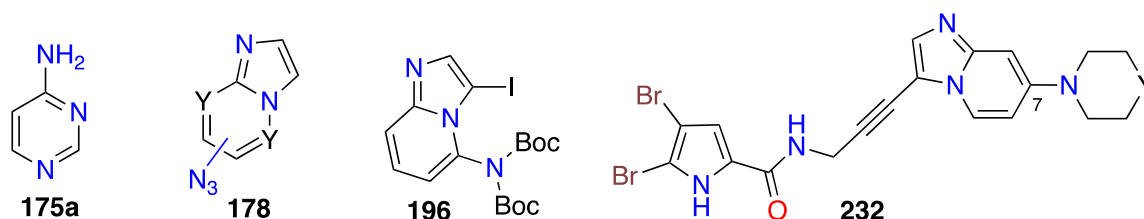


Figure 74 – Produits qui n'ont pas pu être synthétisés au cours de ce chapitre

Parmi les cinquante-quatre produits synthétisés dans ce chapitre, vingt-neuf composés se sont avérés plus actifs que le hit **EL228** avec des  $IC_{50}$  allant de 2590 à 34 nM. Les trois meilleurs composés sont les produits **194** ( $IC_{50}$  = 34 nM), **207** ( $IC_{50}$  = 40 nM) et **208** ( $IC_{50}$  = 36 nM), et sont près de cent-cinquante fois plus actifs que **EL228**.

Ainsi concernant les relations de structure-activité (Figure 75), les hétérocycles de la partie II qui donnent les meilleures activités parmi ceux testés sont de de type imidazo[1,2-a]pyridine. Le déplacement de l'azote de la position 8 aux positions 5 dans **163**, 7 dans **161** ou son remplacement par un CH dans **164** ont conduit à des produits parmi les plus actifs. Le meilleur composé **194** a été obtenu en introduisant en position 8 un élément accepteur et donneur de liaison H au moyen d'une amine aromatique exo-cyclique. Ce composé présente une  $IC_{50}$  de 34 nM sur Aurora B et une bonne sélectivité. Les positions 6 et 7 tolèrent également bien des substituants. L'ajout d'un méthyle sur ces positions nous a donné accès aux produits **208** et **209** qui sont parmi les trois plus actifs. L'introduction de chlore et de fluor est également compatible avec le maintien de l'inhibition enzymatique. Pour finir, nous avons démontré que le 4,5-dibromopyrrole est l'hétérocycle le plus actif par rapport à ses homologues dichlorés et diiodés.

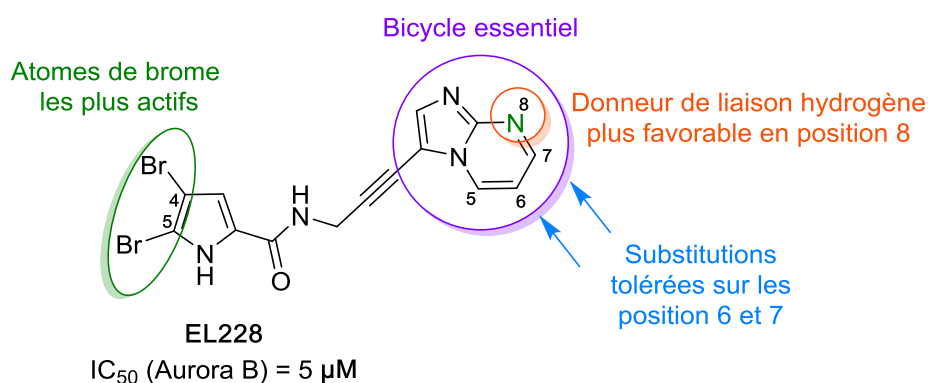


Figure 75 – Bilan de la SAR du chapitre III

# **Chapitre IV**

## **Pharmacomodulations**

### **de la partie III**



# Chapitre IV – Pharmacomodulations de la partie III

## I. Introduction

Le linker qui lie les parties I (4,5-dibromo-1H-pyrrole-2-carboxamide) et II (imidazo[1,2-a]pyrimidine) est un élément important de la structure du hit qui nous a semblé pertinent de modifier pour en mesurer les conséquences sur l'activité inhibitrice (Figure 76). En effet, il est responsable de l'angle et de la distance qui sépare les parties I et II qui interagissent avec la kinase. Il joue un rôle majeur par sa flexibilité dans la forme de la molécule lors de ses interactions avec les récepteurs biologiques.

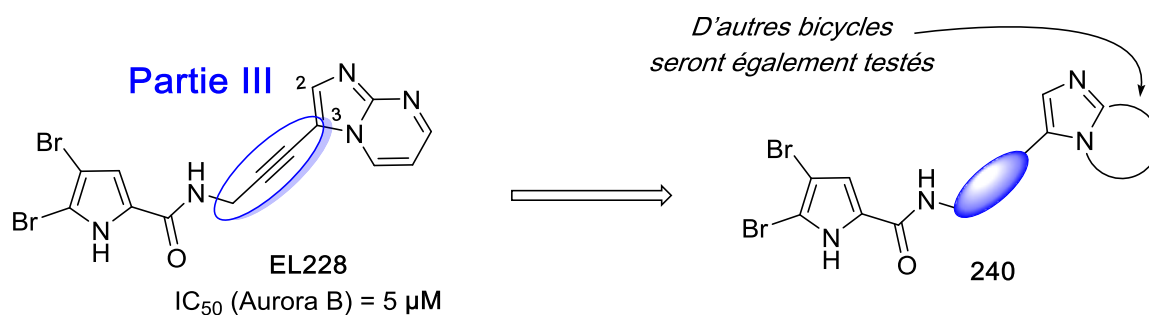


Figure 76

Dans ce chapitre, l'introduction de linkers alcène, aliphatique, aromatique et triazole sera présentée. La dernière partie portera sur les activités inhibitrices des composés pour chacun des linkers préparés. Les chapitres précédents ont permis de mettre en évidence que la partie I la plus active était le 4,5-dibromo-1H-pyrrole et plusieurs hétérocycles de type imidazo[1,2-a]N-pyridine pour la partie II. C'est pour cette raison que le 4,5-dibromo-1H-pyrrole a été combiné avec plusieurs hétérocycles de la partie II, pour chaque linker.

## II. Synthèses des analogues

### 1. Linker alcène

Le linker alcène présente une flexibilité différente de l'alcyne qui est plus rigide, et modifie également l'angle entre les deux parties I et II. Les linkers alcène et alcyne sont superposés sur la Figure 77 afin de visualiser l'effet induit par la modification du linker alcyne en alcène.

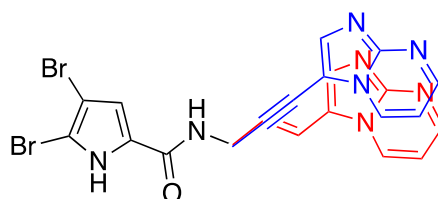
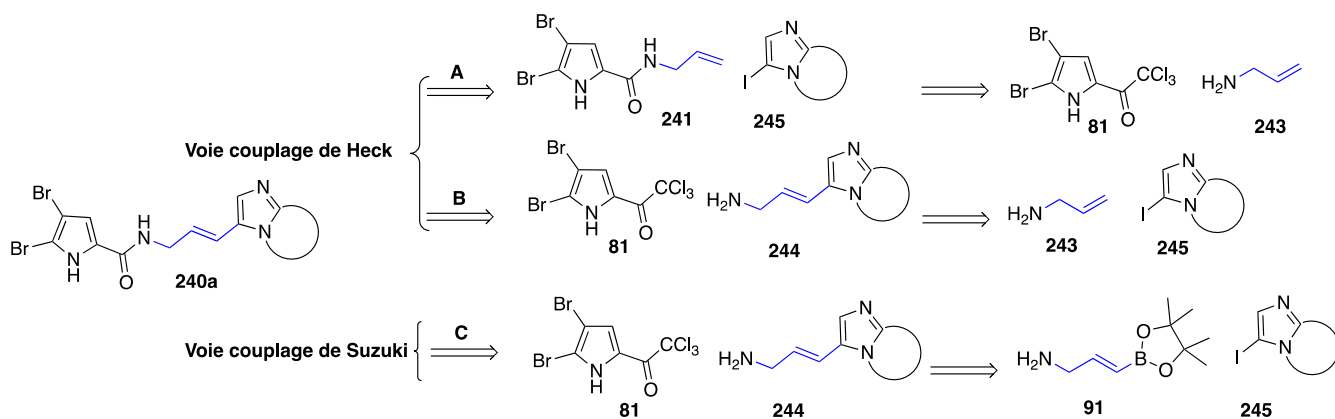


Figure 77 – Superposition des produits alcyne EL228 et alcène

Plusieurs voies de synthèse ont été envisagées pour la préparation des dérivés alcéniques de type **240a** (Figure 78). Les couplages de Heck et de Suzuki-Miyaura ont été envisagés pour la préparation de cette série. Pour le couplage de Heck, il peut intervenir lors de la dernière étape à

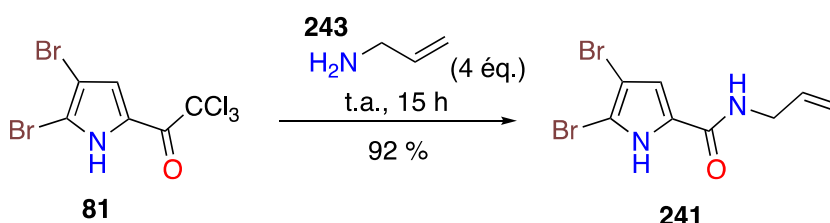
partir de l'alcène préparé **241** (voie A, Figure 78) ou bien lors de la première étape avec l'allylamine **243** et **245** (voie B, Figure 78). Enfin, le couplage de Suzuki (voie C, Figure 78) met en jeu le composé **245** et l'ester boronique **91**, intermédiaire clé pour le couplage qui est synthétisé à partir de la propargylamine et du pinacolborane. Finalement, l'acylation entre l'alcène **244** et le pyrrole **81** conduit au produit souhaité **240a**.



## a. Par le couplage de Heck

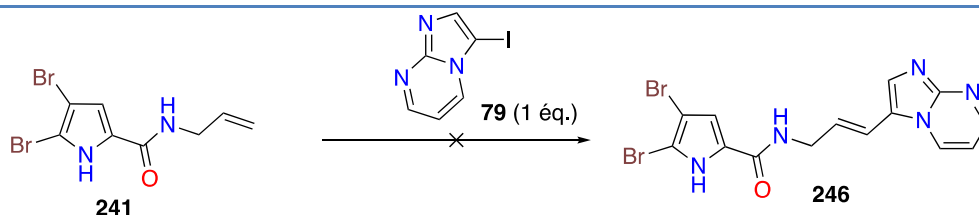
### i. Voie A

L'allylamine commerciale **243** est acylée avec le trichloroacétylpyrrole **81** à température ambiante avec un très bon rendement de 92 % (Schéma 40).<sup>326</sup>



Nous avons ensuite engagé l'intermédiaire **241** dans le couplage de Heck selon les conditions récapitulées dans le Tableau 12. Les catalyseurs  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$  et  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  ont été utilisés à hauteur de 5 mol% en présence de base dans le DMF à 80 °C. Avec la triphénylphosphine<sup>327</sup> (entrée 2), aucun produit n'a été détecté. Après 17 h de réaction, le produit de départ **241** est toujours présent et le produit **246** n'a pu être détecté. Avec du  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$  et la triéthylamine (entrée 3), seuls l'alcène **241** et le produit dé-iodé **78** ont été isolés.

Tableau 12 – Conditions du couplage de Heck par la voie A



Entrée	Conditions	Résultat
1	Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (5 mol%) NaOAc.3H <sub>2</sub> O (3 éq.), DMF, 80 °C, 15 h	Formation de nombreux produits secondaires majoritaires
2	Pd(OAc) <sub>2</sub> (5 mol%), PPh <sub>3</sub> (10 mol%), Et <sub>3</sub> N (3 éq.), DMF, 80 °C, 15 h	Formation de nombreux produits secondaires majoritaires
3	Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (5 mol%), Et <sub>3</sub> N (3 éq.), DMF, 80 °C, 17 h	Alcène <b>241</b> et imidazo[1,2-a]pyrimidine <b>78</b> isolés uniquement

Nous avons alors envisagé d'échanger les partenaires de couplage en effectuant le couplage de Heck entre l'allylamine **243** et le réactif **79** (voie B).

## ii. Voie B

Un premier essai de couplage entre l'allylamine **243** non protégée et **79** n'a conduit à la formation d'aucun produit, seul le dérivé iodé **79** est isolé après deux jours de réaction (Schéma 41). L'allylamine a ainsi été protégée par deux groupements Boc,<sup>328</sup> puis engagée dans le couplage de Heck avec le catalyseur tris(dibenzylidène acétone)dipalladium (0).<sup>329,330</sup> Seuls l'alcène protégé **248** et le réactif dé-iodé **78** ont été isolés à l'issue de cette réaction.

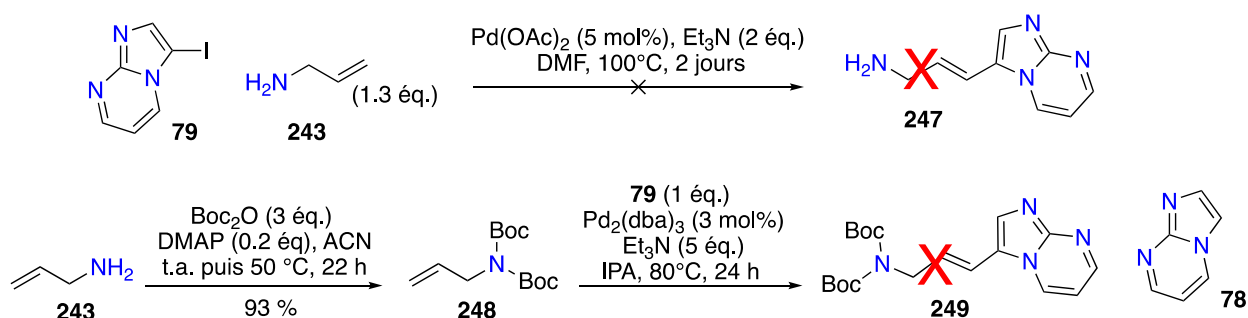


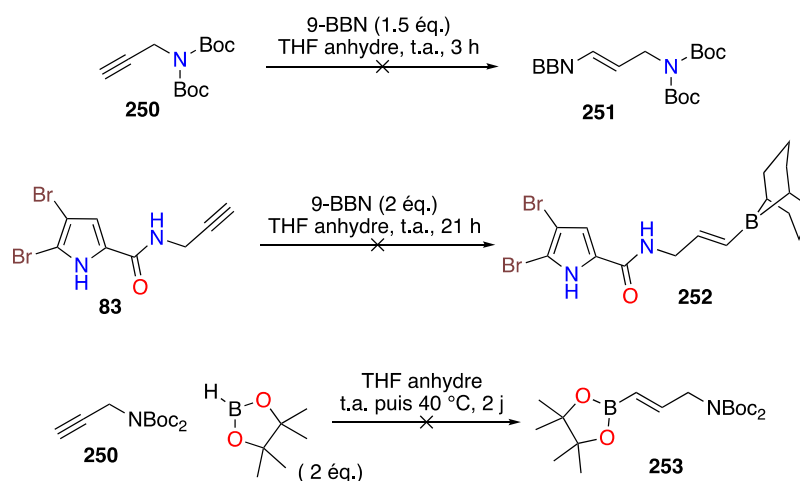
Schéma 41 – Couplage de Heck par la voie B

L'approche synthétique par le couplage de Heck ne nous permettant pas d'accéder aux dérivés, nous nous sommes tournés vers le couplage de Suzuki.

## b. Par le couplage de Suzuki-Miyaura : voie C

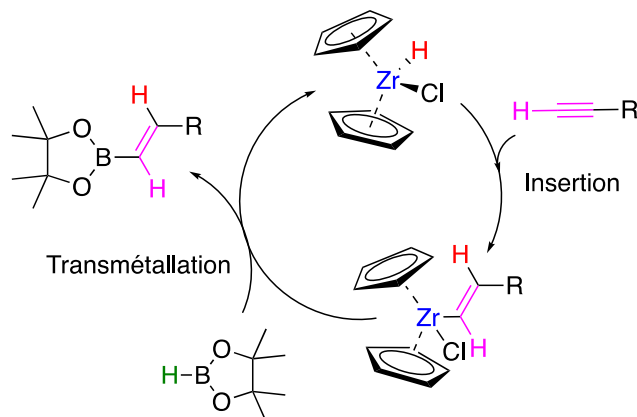
### i. Par réaction d'hydroboration

Le 9-borabicyclo[3.3.1]nonane (9-BBN) a tout d'abord été utilisé avec la propargylamine protégée **250** dans le THF anhydre selon les conditions de la littérature.<sup>331</sup> Malgré la disparition du produit de départ observée en CCM, aucun nouveau produit n'a pu être isolé à l'issue de cette réaction. Nous avons également essayé avec l'alcyne **83**, sans succès. Ce réactif de borylation ne nous sembla donc pas être le plus adapté, du fait de son encombrement notamment. Nous avons utilisé le pinacolborane pour former l'ester boronique **253** mais sans résultat.



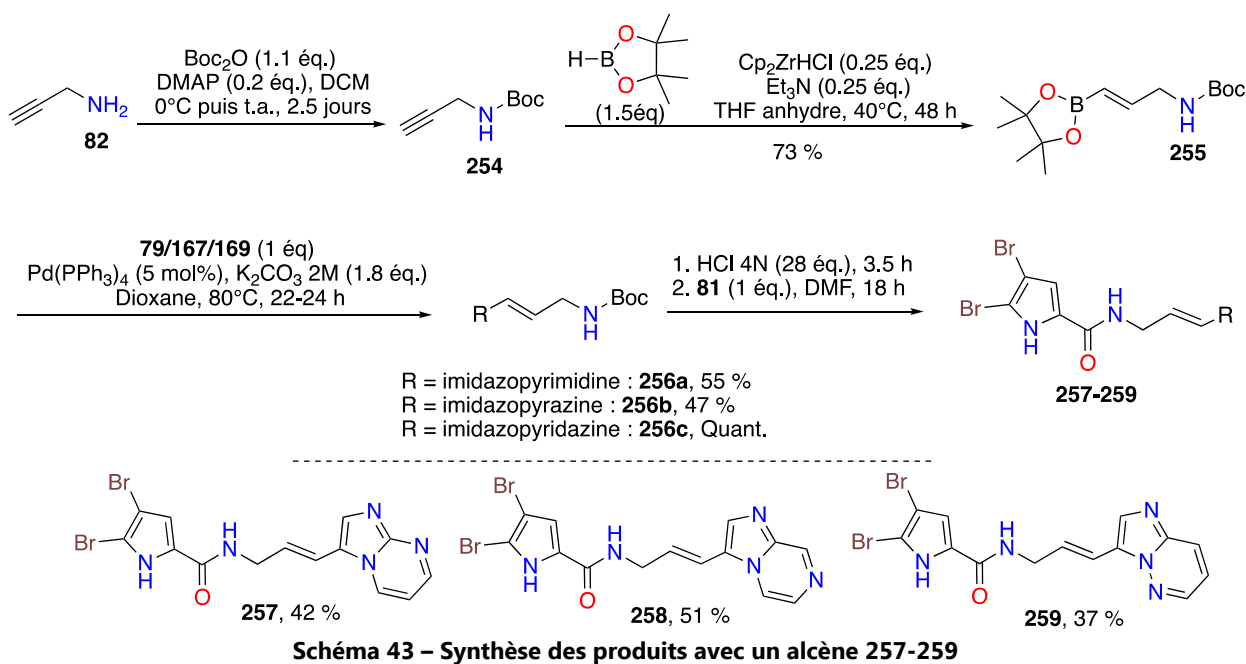
## ii. Par réaction d'hydrozirconation-hydroboration

L'hydroboration de la propargylamine protégée **250** n'ayant pas aboutie à l'ester boronique souhaité **253**, nous avons envisagé un accès par une réaction d'hydroboration catalysée au zirconium. Cette approche est décrite pour être efficace et sélective.<sup>332</sup> La réaction d'hydrozirconation est classiquement réalisée avec le réactif de Schwartz  $\text{Cp}_2\text{ZrHCl}$  qui est un métallocène du zirconium. Il s'agit d'une addition-1,2 de la liaison Zr-hydrure sur la triple liaison  $\text{C}\equiv\text{C}$  pour donner un complexe  $\sigma$  alcénylzirconocène (Figure 79).<sup>333</sup> L'insertion se fait généralement en position terminale et en *trans* du groupement R pour des raisons de gêne stérique entre le cyclopentadiène et le groupe R. La seconde étape est une transmétallation entre le zirconium et le dérivé de bore pour conduire à l'ester boronique. Les quantités en réactif de Schwartz sont catalytiques puisque l'espèce est régénérée en fin de cycle.<sup>334</sup>



**Figure 79 – Cycle catalytique de la séquence hydrozirconation – hydroboration**

La propargylamine **254** protégée avec un groupement Boc a été utilisée pour la réaction d'hydroboration catalysée au zirconium en présence de 0.25 équivalents du réactif de Schwartz. Le produit de la réaction **255** a pu être obtenu avec un bon rendement de 73 %.<sup>335-337</sup> La même réaction a été effectuée avec la propargylamine protégée par deux groupements Boc **97** avec un rendement plus faible de 54 %. L'intermédiaire clé **255** a ensuite été mis en réaction avec les différents hétérocycles iodés **79**, **167** et **169** dans un couplage de Suzuki pour conduire aux alcènes **256a-c** avec des rendements moyens à bons. Finalement, les amines **256a-c** sont déprotégées en conditions acides puis couplées avec le trichloroacétylpyrrole **81** dans le DMF.<sup>338</sup> A l'issue de cette voie de synthèse, nous avons obtenu les trois composés **257**, **258** et **259**, avec respectivement les noyaux imidazo[1,2-a]pyrimidine, imidazo[1,2-a]pyrazine et imidazo[1,2-a]pyridazine.



## 2. Linker aromatique

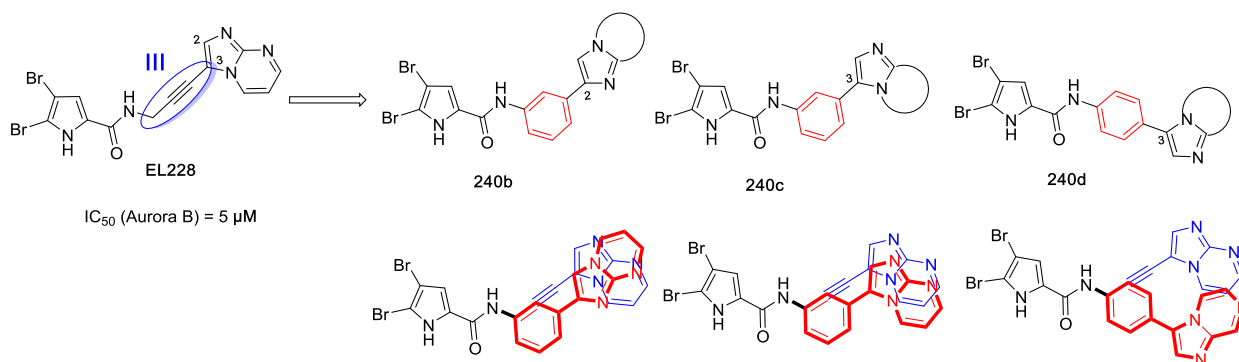
Des linkers aromatiques benzéniques de trois types différents ont été introduits (Figure 80):

- Phényle méta-substitué, connexion au noyau bicyclique en position 2 pour **240b**
- Phényle méta-substitué, connexion au noyau bicyclique en position 3 pour **240c**
- Phényle para-substitué, connexion au noyau bicyclique en position 3 pour **240d**

Sur la Figure 80, les structures planes des molécules envisagées **240b-d** sont superposées à celle de l'alcyne **EL228**. Ceci nous montre que pour la série **240b**, les parties I et II sont séparées du même nombre d'atomes que pour **EL228**, mais la connexion au bicyclic se faisant en position 2 et non en position habituelle 3, l'orientation est différente. L'angle entre les deux parties ici est fortement impacté. Pour la série **240c**, les deux produits sont quasiment superposés, mais la rigidité et l'encombrement du phényle pourraient moduler l'affinité du produit vis-à-vis de la cible biologique. Par ailleurs, le cycle aromatique est susceptible d'établir des interactions de type  $\pi$ -stacking, ce qui peut, améliorer l'affinité ou à l'inverse la déstabiliser. La dernière série de type

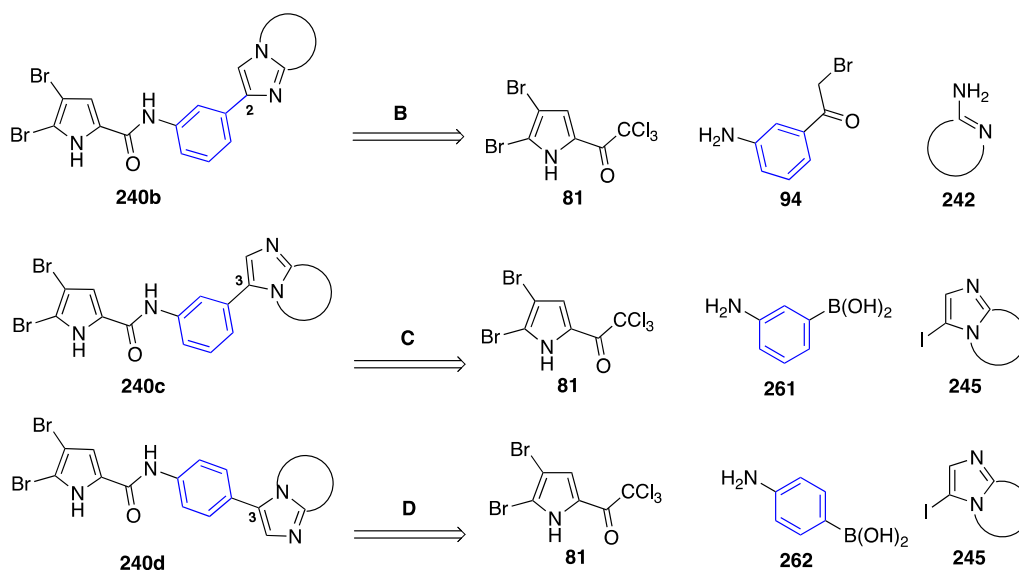


**240d** présente une orientation et un angle complètement différents par la substitution en para du cycle aromatique.



**Figure 80 – Structure des produits cibles 240b-240d**

La synthèse des produits de la série **240b** (voie B, Figure 81) consiste à réaliser la cyclisation du noyau 2-aminopyridine **242** avec la 2-bromo-3'-aminoacétophénone **94** dont le précurseur commercial est nitré (Figure 81). Ceci permet d'introduire une substitution en position 2 du bicycle. L'aniline résultante est ensuite couplée avec le 4,5-dibromopyrrole **81**. Pour les séries **240c** et **240d** (voie C et D, Figure 81), l'introduction du cycle aromatique se fait par un couplage de Suzuki-Miyaura entre les bicycles iodés de type **245** et les acides boroniques **261** et **262**, méta et para substitués par une amine, qui est ensuite acylé à **81**.



**Figure 81 – Rétrosynthèses envisagées pour les différentes séries 240b-d**

## a. Préparation des composés de la série b

### i. Préparations des anilines

Les composés **77** et **168** ont été cyclisés avec la 2-bromo-3'-nitroacétophénone **263** dans l'éthanol à reflux (Schéma 44).<sup>339-341</sup> La fonction nitro des intermédiaires **264** et **265** a ensuite été réduite avec du chlorure d'étain (II) en milieu acide pour conduire aux anilines **266** et **267**.<sup>342</sup>

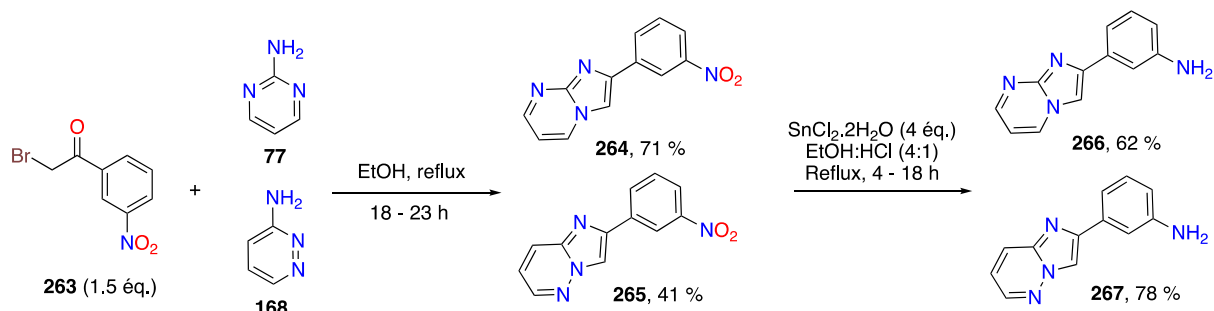


Schéma 44 - Préparation des anilines 266 et 267

La même voie de synthèse a été mise en œuvre avec la 2-amino-pyrazine **169**, sans résultat puisque nous n'avons pu obtenir le produit désiré **268** (Schéma 45). Bien que décrit dans la littérature avec un rendement de 17%,<sup>339</sup> le seul produit que nous avons pu isoler au cours des nombreux essais est le composé **269** résultant de l'attaque nucléophile de l'halogène par l'azote le moins encombré en position 4. Malgré les différents essais en variant la température, la nature du solvant et l'ajout éventuel de NaHCO<sub>3</sub> ou d'acide acétique, nous n'avons observé que la formation de ce produit **269** ou de la dégradation. Les réactions avec le 2-bromo-4'-nitroacétophénone **270**<sup>343</sup> et la 2-bromo-acétophénone **272**<sup>340,344</sup> ont été également mises en œuvre pour comparer les réactivités, mais tout comme **268**, le produit **271** n'a pu être obtenu. Le composé **273** s'est formé avec un rendement de seulement 12%. En effet, l'azote en position 4 est le plus nucléophile et il semblerait que l'alkylation par les bromoacétophénones de ce noyau se fasse préférentiellement sur cette position du cycle, empêchant la formation du bicyclic souhaité.<sup>345</sup>

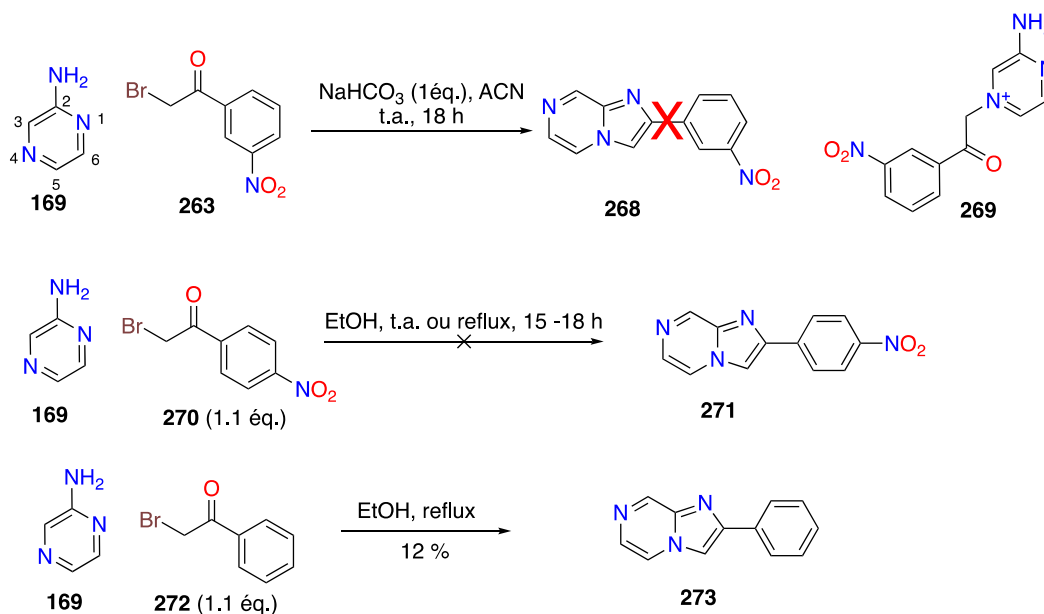


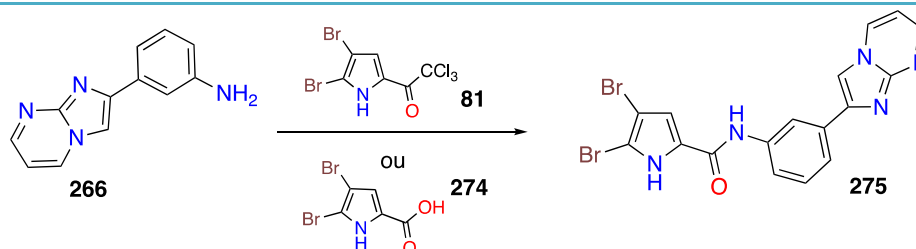
Schéma 45 – Essais de cyclisation avec le 2-amino-pyrazine (169)

## ii. Acylation par le dérivé 4,5-dibromopyrrole

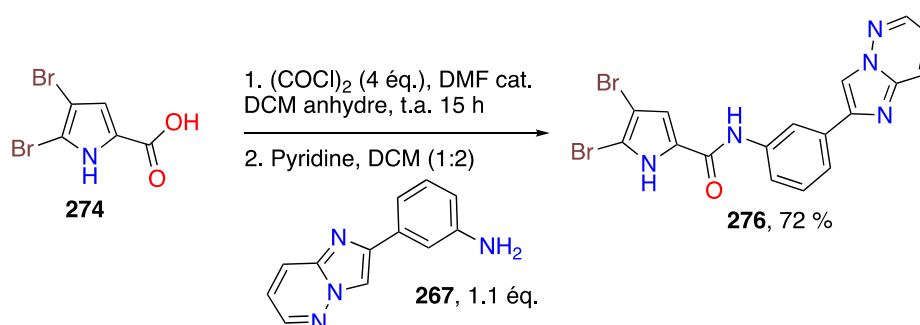
Plusieurs conditions ont été testées pour l'acylation de l'aniline **266** avec le pyrrole **81** (Tableau 13). La réaction dans la triéthylamine à 60 °C nous a permis d'obtenir le produit **275** avec un rendement de 49 % en raison d'une conversion incomplète. Finalement, la préparation du chlorure d'acyle à partir de l'acide carboxylique **274** avec le chlorure d'oxalyle et le DMF en quantité catalytique<sup>346</sup> puis le couplage avec **266** en présence de pyridine nous a donné accès au produit

désiré de façon quantitative.<sup>347,348</sup> Ces conditions (Entrée 8, Tableau 13) ont pu être utilisées pour la réaction de couplage entre le dibromopyrrole **274** et l'aniline **267** (Schéma 46). Le produit **276** a été obtenu avec un bon rendement de 72 %.

**Tableau 13 – Optimisation du couplage entre l'aniline 266 et le pyrrole 81 ou 274**



Entrée	Conditions	Résultats
1	<b>81</b> (1 éq.), DMF anhydre, 60°C, 24 h	Aucune réaction
2	<b>81</b> (1.3 éq.), Et <sub>3</sub> N, 60°C, 17 h	49 %, conversion incomplète
3	<b>81</b> (1.3 éq.), T <sub>3</sub> P (2 éq.), DIEA (2 éq.), DMF anhydre, t.a., 16h	Dégradation
4	<b>81</b> (1.1 éq.), Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (1 éq.), DMF anhydre, 80 °C, 48 h <sup>349</sup>	Aucune réaction
5	<b>81</b> (1 éq.), EDC.HCl (1.2 éq.), HOBT (1.2 éq.), DIEA (5 éq.), DCM, t.a., 48 h	Dégradation
6	<b>265</b> (1 éq.), EDC.HCl (1.3 éq.), HOBT (1.3 éq.), DIEA (3 éq.), DMF anhydre, t.a., 24 h	Aucune réaction
7	1. <b>274</b> (1 éq.) avec SOCl <sub>2</sub> (6 éq.), THF anhydre, 50 °C, 24 h 2. <b>266</b> (1 éq.), Et <sub>3</sub> N (2 éq.), t.a., 16 h	Aucune réaction
8	1. <b>274</b> (1 éq.), (COCl) <sub>2</sub> (3 éq.), DCM anhydre, DMF cat., t.a., 16 h 2. <b>266</b> (1.1 éq.), pyridine, DCM (1:2), t.a., 6 h	Quantitatif



**Schéma 46 – Couplage peptidique de l'aniline 267 pour obtenir l'analogue 276**

## b. Préparation des composés des séries c et d

### i. Préparations des anilines

Les composés des séries C et D ont été préparés par couplage de Suzuki à partir des acides boroniques **277** et **278** nitrés en méta ou en para et des bicycles iodés **79**, **167**, **169** et **172** (Schéma 47).<sup>350,351</sup> Seule la réaction avec le réactif 3-iodoimidazo[1,2-a]pyrimidine **79** et l'acide boronique para-substitué **278** n'a pas fonctionné. La fonction nitro des intermédiaires **279a-g** a été réduite par de l'étain (II) ou du zinc pour donner les sept composés **280a-g**.<sup>342,352</sup>

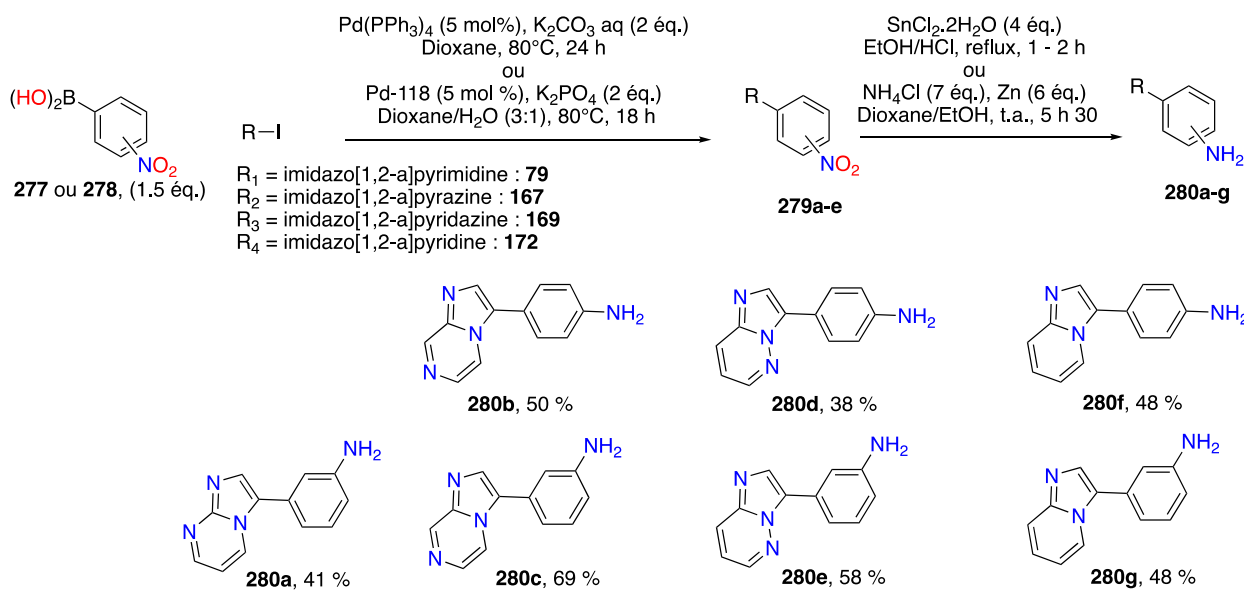


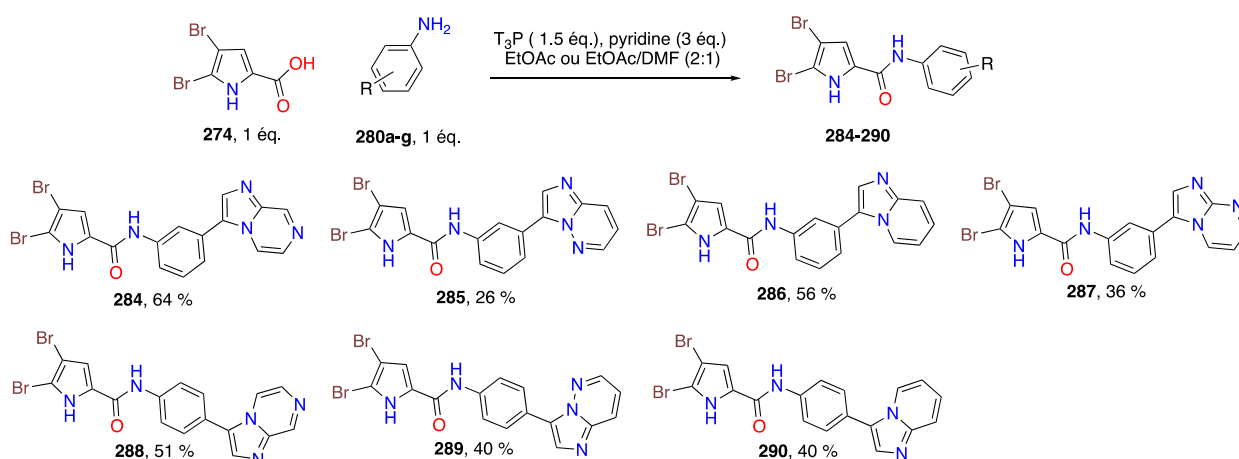
Schéma 47 – Préparation des composés **280a-g** par couplage de Suzuki puis réduction

### ii. Acylation avec le 4,5-dibromopyrrole

Nous avons employé la même méthode de synthèse que présentée sur le Schéma 46 avec du chlorure d'oxalyle pour coupler le pyrrole **274** avec les intermédiaires **280a-g**. Malheureusement, les essais avec les produits **280b** et **280d** n'ont pas abouti à la formation des produits attendus, seule de la dégradation a pu être observée. Nous avons alors utilisés d'autres conditions de couplage en utilisant l'acide 1H-pyrrole-2-carboxylique **281** et l'aniline **282** comme réactifs modèles. Parmi les différentes conditions présentées dans le Tableau 14, la réaction avec l'agent de couplage T<sub>3</sub>P en présence de pyridine dans l'acétate d'éthyle à température ambiante s'est montrée la plus efficace avec un rendement de 87 %. C'est donc cette méthode qui a été utilisée pour le couplage des anilines **280a-g** avec l'acide 4,5-dibromo-1H-pyrrole-2-carboxylique **274** pour conduire aux sept produits finaux **284-290** (Schéma 48).

**Tableau 14 – Optimisation du couplage peptidique en utilisant le pyrrole 281 et l'aniline (282)**

Entrée	Conditions	Résultat
1	EDC.HCl (1.5 éq.), DMAP (1.5 éq.), DMF, t.a., 24 h	59 %
2	EDCI (1.5 éq.), HOBT (1.5 éq.), DIPEA (3 éq.), DMF, t.a., 24 h	78 %
3	T <sub>3</sub> P (1.5 éq.), pyridine (3 éq.), EtOAc, t.a., 24 h	87 %
4	HATU (1.2 éq.), DIPEA (3 éq.), DMF, t.a., 24 h	59 %
5	TBTU (1.1 éq.), DIPEA (3 éq.), DCM dry, 50°C, 24 h	57 %
6	CDI (1.5 éq.), DMF, t.a., 24 h	6 %



**Schéma 48 – Préparation des produits finaux 284-290**

### 3. Linker saturé

Nous avons souhaité introduire un linker aliphatique pour apporter davantage de flexibilité aux inhibiteurs. Une première approche synthétique a utilisé le 1,3-diaminopropane **291** comme linker saturé. Il a tout d'abord été protégé en **292** sur seulement une des amines avec un groupement Boc,<sup>353</sup> puis nous avons entrepris de coupler cette amine avec le bicyclic iodé **79** par substitution nucléophile aromatique, par couplage de Buchwald-Hartwig ou par couplage de type Ullmann catalysé au cuivre (Tableau 15). Malgré nos multiples essais, le produit désiré **293** n'a pas pu être détecté.

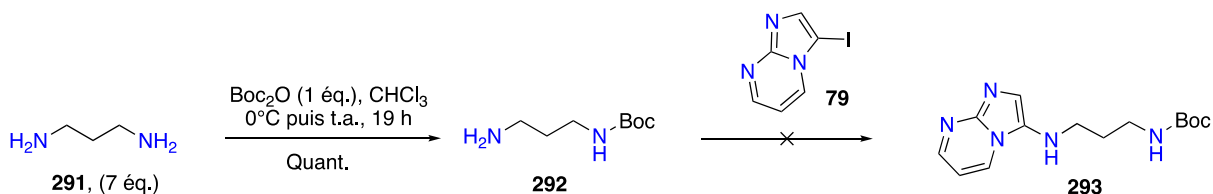


Schéma 49 – Synthèse du 1,3-diaminopropane protégé et tentative de couplage avec 79

Tableau 15 – Conditions de couplage de Buchwald-Hartwig ou de type Ullmann avec le dérivé iodé 79

Entrée	Conditions	Résultat
1	CuI (0.4 éq.), DIPEA (3 éq.), Isopropanol, reflux, 15 h	Aucune réaction
2	CuI (10 mol%), K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (2 éq.), L-proline (0.5 éq.), DMF, 90°C, 7 h <sup>354</sup>	Dégradation
3	ET <sub>3</sub> N (3 éq.), MeCN, 80 °C, 15 h	Aucune réaction
4	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (3 éq.), DMF, 100°C, 15 h	Dégradation
5	Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> (10 mol%), Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (3 éq.), Dioxane anhydre, 100°C, 24 h	Dégradation
6	Pd(OAc) <sub>2</sub> (5 mol%), PPh <sub>3</sub> (10 mol%), NaO <sup>t</sup> Bu (2 éq.), THF, 70°C, 7 h	Dégradation
7	Pd(dtbpf)Cl <sub>2</sub> (5 mol%), Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (3 éq.), Dioxane, t.a., 18 h	Aucune réaction
8	Pd <sub>2</sub> (dba) <sub>3</sub> (10 mol%), XantPhos (30 mol%), Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (3 éq.), DMF, 100°C, 5 h	Dégradation
9	Pd(dtbpf)Cl <sub>2</sub> (5 mol%), Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (3 éq.), Dioxane, 90°C, 7 h	Dégradation

Nous avons préparé le produit **294** chloré dans l'objectif de favoriser la SnAr, l'atome de chlore étant plus petit que l'atome d'iode (Schéma 50). La chloration s'est faite avec le N-chlorosuccinimide avec un rendement de 74 %. Les conditions testées sont regroupées dans le Tableau 16, mais n'ont abouti à aucun succès.

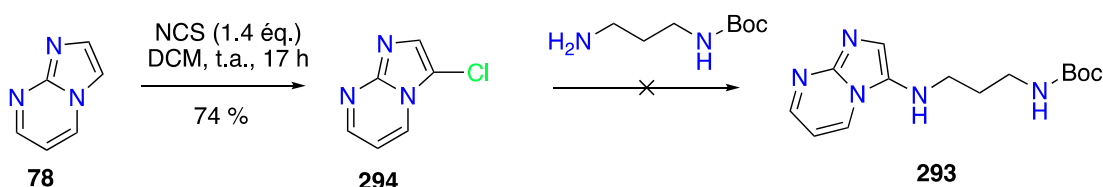
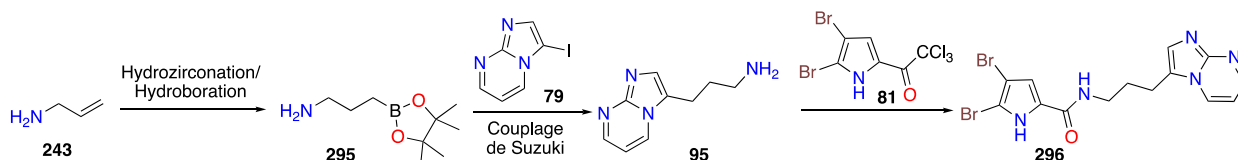


Schéma 50 - Synthèse du bicyclore chloré 294 et tentative de couplage avec 79

**Tableau 16 - Conditions de couplage de Buchwald-Hartwig ou de type Ullmann avec le dérivé chloré 294**

Entrée	Conditions	Résultat
1	Et <sub>3</sub> N (1.2 éq.), MeCN, t.a., 16 h <sup>35b</sup>	Aucune réaction
2	DIPEA (2 éq.), Isopropanol, 80 °C, 16 h	Aucune réaction
3	DIPEA (2 éq.), Butanol, 85 °C, 16 h	Aucune réaction
4	DIPEA (2 éq.), DMF, 85 °C, 16 h	Aucune réaction
5	Pd <sub>2</sub> (dba) <sub>3</sub> (10 mol%), XantPhos (20 mol%), Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (2 éq.) DMF anhydre, 90 °C, 3 h	Aucune réaction

Une approche synthétique que nous aurions pu envisager pour accéder aux dérivés saturés s'appuie sur la préparation de l'ester boronique **295** à partir de l'allylamine **243** avec les mêmes conditions que précédemment utilisées pour la synthèse de **255** (Schéma 51). Avec cet intermédiaire, un couplage de Suzuki est envisagé avec le composé iodé **79**, suivi d'un couplage peptidique avec **81** pour conduire au produit **296**.



**Schéma 51 – Voie envisagée pour la préparation de 296**

Le produit **296** s'est avéré disponible dans la chimiothèque du laboratoire. Il a été obtenu dans l'équipe au cours de la thèse de Sylvain Picon comme produit secondaire.<sup>356</sup> Sa synthèse est décrite sur le Schéma 52. Le trichloroacétylpyrrole **81** est couplé avec le 5-aminopentanol pour donner le produit **297**. Il est ensuite oxydé avec l'acide ortho-iodoxybenzoïque (IBX) en aldéhyde **298**, qui cyclise spontanément avec l'azote de l'amide pour donner **299**. Le produit cyclisé **299** est ensuite déshydraté par traitement à l'acide citrique avec un appareil de Dean-Stark pour conduire à la tétrahydropyridine **300**. Elle est engagée dans un couplage oxydatif avec la 2-aminopyrimidine (**77**) en présence de N-iodosuccinimide à - 40 °C pour obtenir le produit **301** avec un rendement de 52 %. La bromation du pyrrole **301** avec du dibrome a conduit à la formation du produit d'ouverture de l'aminal cyclique **296** avec un rendement de 7 %, en plus du produit initialement désiré **302**. L'obtention du produit ouvert **296** s'explique par la présence d'acide bromohydrique libéré lors de la réaction. Ceci nous a permis de cribler le produit **296**, comme il le sera montré ultérieurement, ce composé n'a présenté aucune activité, ce qui explique que nous n'ayons pas poursuivi nos efforts de synthèse sur la préparation de dérivés possédant un linker aliphatique.

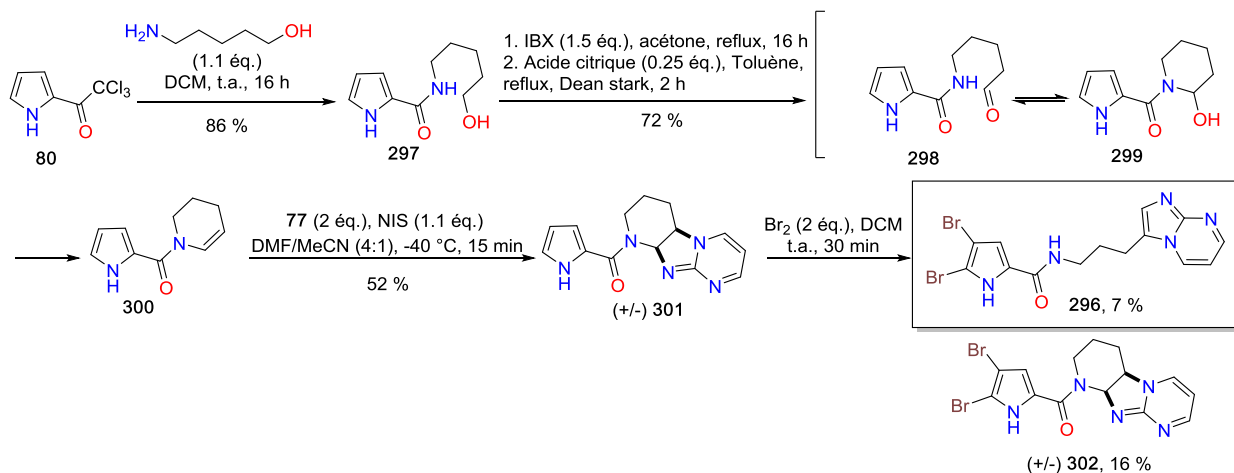


Schéma 52 – Synthèse du produit 296

#### 4. Linker triazole

Le dernier linker que nous avons choisi de tester est le motif 1,2,3-triazole. Comme représenté sur la Figure 82, ce motif éloigne les deux noyaux I et II, bien qu'il offre une orientation similaire à celle de **EL228**. De plus, le motif triazole présente des propriétés intéressantes en chimie médicinale. Il s'agit d'un bioisostère d'amide et ester, ainsi que de nombreux hétérocycles.<sup>357,358</sup> Sa structure aromatique plane et assez rigide est riche en électron. Ainsi, les composés portant un triazole peuvent établir avec les récepteurs biologiques différentes interactions faibles, comme des liaisons hydrogènes, du  $\pi$ -stacking et des interactions de Van der Waals.<sup>359</sup> Ce motif est présent dans des molécules et outils biologiques utilisés dans un large spectre d'activité biologique.

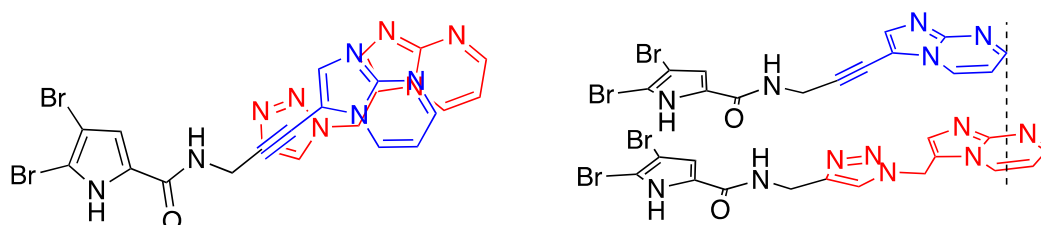


Figure 82 – Superpositions des produits alcyne EL228 et triazole

La rétrosynthèse envisagée (Figure 83) débute avec la préparation du produit hydroxyméthylé **304** par formylation de Vilsmeier-Haack puis réduction ou par hydroxyméthylation au formaldéhyde. Une étape d'azidation en **303** suivie d'une réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen catalysée au cuivre donneraient accès aux dérivés **240e**.

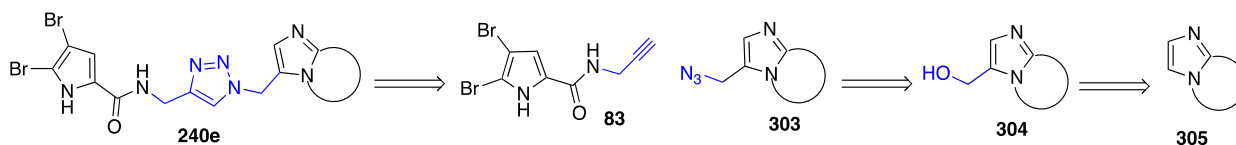


Figure 83 – Rétrosynthèse des produits 1,4-triazole 240e



## a. Hydroxyméthylation

### i. Formylation de Vilsmeier-Haack

La première réaction d'accès aux composés hydroxyméthylés est la formylation de Vilsmeier-Haack de **166** et **306** en aldéhyde **307** et **308** avec du DMF et du trichlorure de phosphore selon les conditions de la littérature.<sup>360,361</sup> L'amide s'additionne sur le trichlorure de phosphore en libérant un ion chlorure qui vient réagir sur le carbone électrophile, donnant lieu à la formation de l'ion chloroiminium, qui est le réactif de de Vilsmeier-Haack. Cette espèce très électrophile subit une substitution électrophile aromatique par le bicyclic. Le chlore est ensuite éliminé et l'iminium résultant est hydrolysé en aldéhyde **307** ou **308**.

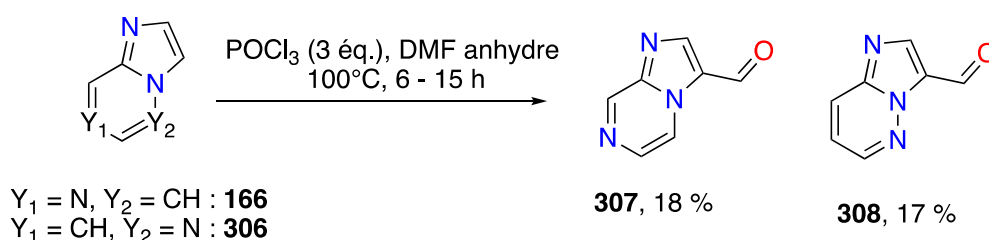
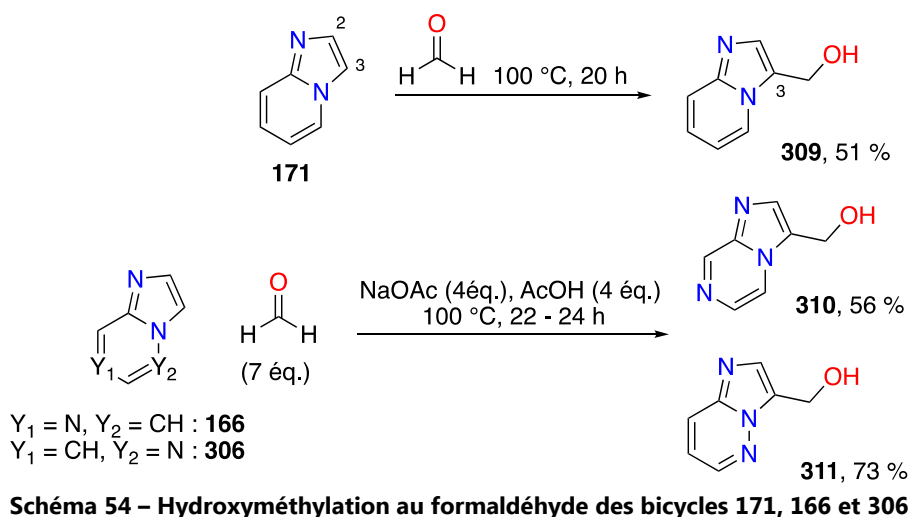


Schéma 53 - Formylation de Vilsmeier-Haack des hétérocycles **166** et **306**

Cependant pour les noyaux imidazo[1,2-a]pyrazine **307** et imidazo[1,2-a]pyridazine **308**, les rendements n'ont pas dépassés les 18 % (Schéma 53). Nous nous sommes tournés vers une autre méthode.

### ii. Hydroxyméthylation directe au formaldéhyde

L'hydroxyméthylation s'opère par la substitution électrophile aromatique au formaldéhyde en solution à 37 % sur la position 3 nucléophile des bicyclics (Schéma 54). Le composé **309** a été préparé à partir de l'imidazo[1,2-a]pyridine **171**, en utilisant le formaldéhyde comme solvant de réaction dans un tube réacteur à 100 °C durant 20 h avec un rendement de 51 %. Cette même réaction qui n'utilise que le formaldéhyde a été aussi tentée pour la préparation du produit **311**, mais nous n'avons obtenu qu'un mélange complexe. L'alternative décrite par Teulade *et al.*<sup>362</sup> utilisant le formaldéhyde en présence d'une solution tampon acide acétique/acétate de sodium a été appliquée aux noyaux imidazo[1,2-a]pyrazine **166** et imidazo[1,2-a]pyridazine **306**.<sup>363,364</sup> Cette méthode a conduit à la formation des produits **310** et **311** avec des rendements respectifs de 56 et 73 %.



## b. Azidation

L'introduction d'un groupe nucléofuge de type halogène,<sup>365</sup> mésyle,<sup>366,367</sup> ou tosylate a été envisagée pour effectuer une substitution nucléophile par l'azoture de sodium. Les quatre essais n'ont pas abouti à la formation du produit **312** attendu (Tableau 17). En effet, au cours du premier essai, le produit isolé à l'issue du traitement de la réaction dans le chlorure de thionyle est le produit **315** portant un méthoxyméthyle en position 3. Lors de cette réaction, le précipité formé par l'ajout du dichlorométhane en fin de réaction a été filtré, puis concentré dans le méthanol. Nous pensons que le composé chloré formé **313** n'est pas stable et se transforme en **314** avec la perte du chlore. La masse de ce composé **314** est d'ailleurs détectée comme pic moléculaire en spectrométrie de masse pour les autres réactions. Le méthanol a ensuite réagi sur cet intermédiaire conduisant au produit **315**. La formation du dérivé chloré avec  $\text{SOCl}_2$  ou  $\text{MsCl}$  suivi de l'azidation *one-pot*, sans traitement intermédiaire, ne nous a pas non plus permis d'obtenir le produit azidé souhaité.

**Tableau 17 – Conditions testées pour l'introduction d'un nucléofuge**

Entrée	Conditions	Résultat
 309 → 312		
<b>1</b>	$\text{SOCl}_2$ , reflux, 20 min	 315 (46 %)
<b>2</b>	$\text{MsCl}$ (1.2 éq.), $\text{Et}_3\text{N}$ (2 éq.), DCM anhydre, t.a., 4 h	Aucune réaction
<b>3</b>	$\text{TsCl}$ (1.2 éq.), Pyridine (2 éq.), DCM anhydre, t.a., 15 h	Disparition du produit de départ, mais pas de produit isolé
<b>4</b>	$\text{PPh}_3$ (1.5 éq.), $\text{CBr}_4$ (1.5 éq.), DMF anhydre, t.a., 15 min	Disparition du produit de départ, mais pas de produit isolé
<b>Réaction d'Appel</b> <sup>365</sup>		

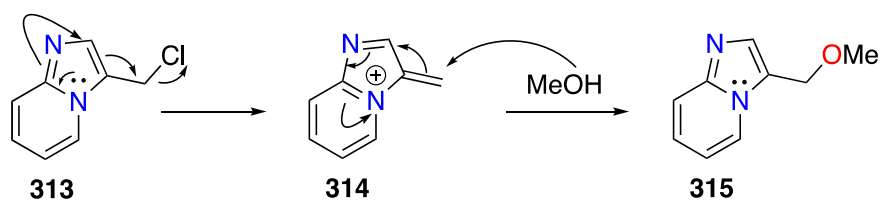
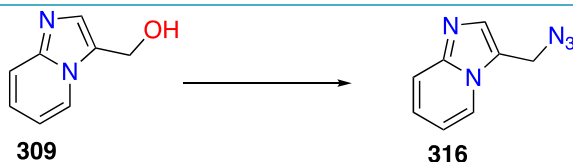


Schéma 55 – Mécanisme suggéré de la formation de 315

L'azoture de diphenylphosphoryle (DPPA) a également été utilisé en présence de DBU<sup>368,369</sup> (Entrée 1, Tableau 18) pour effectuer la substitution nucléophile de l'alcool **309** en azoture **316** et pour la réaction de Mitsunobu (Entrée 2, Tableau 18). La première réaction a bien conduit à la formation du produit **316** mais la présence du complexe de DBU-phosphate de diphenyle a rendu la purification du produit final difficile. La réaction de Mitsunobu quant à elle a abouti à la formation de nombreux produits secondaires observés sur plaque CCM, et aucun n'a pu être isolé.

Tableau 18 – Utilisation du DPPA pour la formation de 316



Entrée	Conditions	Résultat
1	DPPA (1.5 éq.), DBU (1.5 éq.), DMF anhydre, t.a., 18 h	Produit formé mais difficultés de purification
2	PPh <sub>3</sub> (1.1 éq.), DIAD (1.5 éq.), DPPA (1.1 éq.), THF anhydre, 0°C puis t.a., 3 h	Formation de nombreux produits non séparables

En s'inspirant d'un brevet de Boehringer Ingelheim sur un produit de départ similaire,<sup>370</sup> nous avons utilisé l'azoture de sodium en milieu acide avec du TFA comme solvant de réaction d'azidation. La réaction avec **309** à température ambiante a conduit à la formation de **316** avec un rendement de 33 %. En élevant la température à 70°C, nous avons pu améliorer le rendement à 77 % (Schéma 56).<sup>371</sup> Les composés **317** et **318** ont été préparés en suivant cette même méthode avec des rendements de 84 et 56 %.

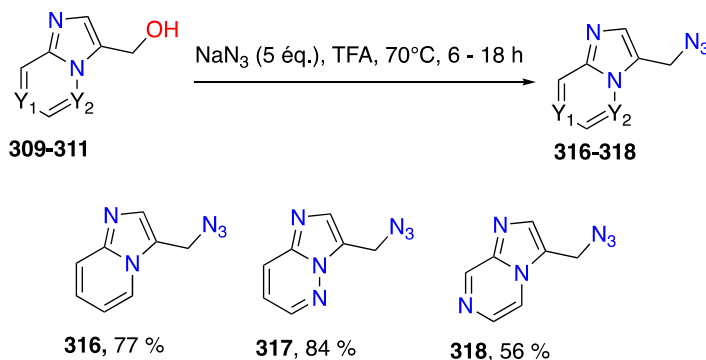


Schéma 56 – Préparation des intermédiaires 316-318 par azidation en milieu acide

### c. Cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen

Les réactifs azidés **316-318** ont été engagés dans une cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen (Schéma 57). Nous avons utilisé 20 mol% de catalyseur au cuivre (II) et 40 mol% d'ascorbate de sodium qui catalyse la réduction de Cu (II) en ions réactifs Cu (I). Nous avons observé en l'espace de quelques minutes la précipitation du milieu et la disparition des réactifs de départ par CCM. Le précipité formé a été filtré et lavé.

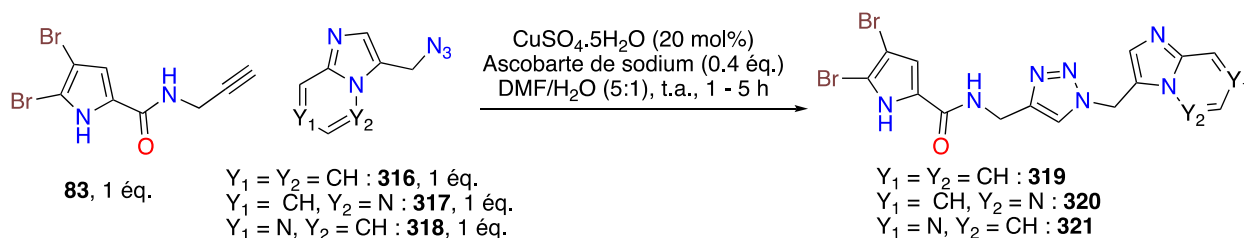


Schéma 57 – Réaction de cycloaddition avec 20 mol% de cuivre (II)

Cependant, les trois produits formés **319-321** se sont montrés extrêmement peu solubles dans les solvants organiques, y compris le DMSO. Bien que le pic moléculaire détecté en spectrométrie de masse corresponde à la masse attendue, les spectres RMN se sont avérés ininterprétables. Des essais de cristallisation ont permis d'obtenir des cristaux de **321** dans le méthanol qui ont pu être analysés par diffraction aux rayons X. Comme illustré sur la Figure 84, les produits de cycloaddition se sont formés mais complexés au cuivre (II) de manière stable, coordonné à quatre molécules par six liaisons, avec une géométrie octaédrique.

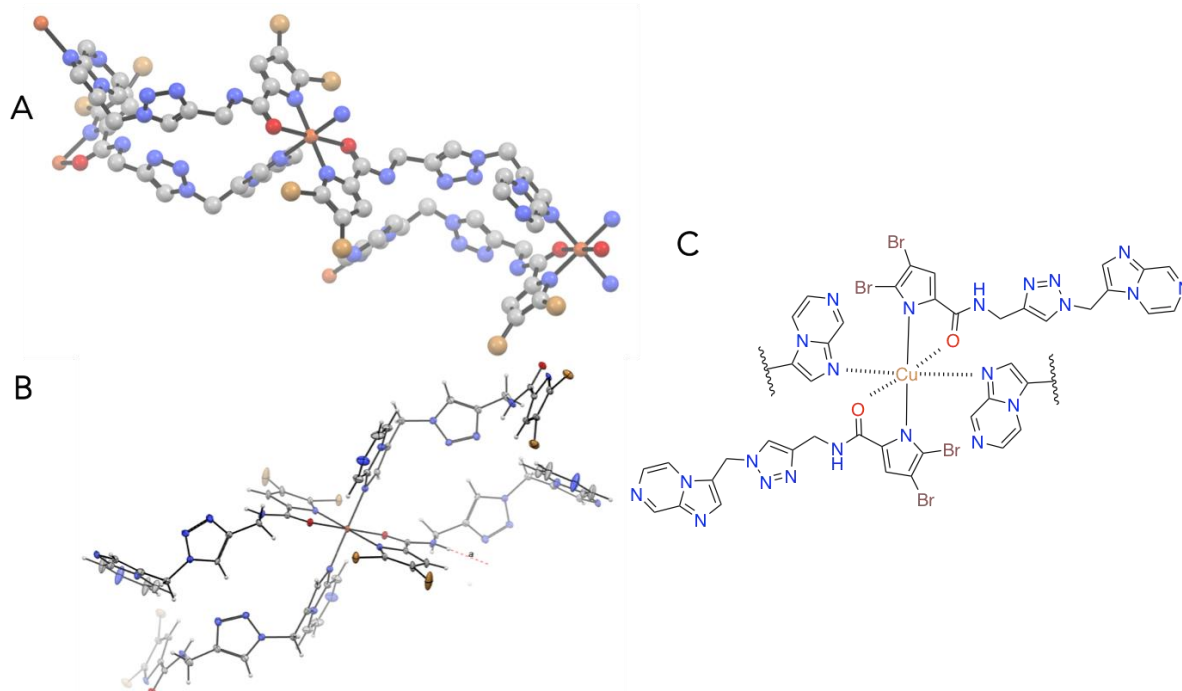
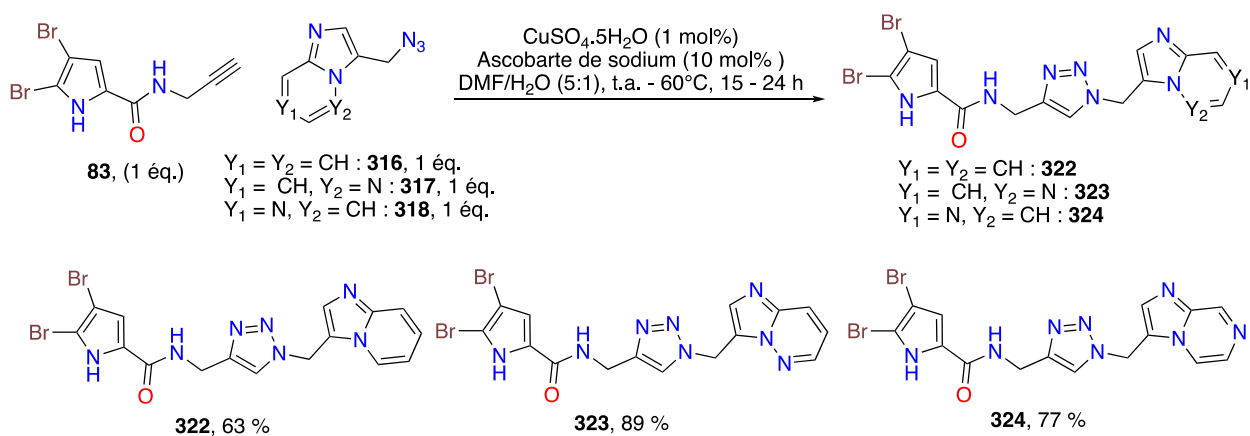


Figure 84 – Cliché RX du complexe **321-Cu<sup>II</sup>**. Les figures A et B sont les images RX avec deux perspectives différentes et la figure C illustre le complexe de cuivre coordonné aux molécules.

Cette complexation a pu être évitée en utilisant une quantité catalytique en cuivre plus faible.<sup>372-374</sup> L'utilisation de 1 mol% de  $\text{CuSO}_4$  nous a permis d'obtenir les trois produits **322-324** avec des bons rendements allant de 63 à 89 % (Schéma 58). Les composés formés non complexés

se sont montrés cette fois-ci plus solubles et ont pu être purifiés sur colonne chromatographique avec les solvants organiques usuels.



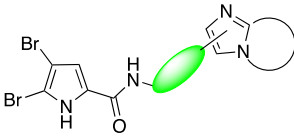
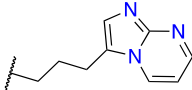
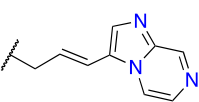
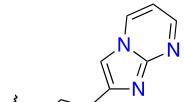
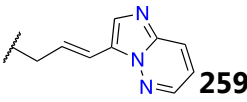
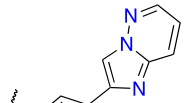
**Schéma 58 – Formation des produits 322-324 par cycloaddition de Huisgen avec 1 mol% de cuivre (II)**

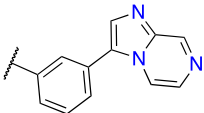
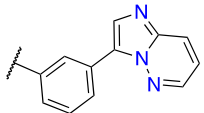
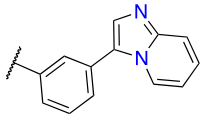
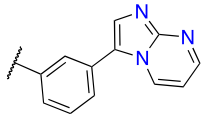
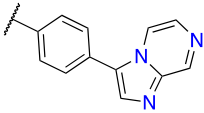
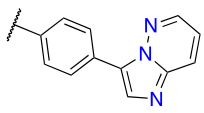
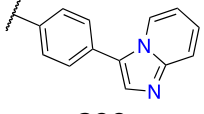

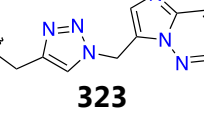

### III. Évaluation biologique et discussion

#### 1. Criblage primaire et $\text{IC}_{50}$ des composés les plus actifs

Comme dans le chapitre précédent, l'ensemble des seize nouvelles molécules finales comportant un linker modifié ont été évaluées à 10  $\mu\text{M}$  et 1  $\mu\text{M}$  sur un panel de kinases dont Aurora B. Pour les molécules présentant une activité inhibitrice intéressante à 1  $\mu\text{M}$ , les  $\text{IC}_{50}$  ont été déterminées. Les valeurs d'inhibition à 10 et 1  $\mu\text{M}$  sont présentées dans le Tableau 19. L'intégralité du criblage est disponible en annexe 2.

**Tableau 19 – Résultats du criblage primaire sur Aurora B des analogues issus de la modification de la partie III**

Produit	% d'inhibition à 10 $\mu\text{M}$	% d'inhibition à 1 $\mu\text{M}$	Produit	% d'inhibition à 10 $\mu\text{M}$	% d'inhibition à 1 $\mu\text{M}$
					
<b>257</b>	31	0	<b>296</b>	9	2
					
<b>258</b>	90	59	<b>275</b>	15	23
					
<b>259</b>	83	45	<b>276</b>	0	0

 <b>284</b>	26	18	 <b>285</b>	45	19
 <b>286</b>	68	18	 <b>287</b>	25	15
 <b>288</b>	54	9	 <b>289</b>	72	42
 <b>290</b>	94	91	 <b>322</b>	27	15
 <b>323</b>	28	10	 <b>324</b>	4	1

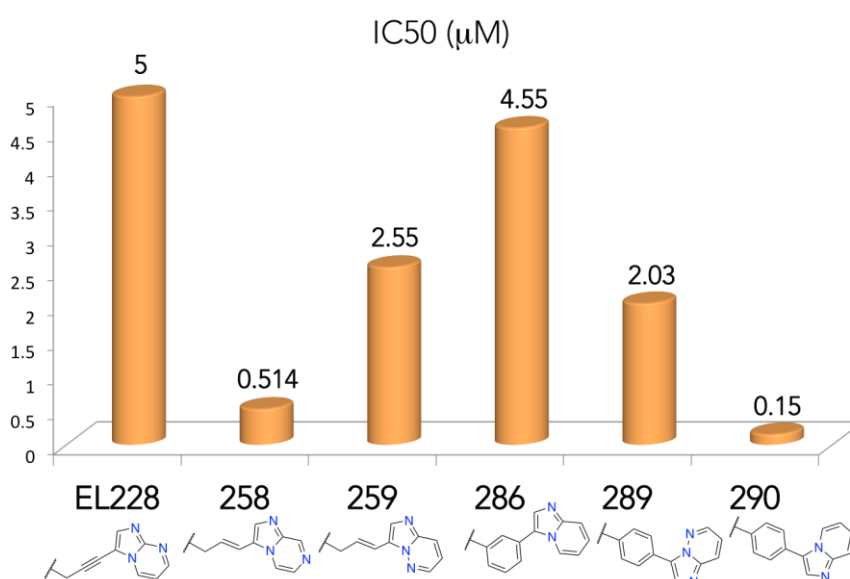


Figure 85 – IC<sub>50</sub> des composés à linkers modifiés les plus actifs

## 2. Interprétation des résultats

La Figure 86 illustre l'activité et la sélectivité des composés selon la nature du linker à 1 µM. Pour chacun des graphes (A, B, C et D), la partie bicyclique est fixée, permettant de ne mettre en avant que l'effet des linkers. Ce qui ressort de ces quatre graphes, c'est qu'aucun linker ne présente une activité meilleure que celles obtenues précédemment avec l'alcyne. En effet, ni les alcènes, ni les triazoles, ni les noyaux aromatiques n'ont amélioré l'activité sur Aurora B. Le linker aliphatique qui n'a pu être testé qu'avec le produit **296** possédant le noyau imidazo[1,2-

a]pyrimidine n'a montré aucune activité sur Aurora B non plus. Quelques composés ont néanmoins présenté une activité inhibitrice modérée. Les  $IC_{50}$  déterminées pour les plus actifs de ce chapitre sont présentées sur la Figure 85. Les linkers alcènes ont montré des activités avec les molécules **258** et **259** portant les noyaux imidazo[1,2-a]pyrazine et imidazo[1,2-a]pyridazine avec des  $IC_{50}$  respectives de 0.514  $\mu$ M et 2.55  $\mu$ M. Ces valeurs restent malgré tout plus faibles que leurs homologues alcynes **161** et **163** (0.185  $\mu$ M et 0.353  $\mu$ M respectivement). Trois produits avec les linkers aromatiques méta **286** et para-substitué **289** et **290** ont une activité inhibitrice sur Aurora B mais avec des  $IC_{50}$  du même ordre de grandeur que **EL228**, de 4.6 et 2  $\mu$ M. Seul le composé **290** s'est avéré bien plus actif avec une valeur d' $IC_{50}$  de 0.150  $\mu$ M. L'orientation imposée par ce linker étant assez différente du hit **EL228**, des études de modélisation pourraient nous permettre de comprendre les raisons de son activité. Les résultats d'activité sur Aurora B qui sont regroupés dans la Figure 87, mettent bien en évidence le linker alcyne comme permettant la meilleure activité avec le bicyclic imidazo[1,2-a]pyrimidine ainsi qu'avec les trois bicyclics comptant parmi les plus actifs, mis en évidence au court du chapitre III précédent (imidazo[1,2-a]pyrazine, imidazo[1,2-a]pyridazine et imidazo[1,2-a]pyridine).

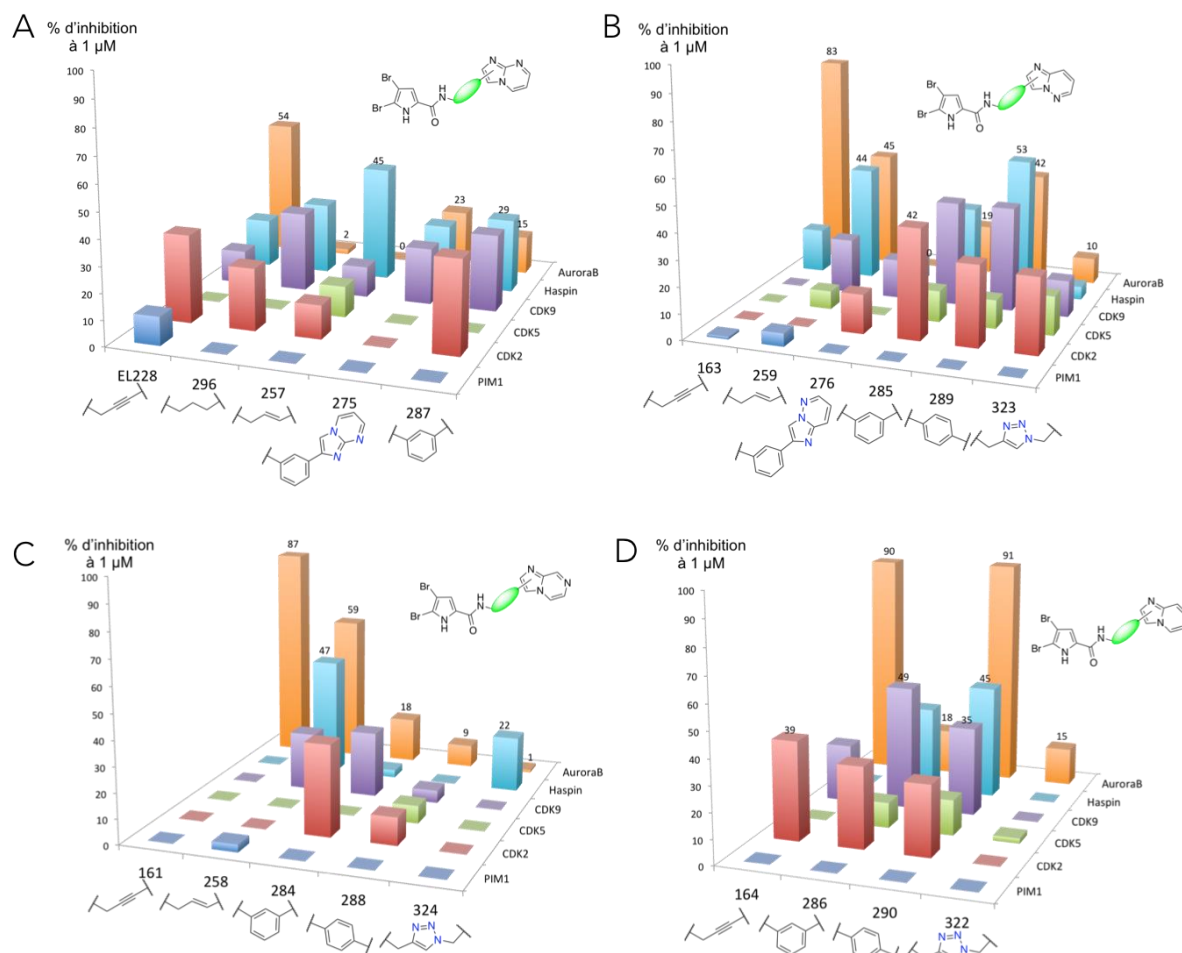
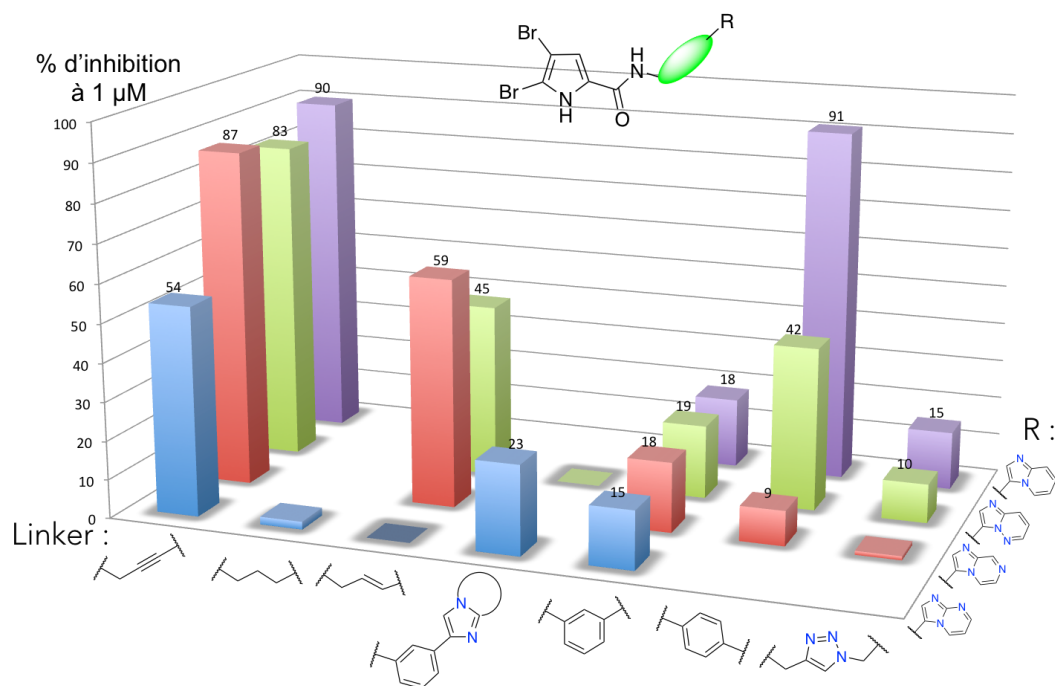


Figure 86 - Histogrammes illustrant le % d'inhibition sur différentes kinases pour chaque linker avec les parties I et II fixées



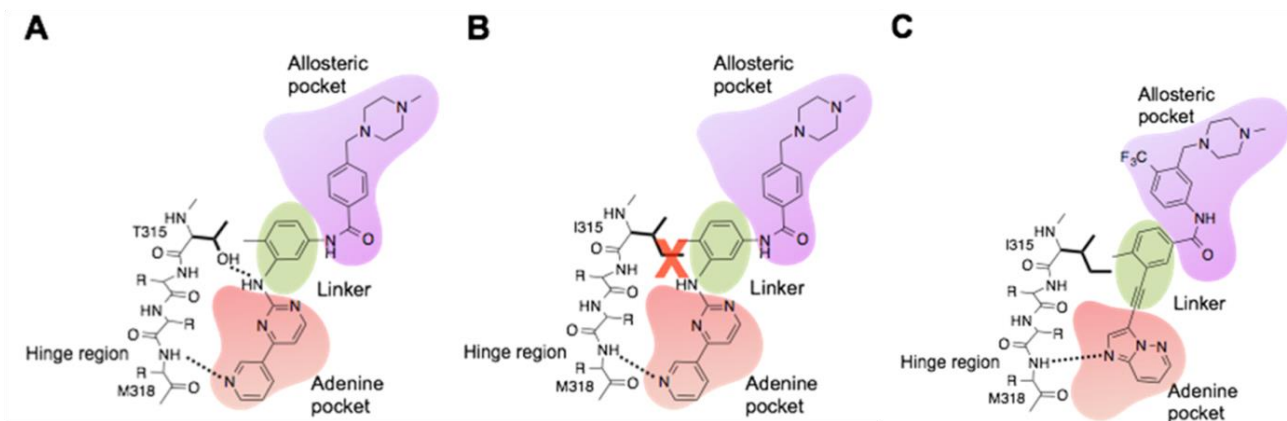
**Figure 87 – Bilan de l'influence des linkers selon le bicyclic imidazo[1,2-a]N-pyridine utilisé**

Le linker alcyne est un espaceur chimique peu encombrant et très rigide. Il semble donc parfaitement adapté pour orienter la molécule dans une poche d'affinité étroite, tout en limitant la gêne stérique. Il permet également de rigidifier la molécule pour optimiser l'activité du composé vis-à-vis de la kinase. L'utilisation de linker acétylénique est couramment utilisée en *drug discovery*, notamment pour l'aspect de rigidification.<sup>375</sup> En effet, un composé qui est flexible peut avoir plusieurs conformations. Parmi ces différentes conformations, une ou plusieurs peuvent être actives, ceci pose donc deux problèmes :

- Les conformations inactives diminuent l'efficacité de la molécule pour son récepteur biologique puisqu'elles ne sont pas favorables.<sup>376</sup>
- Les conformations inactives peuvent impacter la sélectivité en étant plus affines pour d'autres cibles biologiques et donc entraîner des effets secondaires indésirables.<sup>377</sup>

L'intérêt de la rigidification est de maintenir la seule conformation active et sélective.<sup>378</sup> Cette stratégie est notamment illustrée par la mise au point du ponatinib qui a permis de contourner les phénomènes de résistance qui sont rapidement survenus avec l'imatinib (Figure 88). En effet, une mutation du résidu du «*gatekeeper*» en isoleucine de la kinase Bcr-Abl a rendu l'imatinib inefficace. L'introduction du linker alcyne a permis de positionner la molécule dans la poche allostérique tout en évitant la gêne stérique avec le résidu isoleucine.<sup>309,379,380</sup>





Imatinib dans Bcr-AbI<sup>WT</sup>

Imatinib avec le résidu muté  
(T315I)

Ponatinib avec le résidu I315

**Figure 88 – Illustration de l'utilisation d'un linker alcyne avec le cas des médicaments imatinib et ponatinib<sup>379</sup>**

## IV. Conclusion

Au cours de ces travaux, nous nous sommes intéressés à la modification du linker entre les parties I et II, nous conduisant à la préparation de seize nouveaux composés. Quatre familles de linkers chimiques ont été étudiées, en plus du linker alcyne qui fait partie de tous les composés préparés au cours des précédents chapitres.

Les trois composés alcéniques **257**, **258** et **259** ont été préparés en utilisant une réaction d'hydroboration catalysée au zirconium pour préparer l'ester boronique permettant l'introduction de l'alcène. Les bicycles introduits en partie II sont les noyaux imidazo[1,2-a]pyrimidine, imidazo[1,2-a]pyrazine et imidazo[1,2-a]pyridazine.

Des linkers aromatiques ont ensuite été introduits, ils sont de trois type selon leur substitution en para ou méta et selon s'ils sont couplés en position 2 ou 3 du bicycle (de la partie II). Ces linkers apportent un angle et un encombrement différents par rapport au linker alcyne. Les deux composés **275** et **276** avec un linker aromatique méta substitué lié au bicycle en position 2 ont été synthétisés par une première réaction de cyclisation avec la 2-bromo-3'-nitroacétophénone **263**. Les bicycles imidazo[1,2-a]pyrimidine et imidazo[1,2-a]pyridazine ont été utilisés, tandis que le bicycle imidazo[1,2-a]pyrazine n'a pu être introduit à cause de la nucléophilie de l'azote 7. Sept produits (**284-290**) dont le bicycle est lié au linker aromatique en position 3 ont été synthétisés, à partir des acides boroniques méta et para substitués (**277-278**). La dernière étape de couplage entre les anilines et l'acide carboxylique du dibromopyrrole a nécessité une optimisation qui nous a conduit à l'utilisation de l'agent de couplage T<sub>3</sub>P.

Bien que plusieurs réactions aient été réalisées pour préparer les dérivés aliphatiques, nous n'avons pu en préparer aucun. Cependant, nous avons eu accès au dérivé **296** dans notre chimiothèque, nous permettant de tester son activité décevante. Ce composé présente une

flexibilité bien plus importante que le linker alcyne, qui ne semble alors pas favorable avec le site de fixation de la kinase.

Enfin, l'introduction du linker triazole sur trois produits **322-324** s'est faite par hydroxyméthylation au formaldéhyde puis par azidation en milieu acide avec l'azoture de sodium. L'utilisation de 20 mol % de catalyseur au cuivre dans la réaction de click a conduit à la formation de complexe de cuivre identifiés par RX, rendant les produits inexploitable pour les évaluations biologiques. L'utilisation de cuivre à 1 mol% a permis la préparation des trois analogues. Ce linker apporte une fonction chimique très différente avec des interactions possibles nouvelles et allonge la molécule.

Les évaluations biologiques des seize composés ont montré sans ambiguïté que les séries portant un linker alcyne sont plus actives vis-à-vis de la kinase Aurora B (Figure 89). Les linkers alcènes et aromatiques ont tout de même présentés des activités inhibitrices lorsqu'ils sont combinés aux bicycles imidazo[1,2-a]pyrazine **258** ( $IC_{50} = 0.51 \mu M$ ), imidazo[1,2-a]pyridazine **259** ( $IC_{50} = 2.6 \mu M$ ), **289** ( $IC_{50} = 2 \mu M$ ) et imidazo[1,2-a]pyridine **286** ( $IC_{50} = 4.6 \mu M$ ). Seul le composé **290** s'est démarqué avec une  $IC_{50}$  de  $0.150 \mu M$ . Néanmoins à ce stade il est difficile de tirer des conclusions quant aux relations structure-activité de ce produit.

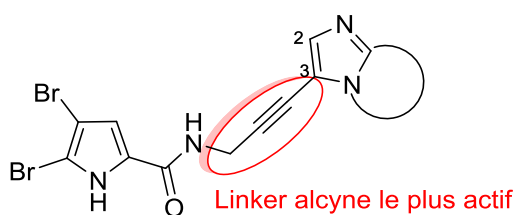


Figure 89 - Bilan de la SAR autour du linker



# **Chapitre V**

## **Évaluations**

### **pharmacologiques**

### **et étude du mode**



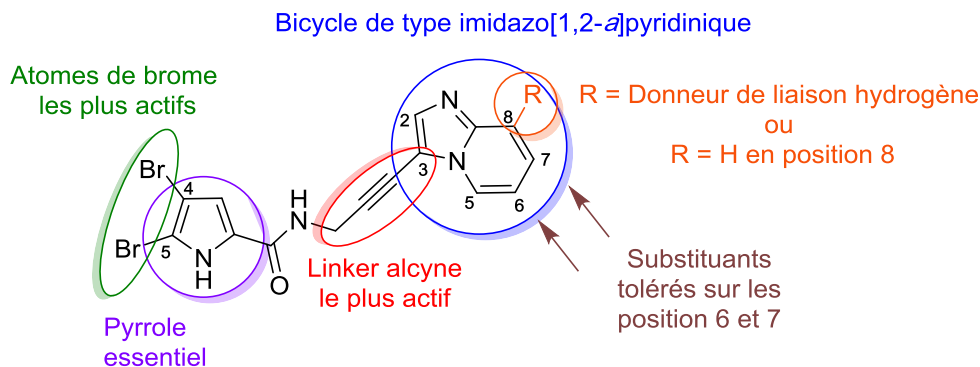
# Chapitre V – Évaluations pharmacologiques et étude du mode d'action

## I. Évaluations biologiques

### 1. Inhibition des kinases et bilan de la SAR

Les quatre-vingt-deux composés que nous avons synthétisés ont été évalués sur un panel de kinases à la plateforme de criblage d'inhibiteurs de kinases (Kinase Inhibitor Specialized Screening facility, KISSf) de la Station biologique de Roscoff. Les six kinases communes aux différents panels testés sont les kinases Pim1, CDK2, CDK5, CDK9, Haspine et Aurora B. Pour des raisons d'homogénéité, seuls les résultats sur ces six kinases ont été présentés, mais les résultats complets sont disponibles en annexe 2. Les composés ont été criblés à 1 à 10  $\mu\text{M}$  en duplicat. Pour les composés qui montrent une activité inhibitrice, les courbes de dose-réponse ont été obtenues à six concentrations différentes en inhibiteur à partir desquelles les  $\text{IC}_{50}$  ont été déterminées. En nous appuyant sur ces valeurs d'activité, nous avons effectué les études de relations de structure-activité afin de guider le *design* des composés synthétisés tout au long de ce travail.

La Figure 90 présente les conclusions tirées de l'étude SAR à l'issue de chacun des précédents chapitres. Le pyrrole s'est montré être l'hétérocycle le plus actif sur la partie I du hit et la présence des deux atomes de brome en position 4 et 5 est également essentielle au maintien de l'activité. Les composés les plus actifs possèdent sur la partie II les bicycles imidazo[1,2-a]pyrazine et imidazo[1,2-a]pyridazine mais surtout le bicycle imidazo[1,2-a]pyridine. A titre d'exemple, le composé **164** possédant ce noyau a une  $\text{IC}_{50}$  de 47 nM. Ceux substitués avec un méthyle en position 6 avec **207** ou en position 7 comme **208** présentent des valeurs d' $\text{IC}_{50}$  tout aussi intéressantes de 40 et 36 nM respectivement, ce qui représente un gain d'activité de 107 et 139 fois par rapport au hit initial **EL228** ( $\text{IC}_{50} = 5000$  nM). Le composé **194** qui présente une amine libre en position 8 est le plus actif avec une  $\text{IC}_{50}$  de 34 nM, soit 146 fois plus actif que le hit initial **EL228**. De plus, ces composés les plus actifs ont tous montré une bonne sélectivité vis-à-vis des autres kinases testées. Enfin, parmi les différents linkers introduits, le lien alcyne est le plus actif, il oriente très probablement de façon rigide la molécule dans une poche étroite, tout en limitant la gêne stérique.



**Figure 90 – Bilan des relations structure-activité**

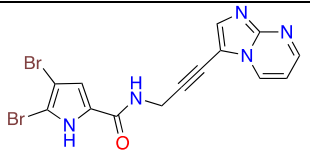
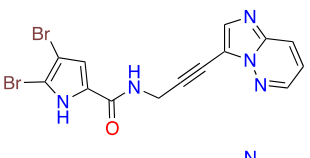
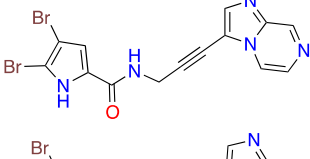
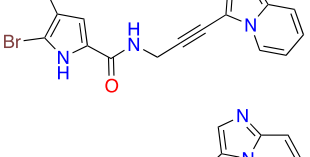
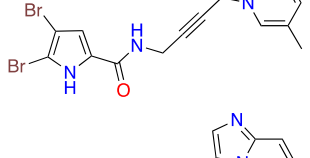
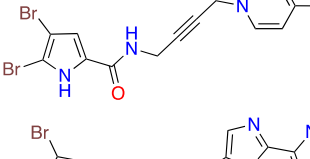
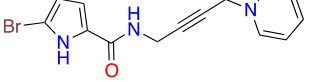
Lipinski *et al.* ont développé une règle servant de guide dans l'optimisation de composés en cinq critères afin d'estimer si leurs propriétés sont compatibles avec leur absorption dans l'organisme et les propriétés « Druglike » :<sup>381</sup>

- Masse molaire  $\leq 500 \text{ g.mol}^{-1}$
- Nombre d'accepteurs de liaison hydrogène  $\leq 10$
- Nombre de donneurs de liaison hydrogène  $\leq 5$
- Coefficient de partage *n*-octanol/eau (logP) compris entre 0 et 5 (valeur optimale entre 1 et 3),<sup>382</sup> qui quantifie la lipophilie d'un composé, paramètre crucial dans l'absorption, la distribution et la biodisponibilité d'un composé. Un logP élevé traduit une molécule très lipophile.
- Nombre de liaisons pivotables  $\leq 5$

La surface polaire totale (Total Polar Surface Area, TPSA) peut être incluse comme sixième critère et doit être dans l'idéal inférieure à 140 Å.

Pour les six composés les plus actifs et le hit initial, nous avons utilisé le logiciel de prédiction Molinspiration pour déterminer les valeurs théoriques de LogP, TPSA et si les cinq règles de Lipinski étaient respectées. Les valeurs sont présentées dans le Tableau 20, et montrent que ces composés respectent la règle de Lipinski. L'introduction d'un azote endo-cyclique ou exocyclique se traduit par une diminution du logP. Les très bonnes activités sur Aurora B des composés **207** et **208** qui possèdent un méthyle sur le bicycle, peuvent potentiellement s'expliquer par ce gain de lipophilie. En effet, l'augmentation de la lipophilie tend à renforcer l'interaction avec des poches hydrophobes du site de fixation sur la kinase.<sup>383</sup> Néanmoins, lorsque l'activité augmente par le gain de lipophilie les risques de diminuer la sélectivité et la biodisponibilité sont plus grands.<sup>384,385</sup> En effet, plus les molécules sont lipophiles, plus elles sont susceptibles d'interagir avec d'autres sites hydrophobes comme les protéines plasmatiques.<sup>386,387</sup> Globalement, nos composés présentent des caractéristiques au regard de la règle de Lipinski qui sont cohérentes avec des potentielles molécules à visée thérapeutique.

**Tableau 20 – Prédiction *in silico* du LogP et TPSA ainsi que le respect de la règle de Lipinski avec le logiciel Molinspiration**

Structure	Référence	IC <sub>50</sub> Aurora B (nM)	LogP <sup>a</sup>	TPSA <sup>a</sup>	M (g/mol)	Règles de Lipinski
	<b>EL228</b>	5000	2.46	75.1	423.1	<input checked="" type="checkbox"/>
	<b>163</b>	353	2.87	75.1	423.1	<input checked="" type="checkbox"/>
	<b>161</b>	185	2.48	75.1	423.1	<input checked="" type="checkbox"/>
	<b>164</b>	47	3.28	62.2	422.1	<input checked="" type="checkbox"/>
	<b>207</b>	40	3.78	62.2	436.1	<input checked="" type="checkbox"/>
	<b>208</b>	36	3.78	62.2	436.1	<input checked="" type="checkbox"/>
	<b>194</b>	34	2.82	88.2	437.1	<input checked="" type="checkbox"/>

## 2. Tests de viabilité sur lignées cellulaires

En plus des tests enzymatiques effectués à la plateforme KISSf de Roscoff, les molécules ont été testées sur différentes lignées cellulaires humaines à l'ICSN dans l'équipe CiBi qui m'a formée à la culture cellulaire ainsi qu'à la réalisation des tests de détermination de la viabilité cellulaire. L'objectif a été de déterminer les concentrations en composé qui inhibent la prolifération cellulaire de 50 % (EC<sub>50</sub>) par rapport au contrôle (DMSO). Nous avons choisi d'utiliser deux lignées cellulaires humaines d'origine cancéreuse, les cellules adhérentes HCT116 d'adénocarcinome du colon et les cellules non adhérentes K562 de leucémie myéloïde chronique. L'ensemble des composés a été testé à 100 µM sur chacune des deux lignées sur un temps de 72 h. Les composés qui ont entraîné une diminution du nombre de cellules de plus de 50 % sur au moins une des deux lignées ont été sélectionnés pour déterminer leur EC<sub>50</sub> à partir de courbes de dose-réponse.



## a. Matériel et méthode

Les cellules HCT116 ont été cultivées dans le milieu Gibco McCoy's 5A complété avec 10% de sérum foetal de veau et 1% de glutamine et les cellules K562 avec du RPMI 1640 complété avec 10% de sérum foetal de veau et 1% de glutamine. Les cellules ont été cultivées à 37 °C dans une atmosphère humide à 5% de CO<sub>2</sub>.

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques 96 puits (3.10<sup>3</sup> cellules par puit pour HCT116 et 3,5.10<sup>3</sup> pour K562) dans 90 µL de milieu de culture pendant 24 h. Les cellules ont ensuite été exposées à dix concentrations croissantes de molécules de 100 µM à 0.005 µM en triplicat. Chaque concentration a été obtenue par dilutions en série dans le milieu de culture à partir des molécules en solution dans le DMSO. Le contrôle négatif a été traité avec du DMSO dilué dans le milieu de culture et le contrôle positif avec le produit commercial de référence pour Aurora B **ZM447439** (Figure 91). Il s'agit d'un inhibiteur 4-aminoquinazoline ATP-compétitif, décrit par AstraZeneca en 2003 qui inhibe sélectivement Aurora B avec une IC<sub>50</sub> de 127 nM (déterminée à la plateforme KISSf avec nos composés) et Aurora A avec une IC<sub>50</sub> de 110 nM.<sup>388,389</sup> Après 72 h d'incubation, la viabilité cellulaire a été mesurée à l'aide du test CellTiter Glo (Promega). Il s'agit d'un test de mesure de la concentration en ATP présent dans les cellules par luminescence à l'aide d'un luminomètre. Les courbes de dose-réponse sont ensuite traitées avec le logiciel GraphPrism.

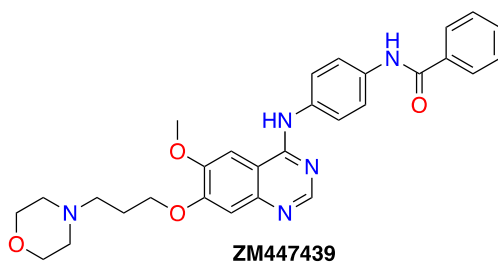


Figure 91 - Structure du composé **ZM447439** utilisé comme référence positive sur Aurora B

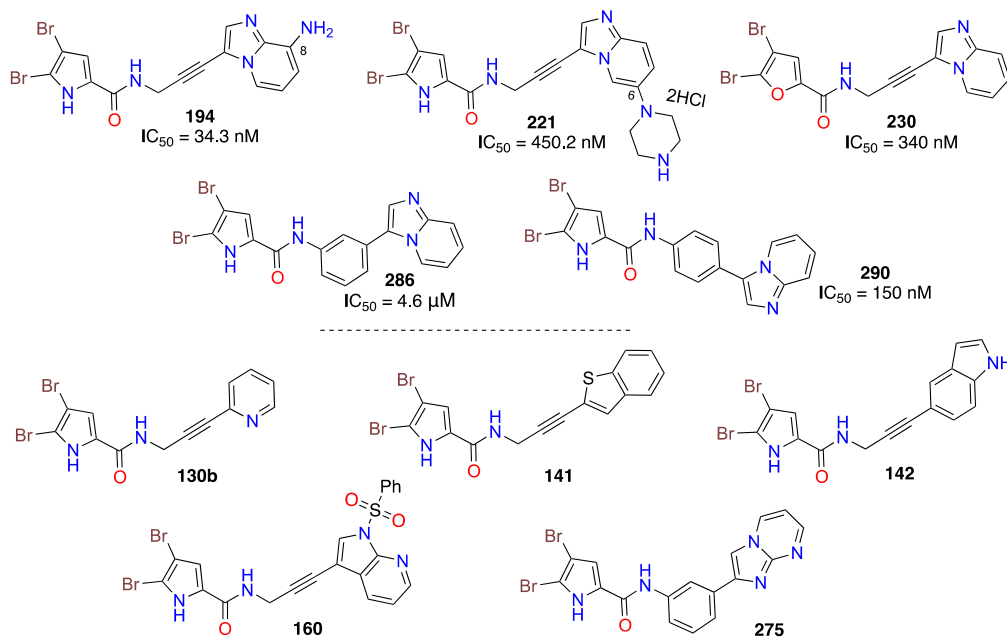
## b. Résultats

Les activités antiprolifératives des trente-cinq composés identifiés comme actifs lors du criblage préliminaire à 100 µM, dont la référence **ZM447439**, ont été déterminées par des expériences de dose-réponse sur les lignées HCT116 et K562, les résultats sont présentés dans le Tableau 21.

**Tableau 21 – EC<sub>50</sub> sur la viabilité cellulaire des lignées HCT116 et K562, calculées à partir des courbes de dose-réponse après 72 h de traitement**

N°	HCT116 EC <sub>50</sub> (µM)	K562 EC <sub>50</sub> (µM)	N°	HCT116 EC <sub>50</sub> (µM)	K562 EC <sub>50</sub> (µM)
<b>EL228</b>	56	51	<b>225d</b>	52	6
<b>110</b>	59	36	<b>221</b>	7	2
<b>130b</b>	7	24	<b>226</b>	65	88
<b>141</b>	34	16	<b>227</b>	> 100	39
<b>142</b>	35	24	<b>229</b>	> 100	60
<b>160</b>	3	15	<b>230</b>	18	17
<b>161</b>	15	44	<b>233</b>	> 100	59
<b>163</b>	76	40	<b>236</b>	> 100	79
<b>194</b>	11	22	<b>237</b>	40	74
<b>202</b>	> 100	55	<b>238</b>	81	> 100
<b>207</b>	5	> 100	<b>239</b>	78	> 100
<b>209</b>	8	32	<b>258</b>	> 100	48
<b>212</b>	3	66	<b>259</b>	65	29
<b>213</b>	93	21	<b>275</b>	36	6
<b>223d</b>	79	38	<b>286</b>	9	22
<b>225a</b>	48	5	<b>287</b>	27	14
<b>225b</b>	65	45	<b>290</b>	12	8
<b>ZM447439</b>	7	9			

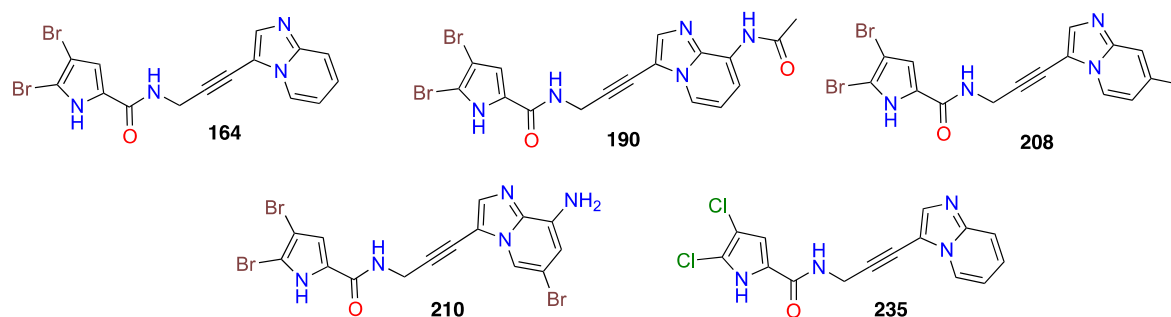
La majorité des composés ont des activités modérées avec des EC<sub>50</sub> supérieures à 20 µM, et neuf produits sont actifs sur seulement une des deux lignées. Six de nos composés sont actifs sur les deux lignées avec des EC<sub>50</sub> inférieures à 20 µM (**160**, **194**, **221**, **230**, **286** et **290**) (Figure 92). Plus particulièrement, le produit **194** qui est le plus actif sur Aurora B (IC<sub>50</sub> = 34 nM) est parmi les sept composés les plus actifs sur cellules avec des EC<sub>50</sub> de 11 et 22 µM sur HCT116 et K562 respectivement, ce qui est très encourageant. Le composé **ZM447439** a montré des effets sur les deux lignées HCT116 et K562 de 7.2 et 8.7 µM respectivement, ce qui du même ordre de grandeur que nos inhibiteurs les plus actifs. Le composé **221** portant un noyau pipérazine utilisé sous forme de chlorhydrate présente de très bonnes activités sur les cellules : EC<sub>50</sub> = 6.8 µM sur HCT116 et 2.4 µM sur K562. Son homologue morpholine non salifié **217** quant à lui n'a pas montré d'effet sur les deux lignées cellulaires. Le composé **160** n'a présenté aucune activité sur les tests biochimiques sur kinases isolées mais est pourtant parmi les plus actifs avec des EC<sub>50</sub> de 3 et 15 µM sur HCT116 et K562, il agirait donc sur une cible biologique autre que celles de notre panel de kinases. C'est le cas également des composés **130b**, **141**, **142**, **275** qui pourraient être intéressants dans le cadre d'autres sujets de chimie médicinale (Figure 92).



**Figure 92 – Structures des produits actifs sur cellules et sur Aurora B (partie du dessus) et ceux actifs uniquement sur cellules**

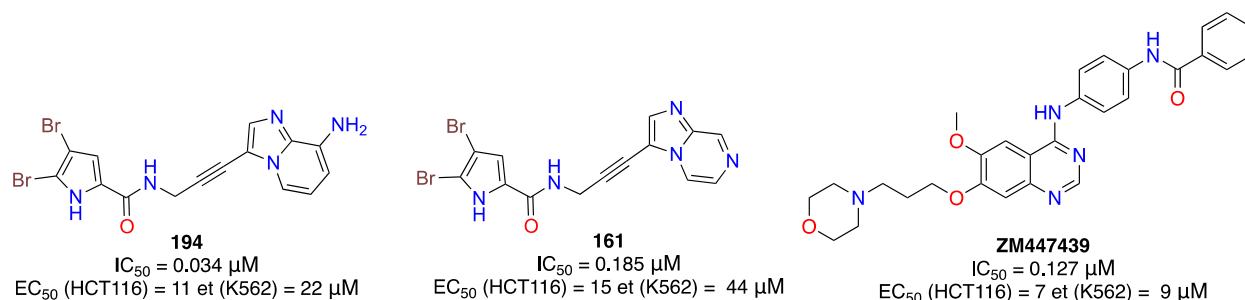
Il est à noter qu'il n'y a pas de corrélation évidente entre les valeurs d'activité des composés sur Aurora B isolée avec celles sur la viabilité cellulaire.<sup>390</sup> Le but est d'interférer avec la mitose, afin de progressivement conduire les cellules en mitose aberrante qui sont par la suite éliminées.<sup>390</sup> Des tests sur des temps plus longs ou des expériences de clonogénicité pourraient s'avérer également pertinents pour juger de l'efficacité des composés sur des modèles cellulaires.<sup>391,392</sup>

Le criblage primaire sur les cellules a mis en lumière également que plusieurs composés, très actifs sur Aurora B en test biochimique, n'ont aucun effet sur les cellules. C'est le cas notamment des composés **164** ( $IC_{50} = 47$  nM), **190** ( $IC_{50} = 87$  nM), **208** ( $IC_{50} = 36$  nM) **210** ( $IC_{50} = 71$  nM) et **235** ( $IC_{50} = 160$  nM) (Figure 93). L'absence d'activité de ces composés sur les cellules peut s'expliquer par plusieurs éléments, comme la faible solubilité des composés en milieu aqueux, la stabilité des composés dans le milieu cellulaire et intracellulaire, le passage des membranes cellulaires, empêchant les composés d'atteindre la cible biologique.



**Figure 93 – Structures des produits actifs sur Aurora B mais pas sur les lignées cellulaires testées**

Nous avons choisi d'utiliser les produits **194** et **161**, actifs sur la kinase et sur les cellules pour les tester sur un plus large panel de cellules avec la référence **ZM447439** (Figure 94).



**Figure 94 - Structures des composés 194, 161 et ZM447439**

En plus des lignées HCT116 et K562, nous avons étendu le panel aux lignées SKOV3 (carcinome ovarien), MCF7 (adénocarcinome du sein), A549 (carcinome pulmonaire), U-2OS (ostéosarcome), K562R (leucémie myéloïde chronique résistante à la doxorubicine) et RPE1 (lignée immortalisée de l'épithélium pigmentaire rétinien). Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 22. Après 72 h d'incubation, nos composés ont un effet sur la viabilité des cellules avec des  $EC_{50}$  allant de 9.3 à 74.6  $\mu\text{M}$ , sauf pour le composé **161** qui n'a pas montré d'activité sur U-2OS. Sur cette dernière lignée, Tavanti *et al.*<sup>143</sup> reporte une  $EC_{50}$  de 2.7  $\mu\text{M}$  pour la référence **ZM447439** à 96 h d'incubation, ce qui semble cohérent avec notre résultat de 29  $\mu\text{M}$  à 72 h d'incubation. La lignée K562R, résistante à la doxorubicine, s'est montrée sensible à nos composés, contrairement au contrôle **ZM447439**.<sup>393,394</sup> Cette lignée surexprime la glycoprotéine P (P-gp) qui est un transporteur transmembranaire de la membrane plasmique, responsable des phénomènes de résistance aux médicaments.<sup>395</sup> Le composé **ZM447439** semble être substrat de cette protéine multi-résistante, contrairement à nos produits.<sup>396</sup> La lignée immortalisée RPE1, bien que non cancéreuse, est sensible aux trois composés puisqu'elle se divise activement. Il serait intéressant pour des prochaines expériences d'évaluer les composés sur des cellules saines qui ne se divisent pas, comme les cellules du sang périphérique (PBMC), afin d'évaluer l'impact de nos inhibiteurs sur des cellules saines non proliférantes. En effet, il est important que le mode d'action des composés anticancéreux soit le plus spécifique possible des cellules tumorales.

**Tableau 22 –  $EC_{50}$  des composés 194, 161 et ZM447439 calculées à partir des courbes de dose-réponse après 72 h de traitement**

Cellules	<b>194</b> $EC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	<b>161</b> $EC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	<b>ZM447439</b> $EC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
<b>HCT116</b>	11	15	7
<b>K562</b>	22	44	9
<b>SKOV3</b>	40	75	31
<b>MCF7</b>	36	34	4
<b>A549</b>	9	42	2
<b>U-2OS</b>	62	> 100	29
<b>K562R</b>	11	25	> 100
<b>RPE1</b>	19	38	28

### 3. Propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques

Dans les projets de chimie thérapeutique, les profils ADMET sont des paramètres déterminés assez tôt dans le processus de recherche de candidats médicaments chefs de file. Ces propriétés permettent de prédire et d'évaluer le devenir des molécules bioactives dans l'organisme vivant. Ces informations sont cruciales pour la mise au point de la voie d'administration, de la forme galénique et aussi du dosage. Ces cinq paramètres correspondent à :

- L'absorption : passage du médicament de son site d'administration à la circulation générale puis à la cible biologique, selon la voie d'administration
- La distribution : proportion de principe actif libre qui atteint de façon effective sa cible (car fixation réversible sur des protéines plasmatiques) et répartition à travers les différents tissus et organes de l'organisme
- La métabolisation : biotransformation du médicament par les enzymes du foie essentiellement grâce aux cytochromes P450
- L'excrétion : élimination du produit après métabolisation (par la bile ou l'urine)
- La toxicité : profil toxicologique du principe actif et de ses métabolites vis-à-vis des différents organes

Afin d'avoir des informations préliminaires sur le comportement de nos composés dans les systèmes vivants, nous avons soumis dix composés (Tableau 23) à des tests de solubilité et de stabilité métabolique auprès de la plateforme de Chimie Biologique Intégrative de Strasbourg (PCBIS).

#### i. Solubilité en milieu aqueux

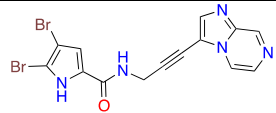
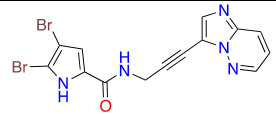
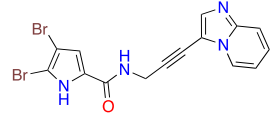
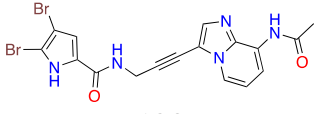
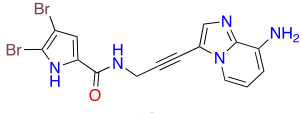
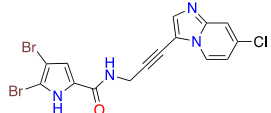
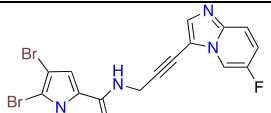
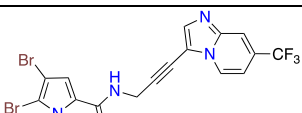
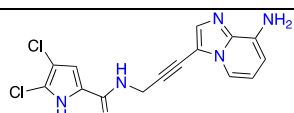
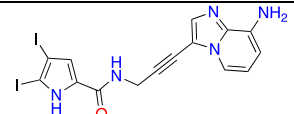
Les dix composés sélectionnés ont été préparés à partir de solutions mères dans le DMSO à 10 mM, diluées au 50<sup>ème</sup> dans le PBS à un pH de 7.4, de manière à obtenir des solutions tests à 200  $\mu$ M (à 2 % de DMSO). Les solutions sont équilibrées sur un agitateur rotatif pendant 24 h à température ambiante ( $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ) et sont ensuite centrifugées à 15000 rpm pendant 5 min à  $20^\circ\text{C}$ . Les surnageants sont analysés par HPLC-UV.

Pour tous les composés testés, les concentrations effectives mesurées sont inférieures à 10  $\mu$ M (Tableau 23). Les composés **161** et **164** sont les plus solubles à hauteur de 7.4 et 8.1  $\mu$ M dans le tampon aqueux, tandis que les **209** et **239** sont très peu solubles puisqu'indétectables dans le tampon. Globalement, ces composés présentent des très faibles solubilités. Ceci nous indique que les activités déterminées de nos composés ( $\text{IC}_{50}$  et surtout  $\text{EC}_{50}$ ) sont très probablement sous-estimées. Ainsi cet axe d'amélioration constitue une priorité pour les prochains analogues à synthétiser.

Il serait intéressant de procéder à ces mêmes analyses avec les composés **217** portant un cycle morpholine et **221** avec un cycle pipérazine (Figure 95), introduit pour justement jouer sur la solubilité des composés. De plus, ces composés ont montré des bonnes activités sur la kinase

et des très bonnes sur les cellules. D'ailleurs, plusieurs produits ont été salifiés en présence d'HCl, mais les sels obtenus n'ont pas permis de préparer les solutions pour les tests sur cellules directement en milieu aqueux, sans avoir recours au DMSO. Ils n'ont pas été utilisés par la suite, l'objectif envisagé initialement étant de ne les diluer qu'en milieu aqueux.

**Tableau 23 – Valeurs de solubilité**

Composé	IC <sub>50</sub> AurB (nM)	λ (nm)	Solubilité (μM)
 <b>161</b>	185	254	7.4 ± 0.6
 <b>163</b>	353	280	4.6 ± 0.1
 <b>164</b>	47	280	8.1 ± 0.9
 <b>190</b>	87	254	1.7 ± 0.4
 <b>194</b>	34	254	2.1 ± 0.2
 <b>209</b>	71	280	0.2 ± 0.1
 <b>212</b>	139	280	0.7 ± 0.3
 <b>213</b>	629	280	1.5 ± 0.9
 <b>236</b>	77	254	3.0 ± 0.2
 <b>236</b>	130	254	0.2 ± 0.1

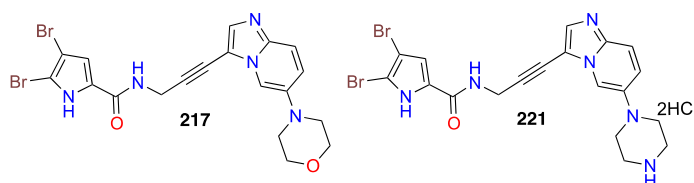


Figure 95 - Structures des produits 217 et 221

## ii. Stabilité métabolique *in vitro*

Les produits dissous dans le DMSO sont dilués dans un mélange acétonitrile/eau à 100  $\mu\text{M}$ . Une fraction de cette solution mère est ensuite diluée avec du tampon phosphate contenant des microsomes de foie de souris (0.5 mg/mL), 1 mM de NADPH et 3 mM de  $\text{MgCl}_2$ . La concentration finale en composé est de 1  $\mu\text{M}$ . Ce mélange réactionnel est incubé durant une heure puis les réactions enzymatiques sont stoppées par ajout d'acétonitrile et maintenues à 0°C. Un contrôle négatif est effectué sans ajout de NADPH, permettant d'identifier une instabilité chimique ou un processus enzymatique non dépendant du co-facteur NADPH. Un contrôle positif est également réalisé en utilisant de la testostérone. Les échantillons sont ensuite analysés par LC-MS/MS avec une UHPLC couplée à un triple quadripôle.

Le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) est une co-enzyme qui intervient dans la réaction de métabolisation catalysée par les cytochromes P450. Il s'agit d'une réaction d'oxydation d'un substrat selon l'équation  $\text{RH} + \text{O}_2 + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{ROH} + \text{H}_2\text{O} + \text{NADP}^+$ .<sup>397,398</sup> Si le taux de composé détecté à l'issue de l'incubation est inférieur au taux à  $t_0$ , ceci traduit une métabolisation par les cytochromes P450.

Les résultats sont regroupés dans le Tableau 24 et représentés sur la Figure 96. Tous les composés testés se sont montrés être des substrats des cytochromes P450. Ils sont tous métabolisés en moins d'une heure, à l'exception du produit **213** qui se trouve à hauteur de 53 % après une heure. Cette stabilité peut s'expliquer par la présence du  $\text{CF}_3$  qui vient ralentir la métabolisation sur le noyau bicyclique, sujet aux oxydations. Deux analogues parmi les dix sont instables chimiquement ou métabolisés par d'autres enzymes indépendantes du NADPH. Il s'agit du produit **161** qui est détecté à hauteur de 26 % après une heure d'incubation sans NADPH et du produit **190** qui n'est plus du tout présent dans le milieu après une heure. Pour ce dernier composé, il est fort probable qu'il s'agisse de la désacétylation de l'amine en composé **194**. Le noyau imidazo[1,2-a]pyrazine de **161** a également été décrit comme instable chimiquement.<sup>321</sup> Il a été reporté dans la littérature la sensibilité de la double liaison  $\text{C}_7-\text{C}_8$  par oxydation métabolique conduisant à l'époxyde **326**. Cet époxyde est ensuite potentiellement attaqué par la glutathione (GSH) pour former le métabolite **327** ou par des résidus nucléophiles des cytochromes.<sup>321,399</sup> La réaction de monohydroxylation par les aldéhydes oxydases de **328** en **329** est également possible (Schéma 59).<sup>400,401</sup> Il serait intéressant de tester le produit **208** méthylé en position 7 puisque le

méthyle peut être responsable de l'augmentation de la stabilité métabolique par effet de bouclier stérique.<sup>321</sup>

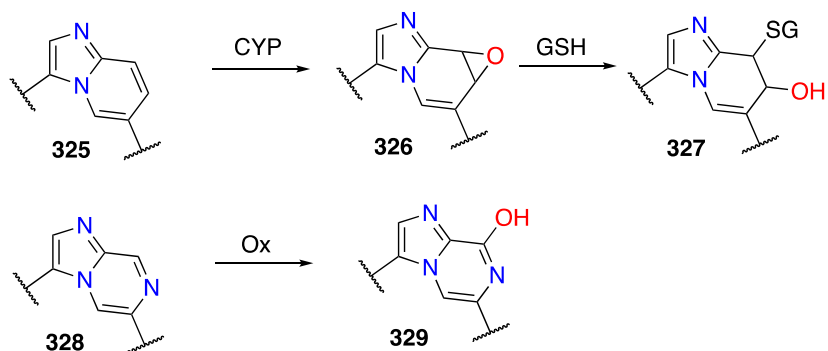
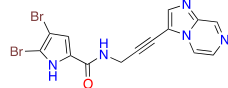
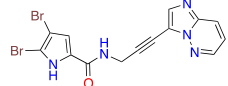
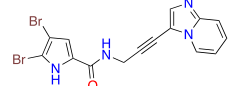
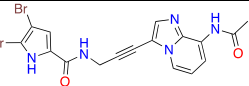
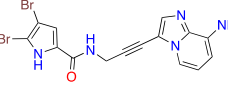
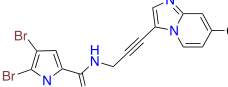
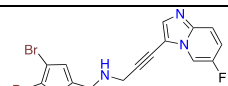
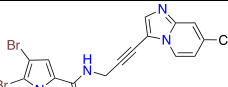
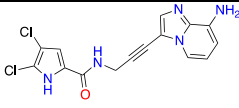
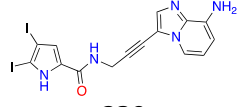


Schéma 59 – Possibles mécanisme de métabolisation des bicycles

Tableau 24 – Résultats des expériences de stabilité métabolique

Composé	% de composé présent après 1 heure	% de composé après 1 heure sans NADPH	Substrat des cytochromes P450	Instabilité chimique ou métabolisation enzymatique non-dépendante du NADPH
 <b>161</b>	0.8 ± 0.2	26 ± 2		
 <b>163</b>	4.6 ± 0.6	103 ± 3		
 <b>164</b>	0.3 ± 0.0	106 ± 1		
 <b>190</b>	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.0		
 <b>194</b>	0.5 ± 0.2	108 ± 2		
 <b>209</b>	3.3 ± 0.3	113 ± 0		
 <b>212</b>	0.7 ± 0.1	110 ± 2		
 <b>53</b>	<b>53 ± 4</b>	101 ± 1		



213		
	$0.7 \pm 0.1$	$101 \pm 4$
236		
	$1.3 \pm 0.2$	$101 \pm 1$
239		

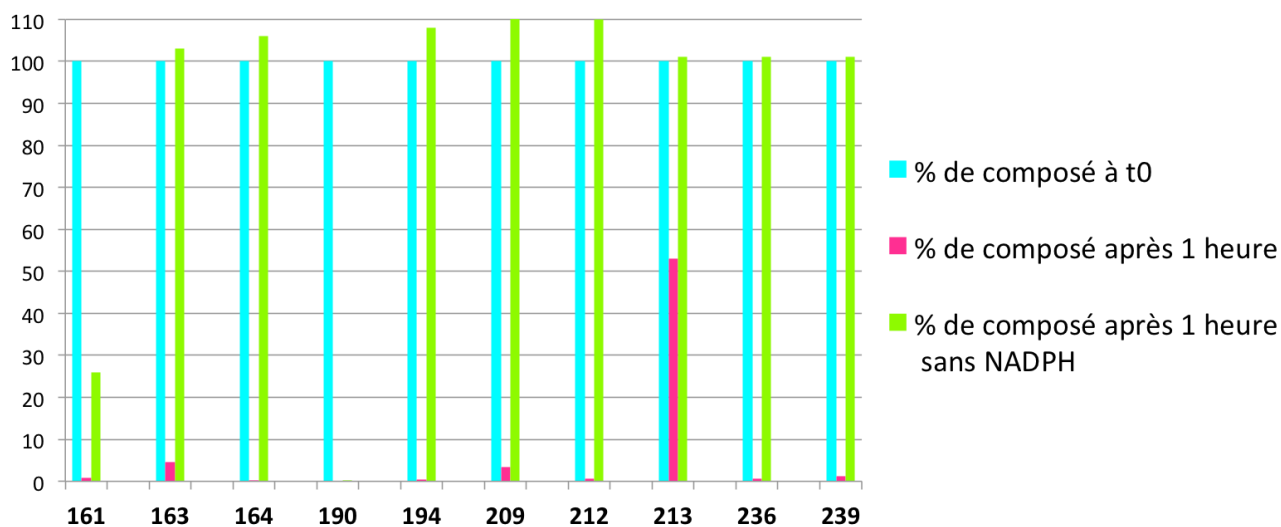


Figure 96 – Graphe des stabilités métaboliques des dix composés à  $t_0$ , à 1h et à 1h sans NADPH

## II. Caractérisation du mode d'action du composé **194**

### 1. Mode d'inhibition du composé **194** sur Aurora B

Nous avons sélectionné le composé **194** afin d'explorer son mode d'action sur la kinase Aurora B (Figure 97). Nous avons tout d'abord cherché à établir son mode d'inhibition. Des expériences doses-réponses croisées ont été effectuées en variant la concentration du substrat, ici l'ATP, en présence de l'inhibiteur **194** à différentes concentrations.

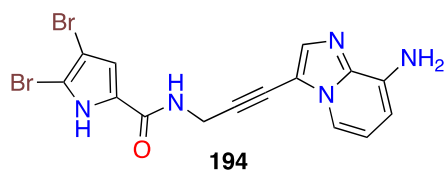


Figure 97 - Structure de l'inhibiteur **194** pour la caractérisation du mode d'action sur Aurora B

#### a. Méthode

Les expériences de doses-réponses croisées à différentes concentrations en ATP (de 3.125 à 50  $\mu\text{M}$ ) et en inhibiteur (2, 1, 0.5, 0.1 et 0  $\mu\text{M}$ ) ont été réalisées à la plateforme KISSf. L'activité

d'Aurora B est directement proportionnelle à la production d'ADP (exprimée en RLU). Elle est représentée en fonction de la concentration en ATP à cinq concentrations fixes en inhibiteur sur le graphe de Michaelis-Menten (Figure 102 - A). La représentation graphique de Lineweaver-Burk permet de visualiser ces résultats sous forme de droites en traçant 1/activité en fonction de 1/[ATP] (Figure 102 - B).

Pour chacune des concentrations en inhibiteur testées on obtient une droite. Les différentes droites convergent les unes vers les autres et la localisation du point d'intersection de ces droites permet de déterminer le mode d'inhibition de l'inhibiteur testé. On considère essentiellement trois types d'inhibition réversible :<sup>402</sup>

- Inhibition compétitive
- Inhibition incompétitive
- Inhibition non-compétitive (pure ou mixte)

### b. Les différents modes d'inhibition réversible

Le Schéma 60 représente la réaction cinétique entre l'enzyme E et son substrat S, où ES est le complexe enzyme-substrat qui conduit à la formation du produit P.  $k_1$  est la constante de vitesse de formation de ES,  $k_2$  la constante de dissociation de ce complexe et pour finir  $k_3$  la constante de vitesse de la formation du produit P.<sup>403</sup>



**Schéma 60 – Interaction enzyme-substrat**

On définit la constante de Michaelis  $K_M$  pour l'enzyme E comme étant la concentration en substrat S pour laquelle  $V_0 = \frac{V_{max}}{2}$ , où  $V_0$  est la vitesse initiale de la réaction et  $V_{max}$  est la vitesse initiale maximale pour une concentration saturante en substrat. La constante  $K_M$  traduit l'affinité de l'enzyme pour son substrat.  $K_M$  est d'autant plus petite que la dissociation de ES est faible, et donc que l'affinité de l'enzyme pour son substrat est importante.

Selon le schéma cinétique ci-dessus, la constante de Michaelis s'écrit :

$$K_M = \frac{k_2 + k_3}{k_1} = \frac{[E][S]}{[ES]}$$

L'équation générale de Michaelis-Menten est la suivante :

$$V_0 = \frac{V_{max} [S]}{K_M + [S]}$$

La linéarisation de Lineweaver-Burk en double inverse s'écrit :

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

On obtient ainsi une droite de pente égale à  $\frac{K_M}{V_{max}}$  et dont l'ordonnée à l'origine est égale à  $\frac{1}{V_{max}}$ . Cette équation permet de connaître les constantes  $K_M$  et  $V_{max}$  d'une enzyme en l'absence de l'inhibiteur (Figure 98).

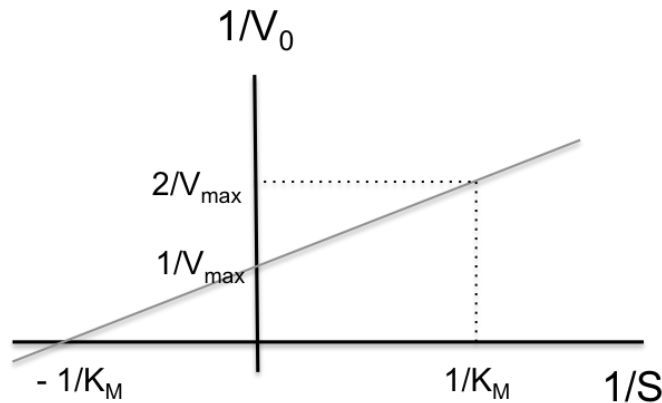


Figure 98 – Représentation de Lineweaver-Burk

Lorsque l'on ajoute un inhibiteur I à différentes concentrations, l'allure des droites du diagramme de Lineweaver-Burk n'est pas la même selon le type d'inhibition. Les pentes, les ordonnées à l'origine et l'intersection des différentes droites sont caractéristiques de chaque type d'inhibition que nous allons présenter brièvement.

### i. Inhibition compétitive

Un inhibiteur compétitif entre en compétition avec le substrat naturel de l'enzyme pour se fixer sur le même site enzymatique (Figure 99).

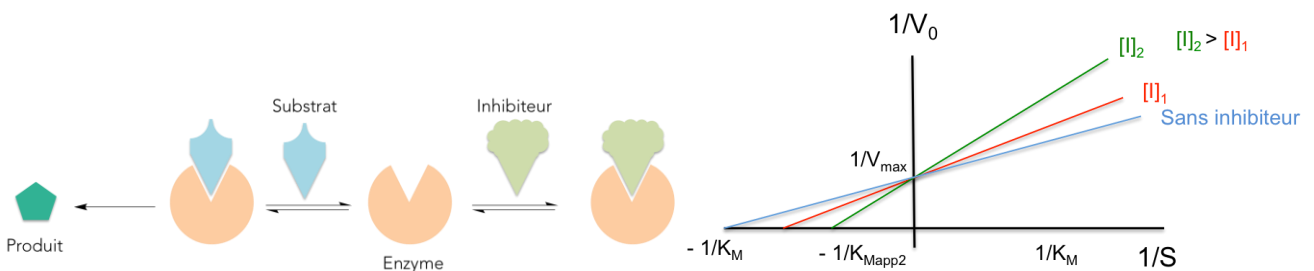
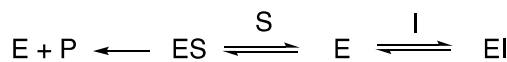


Figure 99 – Mode d'action d'un inhibiteur compétitif (à gauche) et diagramme de Lineweaver-Burk correspondant (à droite)

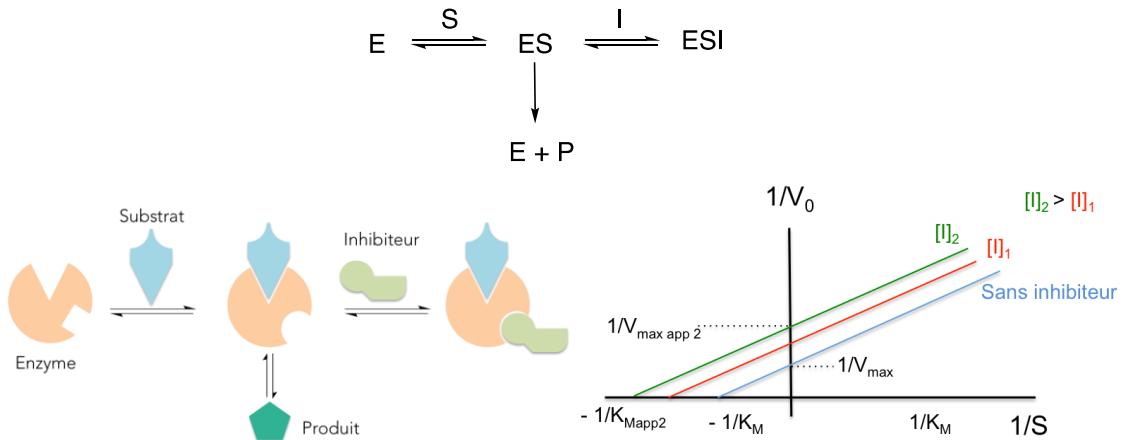
L'équation de Michealis-Menten est la suivante, où  $K_i$  est la constante de dissociation du complexe EI.<sup>403</sup>

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)K_M + [S]}$$

Ce mode d'inhibition se traduit par une vitesse maximale inchangée car un excès de substrat déplace l'inhibiteur, mais la constante  $K_M$  augmente car l'affinité de l'enzyme pour son substrat diminue avec la présence de l'inhibiteur, à mesure que sa concentration augmente. Ainsi pour chaque concentration en inhibiteur, on définit la constante  $K_{M,app}$  avec  $K_{M,app} = \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)K_M$ . La représentation de Lineweaver-Burk pour ce type d'inhibition est illustrée sur la Figure 99.

## ii. Inhibition incompétitive

Un inhibiteur incompétitif ne peut interagir qu'avec le complexe ES (Figure 100). L'interaction du substrat avec l'enzyme induit un changement de conformation qui permet alors la fixation de l'inhibiteur.<sup>403</sup>



**Figure 100 - Mode d'action d'un inhibiteur incompétitif (à gauche) et diagramme de Lineweaver-Burk correspondant (à droite)**

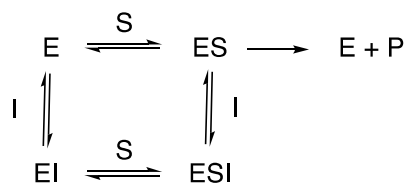
L'équation de Michaelis-Menten pour ce mode d'inhibition est la suivante:

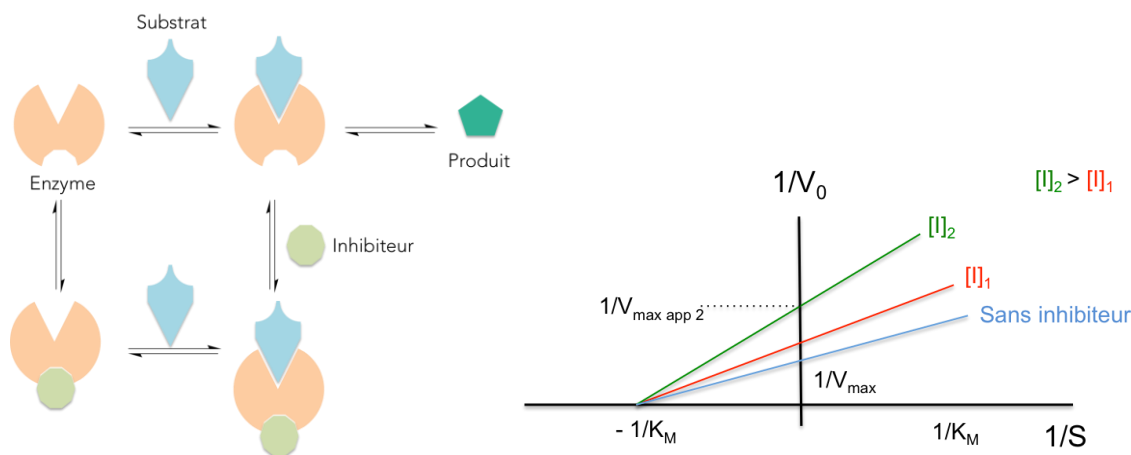
$$V_0 = \frac{V_{max}}{1 + \frac{[I]}{K_i}} \cdot \frac{[S]}{[S] + \frac{K_M}{1 + \frac{[I]}{K_i}}}$$

Cette équation conduit à la représentation graphique caractéristique illustrée sur la Figure 100, où  $K_{M,app} = \frac{K_M}{1 + \frac{[I]}{K_i}}$  et  $V_{max,app} = \frac{V_{max}}{1 + \frac{[I]}{K_i}}$ . L'affinité de l'enzyme pour son substrat augmente, à cause de la formation de ESI qui déplace l'équilibre en faveur de la formation du complexe ES, donc  $K_{M,app}$  diminue. La vitesse  $V_{max,app}$  diminue également à mesure que la concentration en inhibiteur augmente.

## iii. Inhibition non-compétitive pure ou mixte

Un inhibiteur non-compétitif peut aussi bien se fixer sur l'enzyme seule que sur le complexe enzyme-substrat (Figure 101). Ainsi son site de fixation n'est pas en compétition avec le substrat et un excès de substrat ne peut pas déplacer l'inhibiteur. L'inhibiteur entraîne une modification de la conformation du site actif du substrat, empêchant la formation du produit mais n'influe pas sur la reconnaissance entre l'enzyme et le substrat, permettant la formation du complexe ESI.<sup>403</sup>





**Figure 101 - Mode d'action d'un inhibiteur non-compétitif (à gauche) et diagramme de Lineweaver-Burk correspondant (à droite)**

L'équation pour ce mode est :

$$V_0 = \frac{V_{max}}{\alpha'} \cdot \frac{\alpha [S]}{\alpha' K_M + [S]}$$

Où  $\alpha = 1 + \frac{1}{K_i}$ ,  $\alpha' = 1 + \frac{1}{K_i'}$ ,  $K_i = \frac{[E][I]}{[EI]}$  et  $K_i' = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$ ,  $K_i$  et  $K_i'$  traduisent l'affinité de l'inhibiteur pour E et pour ES respectivement.

La représentation de Lineweaver-Burk en double inverse aboutit au graphe de la Figure 101.

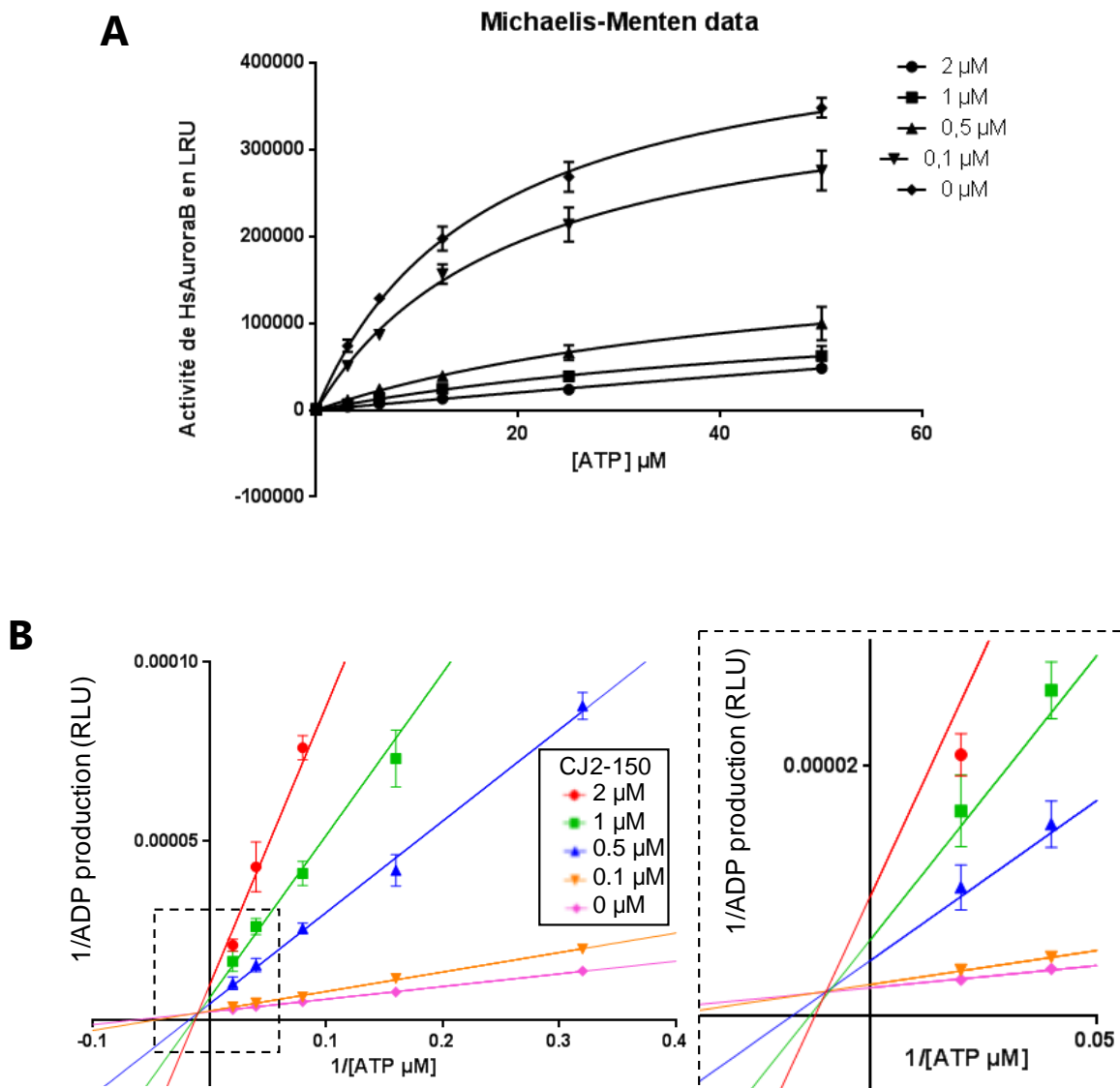
Avec  $K_{M,app} = \frac{\alpha}{\alpha'} K_M$  et  $V_{max,app} = \frac{V_{max}}{\alpha'}$

La Figure 101 représente le cas où les affinités de l'inhibiteur pour l'enzyme et pour le complexe ES sont identiques. La valeur de  $K_M$  n'est alors pas modifiée puisque l'inhibiteur n'empêche pas le substrat de se fixer, en revanche la vitesse maximale est impactée par la concentration en inhibiteur puisqu'un excès de substrat ne peut pas déplacer l'inhibiteur. Dans le cas où les affinités de l'inhibiteur pour E et pour ES ne sont pas identiques, alors l'intersection des droites n'est pas sur l'axe des abscisses et à chaque concentration en inhibiteur, la valeur de  $K_{M,app}$  est modifiée. On parle d'inhibition non-compétitive mixte.

### c. Résultats

Nous avons obtenus les graphes de Michaelis-Menten et de Lineweaver-Burk pour le composé **194** (Figure 102). Le diagramme de Lineweaver-Burk (Figure 102 – B) nous montre qu'en présence d'un excès d'ATP, l'activité d'Aurora B diminue à mesure que la concentration en inhibiteur augmente, nous indiquant que cet inhibiteur n'est donc pas en compétition avec l'ATP. De plus, l'augmentation de la concentration en inhibiteur est liée avec l'augmentation de la constante de Michaelis  $K_{M,app}$  ce qui traduit une moins grande affinité de l'enzyme pour son substrat (ATP). Ces résultats nous montrent donc que l'inhibiteur **194** se lie à un site allostérique en dehors de la poche ATP, et que l'affinité de l'inhibiteur n'est pas identique entre la kinase Aurora B libre et la

kinase Aurora B liée à l'ATP. Comme présenté dans les points précédents, ceci correspond à une inhibition non-compétitive mixte. La même observation a été faite avec l'analogue **164** comportant le bicyclic imidazo[1,2-a]pyridine ( $IC_{50} = 46.8 \text{ nM}$ ) (voir annexes 1-A et 1-B).



**Figure 102 – A : Profil cinétique de Michaelis-Menten pour Aurora B avec l'activité en RLU; B : courbes de Lineweaver-Burk de 1/ADP exprimées en RLU (Relative Light Unit) en fonction de 1/ATP ( $\mu\text{M}$ ) pour pour Aurora B et le composé **194**, la zone d'intersection des droites est agrandie sur la figure de droite**

La réécriture de l'équation de Michealis-Menten avec les vitesses maximales apparentes  $V_{max,app}$  et les constantes  $K_{M,app}$  et sa linéarisation s'écrivent comme suit:

$$V_0 = V_{max,app} \cdot \frac{[S]}{K_{M,app} + [S]}$$

$$\frac{1}{V_0} = \frac{\alpha'}{V_{max}} + \frac{\alpha K_M}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]}$$

Ainsi nous avons accès aux valeurs (Tableau 25) :

- $\frac{\alpha K_M}{V_{max}}$  par la pente,

- $\frac{\alpha'}{V_{max}}$  par l'ordonnée à l'origine
- $\frac{\alpha'}{\alpha K_M}$  par l'intersection des droites avec l'axe des abscisses pour chacune des concentrations en inhibiteurs.

Nous en déduisons alors (Tableau 25):  $V_{max,app} = \frac{V_{max}}{\alpha'}$  et  $K_{M,app} = \frac{\alpha}{\alpha'} \cdot K_M$

Les régressions linéaires des droites  $\frac{K_{M,app}}{V_{max,app}}$  et  $\frac{1}{V_{max,app}}$  en fonction de la concentration en inhibiteur [I] nous permettent de déterminer les valeurs de  $K_i$  et  $K_i'$  avec les équations suivantes (Figure 103):

$$\frac{K_{M,app}}{V_{max,app}} = \frac{K_M}{V_{max}} + \frac{K_M}{V_{max}} \cdot \frac{[I]}{K_i}$$

$$\frac{1}{V_{max,app}} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{1}{V_{max}} \cdot \frac{[I]}{K_i}$$

**Tableau 25 – Données relatives au diagramme de Lineweaver-Burk du composé 194**

[I]	2 $\mu$ M	1 $\mu$ M	0.5 $\mu$ M	0.1 $\mu$ M	0 $\mu$ M
$\frac{\alpha K_M}{V_{max}}$	$7.866 \cdot 10^{-4}$	$4.588 \cdot 10^{-4}$	$2.557 \cdot 10^{-4}$	$5.202 \cdot 10^{-4}$	$3.647 \cdot 10^{-4}$
$\frac{\alpha'}{V_{max}}$	$7.411 \cdot 10^{-6}$	$8.330 \cdot 10^{-6}$	$4.423 \cdot 10^{-6}$	$2.752 \cdot 10^{-6}$	$2.133 \cdot 10^{-6}$
$\frac{\alpha'}{\alpha K_M}$	$9.421 \cdot 10^{-3}$	$1.816 \cdot 10^{-2}$	$1.730 \cdot 10^{-2}$	$5.290 \cdot 10^{-2}$	$5.847 \cdot 10^{-2}$
$V_{max,app}$	$1.349 \cdot 10^5$	$1.201 \cdot 10^5$	$2.261 \cdot 10^5$	$3.634 \cdot 10^5$	$4.689 \cdot 10^5$
$K_{M,app}$	$1.061 \cdot 10^2$	$5.508 \cdot 10^1$	$5.781 \cdot 10^1$	$1.89 \cdot 10^1$	$1.71 \cdot 10^1$

Avec les valeurs obtenues graphiquement à partir des droites A et B de la Figure 103, nous trouvons les valeurs de  $K_i$  de 111 nM et de  $K_i'$  de 493 nM en considérant seulement trois points sur cette deuxième droite pour obtenir une régression linéaire avec  $r^2 > 0.99$ . Les valeurs obtenues par le logiciel GraphPrism à partir de l'intégralité des données sont de 116 nM et 430 nM, ce qui est cohérent avec nos calculs précédents. Le fait que  $K_i$  soit inférieur à  $K_i'$  ( $K_i < K_i'$ ) traduit une plus grande affinité de l'inhibiteur pour la kinase libre « E » que pour le complexe enzyme-ATP « ES ».

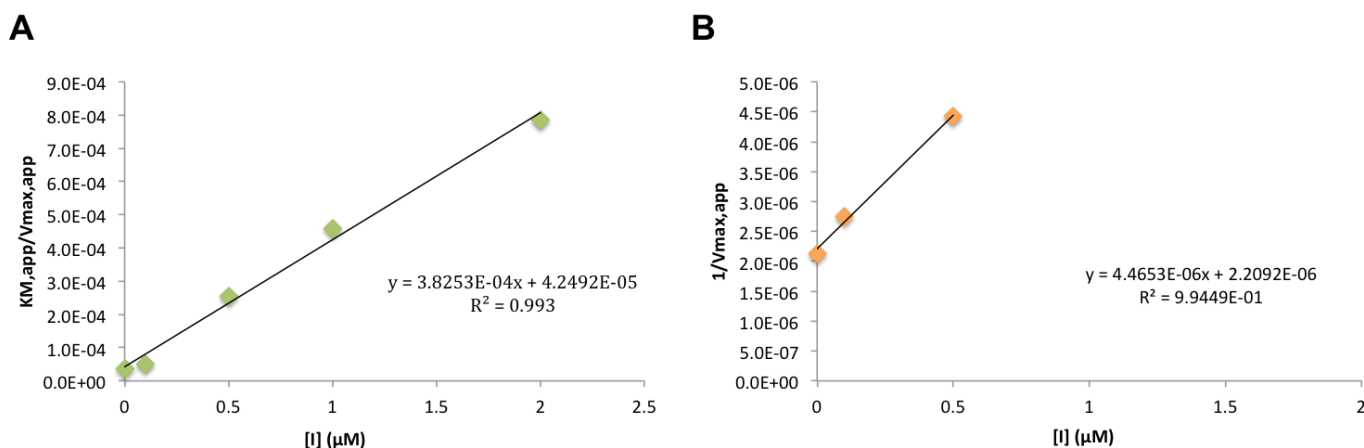


Figure 103 – Graphiques pour la détermination de  $K_i$  et  $K_i'$

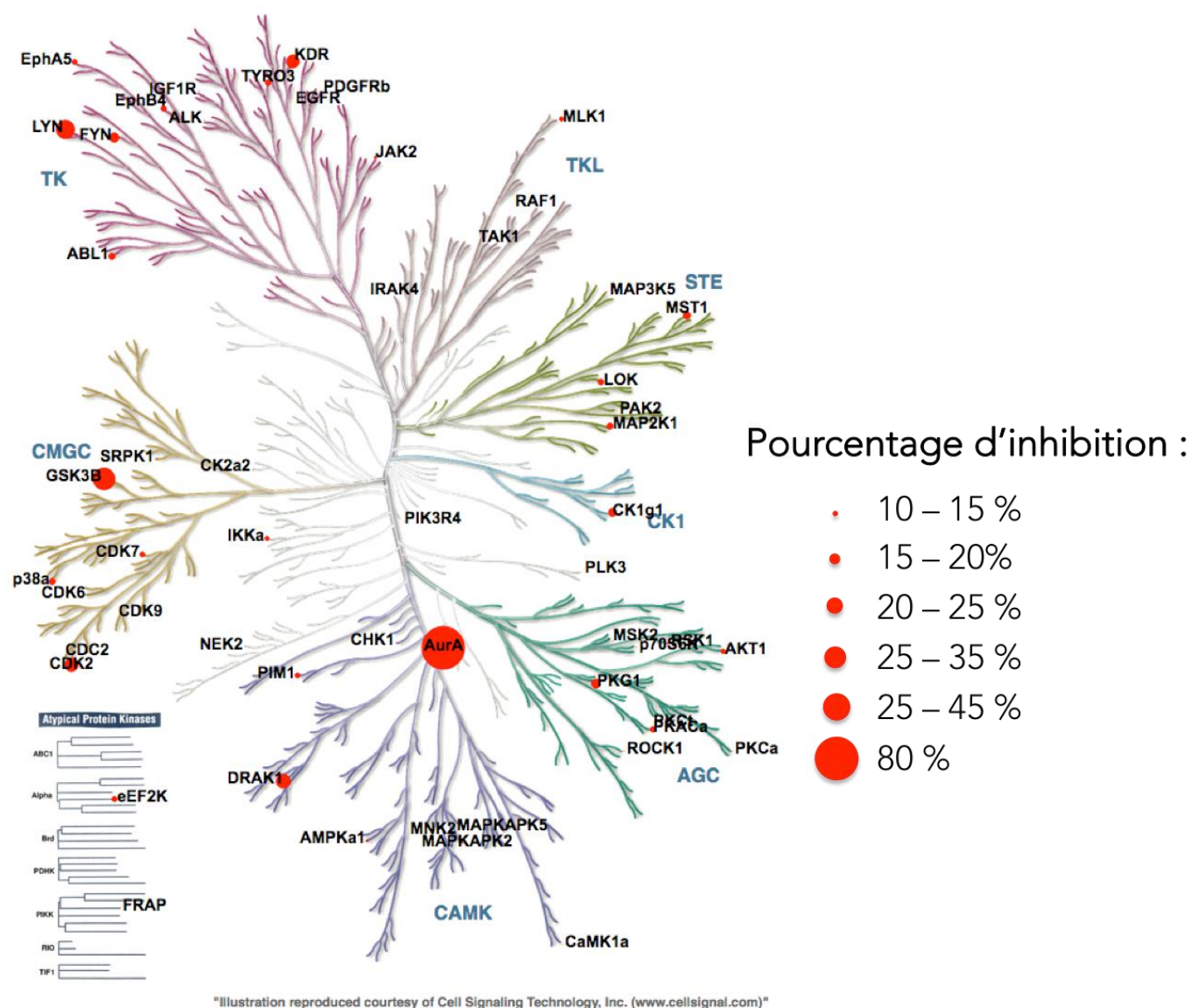
Comme il a été souligné dans le chapitre I, le mode d'inhibition le plus fréquent parmi les inhibiteurs de kinases est ATP-compétitif. Pour Aurora B, il semble que très peu d'exemple n'aient été décrits comme non-compétitif mixte à ce jour. Le seul exemple d'un inhibiteur non-ATP-compétitif annoncé dans la littérature est un dérivé du résorcinol, inhibiteur dual d'Aurora A et B.<sup>132</sup> Il semble que l'inhibition d'Aurora A se fasse de façon allostérique à deux sites potentiels dont un éloigné du site ATP. En revanche, pour ce qui concerne Aurora B ( $IC_{50} = 40 \mu\text{M}$ ), le docking présenté montre une interaction au niveau des résidus très proches au site ATP. Ainsi il s'agirait davantage d'une inhibition de type II ou de type III. Le composé **194** et ses dérivés proches représentent donc des composés très intéressants d'un point de vue pharmaceutique. En effet, ils pourraient permettre de les comparer aux inhibiteurs compétitifs en termes d'efficacité et aussi pour des traitements en combinaison afin d'évaluer si cette double inhibition d'une même cible peut être synergique. De plus, il serait intéressant d'étudier si ce type d'inhibiteur non-ATP-compétitif provoque à terme de la chimiorésistance en comparaison aux inhibiteurs ATP-compétitif, soit par la kinase elle-même qui pourrait muter soit par la cellule, qui s'adapterait par mécanismes de détoxifications des molécules exogènes ou par compensation. En effet, des phénomènes de résistances d'inhibiteurs ATP-compétitifs d'Aurora B ont été décrits, comme pour ZM447439,<sup>396,404</sup> ou AZD1152.<sup>405</sup> C'est pour cela que des inhibiteurs ne ciblant pas le site actif de l'ATP d'Aurora B peuvent être pertinents comme outils biologiques. En effet, l'étude des mécanismes biologiques nécessite des inhibiteurs très sélectifs afin d'étudier des phénotypes très fins. Les inhibiteurs ATP compétitifs peuvent manquer de sélectivité pour des études qui requièrent une telle précision. Pour éteindre l'activité d'une protéine sélectivement des manipulations génétiques ou de siRNA sont utilisées. Cependant, il se peut que ces méthodes affectent aussi d'autres acteurs des mécanismes étudiés et provoquent un biais, ce que l'inhibiteur allostérique n'engendre pas ou beaucoup moins.

## 2. Sélectivité

Le composé **194** a été testé sur un panel de kinases plus large afin de progresser dans l'évaluation de sa sélectivité. Ce produit a été évalué à  $1 \mu\text{M}$  sur l'activité inhibitrice des kinases du DiversityPanel® proposé par Eurofins qui compte cinquante-huit kinases. Les résultats sont



présentés sur la Figure 104, où toutes les kinases du panel sont celles indiquées en noir. Les pourcentages d'inhibition sont symbolisés par les cercles rouges. Si aucun point n'est visible pour une kinase, c'est que le pourcentage d'inhibition est de 0 %. L'histogramme de la Figure 105 regroupe toutes les valeurs d'inhibition. Parmi les cinquante-huit kinases, trente-deux ne sont inhibées qu'entre 0 et 5 %, dix entre 5 et 10 % et dix kinases entre 10 et 20 %. Au-delà de 20 % d'inhibition, seules six kinases sont concernées, dont cinq en dessous de 41 %. La seule kinase fortement inhibée sur ce panel est Aurora A à hauteur de 79 %, un des trois membres de la famille Aurora, qui est, comme il a été vu au premier chapitre, très proche d'Aurora B structuralement. Bien que les expériences aient été effectuées avec des protocoles différents, on peut mettre en parallèle à l'inhibition d'Aurora A, le pourcentage d'inhibition d'Aurora B avec le composé **194** à 1  $\mu$ M qui est de 92 %.



**Figure 104 - Kinome humain avec les kinases testées sur le DiversityPanel®, réalisé avec KinMap (<http://www.kinhub.org/kinmap/>)**

Ces résultats sont très encourageants puisqu'ils montrent que même sur un plus large panel de kinases, le composé chef de file **194** est sélectif. Ceci est cohérent avec le résultat précédemment obtenu, en appuyant le fait que le composé n'est pas un inhibiteur ATP-compétitif.

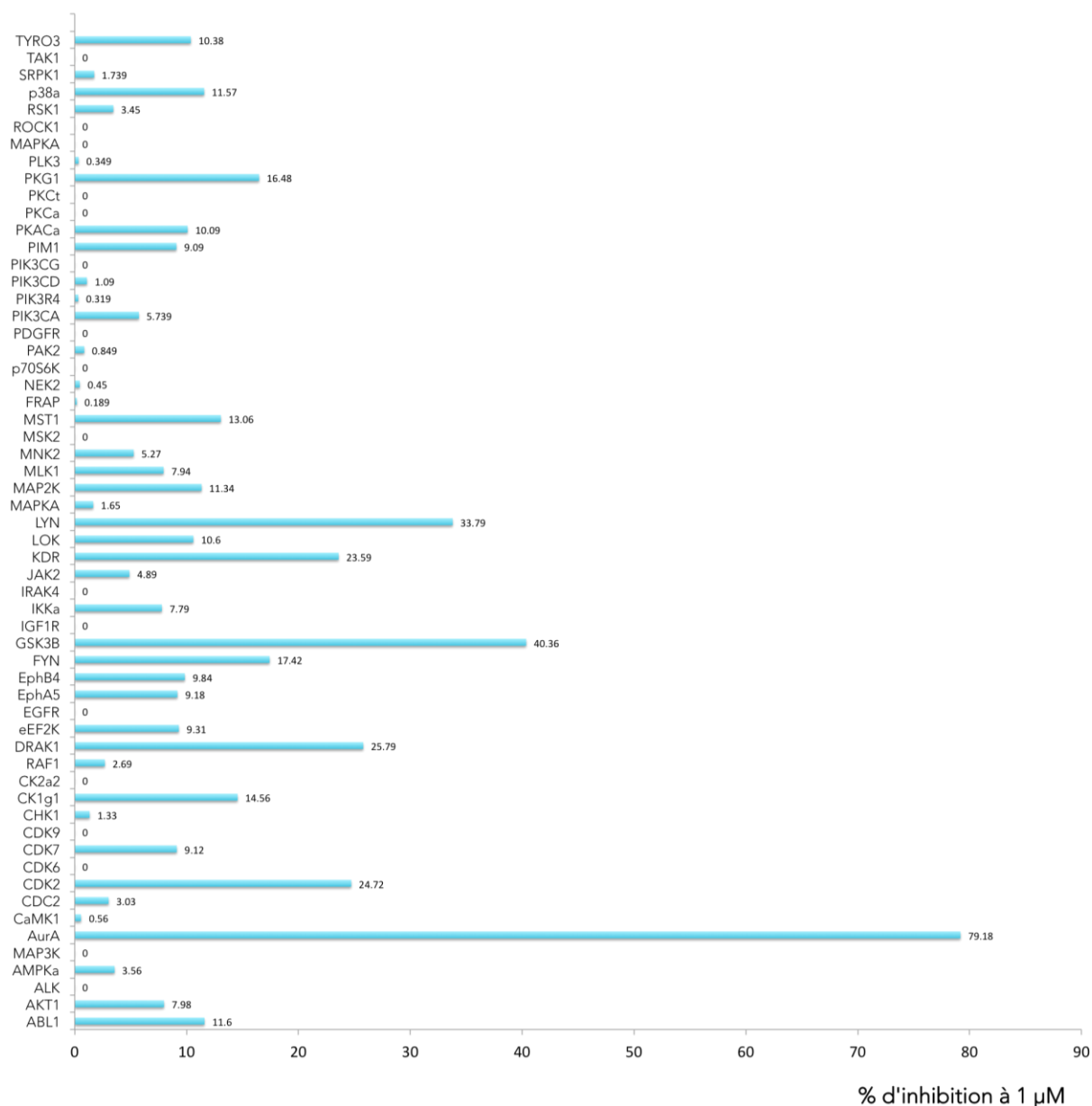


Figure 105 – Pourcentages d'inhibition pour l'ensemble des kinases du panel

### 3. Modélisation moléculaire

Des études de modélisation moléculaire *in silico* ont été réalisées à l'ICSN par Bodgan Iorga et Hristo Nedev afin d'explorer le site potentiel de fixation du produit **194** dans la kinase Aurora B. Les structures cristallines connues à ce jour pour Aurora B ne concernent que des ligands ATP-compétitifs, nécessitant une étude approfondie des structures cristallisées connues d'Aurora A et B. Environ deux-cent-cinquante structures de ces deux kinases ont été utilisées. Puisqu'Aurora A est structuralement proche d'Aurora B et que l'inhibiteur **194** a présenté une activité sur Aurora A lors du criblage DiversityPanel®, il a semblé pertinent d'utiliser les données disponibles pour Aurora A dans cette étude en plus de celles concernant Aurora B. De plus, des inhibiteurs allostériques d'Aurora A sont décrits dans la littérature et dont les structures cristallines de certains des complexes sont connues.

Trois sites distincts allostériques F, W et Y sont identifiés pour Aurora A,<sup>131,406,407</sup> ainsi que leur équivalent pour Aurora B.<sup>59,408</sup> McIntyre *et al.* ont mis en évidence que le site W était peu spécifique.<sup>406</sup> Ainsi le docking du composé **194** a été réalisé avec les sites F et Y à partir de la structure cristallisée d'Aurora B avec VX-680 (PDB 4AF3).<sup>409</sup> Un seul cluster a été obtenu pour le site F tandis que plusieurs l'ont été pour le site Y. C'est-à-dire que pour un même site, les poses de fixation possibles de la molécule sont très proches, et donc plus probables, ce qui forme un unique cluster. De surcroît, pour les modélisations de l'inhibiteur dans le site Y, les atomes de brome sont exposés vers la région du solvant, et ce pour tous les clusters obtenus de ce site, ce qui ne semble pas être cohérent avec nos résultats. Bien qu'on ne puisse pas formellement exclure ce site, le composé **194** est bien plus susceptible d'interagir avec le site F. Les sites F et Y s'avèrent être éloignés du site de l'ATP, ce qui indique que le mode d'inhibition serait de type IV.<sup>410</sup>

Dans ce modèle, le ligand **194** et le site F présentent une très bonne complémentarité structurale (Figure 106 - C). Comme représenté sur la Figure 106 (A et B), les études de docking ont permis de mettre en avant les interactions potentielles entre la kinase et le ligand **194**. Dans cette modélisation, le noyau imidazo[1,2-a]pyridine se situe dans une poche hydrophobe formée par les résidus Phe72, Phe77, Phe101, Val103, Tyr141 et Ile153. De plus, des interactions de  $\pi$ -stacking s'établissent probablement avec les résidus Phe72 et Tyr141. Le 4,5-dibromopyrrole s'étend dans une deuxième cavité hydrophobe entourée par les résidus Ile126, Ala130 et Leu140. L'oxygène de l'amide établit une liaison hydrogène avec la chaîne latérale de Arg139. Deux autres liaisons hydrogènes s'établissent d'une part entre le N-H de l'amide et l'oxygène du squelette de Tyr141, et d'autre part entre le N-H du pyrrole et l'oxygène de Leu140.

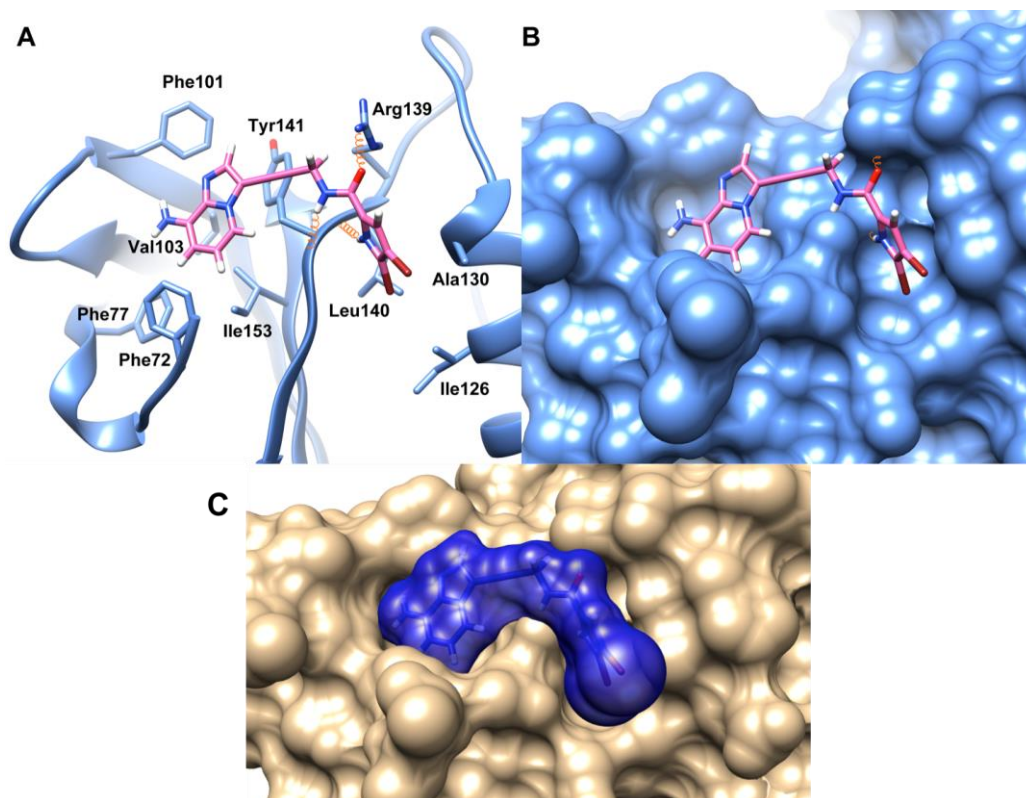
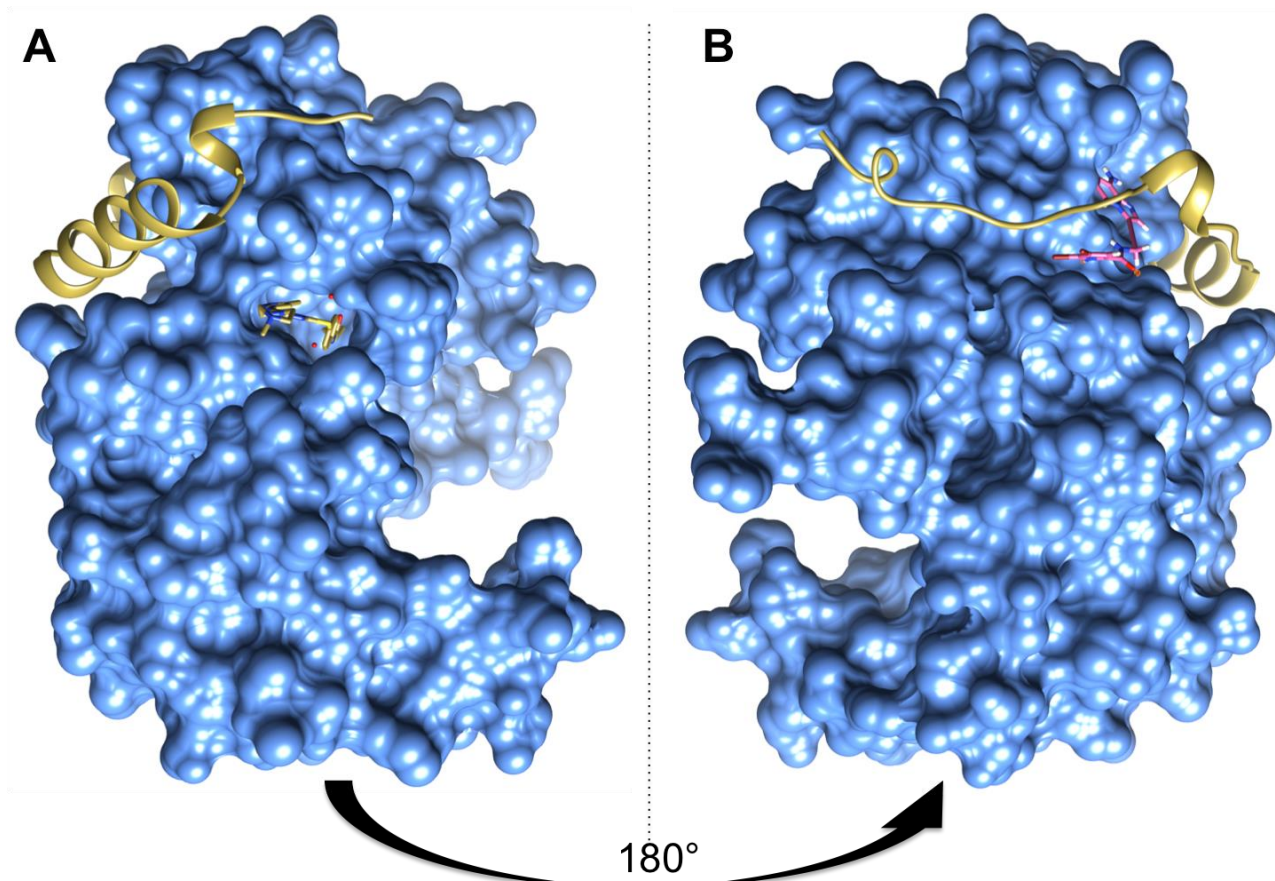


Figure 106 – A et B : Docking de **194**, représenté en rose dans le site allostérique F d'Aurora B en bleu (PDB 4AF3). Les liaisons hydrogènes sont représentées en orange. C : illustration de la complémentarité structurale avec la kinase.

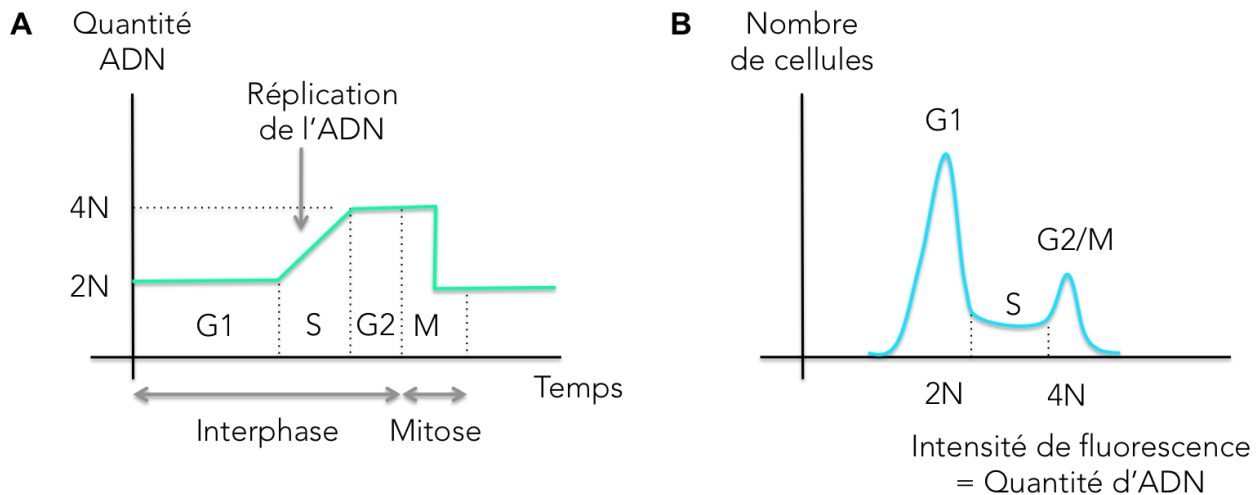


**Figure 107 – A : Représentation du composé VX-680 (en jaune) dans le site ATP d'Aurora B ; B : Vue de la kinase tournée à 180 ° avec le site allostérique de 194 (en rose) ; INCENP est la protéine en jaune**

La localisation du potentiel site allostérique mis en avant par les études de docking est présentée sur la Figure 107 – B, en comparaison au site ATP occupé par l'inhibiteur VX-680 de la Figure 107 – A. Il semble que l'inhibiteur **194** se situe à l'interface entre Aurora B et INCENP, et pourrait donc être un inhibiteur d'interaction protéine-protéine de type IV. Ces éléments très encourageants viennent renforcer l'intérêt de cet inhibiteur. Cependant, seule la co-cristallisation de la kinase avec l'inhibiteur peut valider notre hypothèse. Ainsi, une collaboration avec l'équipe du Dr. A. Jeyaprakash Arulanandam, spécialisée dans l'étude des mécanismes de la division cellulaire et de la cristallisation des complexes protéiques à l'Université d'Édimbourg, s'est établie afin de co-cristalliser Aurora B avec l'inhibiteur **194**. Les premières expériences mises en œuvre ont consisté à mettre en solution un cristal d'Aurora B-INCENP avec l'inhibiteur **194**. Cependant, ce dernier n'a pu s'intégrer à la structure, ce qui peut laisser penser qu'il s'agit effectivement bien d'un inhibiteur de l'interaction protéine-protéine entre Aurora B et INCENP. En effet, l'interaction entre Aurora B et INCENP étant déjà établie et figée au sein du cristal, le site de fixation de l'inhibiteur est bloqué et pas accessible à l'inhibiteur. De nouvelles tentatives sont en cours pour n'utiliser qu'Aurora B sans son co-facteur afin que l'inhibiteur puisse se placer, s'il s'agit bien d'un inhibiteur protéine-protéine. De la même façon, des expériences de chromatographie d'affinité devront être conduites afin d'analyser l'effet de **194** sur la liaison entre Aurora B et INCENP.

## 4. Effets sur la progression du cycle cellulaire

Afin de comprendre comment l'inhibiteur **194** affecte la progression du cycle cellulaire de cellules traitées, nous avons quantifié leur contenu en ADN par cytométrie en flux. Les cellules somatiques sont diploïdes, avec un contenu en ADN de  $2n$ . Au cours de la phase de réplication de l'ADN (phase S) le matériel génétique est doublé, augmentant la quantité d'ADN de  $2$  à  $4n$ , faisant passer les cellules en phase G2, puis rapidement en division cellulaire (Figure 108 – A et B).



**Figure 108 – A : Quantité d'ADN tout au long du cycle de la division cellulaire selon les différentes phases ; B : Profil obtenu par analyse FACS du nombre de cellules en fonction de la quantité d'ADN sans inhibiteur**

### a. Méthode

$1.10^6$  cellules K562 sontensemencées en plaque 12 puits dans du milieu RPMI 1640 complet. Après 24 h, les cellules sont traitées avec six doses décroissantes de **194** : 50, 20, 10, 5, 2 et  $1 \mu\text{M}$ . Pour rappel, l' $\text{EC}_{50}$  de ce composé sur cette lignée est de  $22 \mu\text{M}$ . Après 24 h, 48 h ou 72 h d'incubation avec l'inhibiteur, les cellules sont collectées par centrifugation et lavées dans du PBS. Elles sont ensuite fixées avec de l'éthanol glacé à 70 %, perméabilisées et incubées dans du PBS contenant de la ARNase A pour éviter que le fluorochrome ne se fixe à l'ARN et ne génère du bruit de fond lors de l'analyse. Enfin les cellules sont traitées avec le fluorochrome, qui est un agent intercalant de l'ADN, ici l'iodure de propidium, qui se fixe de façon stœchiométrique entre les bases des acides nucléiques. Ensuite, le contenu en ADN de chaque cellule de la population traitée est analysé par cytométrie de flux (FC500, Beckman Coulter).

La cytométrie de flux est une méthode optique qui permet la quantification des cellules et leurs composantes. Dans le cytomètre, les cellules en suspension sont entraînées dans un flux liquide et chaque cellule passe dans une chambre d'analyse devant un faisceau laser. L'appareil mesure la lumière dispersée par chacune des cellules et la fluorescence émise. Ceci permet de dénombrer les cellules ainsi que de détecter leur taille et leurs propriétés de surface comme la granulation. La fluorescence quant à elle permet l'étude des composantes marquées de la cellule, ici en l'occurrence, l'ADN marqué par l'iodure de propidium.

## b. Résultats

Les graphes de dose-réponse à 24 h et 48 h sont présentés sur la Figure 109. Après 24 h de traitement avec le composé **194** à 1 et 2  $\mu\text{M}$ , il n'y a pas d'effet sur la répartition de la quantité de cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire comparé au contrôle. L'effet sur le cycle commence à partir de la dose de 5  $\mu\text{M}$ , où à 24 h on observe une augmentation significative du nombre de cellules avec 4n chromosomes qui apparaît bien plus marqué à 48 h. Aux plus hautes doses, nous observons l'apparition d'un pic 8n, plus nettement marqué à 48 h. Des temps plus longs d'expérience n'ont pas montré des taux en ADN supérieur à 8n mais davantage de mort cellulaire. Les résultats obtenus pour le contrôle positif **ZM447439** (Figure 111) montrent un profil proche de notre composé **194**, avec un effet plus marqué de cellules en 8n.<sup>411</sup>

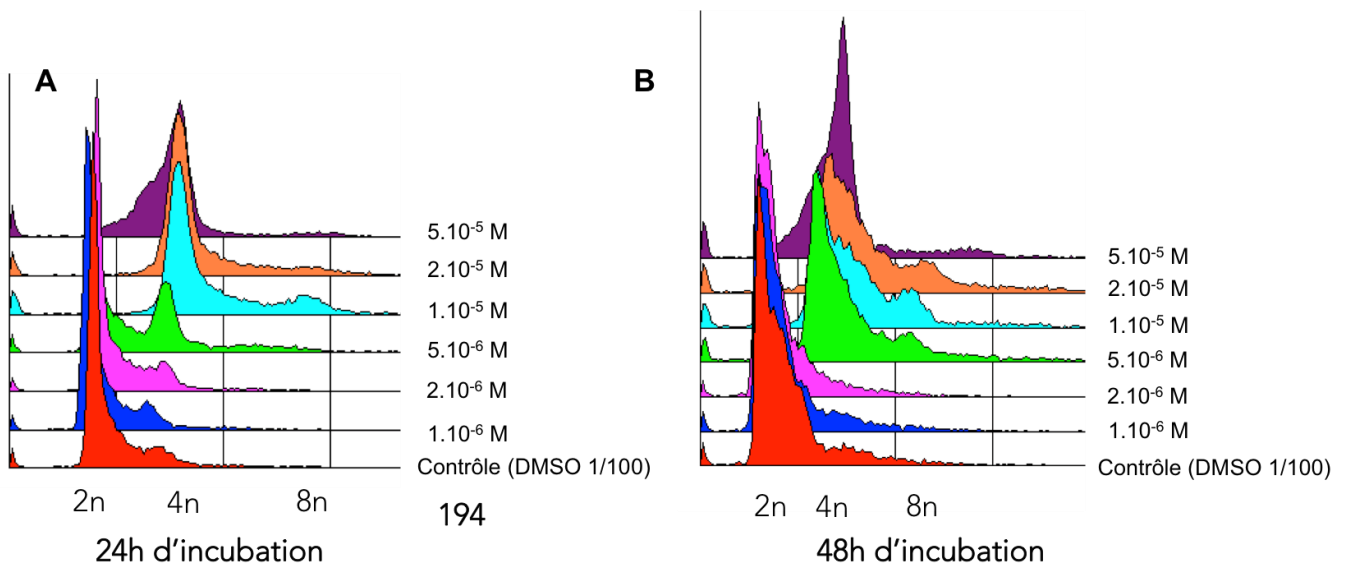


Figure 109 – Analyses FACS en fonction de la dose à 24 et 48 h d'incubation avec le produit **194**

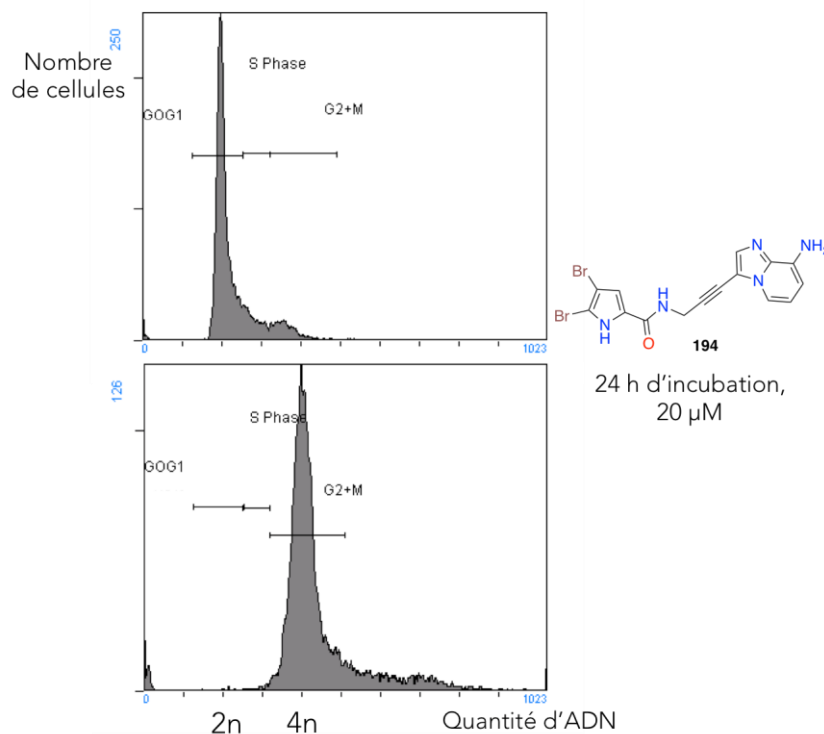
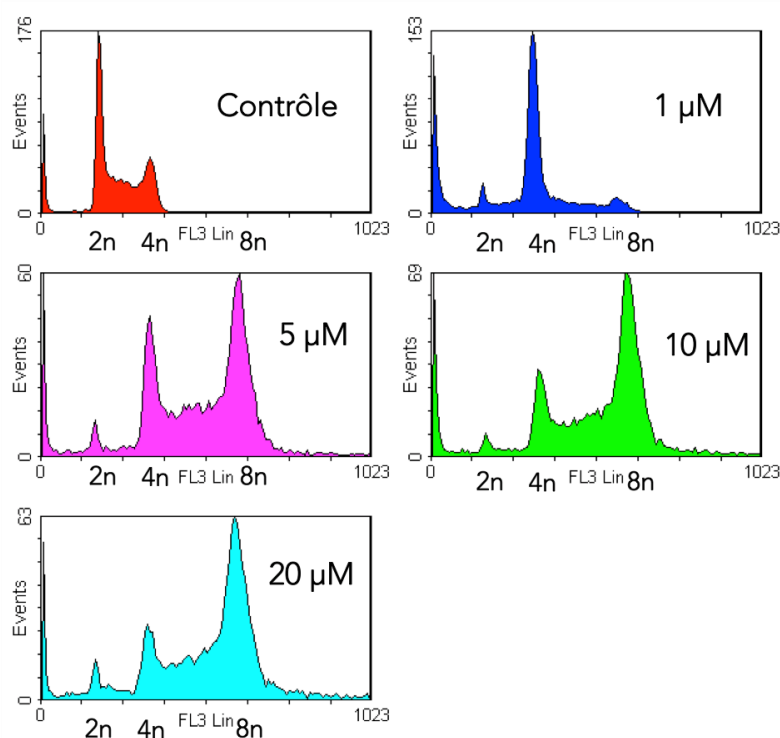


Figure 110 – Quantité d'ADN mesurée pour le composé **194** incubé 24 h à 20  $\mu\text{M}$

### ZM447439, 24 h d'incubation

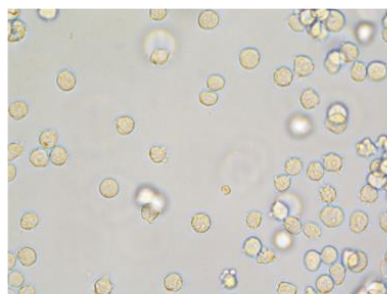


**Figure 111 – Analyses FACS pour le contrôle positif avec ZM447439 à 24 h d'incubation**

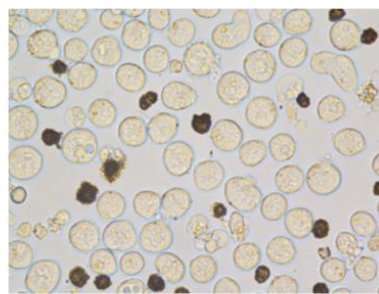
Les résultats mettent en évidence l'effet du composé **194** sur la polyploïdisation des cellules avec un effet net en fonction de la dose. Notre composé **194** est responsable de l'augmentation de la proportion de cellules polyploïdes, ce qui est cohérent avec l'inhibition d'Aurora B. En effet, l'inhibition de cette kinase interfère avec la progression du cycle cellulaire, notamment avec l'échec de la cytodièrese.<sup>412,413</sup> Les cellules voient ainsi leur quantité d'ADN doubler puisque les deux cellules filles ne réussissent pas à être séparées. Sur des temps plus longs, nous observons même des cellules à 8n, ce qui signifie que des cellules ont de nouveau dupliqué leur matériel génétique à partir d'un contenu initial en ADN de 4n.

L'aspect visuel des cellules observées au microscope après deux puis six jours d'incubation avec **194** à 100 µM est cohérent avec ce phénomène de polyploïdie (Figure 112). En effet, après deux jours d'incubation, les cellules présentent une taille environ deux fois celles du contrôle. L'effet est d'autant plus marquant après six jours comme illustré sur la Figure 112 par les cercles rouges. Ce phénotype est effectivement retrouvé en cas d'inhibition d'Aurora B.<sup>414</sup>

48h d'incubation:



Contrôle, x40

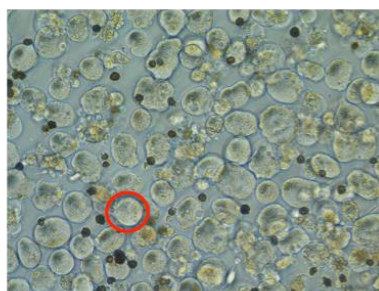


CJ2-150 à  $10^{-4}$  M, x40

6 jours d'incubation:



Contrôle, x20



CJ2-150 à  $10^{-4}$  M, x20

Figure 112 – Cellules (K562) observées au microscope après 2 et 6 jours d'incubation avec 194 à 100  $\mu$ M

## 5. Mise en évidence de l'inhibition d'Aurora B par immunomarquage

### a. Inhibition de la phosphorylation de l'Histone H3 par le composé 194

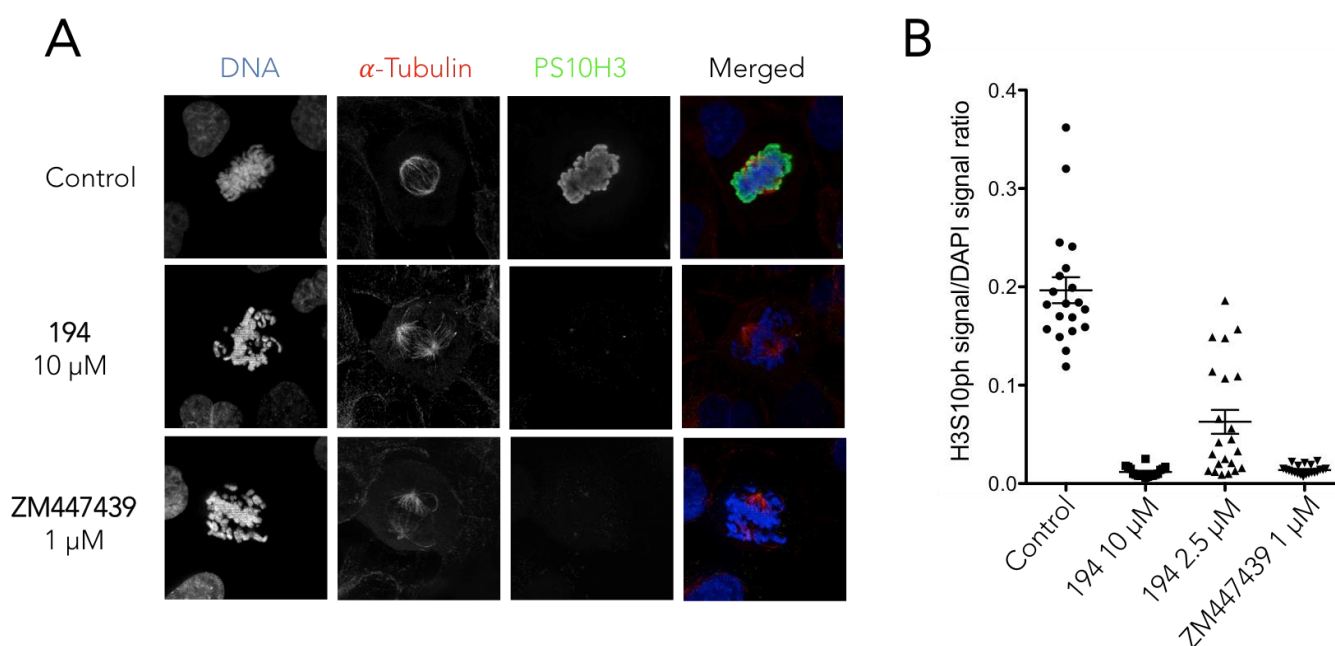
L'effet du composé **194** sur l'activité endogène d'Aurora B a été évaluée par immunofluorescence afin de valider qu'Aurora B est bien la cible biologique de nos inhibiteurs. Comme il a été détaillé dans le premier chapitre, l'histone H3 est un substrat naturel d'Aurora B et sa phosphorylation sur la sérine 10 est un biomarqueur spécifique de l'activité d'Aurora B.<sup>415,416</sup> Ces expériences ont été réalisées à la Station Biologique de Roscoff où j'ai pu être encadrée et formée par le Dr Sandrine Ruchaud.

Les cellules adhérentes U-2OS (ostéosarcome) ont été traitées par l'inhibiteur **194** à 10 et 2.5  $\mu$ M, **ZM447439** (inhibiteur de référence pour Aurora B) à 1  $\mu$ M et avec du DMSO (0.25 %) pour le contrôle négatif. Après 16 h de traitement, les taux de phospho-H3S10 (H3S10ph) ont été évalués par immunomarquage à l'aide d'anticorps spécifiques après fixation au paraformaldéhyde (PFA) et perméabilisation (Figure 113).

Sur la Figure 113 – A, sont présentées des cellules en métaphase traitées au DMSO, avec **194** à 10  $\mu$ M et **ZM447439** à 1  $\mu$ M. L'ADN a été marqué au DAPI en bleu, le cytosquelette est mis en évidence par le marquage de la tubuline en rouge et la sérine 10 phosphorylée de l'Histone 3 (H3S10ph) en vert, avec les anticorps correspondants. Pour le contrôle, le signal H3S10ph est bien visible sur les chromosomes, tandis que dans les deux autres cas de cellules traitées avec les



inhibiteurs, le signal disparaît complètement. Le signal H3S10ph apparaît donc significativement réduit par les produits **194** (10  $\mu$ M) et **ZM447439** (1  $\mu$ M) comparé au contrôle. Cette observation a pu être quantifiée, par analyse d'image sur un nombre significatif de cellules (n = 20), avec la détermination du ratio du signal H3S10ph versus le signal du DAPI sur la Figure 113 – B. La réduction du signal H3S10ph est la plus importante pour **194** à 10  $\mu$ M et **ZM447439** à 1  $\mu$ M. L'effet est moins marqué à 2.5  $\mu$ M pour **194**. Les résultats obtenus montrent bien que **194** inhibe l'activité endogène d'Aurora B dans les cellules cancéreuses U-2OS.<sup>417</sup> Cependant, bien que le composé **194** soit presque quatre fois plus actif que **ZM447439** sur la kinase recombinante (34 nM et 127 nM respectivement), il doit être environ dix fois plus concentré pour observer une inhibition avec un effet similaire à **ZM447439** dans les cellules. Cette différence peut provenir de plusieurs facteurs comme une moins bonne solubilité aqueuse, une affinité plus faible pour les membranes plasmiques lipidiques ou encore une moins bonne stabilité *in cellulo* ou dans le milieu de culture.



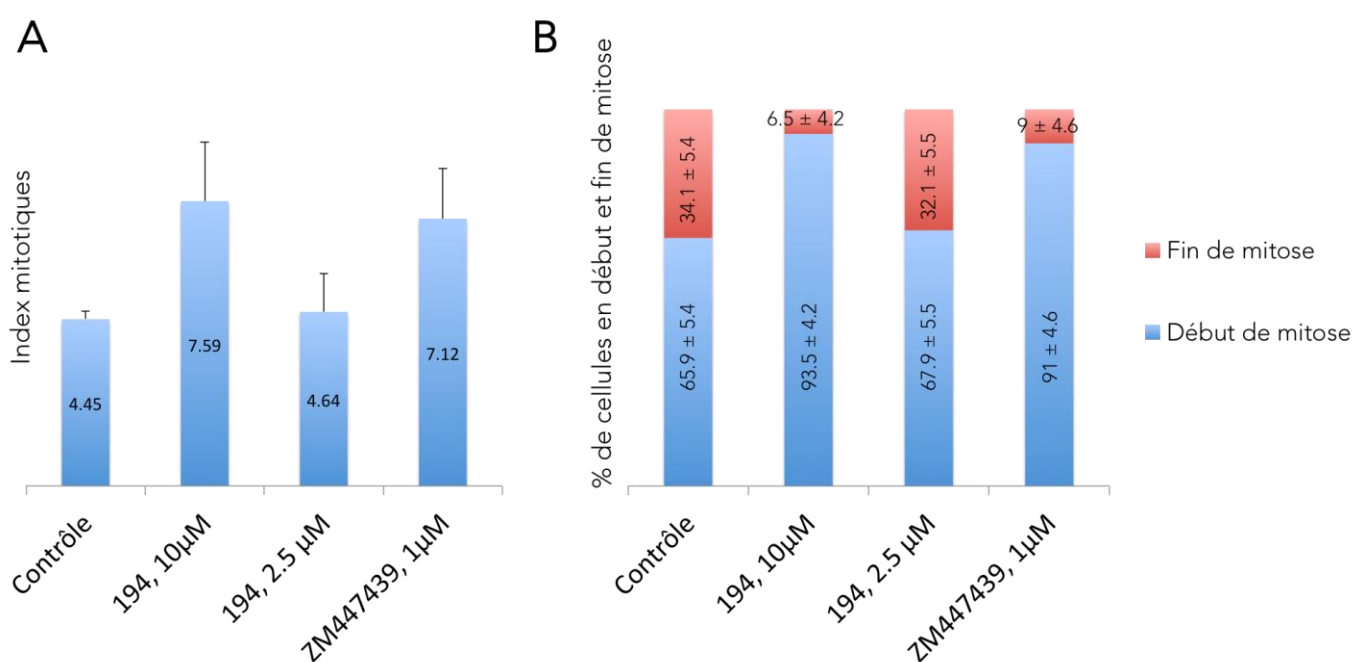
**Figure 113 – Évaluation de l'activité d'Aurora B dans les cellules par immunomarquage. A :** immunofluorescence des cellules U-2OS traitées au DMSO, avec **194** (10  $\mu$ M) et **ZM447439** (1  $\mu$ M) en métaphase ; **B :** Quantification du signal H3S10ph par rapport au signal du DAPI

### b. Impact sur l'index mitotique

Les index mitotiques ainsi que la proportion de cellules en début (prométaphase-métaphase) et fin de mitose (anaphase-télophase) ont été quantifiés après 16 h d'incubation avec les inhibiteurs **194** (10 et 2.5  $\mu$ M) et **ZM447439** (1  $\mu$ M). L'index mitotique correspond au rapport entre le nombre de cellules en mitose sur le nombre de cellules totales. 500 cellules de trois expériences indépendantes ont été comptées par examen visuel au microscope. L'index mitotique a été calculé en divisant le nombre de cellules en mitose par le nombre total de cellules comptées. Pour les ratios début et fin de mitose, 200 cellules en mitose ont été comptabilisées sur trois expériences indépendantes.

Pour les cellules traitées par **ZM447439** et **194** à la plus forte dose, nous observons une augmentation du nombre de cellules en mitose par rapport au contrôle : 7.1 et 7.6 % contre 4.5 % respectivement (Figure 114 – A). L'augmentation de l'index mitotique traduit un retard dans la

mitose, souvent dû à des erreurs d'alignement des chromosomes, ceci ralentit les cellules qui s'accumulent en début de mitose. Ceci a été quantifié et est présenté sur la Figure 114 – B. Pour les deux populations de cellules traitées par **194** à 10  $\mu\text{M}$  et **ZM447439** à 1  $\mu\text{M}$ , une plus grande proportion de cellules mitotiques se trouve en début de mitose plutôt qu'en fin de mitose. Le contrôle présente 34.1 % de cellules en fin de mitose contre 6.5 % pour **194** et 9 % pour **ZM447439**. Ce phénotype se retrouve lorsqu'Aurora B est inhibée.<sup>391,418,419</sup> Dans notre cas, l'augmentation de l'index mitotique suite à l'inhibition d'Aurora B est modérée. En effet, l'inhibition d'Aurora B affaiblit aussi le point de contrôle SAC ce qui pousse les cellules à passer plus rapidement à l'anaphase puis à sortir de la mitose. On observe ainsi le résultat de l'addition de ces deux effets (erreurs d'appariement + point de contrôle affaiblit) qui s'annulent partiellement.

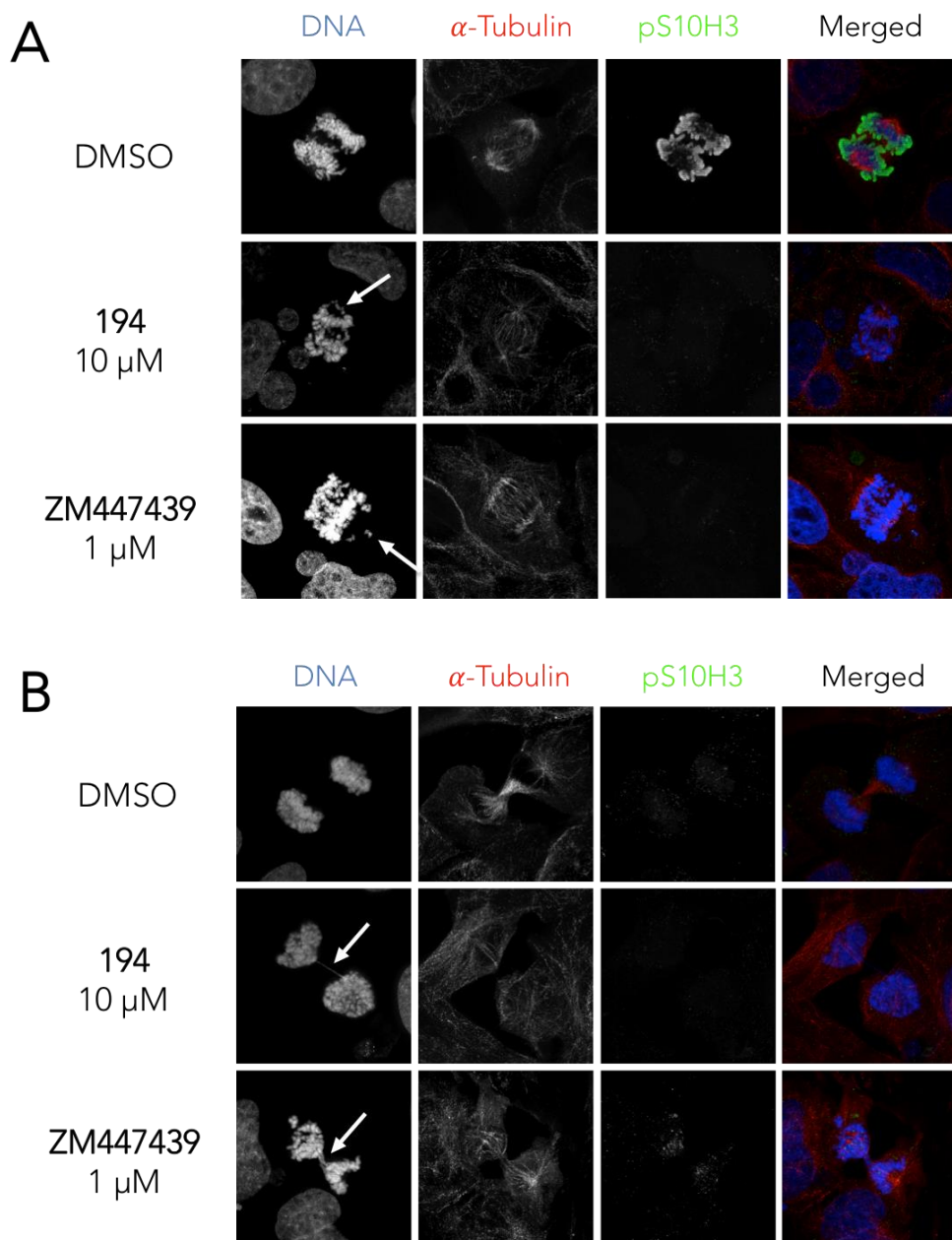


**Figure 114 – Effets des composés sur la mitose des cellules U-2OS. A : Quantification des index mitotiques des cellules traitées avec 194 (10 et 2.5  $\mu\text{M}$ ) ou ZM447439 (1  $\mu\text{M}$ ) ou DMSO (contrôle) pendant 16 h (moyennes de trois expériences indépendantes) ; B : Quantification du nombre de cellules en début et fin de mitose pour les cellules traitées comme pour A (moyennes de trois expériences indépendantes)**

### c. Mise en évidence du phénotype cellulaire avec l'inhibition d'Aurora B

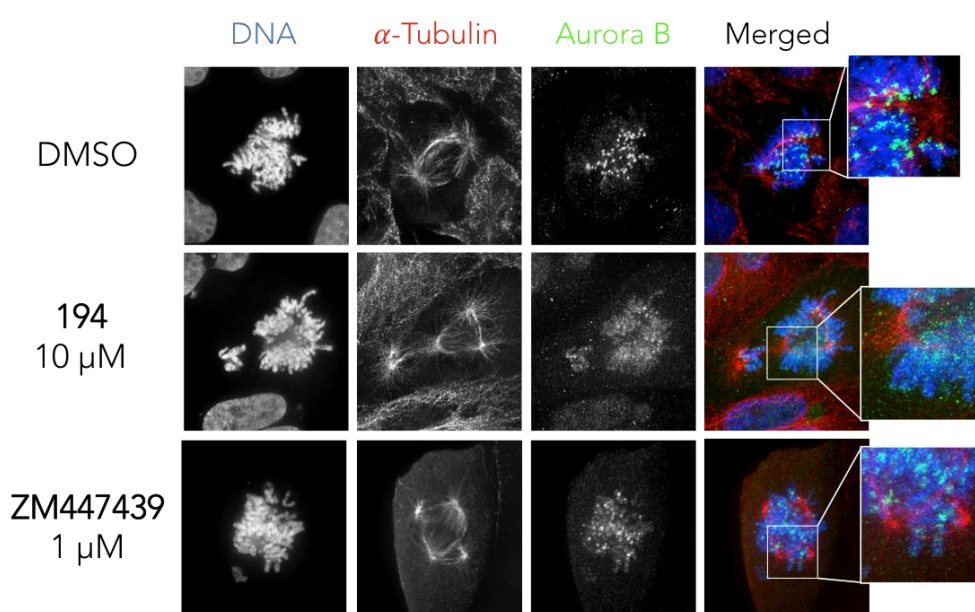
Des défauts de mitose caractéristiques de l'inhibition des kinases Aurora ont pu être observés lors du marquage de H3S10ph, après 16 h d'incubation avec les composés **194** et **ZM447439** (Figure 115).<sup>420</sup> On peut voir au cours de l'anaphase (Figure 115 – A) pour les cellules traitées par les inhibiteurs, des chromosomes perdus (pointés par les flèches).<sup>421</sup> Ces chromosomes n'ont pas été correctement appariés, la progression du cycle cellulaire ayant fini par échapper au point de contrôle, l'anaphase s'enclenche entraînant la tractation des chromosomes aux pôles opposés, en ayant perdu une partie du matériel génétique.

Sur la Figure 115 – B nous pouvons observer lors de la télophase des ponts chromosomiques. Il s'agit de chromosomes dont un des centromères est reliés aux deux pôles en même temps ou bien de chromosomes dicentriques présentant deux centromères à des sites distincts.<sup>422</sup> Ils sont dus aux erreurs d'appariements et à l'incapacité d'Aurora B à les corriger et à bloquer l'avancée du cycle dans ces circonstances.<sup>55,423</sup> Le sort des ponts chromosomiques est multiple. Les chromosomes concernés peuvent être cassés lors de la cytokinèse conduisant à des cellules aneuploïdes, ou bien la cytokinèse échoue donnant lieu à des cellules tétraploïdes.<sup>422,424</sup> Il peut également se former un micro-noyau autour du pont chromosomique qui est ainsi exclu des noyaux des deux cellules filles.



**Figure 115 – Immunomarquage des cellules U-2OS traitées avec du DMSO, 194 (10 μM) et ZM447439 (1 μM) pendant 16 h, l'ADN est marqué en bleu (DAPI), α-Tubuline en rouge et H3S10ph en vert. A : cellules en anaphase ; B : cellules en télophase**

Afin d'analyser l'effet de l'inhibition d'Aurora B par **194** ou **ZM447439** sur la localisation de la kinase, les cellules U-2-OS ont été fixées après 24 h d'incubation avec les inhibiteurs ou le DMSO puis Aurora B a été marquée en vert et l' $\alpha$ -tubuline en rouge avec des anticorps spécifiques et l'ADN en bleu (DAPI) (Figure 116). Pour les cellules contrôles, on observe qu'Aurora B est concentrée aux centromères en prométaphase. En revanche pour les cellules incubées avec **194** ou **ZM447439**, le signal d'Aurora B est beaucoup plus diffus le long des chromosomes, traduisant une délocalisation de la kinase sur les bras chromosomiques. En effet, Aurora B est en partie responsable de sa localisation en début de mitose aux centromères par auto-phosphorylation, ainsi son inhibition se traduit par une mauvaise localisation.<sup>62,425</sup> Le marquage de la tubuline met en évidence une importante perturbation du fuseau bipolaire avec des cellules multipolaires. Ce phénotype traduit une déstabilisation des pôles ou encore les échecs de cytotéière qui ont conduit à la formation de cellules polyploïdes.



**Figure 116 –Marquage par immunofluorescence des cellules U-2OS en prométaphase traitées avec 194 (10  $\mu$ M), ZM447439 (1  $\mu$ M) ou au DMSO pendant 24 h. Aurora B est marquée en vert, l' $\alpha$ -tubuline en rouge et l'ADN en bleu**

Ces résultats montrent que notre inhibiteur **194** inhibe bien directement Aurora B dans la cellule, et impacte par conséquent sa localisation, la structure du fuseau et des pôles, l'alignement des chromosomes sur la plaque équatoriale, leur séparation et pour finir la cytotéière.

### III. Conclusion

Au cours de ce chapitre, le bilan de l'étude des relations structure-activité effectuée grâce aux quatre-vingt-deux nouveaux analogues synthétisés a été récapitulé. L'étude SAR nous a permis d'optimiser l'activité inhibitrice sur Aurora B et de mettre en évidence les éléments importants pour cette activité que sont le 4,5-dibromopyrrole, le bicyclic imidazo[1,2-a]pyridine et l'alcyne comme linker.

Un autre aspect de la thèse a été la culture cellulaire et la détermination de la viabilité cellulaire de l'ensemble des produits. Plusieurs lignées cellulaires ont été cultivées, principalement HCT116 et K562, pour évaluer les composés. Lorsqu'un effet a été détecté, l'EC<sub>50</sub> a été déterminée sur ces deux lignées. Dans l'ensemble, les EC<sub>50</sub> des produits actifs en tests cellulaires sont de l'ordre de la dizaine de micromolaires. Deux composés parmi les plus actifs ont été évalués sur six autres lignées cellulaires pour voir si les effets pouvaient être différents selon la nature des cellules. Contrairement au composé de référence **ZM447439**, notre composé **194** s'est montrée actif sur la lignée résistante à la doxorubicine K562R qui exprime la glycoprotéine P responsable de la résistance médicamenteuse de certaines tumeurs. Certains des produits actifs sur Aurora B n'ont montré aucun effet sur cellules, ce qui peut laisser sous-entendre que leurs propriétés pharmacocinétiques sont peu compatibles avec le milieu biologique, notamment avec les problèmes de solubilité en milieu aqueux, comme il a pu être mis en évidence avec dix produits. Ces dix produits ont été exposés à des microsomes de foie de souris afin d'évaluer leur stabilité métabolique. Neuf composés sur dix se sont avérés être métabolisés par les cytochromes P450 en moins d'une heure. De plus, l'hétérocycle imidazo[1,2-a]pyrazine **161** s'est montré particulièrement sensible à la métabolisation, y compris en absence du co-facteur des cytochromes P450. Le composé **213** qui possède un groupement CF<sub>3</sub> sur le noyau imidazo[1,2-a]pyridine en position 7 a quant à lui montré une meilleure stabilité puisqu'il est métabolisé seulement à hauteur de 47 % après une heure d'incubation. Ceci ouvre donc la voie à de nouveaux composés, qui prennent en compte ces aspects physicochimique et métabolique.

Le produit **194**, qui est le meilleur inhibiteur de ceux que nous avons synthétisé, a été soumis à un test de compétition à l'ATP afin de déterminer son mode d'action, qui peut être extrapolé à l'ensemble de la série des produits actifs. Ces expériences de doses-réponses croisées ont mis en évidence un mode d'inhibition non-ATP-compétitif mixte, ce qui signifie que le composé **194** ne se fixe pas dans le site actif de l'ATP mais dans un site allostérique. A la suite de ce résultat, des études de modélisation moléculaire ont pu montrer un site potentiel qui a une très bonne complémentarité de structure avec le ligand **194**. Ceci indiquerait alors une inhibition de type IV, c'est-à-dire dans un site allostérique éloigné du site ATP. De plus, il semble fort probable que l'inhibiteur inhibe l'interaction entre Aurora B et son cofacteur INCENP. Aucune petite molécule n'a été décrite comme tel pour Aurora B à notre connaissance. En plus de son potentiel comme agent thérapeutique, ce composé pourrait représenter un outil biologique dans l'étude des mécanismes cellulaires impliquant Aurora B.

Ce mode d'inhibition explique ainsi la bonne sélectivité du composé sur le panel de kinases de la plateforme KISSf. Ce panel d'une dizaine de kinases a été élargi à cinquante-huit kinases avec un criblage à 1 µM sur le DiversityPanel® (Eurofins). La majorité des kinases du panel n'ont pas été inhibées à plus de 25 %, seules deux l'ont été à 34 et 40 % (LYN et GSK3β respectivement). Une seule kinase s'est démarquée au cours de ce criblage, il s'agit de la kinase Aurora A qui elle a été inhibée à hauteur de 79 %.

Le composé **194** a également montré qu'il affecte bien le cycle cellulaire en fonction de la dose avec une forte accumulation des cellules avec un contenu en ADN de 4n à 24 h, allant jusqu'à

8n après 48 h d'incubation sur les cellules non adhérentes K562, en cohérence avec l'activité essentielle d'Aurora B dans le processus de cytokinèse. Des expériences d'immunomarquage par fluorescence ont été réalisées sur les cellules U-2OS avec l'inhibiteur **194**. Par la quantification du signal émis par le substrat naturel phosphorylé par Aurora B nous avons mis en évidence l'inhibition d'Aurora B spécifiquement. Ces expériences ont également permis d'observer le phénotype cellulaire résultant, avec les erreurs d'appariements, de ségrégation et de cytodierèse. L'impact sur l'index mitotique et l'accumulation des cellules en début de mitose ont de la même façon été quantifiés. Il est à noter qu'aucun autre phénotype, à part ceux connus pour une inhibition d'Aurora B et éventuellement Aurora A, n'a été détecté, en cohérence avec la sélectivité élevée de **194**.

Le composé **194** est le composé le plus actif de notre librairie parmi les quatre-vingt-deux analogues avec une  $IC_{50}$  sur Aurora B de 34 nM. Sa solubilité très moyenne et sa faible stabilité métabolique sont des voies à travailler vers des composés alliant son activité inhibitrice avec des propriétés pharmacocinétiques plus compatibles avec un potentiel candidat médicament. Ce composé qui est un inhibiteur non-compétitif mixte de l'ATP est particulièrement sélectif de la kinase Aurora B et potentiellement aussi d'Aurora A. Il induit bien chez les cellules cancéreuses un phénotype caractéristique de l'inhibition d'Aurora B.



# **Conclusion Générale et Perspectives**





# Conclusion Générale

L'objectif de ce travail de recherche a été de synthétiser des analogues d'**EL228**, composé identifié au cours d'un criblage d'une chimiothèque de l'équipe, comme hit sur la kinase Aurora B avec une  $IC_{50}$  de 5  $\mu$ M (Figure 117). Le composé **EL228** est issu d'un projet de simplification de la benzosceptrine C, un métabolite secondaire de la famille des pyrrole-2-aminoimidazoliques isolé au laboratoire de l'éponge marine *Agelas Dendromorpha*. Un aperçu de cette famille de molécules est donné dans le chapitre I. Ces métabolites comportent des fragments structuraux pyrrolique et imidazolique d'un grand intérêt en chimie thérapeutique. La cible biologique principale de mon travail est une kinase appartenant à la famille Aurora, qui compte trois membres, Aurora A, B et C. Ces kinases sont impliquées dans la division cellulaire et orchestrent différentes étapes de la mitose. Leurs rôles ont également été détaillés dans le premier chapitre introductif. Ces cibles sont toutes particulièrement intéressantes puisqu'elles jouent un rôle important dans le développement tumoral. Ces kinases suscitent un vif intérêt en oncologie depuis plusieurs années comme en témoigne le nombre d'inhibiteurs en phase clinique. Pour autant, aucune molécule n'a encore été approuvée comme médicament à ce jour. Ainsi, nous avons exploré le potentiel pharmacophore du hit **EL228**. L'objectif était de trouver des molécules avec de très bonnes activités et d'explorer leur mode d'action. Ainsi, nous avons réalisé la synthèse de quatre-vingt-deux analogues dont les évaluations et les études biologiques *in vitro* ont permis de mettre en évidence :

- des analogues actifs à l'échelle nanomolaire
- un mode d'action non-ATP-compétitif mixte sur Aurora B
- le site allostérique probable par modélisation moléculaire comparative

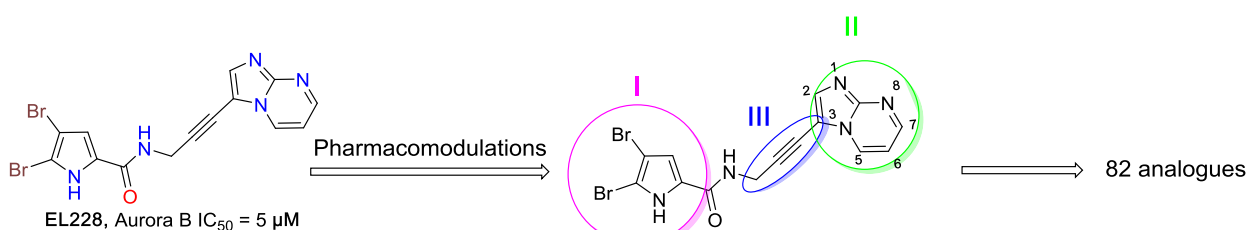


Figure 117

Avec l'objectif d'améliorer l'activité inhibitrice des composés sur Aurora B, nos travaux de synthèse chimique se sont organisés autour de trois grands axes d'étude visant à moduler successivement chacune des trois parties de **EL228** pour étudier les relations de structure-activité (Figure 117) :

- Partie I : 4,5-dibromopyrrole (Chapitre II)
- Partie II : imidazo[1,2-a]pyrimidine (Chapitre III)
- Partie III : alcyne (Chapitre IV)

Enfin, le cinquième et dernier chapitre de ce travail a porté sur l'étude du mode d'action biologique des inhibiteurs les plus actifs.

Les modifications de l'hétérocycle de la partie I, présentées dans le deuxième chapitre, ont conduit à la synthèse de onze nouvelles molécules (Figure 118). Les hétérocycles introduits sont des cycles hétéroaromatiques à cinq chaînons ou indoliques. Nous avons examiné l'importance du noyau pyrrolique, en le comparant à des cycles thiophène et furane avec les composés **127** et **128** respectivement. Le rôle des substituants sur le pyrrole a aussi été exploré, en y introduisant des halogènes de nature différente avec les analogues **109** et **110** ou d'autres substituants comme dans **99c-d**, **103-104**, **122**.

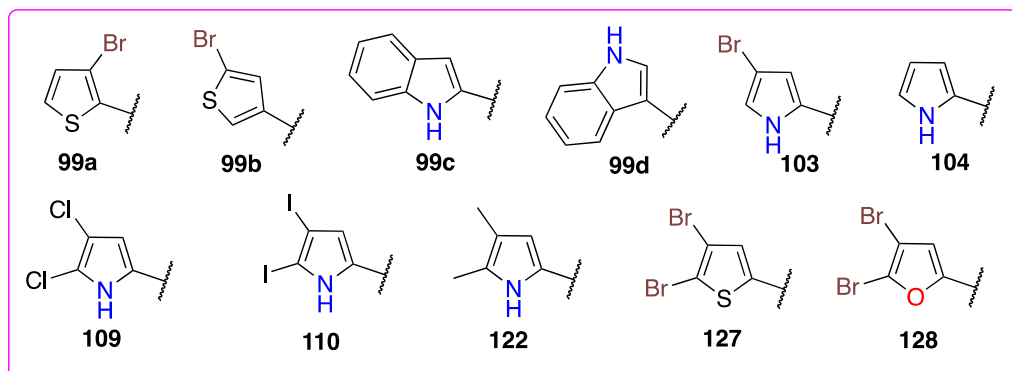


Figure 118 – Hétérocycles introduits sur la partie I

Le chapitre III décrit la préparation de vingt-huit dérivés où le bicyclic imidazo[1,2-a]pyrimidine d'**EL228** a été remplacé par des cycles hétéroaromatiques variés et des bicyclics imidazo[1,2-a]N-hétérocyclique (Figure 119).

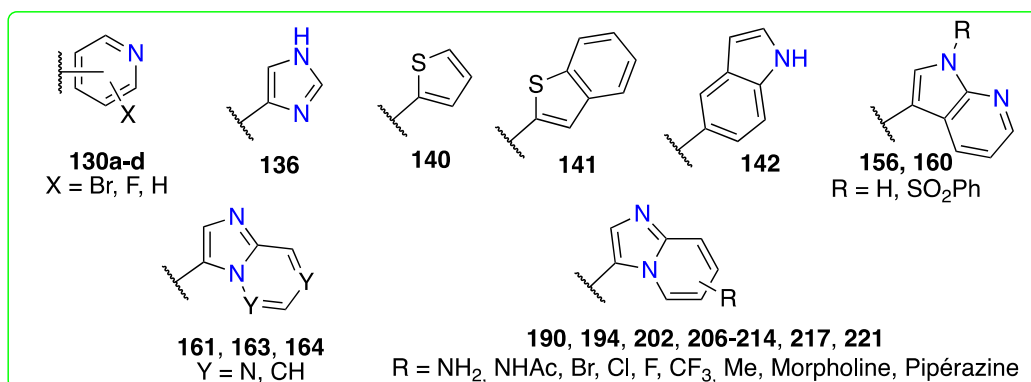


Figure 119 - Hétérocycles introduits sur la partie II

Nous avons également préparé vingt-six composés qui résultent de la combinaison des hétérocycles des parties I et II.

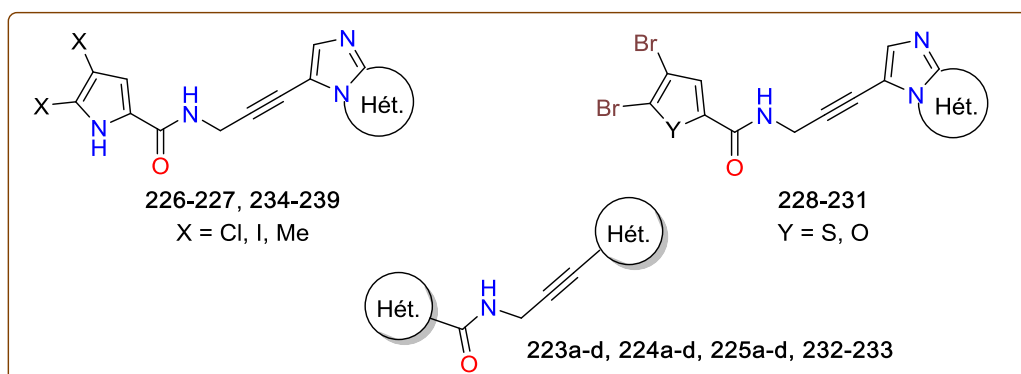


Figure 120 – Molécules synthétisées par combinaison des hétérocycles des parties I et II

Pour finir, les synthèses de seize dérivés avec des linkers variés font l'objet du chapitre IV. Pour se faire, nous avons choisi d'introduire quatre types de linkers : alcènes, alcane, phényles et triazoles. L'ensemble de ces produits possèdent le noyau 4,5-dibromopyrrole mais incluent plusieurs hétérocycles au niveau de la partie II.

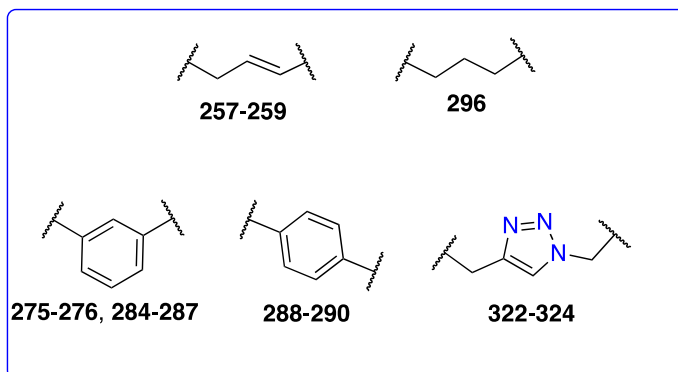
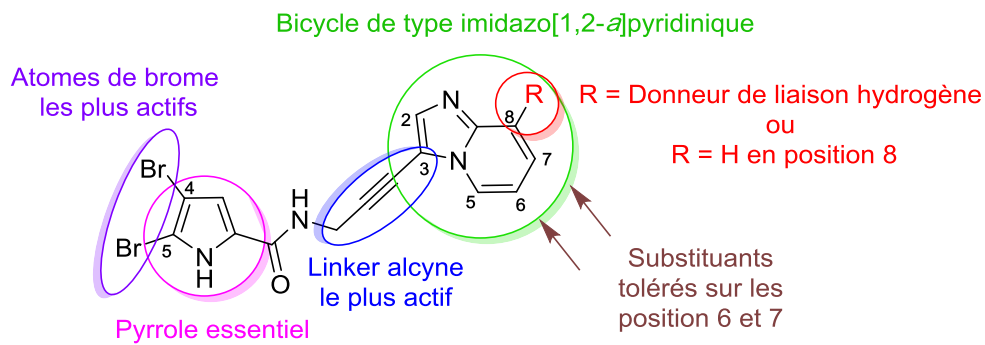


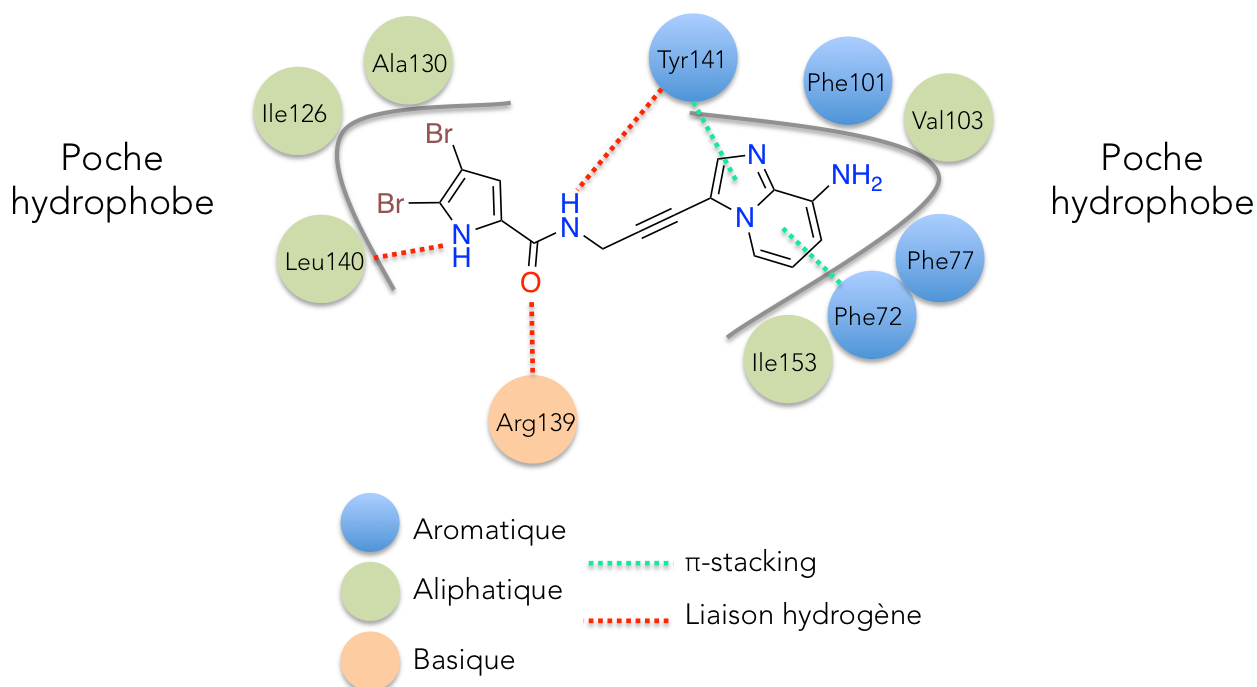
Figure 121 – Les différents linkers introduits sur la partie III

L'ensemble de ces produits a été évalué *in vitro* avec des tests enzymatiques sur un panel de kinases à la Station Biologique de Roscoff (Figure 122). Les évaluations biologiques nous ont progressivement guidés dans la conception des inhibiteurs. Ainsi, nous avons pu établir l'étude SAR autour des pharmacophores (Figure 122). Aucune des pharmacomodulations du noyau pyrrolique n'a présenté de meilleures activités qu'**EL228** sur Aurora B ( $IC_{50}$  de 5  $\mu$ M). L'importance du N-H du noyau pyrrolique de la partie I a pu être soulignée par les cycles 4,5-dibromofurane **128** et 4,5-dibromothiophène **127** qui ne sont pas actifs. Les produits synthétisés nous ont également permis de démontrer l'importance des deux atomes de bromes. En effet, avec un seul atome de brome dans **103** ou son absence dans **104**, l'activité sur la kinase est perdue. Le remplacement des bromes par d'autres halogènes ou substituants hydrophobes n'a pas permis d'améliorer l'activité. Concernant la partie II, l'introduction d'hétérocycles différents du bicyclic imidazo[1,2-a]pyrimidine ne nous a pas permis d'obtenir des analogues actifs. En revanche, le déplacement de l'azote de la position 8 du hit initial sur les autres positions du cycle dans les noyaux imidazo[1,2-a]pyridazine **163**, imidazo[1,2-a]pyrazine **161** et imidazo[1,2-a]pyridine **164** a permis un gain considérable de l'activité avec des  $IC_{50}$  allant de 353 à 47 nM. Les substitutions sur le bicyclic imidazo[1,2-a]pyridine le plus actif ont abouti à des dérivés très actifs également. Le composé **194** présentant une amine libre en position 8 est le plus actif de cette série avec une  $IC_{50}$  de 34 nM. Ainsi l'échange de l'azote endocyclique accepteur de liaison hydrogène en position 8 par une amine exocyclique accepteur-donneur de liaison hydrogène s'est avéré bénéfique à l'activité sur la kinase. Sur les positions 6 et 7, l'introduction de substituants est bien tolérée, comme des méthyles (**207** et **208**) qui ont une  $IC_{50}$  de 40 et 36 nM. Enfin, la modification de la partie III (linker) a permis de mettre en évidence l'alcyne comme le linker le plus actif parmi les autres testés. Bien que les linkers alcènes dans **249** et **250** aient montré des activités de 0.51 et 2.6  $\mu$ M, leurs homologues alcynes se sont avérés être bien plus actifs. Certains composés parmi les linkers phényles ont montré de l'activité inhibitrice mais ne se sont pas montrés supérieurs aux dérivés alcynes également. En revanche, aucune activité n'a été détectée pour les linkers triazoles et alcanes. Le linker alcyne qui est un lien rigide, droit et très peu encombré est le plus favorable pour nos composés en termes d'activité et de sélectivité.



**Figure 122 – Bilan de la SAR**

Nous avons pu mettre en évidence par des expériences de doses-réponses croisées que l'inhibiteur **194** est non-compétitif mixte vis-à-vis d'Aurora B, ce qui en fait un inhibiteur allostérique. Cette information capitale sur le mode d'inhibition a permis une étude de modélisation moléculaire, offrant des éléments de réponse complémentaires à l'étude SAR (Figure 123). De plus, le mode d'inhibition de **194** est cohérent avec sa très bonne sélectivité, testée sur un panel plus large de cinquante-huit kinases. Seule la kinase Aurora A s'est avérée inhibée par le composé **194** à hauteur de 79 % à 1  $\mu$ M. L'activité sur Aurora A n'est cependant pas surprenante sachant qu'Aurora A et B ont 71 % d'homologie et que leurs sites allostériques se retrouvent dans les deux kinases.



**Figure 123 – Éléments d'interaction en 2D du composé **194** dans le site allostérique d'Aurora B détectés *in silico***

Le dernier axe d'étude a concerné les études pharmacologiques et l'étude du mode d'action. Les tests de viabilité cellulaire sur plusieurs lignées cancéreuses nous ont permis d'obtenir des valeurs  $EC_{50}$  de l'ordre de la dizaine de micromolaire pour les composés actifs et suffisamment solubles. En effet, des mesures en milieu tamponné biologique sur dix produits ont mis en évidence des solubilités globalement faibles. La stabilité métabolique de ces dix composés

a également été évaluée, soulignant pour neuf d'entre eux des stabilités assez faibles car métabolisés en moins d'une heure par les cytochromes P450. Ces résultats nous indiquent que la solubilité et la stabilité métabolique des composés sont des aspects sur lesquels nous devons poursuivre nos efforts d'optimisation. Des analyses de cycle cellulaire avec le composé **194** ont montré une forte accumulation des cellules traitées avec un contenu en ADN de 4n à 24 h, allant jusqu'à 8n à 48 h d'incubation. Ce blocage de la division cellulaire est cohérent avec le rôle d'Aurora B et les phénotypes résultants décrits dans la littérature. Pour finir, les expériences d'immunomarquage en présence de l'inhibiteur **194** ont mis en avant l'inhibition d'Aurora B dans la cellule et nous ont permis de visualiser les conséquences de son inhibition sur le phénotype des cellules, avec des chromosomes perdus, des échecs de cytokinèse et la délocalisation d'Aurora B au cours de la mitose.

# Perspectives

Les synthèses effectuées et leurs évaluations biologiques *in vitro* nous ayant permis d'établir des éléments de réponses sur les relations de structure-activité du pharmacophore de départ, il faut désormais intégrer dans le design des prochains analogues les aspects de pharmacocinétique afin d'optimiser ce lead **194** tout en maintenant la bonne activité inhibitrice nanomolaire ( $IC_{50} = 34$  nM). En effet, la solubilité limitée de nos composés et leur sensibilité métabolique au niveau de la liaison C<sub>7</sub>-C<sub>8</sub> vis-à-vis des cytochromes P450, nécessitent des efforts d'optimisation. Il serait intéressant d'évaluer la stabilité du composé **208** portant un méthyle en position 7. Ainsi, nous pourrions envisager la synthèse du composé **328** portant un NH<sub>2</sub> en position 8 et un méthyle en position 7, susceptible de bloquer la métabolisation (Schéma 61).<sup>426</sup> La synthèse du produit **330** substitué avec un chlore en position 7 nous permettrait d'étendre l'espace chimique en position 7 pour bloquer la métabolisation et jouer sur la solubilité avec la préparation des produits **332** (Schéma 61).<sup>427</sup> Pour finir, le bicyclic 6-bromo-8-aminoimidazo[1,2-a]pyridine **333** pourrait également être utilisé comme plateforme pour introduire des groupements modulant la solubilité, comme nous l'avons précédemment effectué avec les cycles morpholine et pipérazine pour conduire aux produits **334** (Schéma 61).

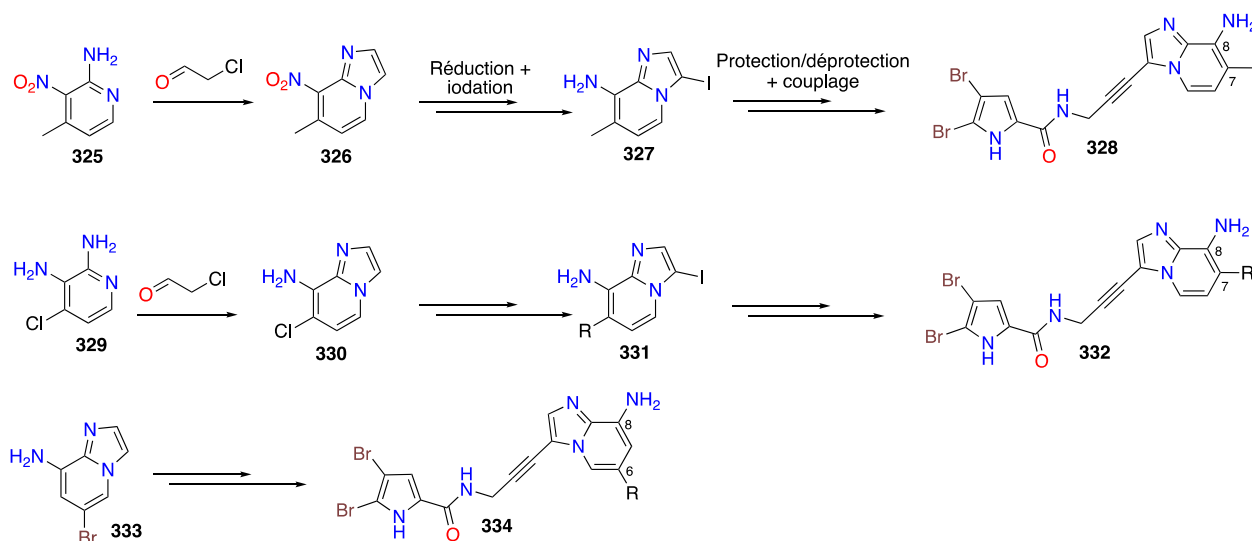


Schéma 61– Perspectives de synthèses pour les prochains dérivés

Par ailleurs, le *design* des prochains analogues s'appuiera sur les récents résultats obtenus à l'issue des études de modélisation moléculaire, méthode dite de « Structure-Based Drug Design ». De plus, une collaboration avec l'équipe du Dr. A. Jeyaprakash Arulanandam de l'Université d'Édimbourg, s'est établie afin de co-cristalliser Aurora B en complexe avec l'inhibiteur **194**. Ceci permettrait de valider le mode d'inhibition et mettrait en lumière le premier site allostérique cristallisé d'Aurora B. De plus, le cliché de diffraction des rayons X du complexe nous permettrait une connaissance plus précise du site de fixation de l'inhibiteur et des interactions qui s'établissent entre le ligand et la kinase.

Il sera important aussi d'évaluer l'activité des inhibiteurs sur le canal hERG (human Ether-à-go-go-Related Gene), dont le blocage est responsable de cardiotoxicité, ce qui représente un des obstacles les plus fréquents dans le développement de candidats médicaments.<sup>428,429</sup> Plusieurs grands paramètres peuvent être modulés pour diminuer la potentielle activité sur le canal hERG, que sont la lipophilie, la basicité, la rigidité et l'aromaticité des inhibiteurs.<sup>430</sup>

Pour poursuivre l'étude pharmacologique de nos composés, il serait pertinent de déterminer les IC<sub>50</sub> des composés actifs sur les autres kinases de la famille, Aurora A et C. Lors du criblage sur le panel de cinquante-huit kinases, le produit **194** a montré une activité inhibitrice de 79% à 1 µM sur Aurora A.

Des études de clonogénicité pourraient être mises en œuvre pour mieux caractériser l'effet antitumorale.<sup>140,431,432</sup> Cette analyse consiste à ensemercer des cellules isolées les unes des autres sur un support semi-solide nutritif pour évaluer leur capacité de prolifération en présence de différentes doses d'inhibiteur. Fondamentalement, ce test quantifie la capacité d'une cellule à former une colonie d'au moins cinquante cellules sur des temps allant de une à trois semaines environ.<sup>433,434</sup>

Nous pourrions envisager d'utiliser le composé **194** en combinaison avec d'autres composés anticancéreux conventionnels pour étudier la réponse des cellules traitées et éventuellement identifier une combinaison synergique ou une sensibilisation. Divers inhibiteurs d'Aurora B ont été testés en association avec différents agents chimiothérapeutiques comme la vincristine, la daunorubicine, la gemcitabine, le docétaxel, l'oxaliplatine ou encore la 5-fluorouracil.<sup>414</sup> Ce type de combinaison peut s'avérer être bénéfique pour l'activité antiproliférative des cellules tumorales ainsi que pour limiter les effets secondaires et l'apparition des phénomènes de résistance.<sup>435,436</sup> A titre d'exemple, Huang *et al.* ont mis en évidence une synergie très favorable entre des inhibiteurs d'Aurora B et d'Haspine sur plusieurs lignées cancéreuses.<sup>437</sup>

Comme abordé dans le chapitre V, les cellules du sang périphérique qui sont des cellules saines en interphase pourraient être exposées au composé **194** afin d'évaluer l'effet de cet inhibiteur sur des cellules qui ne se divisent pas. En effet, la cible Aurora n'étant exprimée que lors de la division cellulaire, nous pouvons penser que notre inhibiteur **194** n'aura pas d'effet cytotoxique, permettant de mettre en évidence sa sélectivité vis-à-vis des cellules tumorales.<sup>149</sup>

Pour conclure sur ce projet de thèse, la synthèse de quatre-vingt-deux composés a permis d'identifier le composé **194**, 150 fois plus actif que le hit initial **EL228** et d'établir des relations de structure-activité. Nous avons mis en évidence l'inhibition de la kinase Aurora B, cible thérapeutique prometteuse en oncologie, et l'effet de son inhibition par notre meilleur composé sur les cellules en mitose. De plus notre travail met en lumière le premier inhibiteur non-ATP compétitif mixte de la kinase Aurora B. Notre étude apporte un éclairage pour la conception future d'autres bibliothèques de composés afin d'aboutir à un candidat médicament.

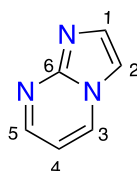


# Experimental part

## 1. Chemical Synthesis

All reagents were of commercial grade and were used without further purification, unless otherwise stated. Commercially available anhydrous solvents were used for reactions conducted under inert atmosphere. Reagent grade solvents were used in all other cases. Flash column chromatography was performed on silicagel 60 (70–230 mesh, Macherey–Nagel). Thin layer chromatography was carried out using precoated silica gel F-254 plates (thickness 0.25 mm) and visualized by UV light (254 nm).  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were recorded on a Bruker Advance 300 NMR spectrometer (300 and 75 MHz) and 500 MHz Bruker. Chemical shifts  $\delta$  are reported in parts per million (ppm) relative to the residual solvent signals ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta = 7.26$  ppm for  $^1\text{H}$  and  $\delta = 77.16$  ppm for  $^{13}\text{C}$ ;  $\text{DMSO-d}_6$ ,  $\delta = 2.50$  ppm for  $^1\text{H}$  and  $\delta = 39.52$  ppm for  $^{13}\text{C}$ .  $\text{DMF-d}_7$ ,  $\delta = 2.79, 2.92, 8.03$  ppm for  $^1\text{H}$  and  $\delta = 29.76, 34.89, 163.15$  ppm for  $^{13}\text{C}$ ). Data are reported as follows: chemical shift, multiplicity (s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, m = multiplet, br = broad), coupling constants (Hz) and integration. High-resolution MS data were obtained on a Waters LCT Micromass spectrometer in positive electrospray ionization-time of flight (ESI-TOF) mode. IR spectra were recorded on a PerkinElmer Spectrum 65 spectrophotometer using an attenuated total reflectance (ATR) device ( $\nu$  in  $\text{cm}^{-1}$ ). Reported yields are unoptimized.

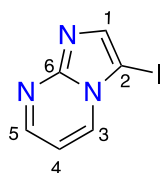
### Imidazo[1,2-*a*]pyrimidine (78).



Chemical Formula:  $\text{C}_6\text{H}_5\text{N}_3$   
Exact Mass: 119,048  
Molecular Weight: 119,127

Prepared according to the literature (1.3 g, quant).<sup>220</sup>

### 3-iodoimidazo[1,2-*a*]pyrimidine (79).



Chemical Formula:  $\text{C}_6\text{H}_4\text{IN}_3$   
Exact Mass: 244,9450  
Molecular Weight: 245,0235

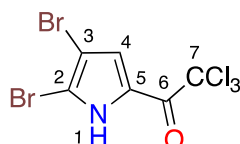
To a solution of compound **78** (150 mg, 1.26 mmol, 1eq) in 1 mL of MeCN was added NIS (453 mg, 2.02 mmol, 1.6 eq). The mixture was stirred at 50°C overnight and then quenched by the

addition of saturated sodium sulfate solution followed by water. The organic layer was separated, washed successively with water, brine and dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>. Concentration and purification over silica gel (elution by gradient from 65/35 to 90/10 EtOAc/Heptane) afforded **79** as a brown amorphous solid (133 mg, 32 %).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7.19 (dd, *J* = 4.2, 7.0 Hz, 1H, H4), 7.91 (s, 1H, H1), 8.55 (dd, *J* = 2.0, 4.1 Hz, 1H, H5), 8.78 (dd, *J* = 2.0, 6.9 Hz, 1H, H3).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 64.2 (C2), 110.1 (C4), 135 (C3), 140.7 (C1), 149.9 (C6), 150.7 (C5).

### 2,2,2-trichloro-1-(4,5-dibromo-1*H*-pyrrol-2-yl)ethan-1-one (**81**).



Chemical Formula: C<sub>6</sub>H<sub>2</sub>Br<sub>2</sub>Cl<sub>3</sub>NO

Exact Mass: 366,7569

Molecular Weight: 370,2460

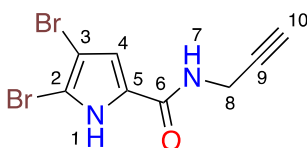
Trichloroacetylpyrrole **80** (2 g, 9.4 mmol) was dissolved in 30 mL of glacial acetic acid. A solution of Br<sub>2</sub> (0.97 mL, 0.019 mmol) in 16 mL of acetic acid was added dropwise over 30 min under argon. The mixture was stirred for 24 h. A solution of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 10 % was carefully added to quench the mixture and extracted with ether. The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated under vacuum. The residue was purified by silica gel flash chromatography (heptane/EtOAc: 98/2) to afford **81** as a pink amorphous solid (2.56 g, 73 %).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7.41 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, H4), 13.75 (s, 1H, H1).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 94 (C7), 100.8 (C3), 114.6 (C2), 122.4 (C4), 123.3 (C5), 170.9 (C6).

HRMS (ESI) *m/z* Calcd for (M-H)<sup>-</sup> C<sub>6</sub>HNOCl<sub>3</sub>Br<sub>2</sub>: 365.7490. Found: 365.7480.

### 4,5-dibromo-*N*-(prop-2-yn-1-yl)-1*H*-pyrrole-2-carboxamide (**83**).



Chemical Formula: C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O

Exact Mass: 303,8847

Molecular Weight: 305,9570

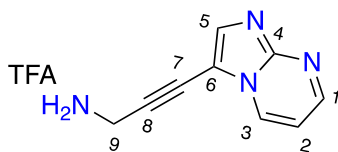
Compound **81** (2.1 g, 5.67 mmol) and propargylamine **82** (0.81 g, 14.7 mmol) were stirred under argon at 60°C for 20 h. The solvent was removed under vacuum and the product was purified by flash chromatography (heptane/EtOAc: 80/20) yielding **83** as a white solid (1.38 g, 80 %).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 3.16 (t, *J* = 2.8 Hz, 1H, H10), 4.01 (dd, *J* = 2.6, 5.7 Hz, 2H, H8), 6.96 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H4), 8.59 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, H7), 12.77 (s, 1H, H1).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 27.8 (C8), 73 (C10), 81.1 (C9), 97.9 (C3), 105 (C2), 112.9 (C4), 127.6 (C5), 158.5 (C6).

**HRMS** (ESI)  $m/z$  Calcd for (M-H)<sup>-</sup> C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>N<sub>2</sub>OBr<sub>2</sub>: 304.8925. Found: 304.8925.

**3-(imidazo[1,2-*a*]pyrimidin-3-yl)prop-2-yn-1-amine (86).**



Chemical Formula: C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>  
Exact Mass: 172,0749  
Molecular Weight: 172,1910

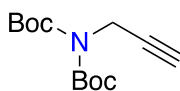
To a solution of compound **98** (40 mg, 0.11 mmol) in 2 mL of DCM under argon, was added dropwise TFA (0.319 mL, 4.3 mmol). The mixture was stirred overnight at room temperature. The mixture was concentrated under vacuum. The residue was rinsed with cold Et<sub>2</sub>O to get a grey solid as the TFA salt (25 mg, 81 %).

**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, MeOD) δ 4.2 (s, 2H, H<sub>9</sub>), 7.28 (m, 1H, H<sub>2</sub>), 8.05 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 8.7 (d,  $J$  = 4.2 Hz, 1H, H<sub>1</sub>), 8.93 (d,  $J$  = 7.7 Hz, 1H, H<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, MeOD) δ 30.9 (C<sub>9</sub>), 73.1 (C<sub>7</sub>), 93.1 (C<sub>8</sub>), 113 (C<sub>2</sub>), 136.3 (C<sub>3</sub>), 155.7 (C<sub>1</sub>). Some quaternary carbons and aromatic CH are too broad to be seen due to very slow relaxation.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>)  $m/z$  Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>N<sub>4</sub>: 173.0827. Found: 173.0826.

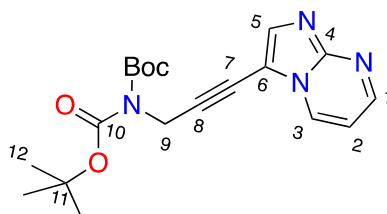
**Di-tert-butyl prop-2-ynylimidodicarbonate (97).**



Chemical Formula: C<sub>13</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>4</sub>  
Exact Mass: 255,147  
Molecular Weight: 255,314

Prepared according to the literature (97 %).<sup>219</sup>

**Di-tert-butyl (3-(imidazo[1,2-*a*]pyrimidin-3-yl)prop-2-yn-1-yl)carbamate (98).**



Chemical Formula: C<sub>19</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>  
Exact Mass: 372,1798  
Molecular Weight: 372,4250

A solution of compound **79** (2 g, 8.16 mmol) in anhydrous 5 mL of DMF and Et<sub>3</sub>N (5.7 ml) was degassed with argon. Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (573 mg, 0.82 mmol, 10 mol %) and CuI (233 mg, 1.22 mmol, 10 mol %) were added to the reaction mixture. Then alkyne **97** (2.5 g, 9.8 mmol) was added to the

mixture. The reaction mixture was stirred at room temperature overnight under inert atmosphere. The mixture was concentrated under vacuum and purified by silica gel flash chromatography (elution by gradient from 50/50 to 25/75 Heptane/EtOAc) to afford an oil (2.42 g) with remaining of  $\text{OPPh}_3$ .

$^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.53 (s, 18H, H12), 4.7 (s, 2H, H9), 6.98 (m, 1H, H2), 7.96 (s, 1H, H5), 8.57 (m, 2H, H1 and H3).

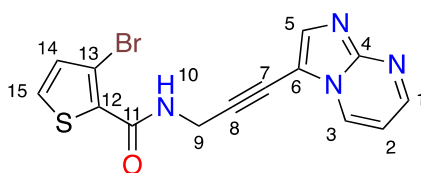
$^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  28 (C12), 36.7 (C9), 68.9 (C7), 83.4 (C11), 96.2 (C8), 107.3 (C6), 109.4 (C2), 132.9 (C3), 139.3 (C5), 148.2 (C4), 150.7 (C1), 151.7 (C10).

**HRMS** ( $\text{ESI}^+$ )  $m/z$  Calcd for  $(\text{M}+\text{H})^+$   $\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{N}_4\text{O}_4$ : 373.1876. Found: 373.1882.

### General Procedure A for Amide Formation.

To a solution of the appropriate carboxylic acid (1 eq) in dry DCM were added HOBT (1.2 eq), then EDC (1.2 eq). DIEA was added (5 eq) followed by the amine **86** (1 eq). The mixture was stirred at room temperature until completion. The mixture was quenched with water and extracted with DCM. The combined organic layers were washed with water and brine, dried over  $\text{MgSO}_4$ , filtered, and concentrated under vacuum. The product was purified by flash chromatography (elution by gradient from 100 to 95/5 or 90/10 DCM/MeOH).

### 3-bromo-*N*-(3-(imidazo[1,2-*a*]pyrimidin-3-yl)prop-2-yn-1-yl)thiophene-2-carboxamide (99a)



Chemical Formula:  $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{BrN}_4\text{OS}$

Exact Mass: 359,9680

Molecular Weight: 361,2170

The title compound was synthesized according to general procedure A using 3-bromothiophene-2-carboxylic acid **85a** (250 mg, 1.21 mmol) yielding **99a** as a beige amorphous solid (244 mg, 56 %).

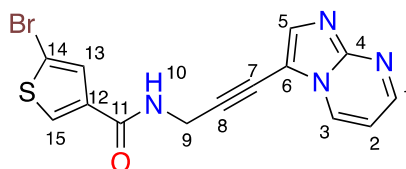
$^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  4.45 (d,  $J = 5.4$  Hz, 2H, H9), 7.19 (d,  $J = 5.4$  Hz, 1H, H14), 7.26 (dd,  $J = 4.2, 2.8$  Hz, 1H, H2), 7.83 (d,  $J = 5.5$  Hz, 1H, H15), 8.05 (s, 1H, H5), 8.65 (dd,  $J = 2.1, 2.1$  Hz, 1H, H1), 8.77 (t,  $J = 5.1$  Hz, 1H, H10), 8.88 (dd,  $J = 1.8, 5.1$  Hz, 1H, H3).

$^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  30 (C9), 68.8 (C7), 96.8 (C8), 106.3 (C6), 110 (C2), 100.7 (C13), 130.2 (C15), 131.8 (C14), 132.3 (C12), 133.6 (C3), 138.7 (C5), 147.8 (C4), 151.5 (C1), 160.3 (C11).

**HRMS** ( $\text{ESI}^+$ )  $m/z$  Calcd for  $(\text{M}+\text{H})^+$   $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{BrN}_4\text{OS}$ : 362.9738. Found: 362.9742.

**IR** ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3335, 1630, 1514, 1484, 1416, 1277.

### 5-bromo-*N*-(3-(imidazo[1,2-*a*]pyrimidin-3-yl)prop-2-yn-1-yl)thiophene-3-carboxamide (99b)



Chemical Formula: C<sub>14</sub>H<sub>9</sub>BrN<sub>4</sub>OS  
 Exact Mass: 359,9680  
 Molecular Weight: 361,2170

The title compound was synthesized according to general procedure A using 5-bromothiophene-3-carboxylic acid **85b** (250 mg, 1.21 mmol) yielding **99b** as a beige amorphous solid (216 mg, 44 %).

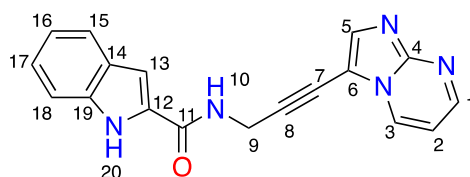
**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 4.44 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H, H<sub>9</sub>), 7.25 (dd, *J* = 2.2, 4 Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 7.62 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, H<sub>13</sub>), 8.04 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 8.19 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, H<sub>15</sub>), 8.64 (dd, *J* = 2.3, 2.3 Hz, 1H, H<sub>1</sub>), 8.88 (dd, *J* = 2.3, 4.6 Hz, 1H, H<sub>3</sub>), 8.96 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H, H<sub>10</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 29.4 (C<sub>9</sub>), 68.7 (C<sub>7</sub>), 96.9 (C<sub>8</sub>), 106.3 (C<sub>6</sub>), 110 (C<sub>2</sub>), 112.1 (C<sub>14</sub>), 129.3 (C<sub>13</sub>), 131.5 (C<sub>15</sub>), 133.8 (C<sub>3</sub>), 137.2 (C<sub>12</sub>), 138.7 (C<sub>5</sub>), 147.9 (C<sub>4</sub>), 151.5 (C<sub>1</sub>), 160.6 (C<sub>11</sub>).

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>BrN<sub>4</sub>OS: 362.9738. Found: 362.9734.

**IR** (cm<sup>-1</sup>): 3249, 1660, 1555, 1215, 1486, 1424, 1262.

#### ***N*-(3-(imidazo[1,2-*a*]pyrimidin-3-yl)prop-2-yn-1-yl)-1*H*-indole-2-carboxamide (99c)**



Chemical Formula: C<sub>18</sub>H<sub>13</sub>N<sub>5</sub>O  
 Exact Mass: 315,1120  
 Molecular Weight: 315,3360

The title compound was synthesized according to general procedure A using 1*H*-indole-2-carboxylic acid **85c** (200 mg, 1.24 mmol) yielding **99c** as a yellow amorphous solid (220 mg, 56 %).

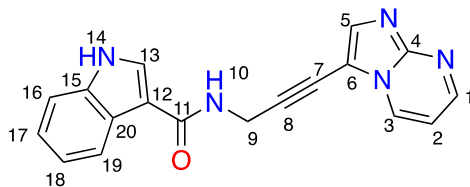
**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 4.53 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H, H<sub>9</sub>), 7.02 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, H<sub>16</sub>), 7.19 (t, *J* = 8.4 Hz, 1H, H<sub>17</sub>), 7.19 (s, 1H, H<sub>13</sub>), 7.25 (dd, *J* = 2.2, 4.5 Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 7.44 (dd, *J* = 1.1, 8.4 Hz, 1H, H<sub>18</sub>), 7.62 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H<sub>15</sub>), 8.06 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 8.64 (dd, *J* = 1.9, 4.3 Hz, 1H, H<sub>1</sub>), 8.9 (dd, *J* = 1.9, 7.1 Hz, 1H, H<sub>3</sub>), 9.1 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H, H<sub>10</sub>), 11.7 (s, 1H, H<sub>20</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 29.3 (C<sub>9</sub>), 68.6 (C<sub>7</sub>), 97.2 (C<sub>8</sub>), 103 (C<sub>13</sub>), 106.3 (C<sub>6</sub>), 109.9 (C<sub>2</sub>), 112.3 (C<sub>18</sub>), 119.7 (C<sub>16</sub>), 121.5 (C<sub>15</sub>), 123.5 (C<sub>17</sub>), 126.9 (C<sub>14</sub>), 131 (C<sub>12</sub>), 133.7 (C<sub>3</sub>), 136.5 (C<sub>19</sub>), 138.7 (C<sub>5</sub>), 147.9 (C<sub>4</sub>), 151.5 (1), 160.9 (C<sub>11</sub>).

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>N<sub>5</sub>O: 316.1198. Found: 316.1218.

**IR** (cm<sup>-1</sup>): 3241, 1631, 1616, 1553, 1257, 1231.

#### ***N*-(3-(imidazo[1,2-*a*]pyrimidin-3-yl)prop-2-yn-1-yl)-1*H*-indole-3-carboxamide (99d)**



Chemical Formula: C<sub>18</sub>H<sub>13</sub>N<sub>5</sub>O

Exact Mass: 315,1120

Molecular Weight: 315,3360

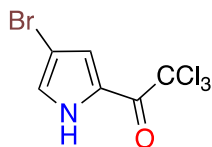
The title compound was synthesized according to general procedure A using 1H-indole-3-carboxylic acid **85d** (200 mg, 1.24 mmol) yielding **99d** as a white amorphous solid (64 mg, 17 %).

**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMF-d<sub>7</sub>) δ 4.62 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H, H<sub>9</sub>), 7.19 (m, 2H, H<sub>17-18</sub>), 7.3 (dd, *J* = 4, 6.9 Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 7.53 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H, H<sub>16</sub>), 8.05 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 8.26 (d, *J* = 3 Hz, 1H, H<sub>13</sub>), 8.34 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H<sub>19</sub>), 8.6 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H, H<sub>10</sub>), 8.71 (dd, *J* = 2, 4.2 Hz, 1H, H<sub>1</sub>), 9.02 (dd, *J* = 1.9, 6.8 Hz, 1H, H<sub>3</sub>), 11.22 (s, 1H, H<sub>14</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 28.9 (C<sub>9</sub>), 68.2 (C<sub>7</sub>), 98.1 (C<sub>8</sub>), 106.5 (C<sub>6</sub>), 110 (C<sub>2-C12</sub>), 111.8 (C<sub>16</sub>), 120.5 (C<sub>17</sub>), 120.9 (C<sub>19</sub>), 121.9 (C<sub>18</sub>), 126.1 (C<sub>15</sub>), 128.1 (C<sub>13</sub>), 133.7 (C<sub>3</sub>), 136.1 (C<sub>20</sub>), 138.5 (C<sub>5</sub>), 147.8 (C<sub>4</sub>), 151.4 (C<sub>1</sub>), 164.4 (C<sub>11</sub>).

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>N<sub>5</sub>O: 316.1198. Found: 316.1209.

**1-(4-bromo-1H-pyrrol-2-yl)-2,2,2-trichloroethan-1-one (100).**



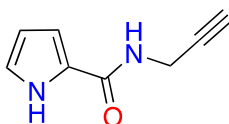
Chemical Formula: C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>BrCl<sub>3</sub>NO

Exact Mass: 288,846

Molecular Weight: 291,350

Prepared according to the literature.<sup>438</sup>

***N*-(prop-2-yn-1-yl)-1H-pyrrole-2-carboxamide (101).**



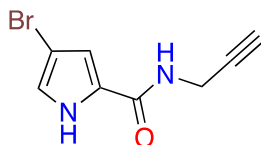
Chemical Formula: C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O

Exact Mass: 148,064

Molecular Weight: 148,165

Prepared according to the literature.<sup>229,230</sup>

**4-bromo-*N*-(prop-2-yn-1-yl)-1H-pyrrole-2-carboxamide (102).**



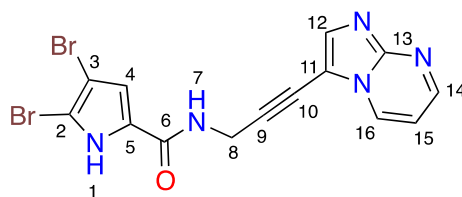
Chemical Formula: C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>BrN<sub>2</sub>O  
 Exact Mass: 225,974  
 Molecular Weight: 227,061

Prepared according to the literature.<sup>229,230</sup>

### General Procedure B for Sonogashira coupling.

Appropriate halide (1eq.) was dissolved in either dry THF or dry DMF and Et<sub>3</sub>N (2-3 eq.). The reaction mixture was degassed by argon bubbling. CuI (5-10 % mol) was introduced followed by Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2-5 % mol). Then the alkyne (1.5-2 eq.) was added to the mixture. The reaction mixture was stirred under inert atmosphere at room temperature or 50°C overnight. The mixture was concentrated under vacuum. The crude residue was purified by silica gel flash column chromatography (elution by gradient from 100 to 95/5 or 90/10 DCM/MeOH) and then on basic alumina gel (elution by gradient from 100 to 95/5 DCM/MeOH) to afford the expected product.

### 4,5-dibromo-N-(3-(imidazo[1,2-a]pyrimidin-3-yl)prop-2-yn-1-yl)-1H-pyrrole-2-carboxamide (EL228).



Chemical Formula: C<sub>14</sub>H<sub>9</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O  
 Exact Mass: 420,9174  
 Molecular Weight: 423,0680

Compound **EL228** was synthesized according to general procedure B using compounds **83** (153 mg, 0.5 mmol) and **79** (147 mg, 0.6 mmol). Purification afforded the title compound as a pale yellow solid (110 mg, 52 %).

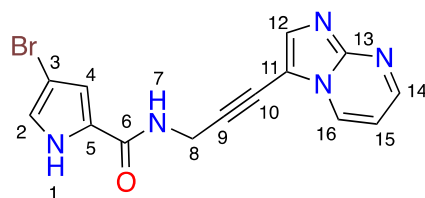
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 4.44 (d, *J* = 5.3 Hz, 2H, H8), 6.98 (s, 1H, H4), 7.24 (m, 1H, H15), 8.05 (s, 1H, H12), 8.66 (m, 1H, H14), 8.76 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H, H7), 8.88 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H, H16), 12.82 (s, 1H, H1).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 29.2 (C8), 68.9 (C10), 97.2 (C3), 98 (C9), 105.2 (C2), 110 (C15), 113.1 (C4), 127.5 (C5), 134 (C16), 151 (C14), 158.7 (C14). Some quaternary carbons and aromatic CH are too broad to be seen due to very slow relaxation.

HRMS (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>N<sub>5</sub>OBr<sub>2</sub>: 423.9226. Found 423.9239.

IR (cm<sup>-1</sup>): 3107, 1616, 1558, 1511, 1395, 1237, 1142.

### 4-bromo-N-(3-(imidazo[1,2-a]pyrimidin-3-yl)prop-2-yn-1-yl)-1H-pyrrole-2-carboxamide (103).



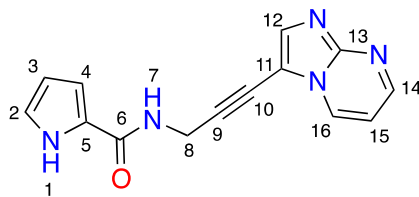
Chemical Formula: C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>BrN<sub>5</sub>O  
 Exact Mass: 343,007  
 Molecular Weight: 344,172

Compound **103** was synthesized according to general procedure B using **102** and **79**. Purification afforded the title compound (72 %).

**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 4.44 (d, *J* = 4.3 Hz, 2H, H8), 6.91 (m, 1H, H4), 7.03 (m, 1H, H2), 7.25 (dd, *J* = 4.0, 6.7 Hz, 1H, H15), 8.07 (br s, 1H, H12), 8.66 (m, 1H, H14), 8.72 (t, *J* = 4.9 Hz, 1H, H7), 8.89 (d, *J* = 5.9 Hz, 1H, H16), 11.94 (br s, 1H, H1).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 29.1 (C8), 68.6 (C10), 97.3 (C9), 95.1 (C3), 110.1 (C15), 112 (C4), 121.7 (C2), 126.3 (C5), 133.8 (C16), 138.6 (C12), 147.6 (C13), 151.6 (C14), 159.4 (C6). Some quaternary carbons and aromatic CH are too broad to be seen due to very slow relaxation.

***N*-(3-(imidazo[1,2-*a*]pyrimidin-3-yl)prop-2-yn-1-yl)-1*H*-pyrrole-2-carboxamide (104).**



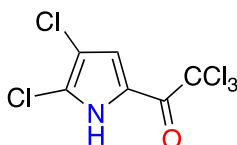
Chemical Formula: C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>N<sub>5</sub>O  
 Exact Mass: 265,096  
 Molecular Weight: 265,276

Compound **104** was synthesized according to general procedure B using **101** and **79**. Purification afforded the title compound (86 %).

**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 4.44 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H, H8), 6.10 (m, 1H, H3), 6.83 (m, 1H, H4), 6.89 (m, 1H, H2), 7.24 (dd, *J* = 4.2, 6.7 Hz, 1H, H15), 8.04 (s, 1H, H12), 8.58 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H, H7), 8.65 (dd, *J* = 2.0, 4.1 Hz, 1H, H14), 8.88 (d, *J* = 2.1, 6.8 Hz, 1H, H16), 11.53 (br s, 1H, H1).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 29 (C8), 68.3 (C10), 97.7 (C9), 106.4 (C11), 108.7 (C3), 110 (C15), 110.5 (C4), 121.8 (C2), 125.6 (C5), 133.7 (C16), 138.6 (C12), 147.8 (C13), 151.5 (C14), 160.4 (C6).

**2,2,2-trichloro-1-(4,5-dichloro-1*H*-pyrrol-2-yl)ethan-1-one (105).**

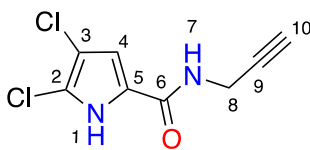


Chemical Formula: C<sub>6</sub>H<sub>2</sub>Cl<sub>5</sub>NO  
 Exact Mass: 278,858  
 Molecular Weight: 281,338



Prepared according to the literature (1.07 g, 81 %).<sup>231</sup>

#### 4,5-dichloro-*N*-(prop-2-yn-1-yl)-1*H*-pyrrole-2-carboxamide (**106**).



Chemical Formula: C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O  
Exact Mass: 215,986  
Molecular Weight: 217,049

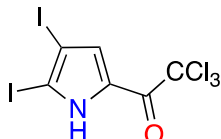
Compound **105** (300 mg, 1.07 mmol, 1 eq.) was dissolved in propargylamine (0.21 mL, 3.2 mmol, 3 eq.) and stirred under argon at 60° overnight. The solvent was removed under vacuum and the product purified by silica gel flash chromatography (elution by gradient from 90/10 to 80/20 heptane/EtOAc) to afford **106** as a white solid (200 mg, 86 %).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 3.13 (t, *J* = 2.5 Hz, 1H, H10), 4.01 (dd, *J* = 2.5, 5.7 Hz, 2H, H8), 6.92 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H4), 8.58 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H, H7), 12.78 (br s, 1H, H1).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 27.9 (C8), 73.1 (C10), 81.1 (C9), 108 (C3), 110 (C4), 115.3 (C2), 124.3 (C5), 158.6 (C6).

HRMS (ESI) *m/z* Calcd for (M-H)<sup>-</sup> C<sub>8</sub>H<sub>5</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O: 214.9779. Found: 214.9792.

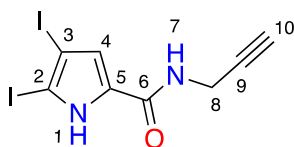
#### 2,2,2-trichloro-1-(4,5-diiodo-1*H*-pyrrol-2-yl)ethan-1-one (**107**).



Chemical Formula: C<sub>6</sub>H<sub>2</sub>Cl<sub>3</sub>I<sub>2</sub>NO  
Exact Mass: 462,729  
Molecular Weight: 464,247

Prepared according to the literature (1.13 g, 52 %).<sup>231</sup>

#### 4,5-diiodo-*N*-(prop-2-yn-1-yl)-1*H*-pyrrole-2-carboxamide (**108**).



Chemical Formula: C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>I<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O  
Exact Mass: 399,857  
Molecular Weight: 399,958

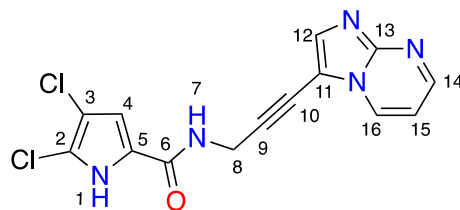
The title compound was prepared according to the same procedure of compound **106**, yielding an orange solid (563 mg, 97 %).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 3.11 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H, H10), 3.99 (dd, *J* = 2.6, 5.6 Hz, 2H, H8), 6.93 (s, 1H, H4), 8.47 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, H7), 12.36 (br s, 1H, H1).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 27.8 (C8), 73 (C10), 76.2 (C3), 81.2 (C9), 84 (C2), 118.5 (C4), 132.2 (C5), 158.2 (C6).

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>I<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O: 400.8648. Found: 400.8675.

**4,5-dichloro-N-(3-(imidazo[1,2-a]pyrimidin-3-yl)prop-2-yn-1-yl)-1H-pyrrole-2-carboxamide (109).**



Chemical Formula: C<sub>14</sub>H<sub>9</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O

Exact Mass: 333,018

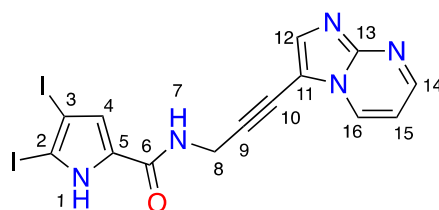
Molecular Weight: 334,160

Compound **109** was synthesized according to general procedure B using compounds **106** (106 mg, 0.49 mmol) and **79** (100 mg, 0.41 mmol). Purification afforded the title compound as a pale yellow amorphous solid (28 mg, 21 %).

**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 4.44 (d, *J* = 5.3 Hz, 2H, H8), 6.96 (s, 1H, H4), 7.25 (t, *J* = 4.6 Hz, 1H, H15), 8.05 (s, 1H, H12), 8.66 (m, 1H, H14), 8.78 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H, H7), 8.88 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H, H16), 12.86 (br s, 1H, H1).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 29.2 (C8), 68.7 (C10), 97.1 (C9), 108.1 (C3), 108.6 (C11), 110 (C15), 110.2 (C4), 115.4 (C2), 124.3 (C5), 133.8 (C16), 138.8 (C12), 150.1 (C13), 151.5 (C14), 158.8 (C6).

**N-(3-(imidazo[1,2-a]pyrimidin-3-yl)prop-2-yn-1-yl)-4,5-diiodo-1H-pyrrole-2-carboxamide (110).**



Chemical Formula: C<sub>14</sub>H<sub>9</sub>I<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O

Exact Mass: 516,890

Molecular Weight: 517,069

Compound **110** was synthesized according to general procedure B using compounds **108** (196 mg, 0.49 mmol) and **79** (120 mg, 0.49 mmol). Purification afforded the title compound as a white amorphous solid (101 mg, 40 %).

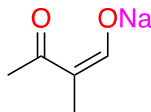
**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 4.43 (d, *J* = 5.2 Hz, 2H, H8), 6.97 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, H4), 7.24 (dd, *J* = 4.2, 6.8 Hz, 1H, H15), 8.04 (s, 1H, H12), 8.66 (m, 2H, H7-14), 8.88 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H, H16), 12.43 (s, 1H, H1).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 29.1 (C8), 68.6 (C10), 76.2 (C3), 84.2 (C2), 97.2 (C9), 106.3 (C11), 110 (C15), 118.6 (C4), 132.2 (C5), 133.8 (C16), 138.7 (C12), 147.8 (C13), 151.5 (C14), 158.4 (C6).

**HMRS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>I<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O: 517.8975. Found: 517.8974.

**IR** (cm<sup>-1</sup>): 3122, 1620, 1553, 1511, 1379, 1277, 1223.

**Sodium (Z)-2-methyl-3-oxobut-1-en-1-olate (117).**



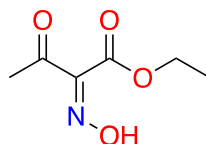
Chemical Formula: C<sub>5</sub>H<sub>7</sub>NaO<sub>2</sub>

Exact Mass: 122,034

Molecular Weight: 122,099

Prepared according to the literature from compounds **115** (0.68 mL, 1.5 eq.) and **116** (0.5 mL, 1 eq.) to afford a white amorphous solid (426 mg, 60 %).<sup>253</sup>

**Ethyl (Z)-2-(hydroxyimino)-3-oxobutanoate (118).**



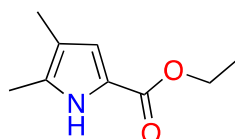
Chemical Formula: C<sub>6</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>4</sub>

Exact Mass: 159,053

Molecular Weight: 159,141

Prepared according to the literature from compound **114** (2 g, 15.4 mmol, 1 eq.) to afford a colorless oil (1.99 mg, 81 %).<sup>254</sup>

**ethyl 4,5-dimethyl-1H-pyrrole-2-carboxylate (119).**



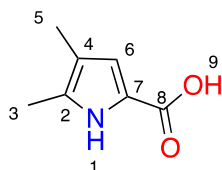
Chemical Formula: C<sub>9</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub>

Exact Mass: 167,095

Molecular Weight: 167,208

Prepared according to the literature from compounds **118** (143 mg, 0.90 mmol, 1.1 eq.) and **117** (100 mg, 0.82 mmol, 1 eq.) (66 %).<sup>439</sup>

**4,5-dimethyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (120).**



Chemical Formula: C<sub>7</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>2</sub>

Exact Mass: 139,063

Molecular Weight: 139,154

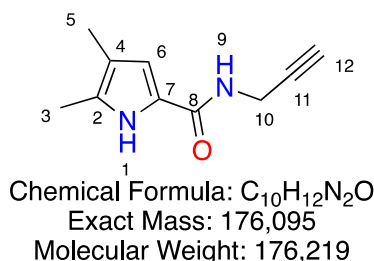
Ester **119** (888 mg, 5.31 mmol, 1eq) was dissolved in 5mL of MeOH and 5 mL of water. LiOH.H<sub>2</sub>O (1.1 g, 26.6 mmol, 5 eq) was added to the mixture which was stirred at 70°C during 3 h. The mixture was concentrated and then cooled down with an ice bath. HCl 3N was slowly added until a pH of 2. The product was extracted with EtOAc twice, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated. The residue was purified by chromatography on silica gel (100% DCM to 95:5 DCM:MeOH) to afford **120** as a brown amorphous solid (577 mg, 78 %).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 1.91 (s, 3H, H5), 2.10 (s, 3H, H3), 6.47 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H, H6), 11.20 (s, 1H, H1), 11.76 (br s, 1H, H9).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10.6 (C5), 10.7 (C3), 115.5 (C4), 116.1 (C6), 119.5 (C7), 130.6 (C2), 161.7 (C8).

HMRS (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>7</sub>H<sub>10</sub>NO<sub>2</sub>: 140.0712. Found: 140.0708.

#### 4,5-dimethyl-*N*-(prop-2-yn-1-yl)-1*H*-pyrrole-2-carboxamide (**121**).



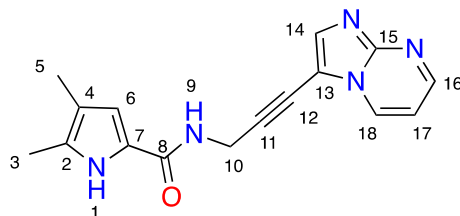
Compound **120** (558 mg, 4 mmol, 1eq.) was dissolved in 10 mL of EtOAc with propargylamine (0.51 mL, 8 mmol, 2eq.) and DIEA (2 mL, 12 mmol, 3 eq.) under argon. T<sub>3</sub>P (3.6 mL, 6 mmol, 1.5 eq.) was slowly added to the reaction mixture. The reaction was stirred at 70°C for 6 h. The reaction was quenched with water and extracted with EtOAc. The organic phase was dried over MgSO<sub>4</sub>, concentrated and purified by silica gel flash chromatography (elution by gradient from 100 to 98/2 DCM/MeOH) yielding **121** as a white amorphous solid (453 mg, 64 %).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 1.91 (s, 3H, H5), 2.10 (s, 3H, H3), 3.06 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H, H12), 3.96 (dd, *J* = 2.4, 5.8 Hz, 2H, H10), 6.52 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, H6), 8.11 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H, H9), 10.98 (s, 1H, H1).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10.6 (C5), 10.7 (C3), 27.6 (C10), 72.5 (C12), 81.9 (C11), 111.8 (C6), 114.5 (C4), 122.5 (C7), 128.4 (C2), 160.3 (C8).

HRMS (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>O: 177.1028. Found: 177.1021.

#### *N*-(3-(imidazo[1,2-*a*]pyrimidin-3-yl)prop-2-yn-1-yl)-4,5-dimethyl-1*H*-pyrrole-2-carboxamide (**122**).



Chemical Formula: C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>O  
 Exact Mass: 293,128  
 Molecular Weight: 293,330

Compound **122** was synthesized according to general procedure B using **121** (129 mg, 0.73 mmol) and **79** (150 mg, 0.61 mmol). Purification afforded the title compound as an orange amorphous solid (94 mg, 52 %).

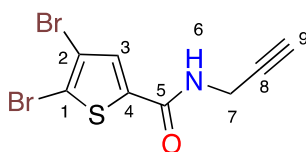
**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 1.91 (s, 3H, H5), 2.10 (s, 3H, H3), 4.40 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H, H10), 6.57 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, H6), 7.24 (dd, *J* = 4.2, 6.8 Hz, 1H, H17), 8.03 (s, 1H, H14), 8.32 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H, H9), 8.64 (dd, *J* = 2.0, 4.1 Hz, 1H, H16), 8.87 (dd, *J* = 2.0, 6.9 Hz, 1H, H18), 11.07 (s, 1H, H1)

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10.6 (C5), 10.7 (C3), 29 (C10), 68.2 (C12), 97.9 (C11), 106.5 (C13), 110 (C17), 112 (C6), 114.6 (C4), 122.4 (C7), 128.7 (C2), 133.7 (C18), 138.5 (C14), 147.8 (C15), 151.5 (C16), 160.5 (C8).

**HMRS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>N<sub>5</sub>O: 294.1355. Found: 294.1342.

**IR** (cm<sup>-1</sup>): 3267, 3205, 1618, 1513, 1486, 1410, 1262, 1230, 1146.

#### 4,5-dibromo-*N*-(prop-2-yn-1-yl)thiophene-2-carboxamide (**125**).



Chemical Formula: C<sub>8</sub>H<sub>5</sub>Br<sub>2</sub>NOS  
 Exact Mass: 320,846  
 Molecular Weight: 323,002

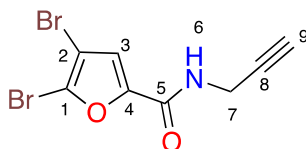
Compound **123** (2 g, 7mmol, 1eq) was dissolved in 10 mL of EtOAc with propargylamine (0.67 mL, 10.5 mmol, 1.5 eq) and DIEA (3.7 mL, 21 mmol, 3 eq) under argon. T<sub>3</sub>P (6.2 mL, 10.5 mmol, 1.5 eq) was slowly added to the reaction mixture at room temperature. The reaction was stirred at room temperature for one day. The reaction was quenched with water and extracted with EtOAc. The combined organic phases were dried over MgSO<sub>4</sub>, concentrated and purified by silica gel flash chromatography (elution by gradient from 100 to 98/2 DCM/MeOH) to afford a white amorphous solid (2.04 g, 90 %).

**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 3.19 (t, *J* = 2.5 Hz, 1H, H9), 4.04 (dd, *J* = 2.5, 5.6 Hz, 2H, H7), 7.80 (s, 1H, H3), 9.12 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H, H6).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 28.5 (C7), 73.5 (C9), 80.4 (C8), 113.9 (C2), 116.9 (C1), 130.6 (C3), 140.5 (C4), 159 (C5).

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>Br<sub>2</sub>NOS: 323.8516. Found: 323.8507

#### 4,5-dibromo-*N*-(prop-2-yn-1-yl)furan-2-carboxamide (**126**).



Chemical Formula: C<sub>8</sub>H<sub>5</sub>Br<sub>2</sub>NO<sub>2</sub>

Exact Mass: 304,869

Molecular Weight: 306,941

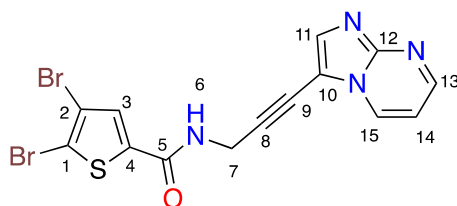
Following a similar procedure as mentioned for **125**, compound **126** was obtained as white amorphous solid (2.23 g, 98 %).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 3.14 (t, *J* = 2.5 Hz, 1H, H<sub>9</sub>), 3.99 (dd, *J* = 2.5, 5.6 Hz, 2H, H<sub>7</sub>), 7.40 (s, 1H, H<sub>3</sub>), 9.0 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H, H<sub>6</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 28 (C<sub>7</sub>), 73.2 (C<sub>9</sub>), 80.6 (C<sub>8</sub>), 103.3 (C<sub>2</sub>), 117.9 (C<sub>3</sub>), 126.2 (C<sub>1</sub>), 149 (C<sub>4</sub>), 155.7 (C<sub>5</sub>).

HRMS (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>Br<sub>2</sub>NO<sub>2</sub>: 307.8745. Found: 3078740.

#### 4,5-dibromo-*N*-(3-(imidazo[1,2-*a*]pyrimidin-3-yl)prop-2-yn-1-yl)thiophene-2-carboxamide (**127**).



Chemical Formula: C<sub>14</sub>H<sub>8</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>4</sub>OS

Exact Mass: 437,879

Molecular Weight: 440,113

Compound **127** was synthesized according to general procedure B using compounds **125** (343 mg, 1.06 mmol) and **79** (200 mg, 0.82 mmol). Purification afforded the title compound as a beige amorphous solid (174 mg, 48 %).

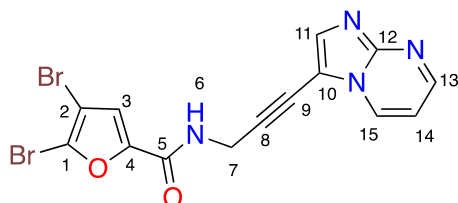
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 4.48 (d, *J* = 5.2 Hz, 2H, H<sub>7</sub>), 7.26 (dd, *J* = 4.1, 6.7 Hz, 1H, H<sub>14</sub>), 7.84 (s, 1H, H<sub>3</sub>), 8.08 (s, 1H, H<sub>11</sub>), 8.66 (dd, *J* = 1.9, 4.4 Hz, 1H, H<sub>13</sub>), 8.90 (dd, *J* = 1.7, 7.0 Hz, 1H, H<sub>15</sub>), 9.29 (t, *J* = 5.0 Hz, 1H, H<sub>6</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 29.8 (C<sub>7</sub>), 69.1 (C<sub>9</sub>), 96.4 (C<sub>8</sub>), 106.3 (C<sub>10</sub>), 110.1 (C<sub>14</sub>), 114 (C<sub>2</sub>), 117 (C<sub>1</sub>), 130.8 (C<sub>3</sub>), 133.9 (C<sub>15</sub>), 139 (C<sub>11</sub>), 140.4 (C<sub>4</sub>), 147.9 (C<sub>12</sub>), 151.6 (C<sub>13</sub>), 159.1 (C<sub>5</sub>).

HMRS (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>14</sub>H<sub>9</sub>N<sub>4</sub>OSBr<sub>2</sub>: 440.8843. Found: 440.8851.

IR (cm<sup>-1</sup>): 3217, 2979, 1645, 1512, 1290, 1230.

#### 4,5-dibromo-*N*-(3-(imidazo[1,2-*a*]pyrimidin-3-yl)prop-2-yn-1-yl)furan-2-carboxamide (**128**).



Chemical Formula:  $C_{14}H_8Br_2N_4O_2$   
 Exact Mass: 421,901  
 Molecular Weight: 424,052

Compound **128** was synthesized according to general procedure B using compounds **126** (245 mg, 0.80 mmol) and **79** (150 mg, 0.61 mmol). Purification afforded the title compound as a white amorphous solid (104 mg, 40 %).

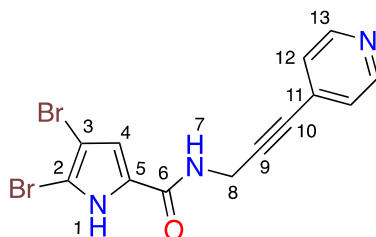
**$^1H$  NMR** (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  4.44 (d,  $J$  = 5.6 Hz, 2H, H7), 7.25 (dd,  $J$  = 4.1, 6.8 Hz, 1H, H14), 7.44 (s, 1H, H3), 8.05 (s, 1H, H11), 8.65 (dd,  $J$  = 2.0, 4.2 Hz, 1H, H13), 8.88 (dd,  $J$  = 2.0, 6.8 Hz, 1H, H15), 9.17 (t,  $J$  = 5.5 Hz, 1H, H6).

**$^{13}C$  NMR** (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  29.2 (C7), 68.8 (C9), 96.6 (C8), 103.4 (C2), 106.3 (C10), 110 (C14), 118.1 (C3), 126.3 (C1), 133.8 (C15), 138.8 (C11), 147.9 (C12), 149 (C4), 151.6 (C13), 155.8 (C6).

**HMRS** (ESI<sup>+</sup>)  $m/z$  Calcd for (M+H)<sup>+</sup>  $C_{14}H_9N_4O_2Br_2$ : 424.9072. Found: 424.9068.

**IR** ( $cm^{-1}$ ): 3214, 3010, 1681, 1513, 1485, 1284, 1192.

#### 4,5-dibromo-N-(3-(pyridin-4-yl)prop-2-yn-1-yl)-1H-pyrrole-2-carboxamide (**130a**).



Chemical Formula:  $C_{13}H_9Br_2N_3O$   
 Exact Mass: 380,911  
 Molecular Weight: 383,043

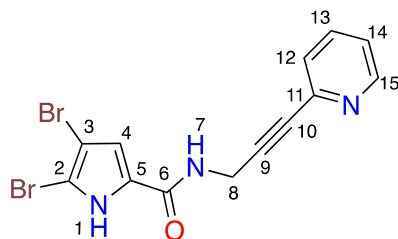
Compound **130a** was synthesized according to general procedure B using compounds **83** (117 mg, 0.38 mmol) and **129a** (106 mg, 0.6 mmol). Purification afforded the title compound as a light yellow amorphous solid (43 mg, 22 %).

**$^1H$  NMR** (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  4.32 (d,  $J$  = 5.7 Hz, 2H, H8), 6.98 (s, 1H, H4), 7.39 (d,  $J$  = 6 Hz, 2H, H12), 8.57 (m, 2H, H13), 8.72 (t,  $J$  = 5.4 Hz, 1H, H7), 12.79 (s, 1H, H1).

**$^{13}C$  NMR** (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  28.6 (C8), 79.2 (C10), 92 (C9), 98 (C3), 105.2 (C2), 113.1 (C4), 125.5 (C12), 127.5 (C5), 130.1 (C11), 149.9 (C13), 158.6 (C6).

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>)  $m/z$  Calcd for (M+H)<sup>+</sup>  $C_{13}H_{10}Br_2N_3O$ : 383.9165. Found 383.9187.

#### 4,5-dibromo-N-(3-(pyridin-2-yl)prop-2-yn-1-yl)-1H-pyrrole-2-carboxamide (**130b**).



Chemical Formula: C<sub>13</sub>H<sub>9</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O  
 Exact Mass: 380,911  
 Molecular Weight: 383,043

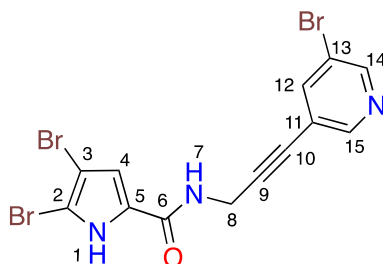
Compound **130b** was synthesized according to general procedure B using compounds **83** (153 mg, 0.5 mmol) and **129b** (123 mg, 0.6 mmol). Purification afforded the title compound as a light yellow amorphous solid (50 mg, 25 %).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 4.31 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H, H8), 6.98 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H, H4), 7.37 (ddd, *J* = 1.2, 4.9, 7.7 Hz, 1H, H14), 7.49 (dt, *J* = 1.1, 7.7 Hz, 1H, H12), 7.79 (td, *J* = 1.9, 7.7 Hz, 1H, H13), 8.54 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H, H15), 8.72 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, H7), 12.79 (s, 1H, H1).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 28.5 (C8), 81.5 (C10), 86.5 (C9), 97.9 (C3), 105.2 (C2), 113.1 (C4), 123.4 (C14), 127 (C12), 127.5 (C5), 136.8 (C13), 142.1 (C11), 150 (C15), 158.6 (C6).

HRMS (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O: 383.9165. Found 383.9167.

#### 4,5-dibromo-*N*-(3-(5-bromopyridin-3-yl)prop-2-yn-1-yl)-1*H*-pyrrole-2-carboxamide (**130c**).



Chemical Formula: C<sub>13</sub>H<sub>8</sub>Br<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O  
 Exact Mass: 458,822  
 Molecular Weight: 461,939

Compound **130c** was synthesized according to general procedure B using compounds **83** (142 mg, 0.46 mmol) and **129c** (110 mg, 0.46 mmol). Purification afforded the title compound as a light yellow amorphous solid (61 mg, 27 %).

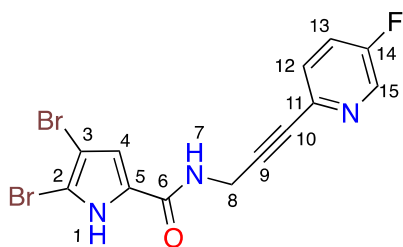
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 4.32 (d, *J* = 5.4 Hz, 2H, H8), 6.97 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H, H4), 8.15 (t, *J* = 1.8 Hz, 1H, H12), 8.60 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, H14), 8.70 (m, 2H, H7 and H15), 12.78 (s, 1H, H1).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 28.6 (C8), 77.1 (C10), 91.9 (C9), 98 (C3), 105.2 (C2), 113.1 (C4), 119.9 (C11), 120.9 (C13), 127.5 (C5), 140.7 (C12), 149.8 (C15), 150.1 (C14), 158.6 (C6).

HRMS (ESI) *m/z* Calcd for (M-H)<sup>-</sup> C<sub>13</sub>H<sub>7</sub>Br<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O: 459.8124. Found 459.8113.

#### 4,5-dibromo-*N*-(3-(5-fluoropyridin-2-yl)prop-2-yn-1-yl)-1*H*-pyrrole-2-carboxamide (**130d**).





Chemical Formula: C<sub>13</sub>H<sub>8</sub>Br<sub>2</sub>FN<sub>3</sub>O

Exact Mass: 398,902

Molecular Weight: 401,033

Compound **130d** was synthesized according to general procedure B using compounds **83** (153 mg, 0.5 mmol) and **129d** (106 mg, 0.6 mmol). Purification afforded the title compound as a light yellow amorphous solid (48 mg, 25 %).

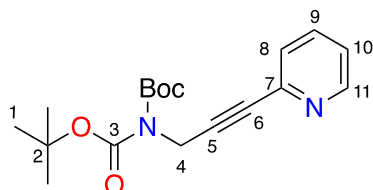
**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 4.30 (d, *J* = 5.4 Hz, 2H, H8), 6.98 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H4), 7.59 (dd, *J* = 4.5, 8.7 Hz, 1H, H12), 7.74 (dt, *J* = 3.0, 9.3 Hz, 1H, H13), 8.56 (m, 1H, H15), 8.71 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H, H7), 12.78 (s, 1H, H1).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 28.4 (C8), 80.5 (C10), 86.4 (C9), 97.9 (C3), 105.2 (C2), 113.1 (C4), 123.9 (*J* = 19.1 Hz, C13), 127.5 (C5), 128.6 (C12), 138.5 (*J* = 24.5 Hz, C15), 156.7 (C14), 158.6 (C6).

Some quaternary carbons are too broad to be seen due to very slow relaxation.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>13</sub>H<sub>9</sub>Br<sub>2</sub>FN<sub>3</sub>O: 401.9070. Found 401.9090.

#### ***Di-tert-butyl (3-(pyridin-2-yl)prop-2-yn-1-yl)carbamate (131b).***



Chemical Formula: C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>

Exact Mass: 332,174

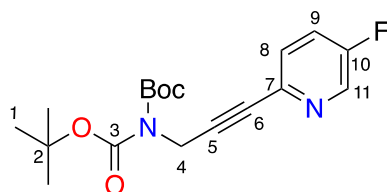
Molecular Weight: 332,400

Compound **131b** was synthesized according to general procedure B using compounds **97** (750 mg, 3 mmol) and **129b** (724 mg, 3.5 mmol) with DIPA (1.23 mL). Purification afforded the title compound as a light yellow amorphous solid (790 mg, 81 %).

**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.54 (s, 18H, H1), 4.63 (s, 2H, H4), 7.24 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, H10), 7.41 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H8), 7.66 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, H9), 8.57 (s, 1H, H11).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 28.2 (C1), 36.6 (C4), 81.9 (C6), 83.2 (C2), 85.6 (C5), 122.9 (C10), 127.2 (C8), 136.1 (C9), 143.2 (C7), 149.9 (C11), 151.6 (C3).

#### ***Di-tert-butyl (3-(5-fluoropyridin-2-yl)prop-2-yn-1-yl)carbamate (131d).***

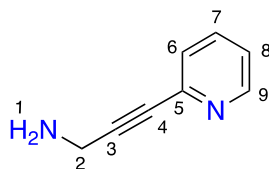


Chemical Formula: C<sub>18</sub>H<sub>23</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>4</sub>  
 Exact Mass: 350,164  
 Molecular Weight: 350,390

Compound **131d** was synthesized according to general procedure B using compounds **97** (400 mg, 1.6 mmol) and **129d** (331 mg, 1.9 mmol) with DIPA (0.66 mL). Purification afforded the title compound as a light yellow amorphous solid (150 mg, 27 %).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.56 (s, 18H, H1), 4.63 (s, 2H, H4), 7.47 – 7.33 (m, 2H, H8-9), 8.43 (s, 1H, H11).

### 3-(pyridin-2-yl)prop-2-yn-1-amine (**132b**).



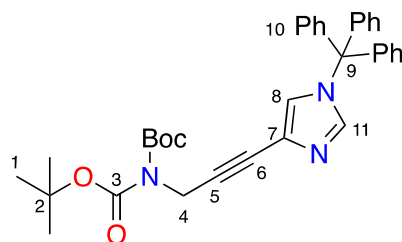
Chemical Formula: C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>  
 Exact Mass: 132,069  
 Molecular Weight: 132,166

Compound **131b** (100 mg, 0.3 mmol) was dissolved in 5 mL of DCM. TFA (0.93 mL, 12 mmol) was added dropwise to the solution under stirring. Reaction mixture was stirred at room temperature under argon during 4 h. Reaction was cooled down to 0°C. Ether (40 mL) was added to the flask, white precipitate fell down. Solution was filtered and the product **132b** was isolated as a white solid (70 mg, 64 %).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, MeOD) δ 4.05 (s, 2H, H2), 7.44 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, H8), 7.58 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H6), 7.86 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, H7), 8.53 (m, 1H, H9).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, MeOD) δ 30.5 (C2), 82.4 (C4), 85.9 (C3), 125.7 (C8), 129.1 (C6), 139 (C7), 150.8 (C9).

### Di-tert-butyl (3-(1*H*-trityl-imidazol-4-yl)prop-2-yn-1-yl)carbamate (**134**).

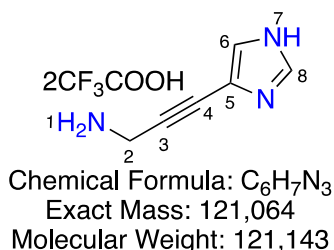


Chemical Formula: C<sub>35</sub>H<sub>37</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>  
 Exact Mass: 563,278  
 Molecular Weight: 563,698

Compound **134** was synthesized according to general procedure B using compounds **97** (500 mg, 2.0 mmol) and **133** (1.03 g, 2.36 mmol) with DIPA (0.82 mL). Purification afforded the title compound **134** as a light yellow amorphous solid (358 mg, 32 %).

$^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.53 (s, 18H, H1), 4.56 (s, 2H, H4), 7.0 (m, 1H, HAr), 7.16-7.10 (m, 6H, HAr), 7.40-7.30 (m, 10H, HAr).

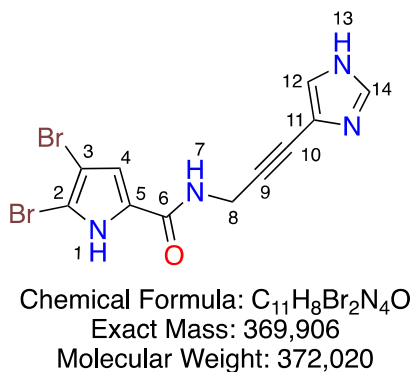
### 3-(1*H*-imidazol-4-yl)prop-2-yn-1-amine (**135**).



Compound **134** (150 mg, 0.27 mmol) was dissolved in 5 mL of DCM. TFA (0.82 mL, 10.6 mmol) was added drop by drop to the solution under stirring. Reaction mixture was stirred at room temperature under argon during 4 h and then cooled down to 0°C. Ether (40 mL) was added to the flask, white precipitate fell down. Solution was filtered and the product was isolated as white solid (56 mg, 60 %).

$^1\text{H NMR}$  (300 MHz, MeOD)  $\delta$  4.05 (s, 2H, H2), 7.70 (s, 1H, H6), 8.57 (s, 1H, H8).

### *N*-(3-(1*H*-imidazol-4-yl)prop-2-yn-1-yl)-4,5-dibromo-1*H*-pyrrole-2-carboxamide (**136**).

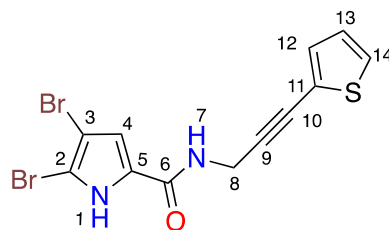


Compounds **81** (36 mg, 0.1 mmol) and **135** (34 mg, 0.1 mmol) were added in the flask. The flask was degassed and filled with argon few times in a Schlenk line. Dry DMF (2.0 mL) was added to the mixture. Reaction mixture was stirred at room temperature under argon for 48 h. Purification by silica gel column chromatography (EtOAc/Heptane: 1/1) afforded **136** as a light yellow amorphous solid (8 mg, 22 %).

$^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  4.22 (s, 2H, H8), 6.96 (s, 1H, H4), 7.38 (s, 1H, H12), 7.63 (s, 1H, H14), 8.67 (s, 1H, H7), 12.32 (s, 1H, H13), 12.73 (s, 1H, H1).

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>)  $m/z$  Calcd for  $(\text{M}+\text{H})^+$   $\text{C}_{11}\text{H}_9\text{Br}_2\text{N}_4\text{O}$ : 372.9117. Found: 372.9105.

### 4,5-dibromo-*N*-(3-(thiophen-2-yl)prop-2-yn-1-yl)-1*H*-pyrrole-2-carboxamide (**140**).



Chemical Formula: C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>2</sub>OS  
 Exact Mass: 385.8724  
 Molecular Weight: 388.0770

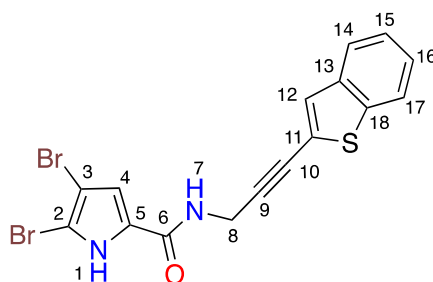
Compound **140** was synthesized according to general procedure B using compounds **83** (200 mg, 0.65 mmol) and **137** (0.1 mL, 0.92 mmol). Purification afforded the title compound as a yellow amorphous solid (92 mg, 36 %).

**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMF-d<sub>7</sub>) δ 4.40 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H, H8), 7.09 (dd, *J* = 3.6, 5.3 Hz, 1H, H13), 7.11 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H, H4), 7.31 (dd, *J* = 1.2, 3.7 Hz, 1H, H12), 7.61 (dd, *J* = 1.2, 5.2 Hz, 1H, H14), 8.76 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, H7), 12.96 (s, 1H, H1).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMF-d<sub>7</sub>) δ 29.2 (C8), 75.3 (C10), 90.8 (C9), 98.6 (C3), 105.3 (C2), 113.4 (C4), 122.6 (C11), 127.7 (C13), 128.3 (C14), 128.5 (C5), 132.7 (C12), 159 (C6).

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>12</sub>H<sub>9</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>2</sub>OS: 390.8761. Found: 390.8794.

***N*-(3-(benzo[*b*]thiophen-2-yl)prop-2-yn-1-yl)-4,5-dibromo-1*H*-pyrrole-2-carboxamide (141).**



Chemical Formula: C<sub>16</sub>H<sub>10</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>2</sub>OS  
 Exact Mass: 435.8881  
 Molecular Weight: 438.1370

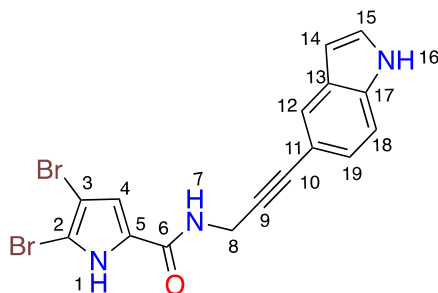
Compound **141** was synthesized according to general procedure B using compounds **83** (100 mg, 0.33 mmol) and **138** (84 mg, 0.39 mmol). Purification afforded the title compound as a yellow amorphous solid (34 mg, 24 %).

**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMF-d<sub>7</sub>) δ 4.46 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H, H8), 7.10 (s, 1H, H4), 7.45 (m, 2H, H15-16), 7.66 (s, 1H, H12), 7.89 (m, 1H, H14), 7.99 (m, 1H, H17), 8.97 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H, H7), 13.09 (br s, 1H, H1).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMF-d<sub>7</sub>) δ 29 (C8), 75.2 (C10), 93 (C9), 98.4 (C3), 105.1 (C2), 113.5 (C4), 122.3 (C17), 122.4 (C11), 124.2 (C14), 125.1 (C15), 125.9 (C16), 128.4 (C5), 129.4 (C12), 139.3 (C13), 139.8 (C18), 159 (C6).

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>2</sub>OS: 436.8959. Found: 436.9008.

***N*-(3-(1*H*-indol-5-yl)prop-2-yn-1-yl)-4,5-dibromo-1*H*-pyrrole-2-carboxamide (142).**



Chemical Formula: C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O  
Exact Mass: 418,9269  
Molecular Weight: 421,0920

Compound **142** was synthesized according to general procedure B using compounds **83** (200 mg, 0.65 mmol) and **139**. Purification afforded the title compound as a beige amorphous solid (25 mg, 10 %).

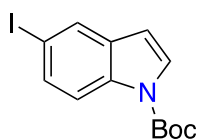
**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 4.28 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H, H8), 6.42 (s, 1H, H14), 7 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H, H4), 7.11 (dd, *J* = 1.4, 8.4 Hz, 1H, H19), 7.37 (m, 1H, H18), 7.39 (m, 1H, H15), 7.64 (s, 1H, H12), 8.66 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H, H7), 11.26 (s, 1H, H16), 12.77 (s, 1H, H1).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 28.7 (C8), 83.7 (C9 and C10), 97.9 (C3), 101.2 (C14), 105 (C2), 111.7 (C18), 112.3 (C11), 113 (C4), 123.7 (C12), 124.3 (C19), 126.5 (C15), 127.5 (C17), 127.7 (C5), 135.5 (C13), 158.5 (C6)

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O: 421.9327. Found: 421.9356.

**IR** (cm<sup>-1</sup>): 3415, 3154, 1639, 1556, 1504, 1236.

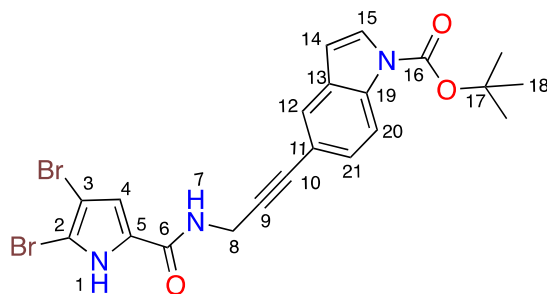
***Tert*-butyl 5-iodo-1*H*-indole-1-carboxylate (144).**



Chemical Formula: C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>INO<sub>2</sub>  
Exact Mass: 343,0069  
Molecular Weight: 343,1645

Prepared according to the literature (86 %).<sup>270</sup>

***Tert*-butyl 5-(3-(4,5-dibromo-1*H*-pyrrole-2-carboxamido)prop-1-yn-1-yl)-1*H*-indole-1-carboxylate (145).**



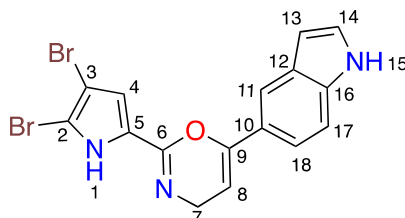
Chemical Formula:  $C_{21}H_{19}Br_2N_3O_3$   
 Exact Mass: 518,979  
 Molecular Weight: 521,209

Compound **145** was synthesized according to general procedure B using compounds **83** (200 mg, 0.65 mmol) and **144** (269 mg, 0.78 mmol). Purification afforded the title compound as a white amorphous solid (141 mg, 41 %).

$^1H$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  1.62 (s, 9H, H18), 4.29 (d,  $J$  = 5.6 Hz, 2H, H8), 6.70 (d,  $J$  = 3.9 Hz, 1H, H14), 6.99 (d,  $J$  = 2.8 Hz, 1H, H4), 7.36 (dd,  $J$  = 1.8, 8.6 Hz, 1H, H21), 7.71 (m, 2H, H12-15), 8.03 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 1H, H20), 8.68 (t,  $J$  = 5.5 Hz, 1H, H7), 12.77 (s, H1).

$^{13}C$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  27.6 (C18), 28.7 (C8), 82.2 (C10), 84.2 (C17), 85.6 (C9), 97.9 (C3), 105.1 (C2), 107.2 (C14), 113 (C4), 114.9 (C20), 116.4 (C11), 124.4 (C12), 127.2 (C15), 127.4 (C5), 127.7 (C21), 130.3 (C13), 134.1 (C19), 148.8 (C16), 158.6 (C6).

### 2-(4,5-dibromo-1H-pyrrol-2-yl)-6-(1H-indol-5-yl)-4H-1,3-oxazine (146).



Chemical Formula:  $C_{16}H_{11}Br_2N_3O$   
 Exact Mass: 418,927  
 Molecular Weight: 421,092

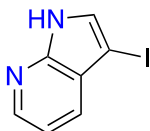
Compound **145** (120 mg, 0.23 mmol) was dissolved in 1 mL of dry DCM under argon atmosphere, TFA (0.17 mL, 10 eq.) was added dropwise. The reaction mixture was stirred at room temperature for 3 h. The reaction was quenched with NaOH 0.1 M and extracted with EtOAc, concentrated under vacuum. The crude was triturated with ether and purified by silica gel flash chromatography (elution by gradient from 100 to 95/5 DCM/MeOH) to afford the deprotected compound **146** as a beige amorphous solid (84 mg, 87 %).

$^1H$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  4.18 (d,  $J$  = 2.9 Hz, 2H, H7), 5.64 (t,  $J$  = 2.9 Hz, 1H, H8), 6.54 (t,  $J$  = 2.2 Hz, 1H, H13), 6.93 (s, 1H, H4), 7.38 (t,  $J$  = 2.5 Hz, 1H, H14), 7.43 (m, 2H, H11-17), 7.93 (m, 1H, H18), 11.2 (s, 1H, H15), 12.71 (br s, 1H, H1).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 42 (C7), 94.8 (C8), 98.2 (C3), 101.9 (C13), 105.4 (C2), 111.5 (C17), 113.4 (C4), 115.9 (C18), 117.4 (C11), 123.1 (C10), 126.2 (C5, C14), 127.5 (C12), 136.1 (C16), 146.7 (C6), 147.9 (C9).

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O: 421.9327. Found: 421.9318.

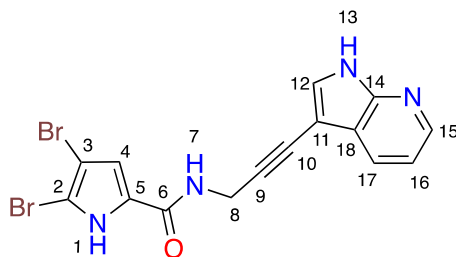
### 3-iodo-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine (**155**).



Chemical Formula: C<sub>7</sub>H<sub>5</sub>IN<sub>2</sub>  
Exact Mass: 243,950  
Molecular Weight: 244,035

Prepared according to the literature from **154** (1.71 g, 83 %).<sup>276</sup>

### *N*-(3-(1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-3-yl)prop-2-yn-1-yl)-4,5-dibromo-1*H*-pyrrole-2-carboxamide (**156**).



Chemical Formula: C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O  
Exact Mass: 419,922  
Molecular Weight: 422,080

Compound **156** was synthesized according to general procedure B using compounds **83** (200 mg, 0.65 mmol) and **159** (301 mg, 0.78 mmol). Purification afforded the intermediate **160** as a brown amorphous solid (221 mg, 60 %). Compound **160** (125 mg, 0.22 mmol, 1.2 eq.) was dissolved in 2 mL of dry THF. A solution of TBAF (187 mg, 0.67 mmol, 3eq.) in 0.7 mL of dry THF was added to the mixture. It was stirred at room temperature for 3 h and then at 50°C for 2 h until completion of reaction. The solvent was removed under vacuum. The crude was purified by silica gel flash chromatography (elution by gradient from 100 to 90/10 DCM/MeOH) to afford the deprotected compound **156** as a beige amorphous solid (57 mg, 61 %).

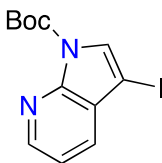
**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 4.33 (d, *J* = 5.4 Hz, 2H, H8), 7.0 (s, 1H, H4), 7.16 (dd, *J* = 4.5, 7.9 Hz, 1H, H16), 7.78 (s, 1H, H12), 7.94 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H17), 8.28 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H, H15), 8.66 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, H7), 12.0 (s, 1H, H13), 12.76 (s, 1H, H1).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 29 (C8), 75.4 (C10), 87.5 (C11), 94.7 (C9), 97.9 (C3), 105 (C2), 112.9 (C4), 116.3 (C16), 120.3 (C18), 127.8 (C5), 127 (C17), 130.1 (C12), 143.8 (C15), 147.6 (C14), 158.5 (C6).

**HMRS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>N<sub>4</sub>OBr<sub>2</sub>: 422.9279. Found: 422.9273.

**IR** (cm<sup>-1</sup>): 3200, 1618, 1517, 1410, 1293, 1214.

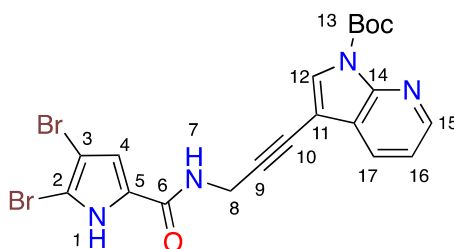
***Tert*-butyl 3-iodo-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-1-carboxylate (157).**



Chemical Formula: C<sub>12</sub>H<sub>13</sub>IN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
Exact Mass: 344,002  
Molecular Weight: 344,152

Prepared according to the literature from **155** (415 mg, 98 %).<sup>277</sup>

***Tert*-butyl-3-(3-(4,5-dibromo-1*H*-pyrrole-2-carboxamido)prop-1-yn-1-yl)-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-1-carboxylate (158).**

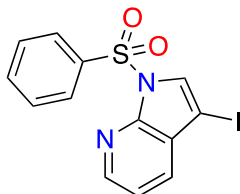


Chemical Formula: C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>  
Exact Mass: 519,975  
Molecular Weight: 522,197

Compound **158** was synthesized according to general procedure B using compounds **83** (148 mg, 0.48 mmol, 1 eq.) and **157** (166 mg, 0.48 mmol, 1 eq.). Purification afforded the title compound as a brown amorphous solid (348 mg, > 100 %) with Et<sub>3</sub>NH<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.6 (s, 9H, H13), 4.35 (d, *J* = 4.9 Hz, 2H, H8), 7.0 (s, 1H, H4), 7.38 (m, 1H, H16), 8.01 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H, H17), 8.04 (s, 1H, H12), 8.47 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H, H15), 8.72 (t, *J* = 4.9 Hz, 1H, H7), 12.8 (s, 1H, H1).

**3-iodo-1-(phenylsulfonyl)-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine (159).**

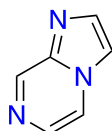


Chemical Formula: C<sub>13</sub>H<sub>9</sub>IN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S  
Exact Mass: 383,943  
Molecular Weight: 384,191

Prepared according to the literature from compound **155**.<sup>276</sup>

**Imidazo[1,2-*a*]pyrazine (166).**

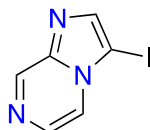




Chemical Formula:  $C_6H_5N_3$   
Exact Mass: 119,048  
Molecular Weight: 119,127

Prepared according to the literature from compound **165** (0.75 g, quant.).<sup>287</sup>

**3-iodoimidazo[1,2-*a*]pyrazine (167).**



Chemical Formula:  $C_6H_4IN_3$   
Exact Mass: 244,945  
Molecular Weight: 245,023

Prepared according to the literature from compound **166** (87 mg, 42 %).<sup>288</sup>

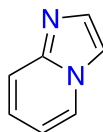
**3-iodoimidazo[1,2-*b*]pyridazine (169).**



Chemical Formula:  $C_6H_4IN_3$   
Exact Mass: 244,945  
Molecular Weight: 245,023

Prepared according to the literature from compound **168** (4.92 g, 64 %).<sup>289</sup>

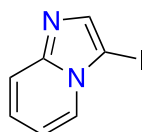
**Imidazo[1,2-*a*]pyridine (171).**



Chemical Formula:  $C_7H_6N_2$   
Exact Mass: 118,053  
Molecular Weight: 118,139

Prepared according to the literature from compound **170** (1.79 g, quant.).<sup>290</sup>

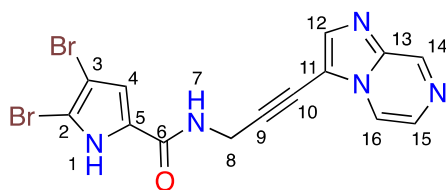
**3-iodoimidazo[1,2-*a*]pyridine (172).**



Chemical Formula:  $C_6H_4IN_3$   
Exact Mass: 244,945  
Molecular Weight: 245,023

Prepared according to the literature from compound **171**.<sup>288,290</sup>

#### 4,5-dibromo-*N*-(3-(imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3-yl)prop-2-yn-1-yl)-1*H*-pyrrole-2-carboxamide (**161**)



Chemical Formula: C<sub>14</sub>H<sub>9</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O  
Exact Mass: 420,9174  
Molecular Weight: 423,0680

Compound **161** was synthesized according to general procedure B using compounds **83** (125 mg, 0.41 mmol) and **167** (100 mg, 0.41 mmol). Purification afforded the title compound as a yellow amorphous solid (46 mg, 27 %).

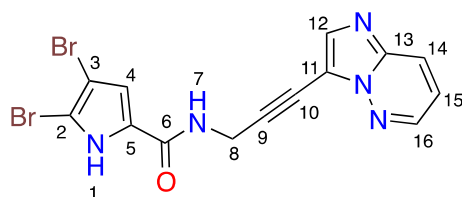
**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 4.45 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H, H8), 6.99 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H4), 8.08 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H, H15), 8.10 (s, 1H, H12), 8.51 (dd, *J* = 1.3, 4.5 Hz, 1H, H16), 8.79 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H, H7), 9.16 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H, H14), 12.83 (s, 1H, H1).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 29.2 (C8), 68.1 (C10), 98 (C3), 98.4 (C9), 105.3 (C2), 108.9 (C11), 113.1 (C4), 118.6 (C16), 127.5 (C5), 130.5 (C12), 138.9 (C15), 140 (C13), 143.2 (C14), 158.8 (C6).

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>N<sub>5</sub>OBr<sub>2</sub>: 425.9211. Found: 425.9236.

**IR** (cm<sup>-1</sup>): 3280, 2922, 1657, 1513, 1412, 1311, 1221.

#### 4,5-dibromo-*N*-(3-(imidazo[1,2-*b*]pyridazin-3-yl)prop-2-yn-1-yl)-1*H*-pyrrole-2-carboxamide (**163**)



Chemical Formula: C<sub>14</sub>H<sub>9</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O  
Exact Mass: 420,9174  
Molecular Weight: 423,0680

Compound **163** was synthesized according to general procedure B using compounds **83** (192 mg, 0.78 mmol) and **169** (200 mg, 0.65 mmol). Purification afforded the title compound as a yellow amorphous solid (24 mg, 9 %).

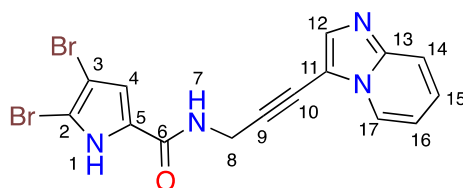
**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 4.43 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H, H8), 6.99 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H, H4), 7.34 (dd, *J* = 4.6, 9 Hz, 1H, H15), 8.07 (s, 1H, H12), 8.2 (dd, *J* = 1.5, 9.2 Hz, 1H, H14), 8.63 (dd, *J* = 1.5, 4.6 Hz, 1H, H16), 8.78 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, H7), 12.8 (s, 1H, H1).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 28.9 (C8), 69.1 (C10), 96.5 (C9), 98 (C3), 105.2 (C2), 111.6 (C11), 113.1 (C4), 118.8 (C15), 126 (C14), 127.6 (C5), 138 (C12), 139 (C13), 144.7 (C16), 158.6 (C6).

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>)  $m/z$  Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>N<sub>5</sub>OBr<sub>2</sub>: 425.9211. Found: 425.9229.

**IR** (cm<sup>-1</sup>): 3141, 3119, 1659, 1562, 1523, 1293, 1240.

**4,5-dibromo-*N*-(3-(imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)prop-2-yn-1-yl)-1*H*-pyrrole-2-carboxamide (164)**



Chemical Formula: C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O  
Exact Mass: 419,922  
Molecular Weight: 422,080

Compound **164** was synthesized according to general procedure B using compounds **83** (282 mg, 0.92 mmol) and **172** (150 mg, 0.62 mmol). Purification afforded the title compound as a beige amorphous solid (120 mg, 46 %).

**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 4.45 (d,  $J$  = 5.4 Hz, 2H, H8), 6.99 (d,  $J$  = 1.9 Hz, 1H, H4), 7.11 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 1H, H15), 7.39 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 1H, H16), 7.68 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 1H, H17), 7.9 (s, 1H, H12), 8.46 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 1H, H14), 8.75 (t,  $J$  = 5.2 Hz, 1H, H7), 12.8 (s, 1H, H1).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 69.4 (C10), 97.2 (C9), 97.9 (C3), 105.5 (C2), 113.1 (C4), 113.6 (C15), 117.4 (C17), 125.2 (C14), 126.2 (C16), 127.6 (C5), 137.7 (C12), 158.7 (C6).

**HMRS** (ESI<sup>+</sup>)  $m/z$  Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>N<sub>4</sub>OBr<sub>2</sub>: 422.9279. Found: 422.9325.

**IR** (cm<sup>-1</sup>): 3137, 3116, 1646, 1565, 1402, 1243.

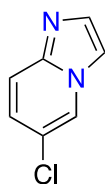
**5-bromoimidazo[1,2-*a*]pyridine (177a).**



Chemical Formula: C<sub>7</sub>H<sub>5</sub>BrN<sub>2</sub>  
Exact Mass: 195,9636  
Molecular Weight: 197,0350

Prepared according to the literature from compound **176a** (2 g, 88 %).<sup>294</sup>

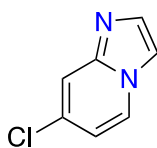
**6-chloroimidazo[1,2-*a*]pyridine (177b).**



Chemical Formula: C<sub>7</sub>H<sub>5</sub>ClN<sub>2</sub>  
Exact Mass: 152,014  
Molecular Weight: 152,581

Prepared according to the literature from compound **176b** (2.38 g, quant.).<sup>296</sup>

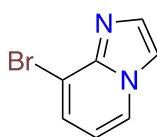
**7-chloroimidazo[1,2-*a*]pyridine (177c).**



Chemical Formula: C<sub>7</sub>H<sub>5</sub>ClN<sub>2</sub>  
Exact Mass: 152,014  
Molecular Weight: 152,581

Prepared according to the literature from compound **176c** (2 g, 88 %).<sup>298</sup>

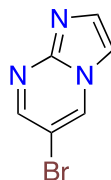
**8-bromoimidazo[1,2-*a*]pyridine (177d).**



Chemical Formula: C<sub>7</sub>H<sub>5</sub>BrN<sub>2</sub>  
Exact Mass: 195,964  
Molecular Weight: 197,035

Prepared according to the literature from compound **176d** (2.31 g, quant.).<sup>295</sup>

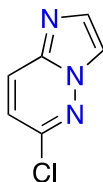
**6-bromoimidazo[1,2-*a*]pyrimidine (177e).**



Chemical Formula: C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>BrN<sub>3</sub>  
Exact Mass: 196,959  
Molecular Weight: 198,023

Prepared according to the literature from compound **176e** (3.25 g, 95 %).<sup>297</sup>

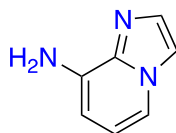
**6-chloroimidazo[1,2-*b*]pyridazine (177f).**



Chemical Formula: C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>ClN<sub>3</sub>  
Exact Mass: 153,0094  
Molecular Weight: 153,5690

Prepared according to the literature from compound **176f** (3.47 g, 98 %).<sup>285</sup>

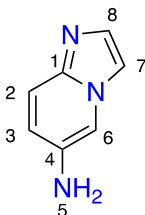
### Imidazo[1,2-*a*]pyridin-8-amine (183).



Chemical Formula: C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>N<sub>3</sub>  
Exact Mass: 133,064  
Molecular Weight: 133,154

Prepared according to the literature from compound **180** (2.38 g, 65 %).<sup>301,308</sup>

### Imidazo[1,2-*a*]pyridin-6-amine (184).



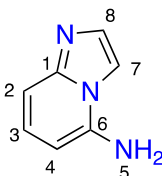
Chemical Formula: C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>N<sub>3</sub>  
Exact Mass: 133,064  
Molecular Weight: 133,154

Compound **199** (228 mg, 1.4 mmol, 1eq.) was dissolved in 5mL of EtOH and 2mL of HCl concentrated under argon. SnCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (1.26 g, 5.58 mmol, 4eq.) was added to the reaction mixture. It was refluxed 22 h. The solvent was removed under vacuum, basified to get a pH around 8, concentrated again and purified by silica gel column chromatography (elution gradient from 100 to 90/10 DCM/MeOH) to afford **184** as a green amorphous solid (146 mg, 78 %).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3.52 (s, 2H, H5), 6.78 (dd, *J* = 1.8, 9.5 Hz, 1H, H3), 7.40 (s, 1H, H8 or 7), 7.43 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H, H2), 7.52 (s, 1H, H8 or 7), 7.57 (s, 1H, H6).

HRMS (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>N<sub>3</sub>: 134.0718. Found: 134.0703.

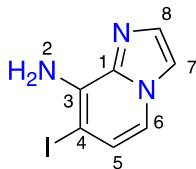
### Imidazo[1,2-*a*]pyridin-5-amine (185).



Chemical Formula: C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>N<sub>3</sub>  
Exact Mass: 133,064  
Molecular Weight: 133,154

Prepared according to the literature from compound **182** (3.63 g, 60 %).<sup>310</sup>

### 7-iodoimidazo[1,2-*a*]pyridin-8-amine (187).

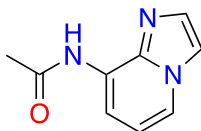


Chemical Formula: C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>IN<sub>3</sub>  
 Exact Mass: 258,961  
 Molecular Weight: 259,050

Compound **183** (30 mg, 0.23 mmol, 1eq.) was dissolved in 0.5 mL of pyridine with I<sub>2</sub> (63 mg, 0.25 mmol, 1.1 eq.). The mixture was stirred 2h30 at room temperature. The reaction was quenched with a solution of Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and extracted with DCM. The organic phase was concentrated and purified by silica gel flash chromatography (elution by gradient from 100 to 95/5 DCM/MeOH) to afford the compound **187**.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5.03 (br s, 2H, H2), 6.92 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H, H6), 7.40 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H, H5), 7.46 (s, 1H, H7), 7.49 (s, 1H, H8).

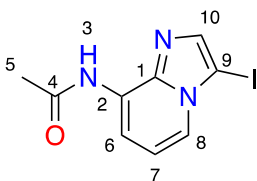
#### ***N*-(imidazo[1,2-*a*]pyridin-8-yl)acetamide (188).**



Chemical Formula: C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>O  
 Exact Mass: 175,075  
 Molecular Weight: 175,191

Prepared according to the literature from compound **183** (62 mg, 95 %).<sup>309</sup>

#### ***N*-(3-iodoimidazo[1,2-*a*]pyridin-8-yl)acetamide (189).**



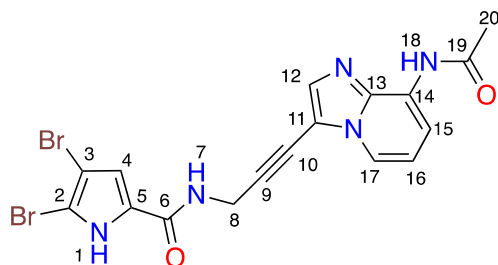
Chemical Formula: C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>IN<sub>3</sub>O  
 Exact Mass: 300,971  
 Molecular Weight: 301,087

Compound **188** (300mg, 1.71 mmol, 1eq.) was dissolved in 6 ml of MeCN under argon. NIS (385mg, 1.71 mmol, 1eq.) was added, leading to the mixture precipitation. The reaction was stirred 2 h at room temperature. The reaction was quenched with water and extracted with DCM, washed with an aqueous solution of Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated. The compound was purified by silica gel flash column chromatography (elution gradient from 100 to 99/1 DCM/MeOH) to afford **189** as a white amorphous solid (421 mg, 82 %) with 11 % of residual NIS.

**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 2.29 (s, 3H, H5), 6.93 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H, H7), 7.59 (s, 1H, H10), 7.83 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H, H8), 8.22 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, H6), 8.70 (s, 1H, H3).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 24.8 (C5), 62.2 (C9), 111.3 (C6), 114.3 (C7), 120.6 (C8), 127.4 (C2), 138.3 (C10), 141.1 (C1), 169.5 (C4).

***N*-(3-(8-acetamidoimidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)prop-2-yn-1-yl)-4,5-dibromo-1*H*-pyrrole-2-carboxamide (190).**



Chemical Formula: C<sub>17</sub>H<sub>13</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>  
Exact Mass: 476,944  
Molecular Weight: 479,132

Compound **190** was synthesized according to general procedure B using compounds **83** (264 mg, 0.86 mmol) and **189** (200mg, 0.66 mmol). Purification afforded the title compound as a beige amorphous solid (110 mg, 35 %).

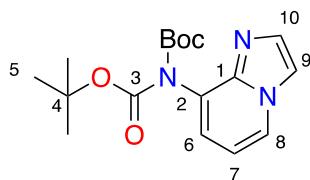
**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 2.21 (s, 3H, H20), 4.44 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H, H8), 6.99 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H, H4), 7.06 (t, *J* = 7 Hz, 1H, H16), 7.87 (s, 1H, H12), 8.09 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, H15), 8.16 (dd, *J* = 1.0, 7.0 Hz, 1H, H17), 8.75 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, H7), 10.1 (s, 1H, H18), 12.81 (s, 1H, H1)

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 24 (C20), 29.2 (C8), 69.3 (C10), 97.2 (C9), 98 (C3), 105.2 (C2), 108.7 (C11), 112.5 (C15), 113.1 (C4), 113.9 (C16), 119.6 (C17), 127.6 (C5), 127.9 (C14), 136.1 (C12), 138.8 (C13), 158.7 (C6), 169.9 (C19).

**HMRS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>Br<sub>2</sub>: 479.9494. Found: 479.9506.

**IR** (cm<sup>-1</sup>): 3115, 1636, 1552, 1522, 1412, 1276, 1222.

***Di-tert*-butyl imidazo[1,2-*a*]pyridin-8-ylcarbamate (191).**



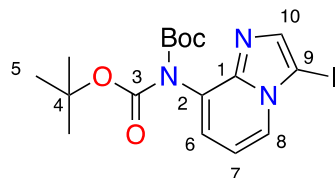
Chemical Formula: C<sub>17</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>  
Exact Mass: 333,169  
Molecular Weight: 333,388

Compound **183** (200 mg, 1.5 mmol) was dissolved in 2mL of DCM. Boc<sub>2</sub>O (983 mg, 4.5 mmol) and DMAP (19 mg, 0.16mmol) were then added. The reaction mixture was stirred at room temperature 48 h under argon. The solvent was removed under vacuum, extracted with EtOAc, washed with water, brine and dried over MgSO<sub>4</sub>. It was concentrated and purified by chromatography on silica gel to afford the expected compound **191** as a green amorphous solid (336 mg, 67 %).

**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.41 (s, 18H, H5), 6.78 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H, H7), 7.05 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H, H8), 7.59 (s, 1H, H9 or 10), 7.63 (s, 1H, H9 or 10), 8.09 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H, H6).

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: 334.1767. Found: 334.1774.

***Di-tert-butyl (3-iodoimidazo[1,2-*a*]pyridin-8-yl)carbamate (192).***



Chemical Formula: C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>IN<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

Exact Mass: 459,065

Molecular Weight: 459,284

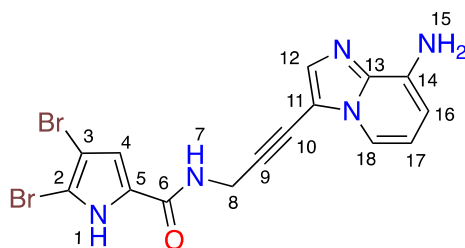
Compound **191** (327 mg, 0.98 mmol, 1eq.) was dissolved in 2 ml of ACN under argon. NIS (288 mg, 1.3 mmol, 1.3 eq.) was added. The reaction was stirred 24 h at rt. The reaction was quenched with water and extracted with DCM, washed with an aqueous solution of Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated. The compound was purified by silica gel flash column chromatography (elution gradient from 100 to 99/1 DCM/MeOH) to afford **192** as a white amorphous solid (391 mg, 88 %).

**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.42 (s, 18H, H5), 6.96 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H, H7), 7.16 (dd, *J* = 1.0, 7.1 Hz, 1H, H6), 7.70 (s, 1H, H10), 8.11 (dd, *J* = 1.0, 7.1 Hz, 1H, H8).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 28 (C5), 61.4 (C9), 83.5 (C4), 112.7 (C7), 124.2 (C6), 125.7 (C8), 128.9 (C2), 140 (C10), 145 (C1), 151.3 (C3).

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>17</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>I: 460.0733. Found: 460.0729.

***N*-(3-(8-aminoimidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)prop-2-yn-1-yl)-4,5-dibromo-1*H*-pyrrole-2-carboxamide (194).**



Chemical Formula: C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O

Exact Mass: 434,933

Molecular Weight: 437,095

Compound **194** was synthesized according to general procedure B using compounds **83** (466 mg, 1.52 mmol) and **192** (350 mg, 0.76 mmol). Purification afforded the intermediate **193** as a brown amorphous solid (321 mg, 66 %). Then **193** (320 mg, 0.5 mmol, 1eq.) was dissolved in 2.5 mL of dry DCM under argon at 0°C. TFA (0.37 mL, 5mmol, 10 eq.) was added dropwise to the reaction mixture. After 2 h of reaction, 10 eq. of TFA (0.37 mL) were added to the mixture at -5°C. The



reaction mixture was stirred at -5°C during 2 h and then additional 2 h at room temperature. The mixture was quenched with an aqueous solution of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and extracted with DCM. Collected organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under vacuum. Flash chromatographic purification (elution by gradient from 100 to 95/5 DCM/MeOH) afforded compound **194** as a beige amorphous solid (153 mg, 70 %).

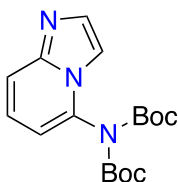
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 4.42 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H, H8), 5.79 (s, 2H, H15), 6.37 (dd, *J* = 1.0, 7.5 Hz, 1H, H16), 6.83 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H, H17), 6.99 (s, 1H, H4), 7.7 (m, 2H, H12-18), 8.74 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H, H7), 12.8 (s, 1H, H1).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 29.2 (C8), 70.1 (C10), 96.5 (C9), 98 (C3), 101.9 (C16), 105.2 (C2), 108 (C11), 112.7 (C18), 113.1 (C4), 114.9 (C17), 127.6 (C5), 135.6 (C12), 137.6 (C14), 138.9 (C13), 158.7 (C6).

HMRS (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>N<sub>5</sub>OBr<sub>2</sub>: 437.9388. Found: 437.9375.

IR (cm<sup>-1</sup>): 3376, 3133, 1645, 1557, 1402, 1240.

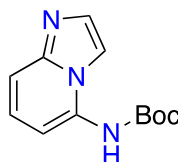
#### ***Di-tert-butyl imidazo[1,2-*a*]pyridin-5-ylcarbamate (195).***



Chemical Formula: C<sub>17</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>  
Exact Mass: 333,169  
Molecular Weight: 333,388

Prepared according to literature from amine **185** (quant.).<sup>311</sup>

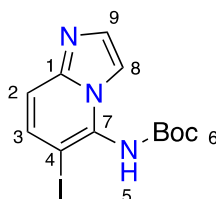
#### ***Tert-butyl imidazo[1,2-*a*]pyridin-5-ylcarbamate (197).***



Chemical Formula: C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>  
Exact Mass: 233,116  
Molecular Weight: 233,271

Prepared according to literature from compounds **195** (1.74 g, quant.).<sup>311</sup>

#### ***Tert-butyl (6-iodoimidazo[1,2-*a*]pyridin-5-yl)carbamate (198).***



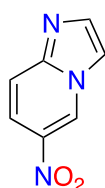
Chemical Formula: C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>IN<sub>3</sub>O<sub>2</sub>  
Exact Mass: 359,013  
Molecular Weight: 359,167

Compound **197** (200 mg, 0.86 mmol, 1 eq.) was dissolved in 2 mL of DMF under argon at room temperature. NIS (213 mg, 0.94 mmol, 1.1 eq.) was added to the mixture, and it was stirred 22 h. The solvent was removed under vacuum, and quenched with Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. It was extracted with EtOAc, then the organic phase was washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, concentrated and purified by silica gel column chromatography (elution gradient from 100 to 98/2 DCM/MeOH) to afford **198** as a brown amorphous solid (276 mg, 90 %).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 1.50 (s, 9H, H<sub>6</sub>), 6.82 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 7.62 (s, 1H, H<sub>9</sub>), 7.76 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H<sub>3</sub>), 8.09 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 9.97 (s, 1H, H<sub>5</sub>).

HRMS (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>I: 360.0209. Found: 360.0219.

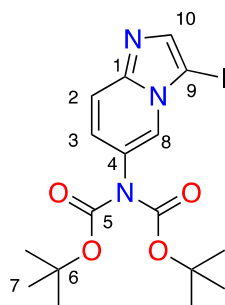
### 6- Nitroimidazo[1,2-*a*]pyridine (**199**).



Chemical Formula: C<sub>7</sub>H<sub>5</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>  
Exact Mass: 163,038  
Molecular Weight: 163,136

Prepared according to the literature (547 mg, 93 %).<sup>301</sup>

### Di-*tert*-butyl (3-iodoimidazo[1,2-*a*]pyridin-6-yl)carbamate (**201**).



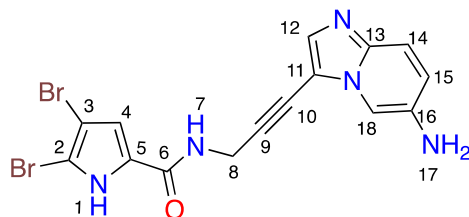
Chemical Formula: C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>IN<sub>3</sub>O<sub>4</sub>  
Exact Mass: 459,065  
Molecular Weight: 459,284

Compound **184** (245 mg, 1.84mmol, 1eq.) was dissolved in 2 mL of MeCN and Et<sub>3</sub>N (0.8 mL, 5.52 mmol, 3 eq.). Boc<sub>2</sub>O (1.3 mL, 5.52 mmol, 3eq.) was added to the mixture and stirred at room temperature for two days. The solvent was removed under vacuum and the crude residue was purified by silica gel column chromatography (elution gradient from 100 to 95/5 DCM/MeOH) to afford **200** as a brown solid (257 mg, 42 %). Intermediate **200** was subjected to the iodination with NIS (174 mg, 0.77 mmol, 1eq.) in 1 mL of ACN during 24 h. The mixture was concentrated and purified by silica gel column chromatography (elution gradient from 100 to 95/5 DCM/MeOH) to afford **201** as a yellow oil (383 mg, quant.).

**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.47 (s, 18H), 7.12 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H), 7.63 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H), 7.75 (s, 1H), 8.07 (s, 1H).

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>17</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>I: 460.0733. Found: 460.0746.

***N*-(3-(6-aminoimidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)prop-2-yn-1-yl)-4,5-dibromo-1*H*-pyrrole-2-carboxamide (**202**).**



Chemical Formula: C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O

Exact Mass: 434,933

Molecular Weight: 437,095

Compound **202** was synthesized according to general procedure B using compounds **83** and **201** (358 mg, 0.78 mmol). The protected intermediate was directly engaged in a TFA (1 mL) deprotection in DCM at 0°C then at room temperature. After 24 h of reaction, the reaction mixture was quenched with Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and concentrated under vacuum. The crude product was purified by silica gel flash chromatography (elution by gradient from 100 to 95/5 DCM/MeOH) to afford **202** as a brown amorphous solid (38 mg, 11 % over two steps).

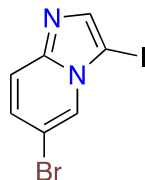
**<sup>1</sup>H NMR** (500MHz, -d7) δ 4.53 (s, 2H, H8), 5.26 (s, 2H, H17), 7.10 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H, H15), 7.14 (s, 1H, H4), 7.44 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H, H14), 7.66 (s, 1H, H12), 7.86 (s, 1H, H18), 8.81 (t, *J* = 4.6 Hz, 1H, H7), 12.95 (s, 1H, H1).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMF-*d*7) δ 29.8 (C8), 70.8 (C10), 96.7 (C9), 98.7 (C3), 105.3 (C2), 106.6 (C18-C11), 113.6 (C4), 117.4 (C14), 21.6 (C15), 128.7 (C5), 137 (C12), 138.2 (C16), 142.2 (C13), 159.2 (C6).

**HMRS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>N<sub>5</sub>OBr<sub>2</sub>: 437.9388. Found: 437.9388.

**IR** (cm<sup>-1</sup>): 3149, 2920, 2849, 1628, 1565, 1521, 1500, 1414, 1203.

**6-bromo-3-iodoimidazo[1,2-*a*]pyridine (**205a**).**



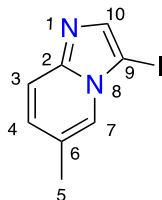
Chemical Formula: C<sub>7</sub>H<sub>4</sub>BrIN<sub>2</sub>

Exact Mass: 321,860

Molecular Weight: 322,931

Prepared according to the literature from compounds **203a** and **204a** (770 mg, 73 % over two steps).<sup>314, 315</sup>

**3-iodo-6-methylimidazo[1,2-*a*]pyridine (**205b**).**



Chemical Formula: C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>IN<sub>2</sub>  
 Exact Mass: 257,965  
 Molecular Weight: 258,062

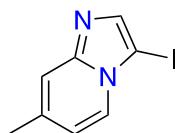
Prepared according to the procedure used for **205c** from compounds **203b** and **204b** (1.89 g, 79 % over two steps).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ : 2.35 (s, 3H, H<sub>5</sub>), 7.16 (dd, *J* = 1.8, 9.3 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 7.50 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H, H<sub>3</sub>), 7.64 (s, 1H, H<sub>10</sub>), 8.1 (m, 1H, H<sub>7</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 17.5 (C<sub>5</sub>), 63.8 (C<sub>9</sub>), 116.5 (C<sub>3</sub>), 122.9 (C<sub>6</sub>), 123.8 (C<sub>7</sub>), 128 (C<sub>4</sub>), 139.5 (C<sub>10</sub>), 145.9 (C<sub>2</sub>).

HRMS (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>I: 258.9732. Found: 258.9723.

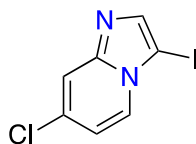
### 3-iodo-7-methylimidazo[1,2-*a*]pyridine (205c).



Chemical Formula: C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>IN<sub>2</sub>  
 Exact Mass: 257,965  
 Molecular Weight: 258,062

Prepared according to the literature from compounds **203c** and **204c** (2.13 g, 89 % over two steps).<sup>316, 317</sup>

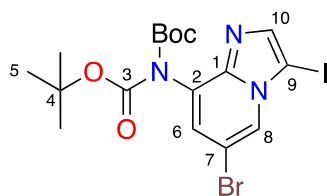
### 7-chloro-3-iodoimidazo[1,2-*a*]pyridine (205d).



Chemical Formula: C<sub>7</sub>H<sub>4</sub>ClIN<sub>2</sub>  
 Exact Mass: 277,911  
 Molecular Weight: 278,477

Prepared according to the literature from compound **177c** (902 mg, 94 %).<sup>298, 298</sup>

### *Di-tert*-butyl (6-bromo-3-iodoimidazo[1,2-*a*]pyridin-8-yl)carbamate (205e).



Chemical Formula: C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>BrIN<sub>3</sub>O<sub>4</sub>  
 Exact Mass: 536,976  
 Molecular Weight: 538,180

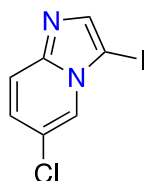
Compound **204a** was synthesized according to the literature method from compound **203e** and Boc protection with Boc<sub>2</sub>O (1.54 g, 7.07 mmol, 3eq.) and DMAP (58 mg, 0.47 mmol, 0.2 eq.) in 10 mL of DCM overnight at room temperature (375 mg, 33 % over two steps).<sup>312</sup> **204e** (180 mg, 0.44 mmol, 1eq.) was dissolved in 2 mL of MeCN and NIS (98 mg, 0.44 mmol, 1 eq.) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature overnight. The solvent was removed under vacuum and dissolved in DCM. The organic phase was washed with NaHCO<sub>3</sub> (aq), dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated. The crude was purified by silica gel chromatography (elution gradient from 100 to 98/2 DCM/MeOH) to afford **205e** as a grey amorphous solid (229 mg, 97 %).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.44 (s, 18H, H5), 7.26 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, H6), 7.69 (s, 1H, H10), 8.25 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, H8).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 28 (C5), 61.8 (C9), 84 (C4), 106.9 (C7), 125.9 (C8), 129 (C2), 127.9 (C6), 140.6 (C10), 143.8 (C1), 150.9 (C3).

HMRS (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>BrN<sub>3</sub>O<sub>4</sub>I: 537.9838. Found: 537.9816.

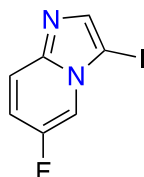
#### 6-chloro-3-iodoimidazo[1,2-*a*]pyridine (205f).



Chemical Formula: C<sub>7</sub>H<sub>4</sub>ClIN<sub>2</sub>  
 Exact Mass: 277,911  
 Molecular Weight: 278,477

Prepared according to the literature from compound **177b** (1.19 g, 87 %).<sup>296</sup>

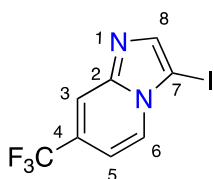
#### 6-fluoro-3-iodoimidazo[1,2-*a*]pyridine (205g).



Chemical Formula: C<sub>7</sub>H<sub>4</sub>FIN<sub>2</sub>  
 Exact Mass: 261,940  
 Molecular Weight: 262,026

Prepared according to the literature from compounds **203g** and **204g** (131 mg, 61 % over two steps).<sup>317</sup>

### 3-iodo-7-(trifluoromethyl)imidazo[1,2-*a*]pyridine (205h).

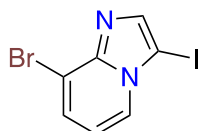


Chemical Formula: C<sub>8</sub>H<sub>4</sub>F<sub>3</sub>IN<sub>2</sub>  
Exact Mass: 311,937  
Molecular Weight: 312,034

The intermediate **204h** was prepared according to the literature from compound **203h**.<sup>318</sup> Compound **204h** (423 mg, 2.28mmol, 1eq.) was dissolved in 3 mL of ACN and NIS (511 mg, 2.28 mmol, 1eq.) was added. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. The reaction was quenched with NaOH 10 %, extracted with DCM and washed with 5 % Na<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (aq). It was dried over MgSO<sub>4</sub> and rotary evaporated. The crude product was purified with silica gel column chromatography (100% DCM) to afford a white amorphous solid (461 mg, 60 % over two steps).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.14 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, H5), 7.88 (s, 1H, H8), 7.96 (s, 1H, H3), 8.29 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, H6).

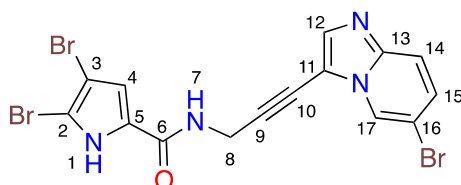
### 8-bromo-3-iodoimidazo[1,2-*a*]pyridine (205i).



Chemical Formula: C<sub>7</sub>H<sub>4</sub>BrIN<sub>2</sub>  
Exact Mass: 321,860  
Molecular Weight: 322,931

Prepared according to the literature from compounds **176d** and **177d** (695 mg, 97 % over two steps).<sup>295</sup>

### 4,5-dibromo-*N*-(3-(6-bromoimidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)prop-2-yn-1-yl)-1*H*-pyrrole-2-carboxamide (206).



Chemical Formula: C<sub>15</sub>H<sub>9</sub>Br<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O  
Exact Mass: 497,833  
Molecular Weight: 500,976

Compound **206** was synthesized according to general procedure B using compounds **83** (549 mg, 1.79 mmol) and **205a** (386 mg, 1.2 mmol). Purification afforded the title compound as a pale yellow amorphous solid (32 mg, 5 %).

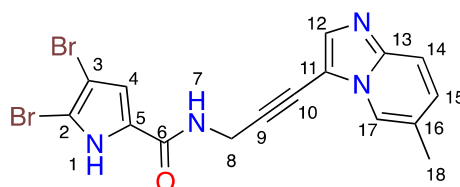
**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 4.46 (d, *J* = 5.4 Hz, 2H, H8), 6.99 (s, 1H, H4), 7.52 (dd, *J* = 1.9, 9.6 Hz, 1H, H15), 7.67 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H, H14), 7.91 (s, 1H, H12), 8.67 (s, 1H, H17), 8.74 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H, H7), 12.81 (br s, 1H, H1).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 29.2 (C8), 68.8 (C10), 98 (C9-C2), 105.2 (C2), 107 (C11), 107.8 (C16), 113.1 (C4), 118.5 (C14), 125.2 (C17), 127.6 (C5), 129.2 (C15), 138.1 (C12), 143.4 (C13), 158.7 (C6).

**HMRS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>OBr<sub>3</sub>: 500.8384. Found: 500.8393.

**IR** (cm<sup>-1</sup>): 3152, 1654, 1561, 1518, 1407, 1310, 1222.

**4,5-dibromo-*N*-(3-(6-methylimidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)prop-2-yn-1-yl)-1*H*-pyrrole-2-carboxamide (207).**



Chemical Formula: C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O  
Exact Mass: 433,938  
Molecular Weight: 436,107

Compound **207** was synthesized according to general procedure B using compounds **83** (376 mg, 1.23 mmol) and **205b** (211 mg, 0.82 mmol). Purification afforded the title compound as a pale yellow amorphous solid (105 mg, 30 %).

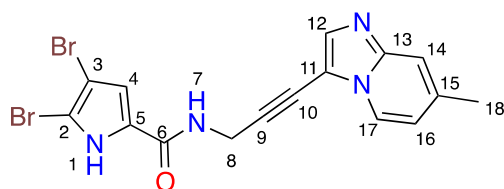
**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 2.34 (s, 3H, H18), 4.45 (d, *J* = 5.3 Hz, 2H, H8), 7.0 (s, 1H, H4), 7.25 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H15), 7.59 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H14), 7.82 (s, 1H, H12), 8.25 (s, 1H, H17), 8.74 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H, H7), 12.80 (s, 1H, H1).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 17.5 (C18), 29.2 (C8), 69.7 (C10), 97.1 (C9), 98 (C3), 105.2 (C2), 107.4 (C11), 113.1 (C4), 116.8 (C14), 122.7 (C17), 123.1 (C16), 127.6 (C5), 129.1 (C15), 137.5 (C12), 144.2 (C13), 158.7 (C6).

**HMRS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>N<sub>4</sub>OBr<sub>2</sub>: 436.9436. Found: 436.9457.

**IR** (cm<sup>-1</sup>): 3144, 1651, 1564, 1404, 1308, 1243, 1162.

**4,5-dibromo-*N*-(3-(7-methylimidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)prop-2-yn-1-yl)-1*H*-pyrrole-2-carboxamide (208).**



Chemical Formula: C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O  
 Exact Mass: 433,938  
 Molecular Weight: 436,107

Compound **208** was synthesized according to general procedure B using compounds **83** (457 mg, 1.5 mmol) and **205c** (257 mg, 1.0 mmol). Purification afforded the title compound as a beige amorphous solid (100 mg, 23 %).

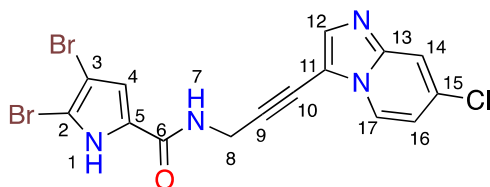
**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 2.39 (s, 3H, H18), 4.43 (d, *J* = 5.3 Hz, 2H, H8), 6.96 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H, H16), 6.99 (s, 1H, H4), 7.47 (br s, 1H, H17), 8.35 (br s, 1H, H14), 8.75 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H, H7), 12.81 (s, 1H, H1).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 20.7 (C18), 29.2 (C8), 69 (C10), 97 (C9), 97.9 (C3), 105.1 (C2), 113.1 (C4), 115.8 (C17), 116 (C16), 124.5 (C14), 127.6 (C5), 136.9 (C12), 158.7 (C6). Some quaternary carbons are too broad to be seen due to very slow relaxation.

**HMRS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>N<sub>4</sub>OBr<sub>2</sub>: 436.9436. Found: 436.9424.

**IR** (cm<sup>-1</sup>): 3136, 1634, 1566, 1400, 1244, 1190.

#### 4,5-dibromo-*N*-(3-(7-chloroimidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)prop-2-yn-1-yl)-1*H*-pyrrole-2-carboxamide (**209**).



Chemical Formula: C<sub>15</sub>H<sub>9</sub>Br<sub>2</sub>ClN<sub>4</sub>O  
 Exact Mass: 453,883  
 Molecular Weight: 456,522

Compound **209** was synthesized according to general procedure B using compounds **83** (169 mg, 0.55 mmol) and **205d** (62 mg, 0.22 mmol). Purification afforded the title compound as a pale yellow amorphous solid (20 mg, 20 %).

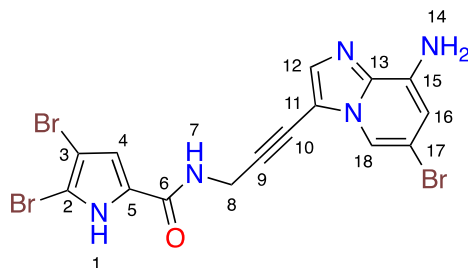
**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 4.44 (d, *J* = 5.4 Hz, 2H, H8), 6.99 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H, H4) 7.18 (dd, *J* = 2.1, 7.3 Hz, 1H, H16), 7.88 (s, 1H, H14), 7.91 (s, 1H, H12) 8.46 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H, H17), 8.75 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H, H7), 12.80 (s, 1H, H1).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 29.2 (C8), 68.9 (C10), 97.6 (C9), 98 (C3), 105.2 (C2), 108.1 (C11), 113.1 (C4), 114.7 (C16), 116.3 (C14), 126.2 (C17), 127.5 (C5), 131.3 (C15), 138.4 (C12), 144.6 (C13), 158.7 (C6).

**HMRS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>OBr<sub>2</sub>Cl: 456.8889. Found: 456.8879.



**N-(3-(8-amino-6-bromoimidazo[1,2-a]pyridin-3-yl)prop-2-yn-1-yl)-4,5-dibromo-1H-pyrrole-2-carboxamide (210).**



Chemical Formula: C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>Br<sub>3</sub>N<sub>5</sub>O  
Exact Mass: 512,844  
Molecular Weight: 515,991

Compound **210** was synthesized according to general procedure B using compounds **83** (238 mg, 0.78 mmol) and **205e** (209 mg, 0.39 mmol) to afford the protected intermediate, which was dissolved in 2 mL of DCM. The mixture was cooled with an ice bath and TFA was added (0.2 mL, 10 eq.). The mixture was stirred 8 h at room temperature. The reaction was quenched with the addition of NaOH 10 %, the resulting precipitate was filtered and rinsed with water and then DCM yielding a pale yellow amorphous solid **210** (119 mg, 59 % over two steps).

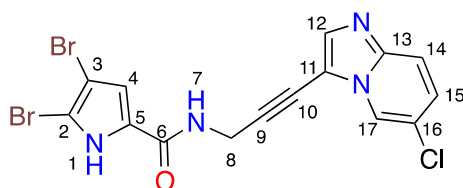
**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 4.43 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H, H8), 6.18 (br s, 2H, H14), 6.48 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, H16), 6.99 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H, H4), 7.73 (s, 1H, H12), 7.83 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, H18), 8.72 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, H7), 12.80 (s, 1H, H1).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 29.2 (C8), 69.3 (C10), 97.3 (C9), 98 (C3), 104.6 (C16), 105.2 (C2), 108.6 (C11), 109.5 (C17), 112 (C18), 113.1 (C4), 127.6 (C5), 135.5 (C12), 137.1 (C15), 138.2 (C13), 158.7 (C6).

**HMRS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>N<sub>5</sub>OBr<sub>3</sub>: 515.8493. Found: 515.8485.

**IR** (cm<sup>-1</sup>): 3385, 3147, 1649, 1600, 1561, 1397, 1239, 1212.

**4,5-dibromo-N-(3-(6-chloroimidazo[1,2-a]pyridin-3-yl)prop-2-yn-1-yl)-1H-pyrrole-2-carboxamide (211).**



Chemical Formula: C<sub>15</sub>H<sub>9</sub>Br<sub>2</sub>ClN<sub>4</sub>O  
Exact Mass: 453,883  
Molecular Weight: 456,522

Compound **211** was synthesized according to general procedure B using compounds **83** (198 mg, 0.65 mmol) and **205f** (150 mg, 0.54 mmol). Purification afforded the title compound as a beige amorphous solid (75 mg, 31 %).

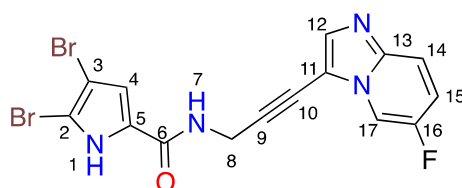
**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 4.46 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H, H8), 6.99 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H, H4), 7.45 (dd, *J* = 1.9, 9.4 Hz, 1H, H15), 7.73 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H, H14), 7.94 (s, 1H, H12), 8.62 (s, 1H, H17), 8.74 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H, H7), 12.80 (s, 1H, H1).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 29.2 (C8), 68.8 (C10), 98 (C9), 98 (C3), 105.2 (C2), 108.7 (C11), 113.1 (C4), 118.3 (C14), 120.8 (C16), 123.2 (C17), 127.6 (C5), 127.1 (C15), 138.2 (C12), 143.4 (C13), 158.7 (C6).

**HMRS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>OBr<sub>2</sub>Cl: 456.8889. Found: 456.8891.

**IR** (cm<sup>-1</sup>): 3158, 1655, 1561, 1520, 1489, 1308, 1242.

**4,5-dibromo-*N*-(3-(6-fluoroimidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)prop-2-yn-1-yl)-1*H*-pyrrole-2-carboxamide (212).**



Chemical Formula: C<sub>15</sub>H<sub>9</sub>Br<sub>2</sub>FN<sub>4</sub>O  
Exact Mass: 437,913  
Molecular Weight: 440,070

Compound **212** was synthesized according to general procedure B using compounds **83** (214 mg, 0.70 mmol) and **205g** (122 mg, 0.47 mmol). Purification afforded the title compound as a pale yellow amorphous solid (129 mg, 63 %).

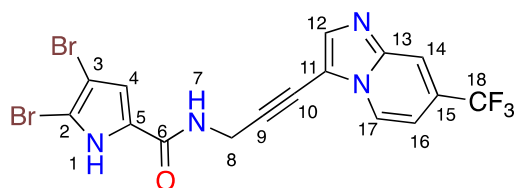
**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 4.45 (d, *J* = 5.4 Hz, 2H, H8), 6.99 (s, 1H, H4), 7.49 (t, *J* = 9.2 Hz, 1H, H15), 7.77 (dd, *J* = 5.1, 9.3 Hz, 1H, H14), 7.94 (s, 1H, H12), 8.63 (s, 1H, H17), 8.74 (t, *J* = 4.9 Hz, 1H, H7), 12.82 (s, 1H, H1).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 29.3 (C8), 69.1 (C10), 98(C9), 98.1 (C3), 105.2 (C2), 108.9 (C11), 112.3 (d, *J* = 41.6 Hz, C17), 113.2 (C4), 118.0 (d, *J* = 25.7 Hz, C15), 118.4 (d, *J* = 9.3 Hz, C14), 127.6 (C5), 138.6 (C12), 152-155.1 (d, *J* = 235.8 Hz, C16), 158.7 (C6). One quaternary carbon too broad to be seen due to very slow relaxation.

**HMRS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>OBr<sub>2</sub>F: 440.9188. Found: 440.9185.

**IR** (cm<sup>-1</sup>): 3148, 1653, 1562, 1519, 1499, 1404, 1309, 1221.

**4,5-dibromo-*N*-(3-(7-(trifluoromethyl)imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)prop-2-yn-1-yl)-1*H*-pyrrole-2-carboxamide (213).**



Chemical Formula: C<sub>16</sub>H<sub>9</sub>Br<sub>2</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O  
Exact Mass: 487,910  
Molecular Weight: 490,078

Compound **213** was synthesized according to general procedure B using compounds **83** (286 mg, 0.94 mmol) and **205h** (122 mg, 0.62 mmol). Purification afforded the title compound as a pale yellow amorphous solid (173 mg, 57 %).

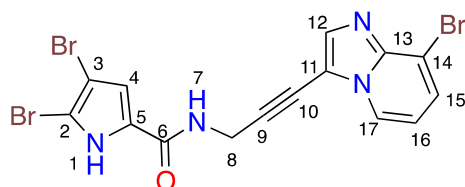
**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 4.46 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H, H8), 6.99 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, H4), 7.37 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H, H16), 8.11 (s, 1H, H12), 8.20 (s, 1H, H14), 8.65 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H, H17), 8.77 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H, H7), 12.80 (br s, 1H, H1).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 29.2 (C8), 68.7 (C10), 98 (C9), 98.1 (C3), 105.2 (C2), 108.9 (d, *J* = 3.0 Hz, C16), 109.4 (C11), 113.1 (C4), 115.6 (d, *J* = 5.0 Hz, C14), 121.6 (C18), 125.7 (t, *J* = 36.7 Hz, C15), 126.8 (C17), 127.5 (C5), 139.5 (C12), 143.3 (C13), 158.7 (C6).

**HMRS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>16</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>OBr<sub>2</sub>F<sub>3</sub>: 490.9147. Found: 490.9153.

**IR** (cm<sup>-1</sup>): 3154, 1638, 1564, 1314, 1168, 1131, 1052.

#### 4,5-dibromo-*N*-(3-(8-bromoimidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)prop-2-yn-1-yl)-1*H*-pyrrole-2-carboxamide (**214**).



Chemical Formula: C<sub>15</sub>H<sub>9</sub>Br<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O

Exact Mass: 497,833

Molecular Weight: 500,976

Compound **214** was synthesized according to general procedure B using compounds **83** (313 mg, 1.02 mmol) and **205i** (220 mg, 0.68 mmol). Purification afforded the title compound as a beige amorphous solid (113 mg, 33 %).

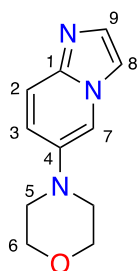
**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 4.44 (d, *J* = 5.4 Hz, 2H, H8), 6.99 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H, H4), 7.03 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H, H16), 7.74 (dd, *J* = 0.9, 7.2 Hz, 1H, H15), 7.94 (s, 1H, H12), 8.48 (dd, *J* = 0.9, 6.8 Hz, 1H, H17), 8.75 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H, H7), 12.80 (s, 1H, H1).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 29.2 (C8), 69 (C10), 97.6 (C9), 98 (C3), 105.2 (C2), 109.6 (C11), 110.9 (C14), 113.1 (C4), 113.9 (C16), 125 (C17), 127.5 (C5), 128.7 (C15), 137.7 (C12), 142.5 (C13), 158.7 (C6).

**HMRS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>OBr<sub>3</sub>: 498.8405. Found: 498.8423.

**IR** (cm<sup>-1</sup>): 3135, 3116, 1642, 1560, 1521, 1398, 1240, 1212.

#### 4-(imidazo[1,2-*a*]pyridin-6-yl)morpholine (**215**).



Chemical Formula: C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O

Exact Mass: 203,106

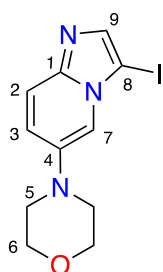
Molecular Weight: 203,245

Compound **204a** (215 mg, 1.1 mmol, 1 eq.) was dissolved in 2 mL of anhydrous toluene with NaOtBu (157 mg, 1.6 mmol, 1.5 eq.) followed by morpholine (0.3 mL, 3.3 mmol, 3 eq.). The mixture was degased with argo, then Xphos (52 mg, 0.11 mmol, 10 mol %) and Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> (50 mg, 5 mol %) were added. The mixture was stirred at 100°C for 4 h until reaction completion. The mixture was filtered through a pad of celite, concentrated and purified with silica gel chromatography (elution gradient from 100 to 90/10 DCM/MeOH) to afford a grey amorphous solid (138 mg, 62 %).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3.05 (t, *J* = 4.5 Hz, 4H, H5), 3.88 (t, *J* = 4.5 Hz, 4H, H6), 7.06 (dd, *J* = 2.3, 9.8 Hz, 1H, H3), 7.50 (s, 1H, H8), 7.55 (m, 3H, H2-7-9).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 50.8 (C5), 66.9 (C6), 111.5 (C7), 113.2 (C8), 117.7 (C2), 121.5 (C3), 132.8 (C9), 140.3 (C4), 142.5 (C1).

#### 4-(3-iodoimidazo[1,2-*a*]pyridin-6-yl)morpholine (216).



Chemical Formula: C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>IN<sub>3</sub>O  
 Exact Mass: 329,003  
 Molecular Weight: 329,141

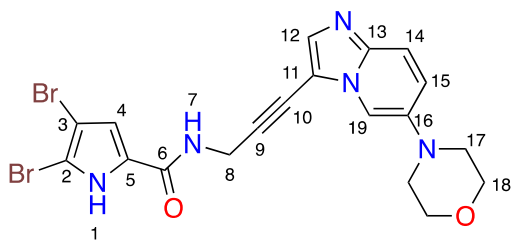
Compound **216** was synthesised from compound **215** with the same procedure as previously described with NIS in ACN to afford a green amorphous solid (175 mg, 72 %).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 3.11 (t, *J* = 4.6 Hz, 4H, H5), 3.89 (t, *J* = 4.6 Hz, 4H, H6), 7.10 (dd, *J* = 2.2, 9.7 Hz, 1H, H3), 7.49 (m, 2H, H2-7), 7.61 (s, 1H, H9).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 50.6 (C5), 61.7 (C8), 66.8 (C6), 111.6 (C7), 117.8 (C2), 121.4 (C3), 139.7 (C9), 141 (C4), 144.6 (C1).

HMRS (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>OI: 330.0103. Found: 330.0110.

#### 4,5-dibromo-*N*-(3-(6-morpholinoimidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)prop-2-yn-1-yl)-1*H*-pyrrole-2-carboxamide (217).



Chemical Formula: C<sub>19</sub>H<sub>17</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>  
 Exact Mass: 504,975  
 Molecular Weight: 507,186

Compound **217** was synthesized according to general procedure B using compounds **83** (383 mg, 1.3 mmol) and **216** (206 mg, 0.63 mmol). Purification afforded the title compound as a beige amorphous solid (71 mg, 22 %).

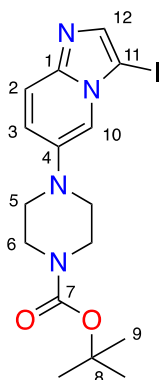
**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 3.05 (t, *J* = 4.5 Hz, 4H, H17), 3.75 (t, *J* = 4.5 Hz, 4H, H18), 4.43 (d, *J* = 5.3 Hz, 2H, H8), 6.99 (s, 1H, H4), 7.38 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H, H15), 7.57 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H, H14), 7.64 (s, 1H, H19), 7.76 (s, 1H, H12), 8.79 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H, H7), 12.79 (s, 1H, H1).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 49.3 (C17), 65.8 (C18), 29.3 (C8), 69.9 (C10), 97.5 (C9), 98 (C3), 105.1 (C2), 107.8 (C11), 108.8 (C19), 113 (C4), 117.2 (C14), 121.7 (C15), 127.6 (C5), 136.9 (C12), 140.5 (C16), 141.7 (C13), 158.7 (C6).

**HMRS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>Br<sub>2</sub>: 507.9807. Found: 507.9807.

**IR** (cm<sup>-1</sup>): 3111, 1642, 1567, 1505, 1402, 1244, 1167, 1118.

### **Tert-butyl 4-(3-iodoimidazo[1,2-*a*]pyridin-6-yl)piperazine-1-carboxylate (219).**



Chemical Formula: C<sub>16</sub>H<sub>21</sub>IN<sub>4</sub>O<sub>2</sub>  
Exact Mass: 428,071  
Molecular Weight: 428,274

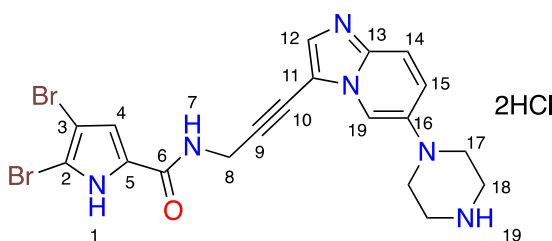
Compound **219** was synthesised from compounds **218** and **204g** with the same procedures as for compounds **215** and then **216** to afford a brown amorphous solid (355 mg, 59 % over two steps).

**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.49 (s, 9H, H9), 3.09 (t, *J* = 4.5 Hz, 4H, H5), 3.64 (t, *J* = 4.5 Hz, 4H, H6), 7.16 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H, H3), 7.52 (s, 1H, H10), 7.57 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H, H2), 7.64 (s, 1H, H12).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 28.5 (C9), 43.6 (C6), 50.6 (C5), 61.8 (C11), 80.3 (C8), 112.4 (C10), 117.7 (C2), 122.5 (C3), 139.3 (C12), 141.2 (C4), 144.5 (C1), 154.7 (C7).

**HMRS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>I: 429.0788. Found: 429.0793.

### **4,5-dibromo-*N*-(3-(6-(piperazin-1-yl)imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)prop-2-yn-1-yl)-1*H*-pyrrole-2-carboxamide (221).**



Chemical Formula: C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O  
Exact Mass: 503,991  
Molecular Weight: 506,202

Compound **220** was synthesized according to general procedure B using compounds **83** (296 mg, 0.97 mmol) and **219** (207 mg, 0.48 mmol). Purification afforded the title compound as a yellow amorphous solid. **220** was dissolved in 4 mL of DCM. The reaction mixture was cooled with an ice bath and HCl (4N dioxane) was added (0.6 mL) with 2 mL of methanol. It was stirred overnight at room temperature. The solvent was removed under vacuum, the resulting solid rinsed with DCM and MeOH to afford the salt **221** as a white amorphous solid (123 mg, 44 % over two steps).

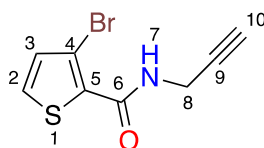
**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 3.27 (s, 4H, H18), 3.54 (s, 4H, H17), 4.45 (d, *J* = 5.3 Hz, 2H, H8), 7.08 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H, H4), 7.92 (m, 2H, H14-15), 8.03 (s, 1H, H19), 8.41 (s, 1H, H12), 9.28 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H, H7), 9.64 (br s, 2H, H19), 12.91 (s, 1H, H1).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 29.2 (C8), 42.2 (C18), 45.5 (C17), 66.7 (C10), 98.1 (C3), 99.5 (C9), 105 (C2), 109.3 (C11), 113.3 (C15), 113.8 (C4), 127.2 (C12), 127.6 (C5), 127.7 (C14), 135.6 (C13), 142.1 (C16), 158.7 (C6).

**HMRS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>N<sub>6</sub>OBr<sub>2</sub>: 506.9967. Found: 506.9964.

**IR** (cm<sup>-1</sup>): 3275, 2928, 1640, 1521, 1390, 1322, 1237.

### 3-bromo-*N*-(prop-2-yn-1-yl)thiophene-2-carboxamide (**222a**).



Chemical Formula: C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>BrNOS  
Exact Mass: 242,9353  
Molecular Weight: 244,1060

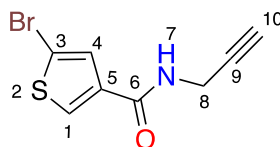
Carboxylic acid **85a** (2 g, 9.66 mmol, 1eq.) was dissolved in 2 mL of pyridine and 4 mL of EtOAc and propargylamine (0.93 mL, 14.5 mmol, 1.5 eq.) was added. The mixture was cooled down with an ice bath and T<sub>3</sub>P (11.5 mL, 19.3 mmol, 2 eq.) was slowly added under inert atmosphere. The reaction mixture was stirred at room temperature during 40 h. The reaction was quenched with an aqueous solution of HCl 1N and was extracted with EtOAc twice. The organic phase was washed with a solution of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 10 % and with brine. It was dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum. The crude was purified by silica gel chromatography (elution gradient from 100 to 98/2 DCM/MeOH) to afford **222a** as a white amorphous solid (2.02 g, 86 %).

**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 3.14 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H, H10), 4.02 (dd, *J* = 2.6, 5.6 Hz, 2H, H8), 7.18 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H, H3), 7.82 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H, H2), 8.58 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, H7)

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 28.8 (C8), 73.1 (C10), 80.8 (C9), 110.5 (C4), 130.1 (C2), 131.7 (C3), 132.4 (C5), 160 (C6).

**HMRS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>NOSBr: 245.9411. Found: 245.9439.

### 5-bromo-*N*-(prop-2-yn-1-yl)thiophene-3-carboxamide (**222b**).



Chemical Formula: C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>BrNOS

Exact Mass: 242,9353

Molecular Weight: 244,1060

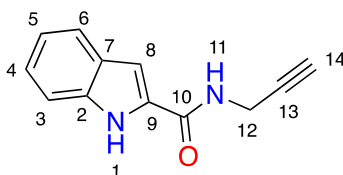
Alkyne **222b** was synthesized according to the same procedure as for compound **222a** with carboxylic acid **85b**, to afford a white amorphous solid (1.46 g, 95 %).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 2.27 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H, H10), 4.19 (dd, *J* = 2.6, 5.2 Hz, 2H, H8), 6.38 (br s, 1H, H7), 7.37 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, H4), 7.81 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, H1).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 29.6 (C8), 72 (C10), 79.2 (C9), 113.6 (C3), 128.6 (C4), 130.1 (C1), 136.9 (C5), 161.5 (C6).

HMRS (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>NOSBr: 245.9411. Found: 245.9447.

#### ***N*-(prop-2-yn-1-yl)-1*H*-indole-2-carboxamide (222c).**



Chemical Formula: C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O

Exact Mass: 198,0793

Molecular Weight: 198,2250

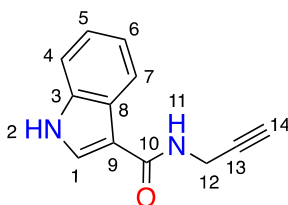
Alkyne **222c** was synthesized according to the same procedure as for compound **222a** with carboxylic acid **85c**, to afford a yellow amorphous solid (1.32 g, 83 %).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 3.16 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H, H14), 4.10 (dd, *J* = 2.4, 5.6 Hz, 2H, H12), 7.04 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H, H5), 7.15 (m, 1H, H8), 7.19 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, H4), 7.43 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H3), 7.62 (d, *J* = 8 Hz, 1H, H6), 8.93 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H, H11), 11.61 (s, 1H, H1)

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 28 (C12), 73 (C14), 81.3 (C13), 102.9 (C8), 112.3 (C3), 119.7 (C5), 121.6 (C6), 123.4 (C4), 127 (C9), 131.1 (C7), 136.5 (C2), 160.8 (C10)

HMRS (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O: 199.0871. Found: 199.0870.

#### ***N*-(prop-2-yn-1-yl)-1*H*-indole-3-carboxamide (222d).**



Chemical Formula: C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O

Exact Mass: 198,0793

Molecular Weight: 198,2250

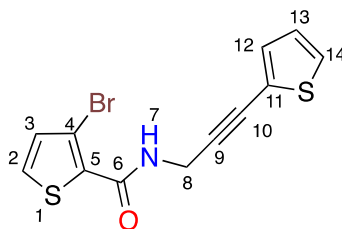
Alkyne **222d** was synthesized according to the same procedure as for compound **222a** with carboxylic acid **85d**, to afford a yellow amorphous solid (1.2 g, 98 %).

**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 3.09 (t, *J* = 2.5 Hz, 1H, H14), 4.06 (dd, *J* = 2.5, 5.8 Hz, 2H, H12), 7.13 (qt d, *J* = 1.9, 7.3, 2H, H5-6), 7.43 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H, H4), 8.04 (d, *J* = 3 Hz, 1H, H1), 8.14 (d, *J* = 3 Hz, 1H, H7), 8.30 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H, H11), 11.57 (s, 1H, H2).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 27.6 (C12), 72.5 (C14), 82.1 (C13), 110 (C9), 111.8 (C4), 120.4 (C6), 120.9 (C7), 121.9 (C5), 126.1 (C3), 128 (C1), 136.1 (C8), 164.2 (C10).

**HMRS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O: 199.0871. Found: 199.0871.

### 3-bromo-*N*-(3-(thiophen-2-yl)prop-2-yn-1-yl)thiophene-2-carboxamide (**223a**).



Chemical Formula: C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>BrNOS<sub>2</sub>  
Exact Mass: 324,9231  
Molecular Weight: 326,2260

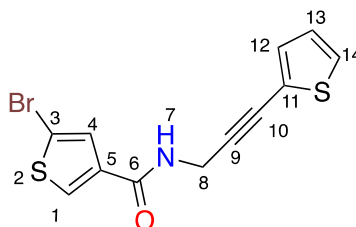
Compound **223a** was synthesized according to general procedure B using compounds **222a** and **137**. Purification afforded the title compound as a red oil (74 mg, 22 %).

**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 4.32 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H, H8), 7.07 (dd, *J* = 3.8, 5.2 Hz, 1H, H13), 7.2 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H, H3), 7.31 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H, H12), 7.58 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H, H14), 7.83 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H, H2), 8.7 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H, H7).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 29.7 (C8), 74.9 (C10), 90.7 (C9), 110.7 (C4), 121.8 (C11), 127.5 (C13), 128.4 (C14), 130.2 (C2), 131.8 (C3), 132.3 (C5), 132.5 (C12), 160.1 (C6).

**HMRS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>12</sub>H<sub>9</sub>BrNOS<sub>2</sub>: 327.9288. Found: 327.9325.

### 5-bromo-*N*-(3-(thiophen-2-yl)prop-2-yn-1-yl)thiophene-3-carboxamide (**223b**).



Chemical Formula: C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>BrNOS<sub>2</sub>  
Exact Mass: 324,9231  
Molecular Weight: 326,2260

Compound **223b** was synthesized according to general procedure B using compounds **222b** and **137**. Purification afforded the title compound as a yellow amorphous solid (313 mg, 67 %).



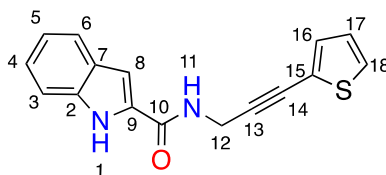
**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 4.45 (d, *J* = 5.3 Hz, 2H, H8), 6.37 (s, 1H, H7), 6.96 (dd, *J* = 3.7, 5.1 Hz, 1H, H13), 7.20 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H, H12), 7.25 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, H14), 7.38 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, H4), 7.83 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, H1).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 30.7 (C8), 77.3 (C10), 88.5 (C9), 113.7 (C3), 122.4 (C11), 127.1 (C13), 127.5 (C14), 128.7 (C4), 130.1 (C1), 132.6 (C12), 137.1 (C5), 161.6 (C6).

**HMRS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>12</sub>H<sub>9</sub>NOS<sub>2</sub>Br: 327.9288. Found 327.9287.

**IR** (cm<sup>-1</sup>): 3280, 1634, 1555, 1419, 1280, 1191.

### ***N*-(3-(thiophen-2-yl)prop-2-yn-1-yl)-1*H*-indole-2-carboxamide (223c).**



Chemical Formula: C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>OS  
Exact Mass: 280,0670  
Molecular Weight: 280,3450

Compound **223c** was synthesized according to general procedure B using compounds **222c** and **137**. Purification afforded the title compound as a yellow amorphous solid (244 mg, 58 %).

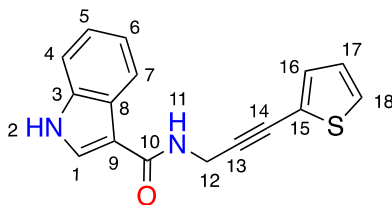
**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 4.39 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H, H12), 7.04 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H5), 7.06 (dd, *J* = 3.6, 5.6 Hz, 1H, H17), 7.17 (m, 1H, H8), 7.19 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, H4), 7.31 (dd, *J* = 1.1, 3.6 Hz, 1H, H16), 7.44 (d, *J* = 8 Hz, 1H, H3), 7.58 (dd, *J* = 1.1, 5.4 Hz, 1H, H18), 7.62 (d, *J* = 8 Hz, 1H, H6), 9.04 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H, H11), 11.65 (s, 1H, H1).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 29 (C12), 83.6 (C13), 75 (C14), 91.2 (C13), 103 (C8), 112.3 (C3), 119.8 (C5), 121.6 (C6), 121.8 (C15), 123.5 (C4), 127 (C9), 127.5 (C17), 128.3 (C18), 131 (C7), 132.4 (C16), 136.5 (C2), 160.9 (C10).

**HMRS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>OS: 281.0749. Found 281.0759.

**IR** (cm<sup>-1</sup>): 3414, 3232, 1642, 1538, 1408, 1190.

### ***N*-(3-(thiophen-2-yl)prop-2-yn-1-yl)-1*H*-indole-3-carboxamide (223d).**



Chemical Formula: C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>OS  
Exact Mass: 280,0670  
Molecular Weight: 280,3450

Compound **223d** was synthesized according to general procedure B using compounds **222d** and **137**. Purification afforded the title compound as a green amorphous solid (122 mg, 43 %).

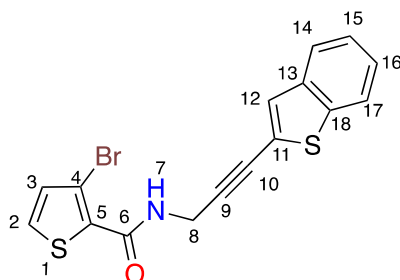
**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 4.35 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H, H12), 7.06 (dd, *J* = 3.7, 5.4 Hz, 1H, H17), 7.14 (qt d, *J* = 1.8, 7.2 Hz, 2H, H5-6), 7.29 (dd, *J* = 1.2, 3.7 Hz, 1H, H16), 7.43 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, H4), 7.57 (dd, *J* = 1.2, 5.1 Hz, 1H, H18), 8.06 (d, *J* = 3 Hz, 1H, H1), 8.17 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, H7), 8.42 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H, H11), 11.59 (br s, 1H, H2).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 28.5 (C12), 74.5 (C14), 92 (C13), 109.9 (C9), 111.8 (C4), 120.5 (C6), 120.9 (C7), 121.9 (C5), 122.1 (C15), 126.1 (C3), 127.5 (C17), 128.1 (C18-1), 132.2 (C16), 136.1 (C8), 164.3 (C10).

**HMRS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>OS: 281.0749. Found 281.0757.

**IR** (cm<sup>-1</sup>): 3242, 1589, 1523, 1496, 1435, 1303, 1202.

***N*-(3-(benzo[*b*]thiophen-2-yl)prop-2-yn-1-yl)-3-bromothiophene-2-carboxamide (224a).**



Chemical Formula: C<sub>16</sub>H<sub>10</sub>BrNOS<sub>2</sub>

Exact Mass: 374,9387

Molecular Weight: 376,2860

Compound **224a** was synthesized according to general procedure B using compounds **222a** and **138**. Purification afforded the title compound as a beige amorphous solid (72 mg, 18 %).

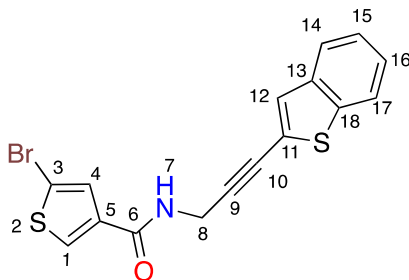
**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 4.38 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H, H8), 7.2 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H, H3), 7.42 (m, 2H, H15-16), 7.66 (s, 1H, H12), 7.84 (m, 2H, H2-14), 7.95 (m, 1H, H17), 8.76 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H, H7).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 29.8 (C8), 75.1 (C10), 92.9 (C9), 110.7 (C4), 121.8 (C11), 122.3 (C17), 124.1 (C14), 125.1 (C15), 125.8 (C16), 129.3 (C12), 130.2 (C2), 131.8 (C3), 132.3 (C5), 138.7 (C18), 139.1 (C13), 160.2 (C6).

**HMRS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>NOS<sub>2</sub>Br: 375.9465. Found 375.9462.

**IR** (cm<sup>-1</sup>): 3400, 3075, 1632, 1519, 1491, 1414, 1278.

***N*-(3-(benzo[*b*]thiophen-2-yl)prop-2-yn-1-yl)-5-bromothiophene-3-carboxamide (224b).**



Chemical Formula: C<sub>16</sub>H<sub>10</sub>BrNOS<sub>2</sub>

Exact Mass: 374,9387

Molecular Weight: 376,2860

Compound **224b** was synthesized according to general procedure B using compounds **222b** and **138**. Purification afforded the title compound as a beige amorphous solid (34 mg, 7 %).

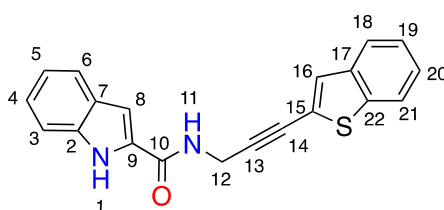
**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 4.37 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H, H8), 7.42 (m, 2H, H15-16), 7.62 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, H4), 7.65 (s, 1H, H12), 7.84 (m, 1H, H14), 7.94 (m, 1H, H17), 8.19 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, H1), 8.96 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, H7).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 29.2 (C8), 75.2 (C10), 93.1 (C9), 112.2 (C3), 121.8 (C11), 122.3 (C17), 124.1 (C14), 125.1 (C15) 125.8 (C16), 129.3 (C12), 129.4 (C4), 131.7 (C1), 137.2 (C5), 138.7 (C18), 139.1 (C13), 160.6 (C6).

**HMRS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>NOS<sub>2</sub>Br: 375.9465. Found 375.9449.

**IR** (cm<sup>-1</sup>): 3281, 1631, 1557, 1420, 1285, 1247.

### ***N*-(3-(benzo[*b*]thiophen-2-yl)prop-2-yn-1-yl)-1*H*-indole-2-carboxamide (224c).**



Chemical Formula: C<sub>20</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>OS

Exact Mass: 330,0827

Molecular Weight: 330,4050

Compound **224c** was synthesized according to general procedure B using compounds **222c** and **138**. Purification afforded the title compound as a yellow amorphous solid (230 mg, 46 %).

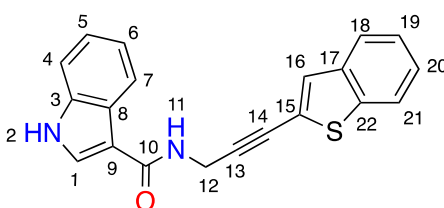
**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 4.45 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H, H12), 7.04 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, H5), 7.19 (m, 2H, H4-8), 7.42 (m, 2H, H19-20), 7.44 (m, 1H, H3), 7.63 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H6), 7.66 (s, 1H, H16), 7.84 (m, 1H, H18), 7.94 (m, 1H, H21), 9.09 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, H11), 11.67 (br s, 1H, H1).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 29.2 (C8), 75.2 (C10), 93.1 (C9), 112.2 (C3), 121.8 (C11), 122.3 (C17), 124.1 (C14), 125.1 (C15) 125.8 (C16), 129.3 (C12), 129.4 (C4), 131.7 (C1), 137.2 (C5), 138.7 (C18), 139.1 (C13), 160.6 (C6).

**HMRS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>20</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>OS: 331.0905. Found 331.0903.

**IR** (cm<sup>-1</sup>): 3414, 3251, 1640, 1538, 1412, 1245.

### ***N*-(3-(benzo[*b*]thiophen-2-yl)prop-2-yn-1-yl)-1*H*-indole-3-carboxamide (224d).**



Chemical Formula: C<sub>20</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>OS

Exact Mass: 330,0827

Molecular Weight: 330,4050

Compound **224d** was synthesized according to general procedure B using compounds **222d** and **138**. Purification afforded the title compound as a yellow amorphous solid (66 mg, 26 %).

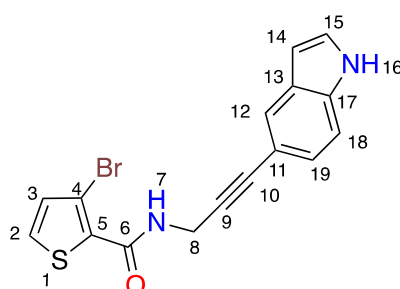
**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 4.41 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H, H12), 7.14 (m, 2H, H5-6), 7.43 (m, 3H, H4-19-20), 7.65 (s, 1H, H16), 7.83 (m, 1H, H18), 7.94 (m, 1H, H21), 8.08 (d, *J* = 3 Hz, 1H, H1), 8.18 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H, H7), 8.48 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H, H11), 11.61 (s, 1H, H2).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 28.6 (C12), 74.7 (C14), 94.3 (C13), 109.9 (C9), 111.9 (C4), 120.5 (C6), 120.9 (C7), 122 (C5), 122.1 (C15), 122.3 (C21), 124 (C18), 125 (C19), 125.8 (C20), 126.1 (C3), 128.2 (C1), 129 (C16), 136.1 (C8), 138.7 (C22), 139 (C17), 164.3 (C10).

**HMRS** (ESI) *m/z* Calcd for (M-H)<sup>-</sup> C<sub>20</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>OS: 329.0749. Found 329.0756.

**IR** (cm<sup>-1</sup>): 3226, 1590, 1575, 1523, 1498, 1433, 1201.

### ***N*-(3-(1*H*-indol-5-yl)prop-2-yn-1-yl)-3-bromothiophene-2-carboxamide (225a).**



Chemical Formula: C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>BrN<sub>2</sub>OS  
Exact Mass: 357,9775  
Molecular Weight: 359,2410

Compound **225a** was synthesized according to general procedure B using compounds **222a** and **139**. Purification afforded the title compound as a beige amorphous solid (188 mg, 51 %).

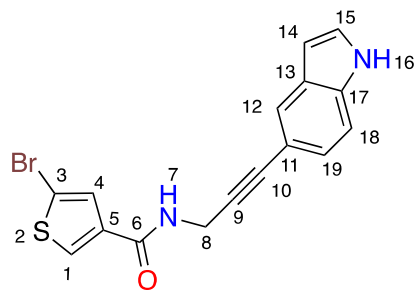
**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) 4.30 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H, H8), 6.43 (s, 1H, H14), 7.13 (dd, *J* = 1.4, 8.3 Hz, 1H, H19), 7.20 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H, H3), 7.36 (s, 1H, H18), 7.39 (t, *J* = 2.8 Hz, 1H, H15), 7.65 (s, 1H, H12), 7.83 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H, H2), 8.67 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H, H7), 11.27 (s, 1H, H16).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 29.7 (C8), 83.4 (C9), 83.7 (C10), 101.3 (C14), 110.5 (C4), 111.7 (C18), 112.3 (C11), 123.8 (C12), 124.3 (C19), 126.5 (C15), 127.5 (C17), 130 (C2), 131.7 (C3), 132.5 (C5), 135.5 (C13), 160 (C6).

**HMRS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>OSBr: 360.9833. Found 360.9873.

**IR** (cm<sup>-1</sup>): 3308, 1609, 1529, 1410, 1349, 1284.

### ***N*-(3-(1*H*-indol-5-yl)prop-2-yn-1-yl)-5-bromothiophene-3-carboxamide (225b).**



Chemical Formula:  $C_{16}H_{11}BrN_2OS$   
 Exact Mass: 357,9775  
 Molecular Weight: 359,2410

Compound **225b** was synthesized according to general procedure B using compounds **222b** and **139**. Purification afforded the title compound as a yellow amorphous solid (192 mg, 52 %).

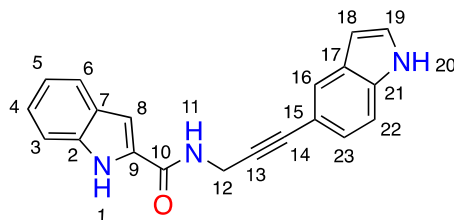
**$^1H$  NMR** (300 MHz, DMSO- $d_6$ ) 4.29 (d,  $J$  = 5.7 Hz, 2H, H8), 6.42 (s, 1H, H14), 7.13 (dd,  $J$  = 1.6, 8.5 Hz, 1H, H19), 7.36 (s, 1H, H18), 7.39 (t,  $J$  = 2.5 Hz, 1H, H15), 7.64 (d,  $J$  = 1.7 Hz, 1H, H4), 7.65 (s, 1H, H12), 8.19 (d,  $J$  = 1.7 Hz, 1H, H1), 8.89 (t,  $J$  = 5.5 Hz, 1H, H7), 11.27 (s, 1H, H16).

**$^{13}C$  NMR** (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  29.1 (C8), 83.6 (C9), 83.7 (C10), 101.2 (C14), 111.7 (C18), 112.1 (C3), 112.3 (C11), 123.7 (C12), 124.3 (C19), 126.5 (C15), 127.5 (C17), 129.4 (C4), 131.5 (C1), 135.5 (C13), 137.4 (C5), 160.4 (C6).

**HMRS** (ESI<sup>+</sup>)  $m/z$  Calcd for (M+H)<sup>+</sup>  $C_{16}H_{12}N_2OSBr$ : 360.9833. Found 360.9862.

**IR** (cm<sup>-1</sup>): 3445, 2214, 1627, 1537, 1412, 1281, 1252.

#### ***N*-(3-(1*H*-indol-5-yl)prop-2-yn-1-yl)-1*H*-indole-2-carboxamide (225c).**



Chemical Formula:  $C_{20}H_{15}N_3O$   
 Exact Mass: 313,1215  
 Molecular Weight: 313,3600

Compound **225c** was synthesized according to general procedure B using compounds **222c** and **139**. Purification afforded the title compound as a yellow amorphous solid (200 mg, 63 %).

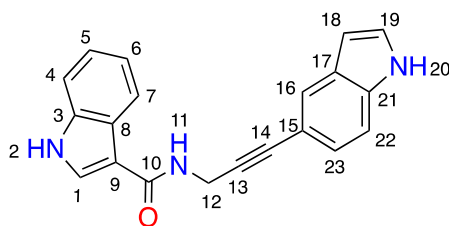
**$^1H$  NMR** (300 MHz, DMSO- $d_6$ ) 4.38 (d,  $J$  = 5.6 Hz, 2H, H12), 6.43 (s, 1H, H18), 7.04 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 1H, H5), 7.16 (t,  $J$  = 8.6 Hz, 1H, H4), 7.20 (m, 2H, H8-23), 7.38 (m, 1H, H22), 7.4 (m, 1H, H19), 7.45 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1H, H3), 7.62 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 1H, H6), 7.67 (s, 1H, H16), 9.02 (t,  $J$  = 5.6 Hz, 1H, H11), 11.27 (br s, 1H, H20), 11.64 (br s, 1H, H1).

**$^{13}C$  NMR** (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  28.9 (C12), 83.6 (C14), 83.9 (C13), 101.3 (C18), 102.9 (C8), 111.8 (C22), 112.3 (C3), 112.4 (C15), 119.8 (C5), 121.6 (C6), 123.4 (C4), 123.7 (C16), 124.3 (C23), 126.6 (C19), 127.1 (C9), 127.5 (C21), 131.3 (C7), 135.5 (C17), 136.5 (C2), 160.8 (C10).

**HMRS** (ESI<sup>+</sup>)  $m/z$  Calcd for (M+H)<sup>+</sup>  $C_{20}H_{16}N_3O$ : 314.1293. Found 314.1298.

IR (cm<sup>-1</sup>): 3397, 3232, 1642, 1539, 1410, 1248.

***N*-(3-(1*H*-indol-5-yl)prop-2-yn-1-yl)-1*H*-indole-3-carboxamide (225d).**



Chemical Formula: C<sub>20</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O  
Exact Mass: 313,1215  
Molecular Weight: 313,3600

Compound **225d** was synthesized according to general procedure B using compounds **222d** and **139**. Purification afforded the title compound as a beige amorphous solid (144 mg, 46 %).

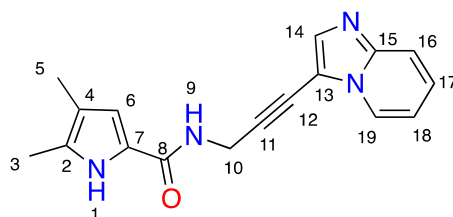
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) 4.35 (d, *J* = 5.4 Hz, 2H, H12), 6.43 (m, 1H, H18), 7.14 (m, 3H, H5-6-23), 7.38 (m, 1H, H22), 7.39 (m, 1H, H19), 7.44 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H, H4), 7.66 (s, 1H, H16), 8.10 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H, H1), 8.20 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H, H7), 8.41 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H, H11), 11.26 (br s, 1H, H20), 11.59 (br s, 1H, H2).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 28.5 (C12), 83.2 (C13), 84.7 (C14), 101.3 (C18), 110.1 (C9), 111.7 (C22), 111.8 (C4), 112.6 (C15), 120.4 (C6), 121 (C7), 121.9 (C5), 123.7 (C16), 124.3 (C23), 126.2 (C3), 126.5 (C19), 127.5 (C21), 128 (C1), 135.5 (C17), 136.1 (C8), 164.2 (C10).

HMRS (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>20</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub>O: 314.1293. Found 314.1302.

IR (cm<sup>-1</sup>): 3419, 3184, 1607, 1531, 1411, 1312, 1206.

***N*-(3-(imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)prop-2-yn-1-yl)-4,5-dimethyl-1*H*-pyrrole-2-carboxamide (226).**



Chemical Formula: C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O  
Exact Mass: 292,132  
Molecular Weight: 292,342

Compound **226** was synthesized according to general procedure B using compounds **121** (87 mg, 0.49 mmol, 1.2 eq.) and **172** (100 mg, 0.41 mmol, 1eq.). Purification afforded the title compound as a white amorphous solid (67 mg, 56 %).

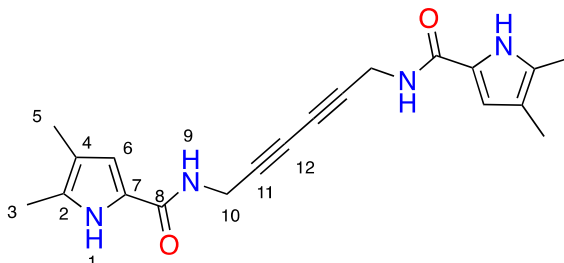
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 1.92 (s, 3H, H5), 2.10 (s, 3H, H3), 4.40 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H, H10), 6.57 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, H6), 7.10 (td, *J* = 1.1, 6.7 Hz, 1H, H18), 7.39 (ddd, *J* = 1.3, 6.8, 9.0 Hz, 1H, H17), 7.67 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, H16), 7.87 (s, 1H, H14), 8.30 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, H9), 8.44 (dt, *J* = 1.1, 6.7 Hz, 1H, H19).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10.6 (C5), 10.8 (C3), 29 (C10), 69 (C12), 98 (C11), 107.6 (C13), 112 (C6), 113.6 (C18), 114.6 (C4), 117.4 (C16), 122.5 (C7), 125.2 (C19), 126.1 (C17), 128.6 (C2), 137.4 (C14), 144.8 (C15), 160.5 (C7).

**HMRS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>N<sub>4</sub>O: 293.1402. Found: 293.1407.

**IR** (cm<sup>-1</sup>): 3234, 2916, 1627, 1494, 1268, 1259, 1235.

***N,N'*-(hexa-2,4-diyne-1,6-diyl)bis(4,5-dimethyl-1*H*-pyrrole-2-carboxamide) (226a).**



Chemical Formula: C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>  
Exact Mass: 350,174  
Molecular Weight: 350,422

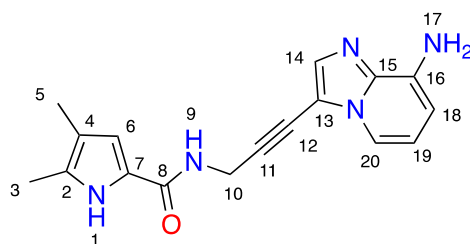
Compound **226a** was isolated from the reaction mixture of compound **226** (37 mg, 43 %).

**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 1.91 (s, 3H, H5), 2.08 (s, 3H, H3), 4.08 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H, H10), 6.51 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H, H6), 8.30 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H, H9), 11.0 (s, 1H, H1)

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10.6 (C5), 10.7 (C3), 28.3 (C10), 65.6 (C12), 76.8 (C11), 111.9 (C6), 114.6 (C4), 122.3 (C7), 128.7 (C2), 160.3 (C8)

**HMRS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>20</sub>H<sub>23</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>: 351.1821. Found: 351.1827.

***N*-(3-(8-aminoimidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)prop-2-yn-1-yl)-4,5-dimethyl-1*H*-pyrrole-2-carboxamide (227).**



Chemical Formula: C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>N<sub>5</sub>O  
Exact Mass: 307,143  
Molecular Weight: 307,357

Compound **227** was synthesized according to general procedure B using compounds **121** (150 mg, 0.85 mmol, 1.3 eq.) and **192** (300 mg, 0.65 mmol, 1eq.). Purification afforded the protected corresponding compound which was deprotected in DCM with TFA (0.3 mL) during 24 h. The mixture was then cooled down and basified with NaOH 10%. The aqueous phase was removed, the organic phase concentrated and purified by chromatography on silica gel (elution gradient from 100 to 98/2 DCM/MeOH) to afford **227** as a yellow amorphous solid (64 mg, 32 % over two steps).

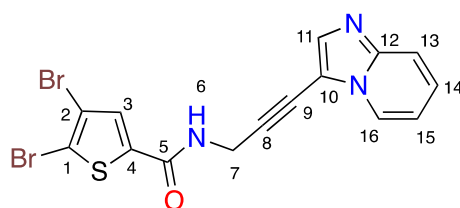
**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 1.91 (s, 3H, H5), 2.09 (s, 3H, H3), 4.37 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H, H10), 5.77 (br s, 2H, H17), 6.37 (dd, *J* = 0.9, 7.5 Hz, 1H, H18), 6.56 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, H6), 6.82 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H, H19), 7.70 (m, 2H, H14-20), 8.29 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H, H9), 11.04 (s, 1H, H1)

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10.6 (C5), 10.7 (C3), 29.9 (C10), 69.6 (C12), 97.3 (C11), 108.1 (C13), 101.8 (C18), 111.9 (C6), 112.7 (C20), 114.6 (C4), 114.8 (C19), 122.5 (C7), 128.6 (C2), 135.4 (C14), 137.5 (C16), 138.7 (C15), 160.4 (C8)

**HMRS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>N<sub>5</sub>O: 308.1511. Found: 308.1512.

**IR** (cm<sup>-1</sup>): 3230, 1621, 1607, 1523, 1491, 1263, 1231.

**4,5-dibromo-*N*-(3-(imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)prop-2-yn-1-yl)thiophene-2-carboxamide (228).**



Chemical Formula: C<sub>15</sub>H<sub>9</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>3</sub>OS  
Exact Mass: 436,883  
Molecular Weight: 439,125

Compound **228** was synthesized according to general procedure B using compounds **125** (258 mg, 0.80 mmol, 1.3 eq.) and **172** (150 mg, 0.61 mmol, 1eq.). Purification afforded the title compound as a beige amorphous solid (177 mg, 66 %).

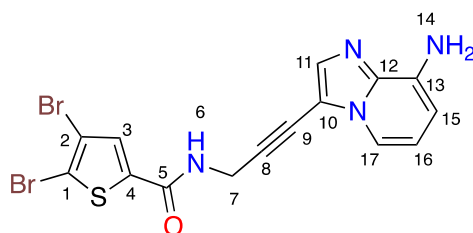
**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 4.49 (d, *J* = 5.2 Hz, 2H, H7), 7.13 (t, *J* = 6.7 Hz, 1H, H15), 7.41 (t, *J* = 6.7 Hz, 1H, H14), 7.70 (m, 1H, H13), 7.84 (s, 1H, H3), 7.95 (m, 1H, H11), 8.48 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H, H16), 9.30 (t, *J* = 5.1 Hz, 1H, H6).

**<sup>13</sup>C NMR** (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 29.8 (C7), 70.6 (C9), 96.7 (C8), 113.7 (C15), 113.9 (C2), 116.9 (C1), 117.9 (C13), 125.8 (C16), 126.1 (C14), 130.7 (C3), 140.4 (C4), 159.1 (C5). Some quaternary carbons and aromatic CH are too broad to be seen due to very slow relaxation.

**HMRS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>3</sub>OS: 439.8891. Found: 439.8889.

**IR** (cm<sup>-1</sup>): 2989, 1652, 1555, 1415, 1285, 1158.

***N*-(3-(8-aminoimidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)prop-2-yn-1-yl)-4,5-dibromothiophene-2-carboxamide (229).**



Chemical Formula: C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>4</sub>OS  
Exact Mass: 451,894  
Molecular Weight: 454,140



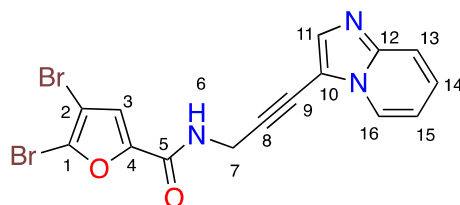
Compound **229** was synthesized according to general procedure B using compounds **125** (295 mg, 0.91 mmol, 1.2 eq.) and **192** (350 mg, 0.76 mmol, 1eq.). Purification afforded the protected corresponding compound which was deprotected in DCM with TFA (0.3 mL) overnight. The mixture was then cooled down and basified with NaOH 10%. The aqueous phase was removed, the organic phase concentrated and purified by chromatography on silica gel (elution gradient from 100 to 95/ DCM/MeOH) to afford **229** as a yellow amorphous solid (116 mg, 34 % over two steps).

**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 4.46 (d, *J* = 5.3 Hz, 2H, H7), 5.79 (br s, 2H, H14), 6.37 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H, H15), 6.84 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H, H16), 7.70 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H, H17), 7.73 (s, 1H, H11), 7.84 (s, 1H, H3), 9.29 (t, *J* = 5.1 Hz, 1H, H6).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 29.8 (C7), 70.5 (C9), 95.8 (C8), 101.9 (C15), 107.8 (C10), 112.7 (C17), 114 (C2), 115 (C16), 116.9 (C1), 130.7 (C3), 135.8 (C11), 137.5 (C13), 138.8 (C12), 140.5 (C4), 159.1 (C5).

**IR** (cm<sup>-1</sup>): 3221, 1648, 1544, 1492, 1410, 1275.

#### 4,5-dibromo-*N*-(3-(imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)prop-2-yn-1-yl)furan-2-carboxamide (**230**).



Chemical Formula: C<sub>15</sub>H<sub>9</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>

Exact Mass: 420,906

Molecular Weight: 423,064

Compound **230** was synthesized according to general procedure B using compounds **126** (94 mg, 0.31 mmol, 1.5 eq.) and **172** (50 mg, 0.21 mmol, 1eq.). Purification afforded the title compound as a white amorphous solid (30 mg, 34 %).

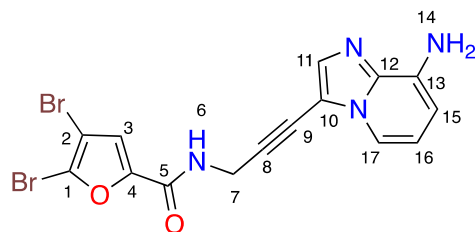
**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 4.44 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H, H7), 7.13 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H, H15), 7.40 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H, H14), 7.45 (s, 1H, H3), 7.68 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H13), 7.91 (s, 1H, H11), 8.47 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H, H16), 9.19 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H, H6).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 29.3 (C7), 69.7 (C9), 96.7 (C8), 103.3 (C2), 113.6 (C15), 117.5 (C13), 118.1 (C3), 125.4 (C16), 126.2 (C14), 126.3 (C1), 137.8 (C11), 149.1 (C4), 155.8 (C5). Some quaternary carbons and aromatic CH are too broad to be seen due to very slow relaxation.

**HMRS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>: 423.9119. Found: 423.9114.

**IR** (cm<sup>-1</sup>): 3213, 1692, 1575, 1536, 1488, 1286.

#### *N*-(3-(8-aminoimidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)prop-2-yn-1-yl)-4,5-dibromofuran-2-carboxamide (**231**).



Chemical Formula:  $C_{15}H_{10}Br_2N_4O_2$   
 Exact Mass: 435,917  
 Molecular Weight: 438,079

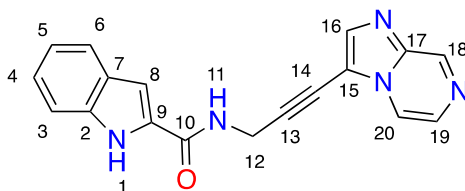
Compound **231** was synthesized according to general procedure B using compounds **126** (220 mg, 0.72 mmol, 1.1 eq.) and **192** (300 mg, 0.65 mmol, 1eq.). Purification afforded the protected corresponding compound which was deprotected in DCM with TFA (0.3 mL) during 24 h. The mixture was then cooled down and basified with NaOH 10%. The aqueous phase was removed, the organic phase concentrated and purified by chromatography on silica gel (elution gradient from 100 to 95/5 DCM/MeOH) to afford **231** as a yellow amorphous solid (95 mg, 33 % over two steps).

**$^1H$  NMR** (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  4.42 (d,  $J$  = 5.7 Hz, 2H, H7), 5.78 (br s, 2H, H14), 6.38 (dd,  $J$  = 1.1, 7.4 Hz, 1H, H15), 6.83 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 1H, H16), 7.44 (s, 1H, H3), 7.70 (m, 2H, H11-17), 9.16 (t,  $J$  = 5.4 Hz, 1H).

**$^{13}C$  NMR** (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  29.2 (C7), 70.2 (C9), 96 (C8), 101.9 (C15), 103.3 (C2), 107.9 (C10), 112.8 (C17), 114.9 (C16), 118 (C3), 126.3 (C1), 135.7 (C11), 137.5 (C13), 138.8 (C12), 149.1 (C4), 155.8 (C5).

**IR** ( $cm^{-1}$ ): 3372, 1656, 1615, 1557, 1523, 1482, 1290.

***N*-(3-(imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3-yl)prop-2-yn-1-yl)-1*H*-indole-2-carboxamide (232).**



Chemical Formula:  $C_{18}H_{13}N_5O$   
 Exact Mass: 315,1120  
 Molecular Weight: 315,3360

Compound **232** was synthesized according to general procedure B using compounds **222c** and **167**. Purification afforded the title compound as a yellow amorphous solid (170 mg, 88 %).

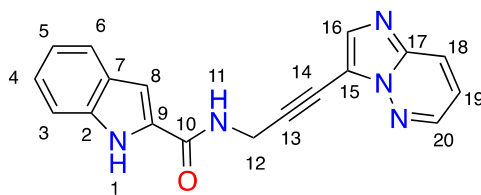
**$^1H$  NMR** (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  4.55 (d,  $J$  = 5.6 Hz, 2H, H12), 7.04 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 1H, H5), 7.19 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 1H, H4), 7.44 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1H, H3), 7.63 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1H, H6), 8.1 (d,  $J$  = 4.6 Hz, 1H, H19), 8.12 (s, 1H, H16), 8.54 (dd,  $J$  = 1.5, 4.6 Hz, 1H, H20), 9.14 (t,  $J$  = 5.6 Hz, 1H, H11), 9.16 (d,  $J$  = 1.5 Hz, 1H, H18), 11.68 (s, 1H, H1).

**$^{13}C$  NMR** (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  29.4 (C12), 68.1 (C14), 98.5 (C13), 103.1 (C8), 109 (C15), 112.4 (C3), 118.6 (C20), 119.8 (C5), 121.6 (C6), 123.5 (C4), 127 (C9), 130.5 (C19), 131 (C7), 136.6 (C2), 138.9 (C16), 140 (C17), 143.2 (C18), 161.1 (C10).

**HMRS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>N<sub>5</sub>O: 316.1198. Found: 316.1208.

**IR** (cm<sup>-1</sup>): 3252, 1638, 1550, 1468, 1310, 1270.

***N*-(3-(imidazo[1,2-*b*]pyridazin-3-yl)prop-2-yn-1-yl)-1*H*-indole-2-carboxamide (233).**



Chemical Formula: C<sub>18</sub>H<sub>13</sub>N<sub>5</sub>O  
Exact Mass: 315,1120  
Molecular Weight: 315,3360

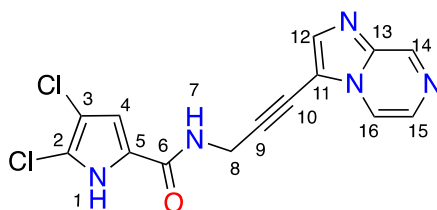
Compound **233** was synthesized according to general procedure B using compounds **222c** and **169**. Purification afforded the title compound as a yellow amorphous solid (45 mg, 19 %).

**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) 4.52 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H, H12), 7.04 (t, *J* = 7.5, 1H, H5), 7.19 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H4), 7.19 (s, 1H, H8), 7.33 (dd, *J* = 4.5, 9.3 Hz, 1H, H19), 7.44 (dd, *J* = 0.9, 8.4 Hz, 1H, H3), 7.62 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H6), 8.08 (s, 1H, H16), 8.20 (dd, *J* = 1.7, 9.3 Hz, 1H, H18), 8.63 (dd, *J* = 1.7, 4.5 Hz, 1H, H20), 9.13 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H, H11), 11.66 (s, 1H, H1).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 29.7 (C12), 69.1 (C14), 96.6 (C13), 103 (C8), 111.7 (C15), 112.3 (C3), 118.7 (C19), 119.8 (C5), 121.6 (C6), 123.5 (C4), 126 (C18), 127 (C9), 131.1(C7), 136.5 (C2), 138 (C16), 139.1 (C17), 144.7 (C20), 160.9 (C10).

**HMRS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>N<sub>5</sub>O: 316.1198. Found: 316.1157.

**4,5-dichloro-*N*-(3-(imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3-yl)prop-2-yn-1-yl)-1*H*-pyrrole-2-carboxamide (234).**



Chemical Formula: C<sub>14</sub>H<sub>9</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O  
Exact Mass: 333,018  
Molecular Weight: 334,160

Compound **234** was synthesized according to general procedure B using compounds **106** (133 mg, 0.61 mmol) and **167** (100 mg, 0.41 mmol). Purification afforded the title compound as a yellow amorphous solid (90 mg, 66 %).

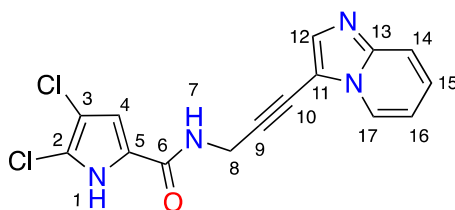
**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 4.46 (d, *J* = 5.3 Hz, 2H, H8), 6.96 (s, 1H, H4), 8.08 (m, 2H, H12-15), 8.50 (dd, *J* = 1.4, 4.7 Hz, 1H, H16), 8.79 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, H7), 9.15 (s, 1H, H14), 12.85 (br s, 1H, H1).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 29.2 (C8), 68.1 (C10), 98.4 (C9), 108.1 (C3), 109.2 (C11), 110.2 (C4), 115.4 (C2), 118.6 (C16), 124.2 (C5), 130.5 (C15), 138.9 (C12), 140 (C13), 143.2 (C14), 158.8 (C6).

**HMRS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O: 334.0262. Found: 334.0277.

IR (cm<sup>-1</sup>) : 3156, 3126, 1656, 1523, 1429, 1313.

**4,5-dichloro-*N*-(3-(imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)prop-2-yn-1-yl)-1*H*-pyrrole-2-carboxamide (235).**



Chemical Formula: C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O  
Exact Mass: 332,023  
Molecular Weight: 333,172

Compound **235** was synthesized according to general procedure B using compounds **106** (110 mg, 0.51 mmol) and **172** (124 mg, 0.51 mmol). Purification afforded the title compound as a white amorphous solid (63 mg, 37 %).

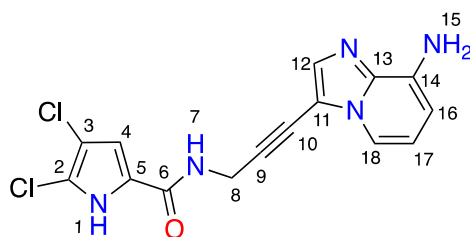
**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 4.45 (d, *J* = 5.3 Hz, 2H, H8), 6.96 (s, 1H, H4), 7.11 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H, H16), 7.40 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, H15), 7.68 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H, H14), 7.89 (s, 1H, H12), 8.45 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H, H17), 8.78 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H, H7), 12.85 (s, 1H, H1).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 29.2 (C8), 69.5 (C10), 97.2 (C9), 108.1 (C3), 110.2 (C4), 115.4 (C2), 108.1 (C11), 113.6 (C16), 117.4 (C14), 124.3 (C5), 125.3 (C17), 126.2 (C15), 137.6 (C12), 144.9 (C13), 158.8 (C6).

**HMRS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O: 333.0310. Found: 333.0354.

IR (cm<sup>-1</sup>) : 3151, 1650, 1524, 1431, 1306, 1255.

***N*-(3-(8-aminoimidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)prop-2-yn-1-yl)-4,5-dichloro-1*H*-pyrrole-2-carboxamide (236).**



Chemical Formula: C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O  
Exact Mass: 347,034  
Molecular Weight: 348,187

Compound **236** was synthesized according to general procedure B using compounds **106** (150 mg, 0.69 mmol) and **192** (317 mg, 0.69 mmol). Then the Boc-protected intermediate was dissolved in 2 mL of dry DCM under argon at 0°C. TFA (0.63 mL, 17 eq.) was added dropwise to the reaction mixture. After 2 h of reaction, 10 eq. of TFA (0.37 mL) were added to the mixture at 0°C. The reaction mixture was stirred at room temperature 7 h. The mixture was quenched with an aqueous solution of NaHCO<sub>3</sub> and extracted with DCM. Collected organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under vacuum. Flash chromatographic purification (elution by gradient

from 100 to 95/5 DCM/MeOH) afforded compound **236** as a beige amorphous solid (60 mg, 25 % over two steps).

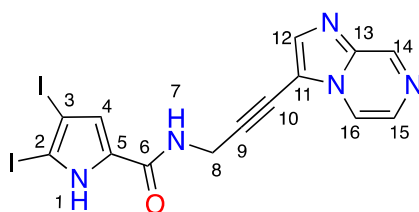
**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 4.43 (d, *J* = 5.4 Hz, 2H, H8), 5.78 (br s, 2H, H15), 6.38 (dd, *J* = 0.9, 7.6 Hz, 1H, H16), 6.83 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H, H17), 6.96 (s, 1H, H4), 7.70 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H, H18), 7.71 (s, 1H, H12), 8.76 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H, H7), 12.84 (br s, 1H, H1).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 29.2 (C8), 70.1 (C10), 96.5 (C9), 101.9 (C16), 108 (C11), 108.1 (C3), 110.1 (C4), 112.7 (C18), 114.9 (C17), 115.4 (C2), 124.3 (C5), 135.6 (C12), 137.5 (C14), 138.9 (C13), 158.8 (C6).

**HMRS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O: 348.0419. Found: 348.0457.

**IR** (cm<sup>-1</sup>): 3149, 1651, 1607, 1514, 1493, 1431.

***N*-(3-(imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3-yl)prop-2-yn-1-yl)-4,5-diiodo-1*H*-pyrrole-2-carboxamide (237).**



Chemical Formula: C<sub>14</sub>H<sub>9</sub>I<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O  
Exact Mass: 516,890  
Molecular Weight: 517,069

Compound **237** was synthesized according to general procedure B using compounds **108** (149 mg, 0.37 mmol) and **167** (70 mg, 0.29 mmol). Purification afforded the title compound as a beige amorphous solid (95 mg, 64 %).

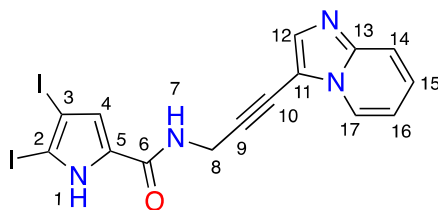
**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 4.44 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H, H8), 6.97 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, H4), 8.1 (s, 2H, H12-15), 8.50 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H, H16), 8.68 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H, H7), 9.16 (br s, 1H, H14), 12.43 (s, 1H, H1).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 29.1 (C8), 68.1 (C10), 76.3 (C3), 84.2 (C2), 98.4 (C9), 109 (C11), 118.6 (C4-C16), 130.4 (C15), 132.1 (C5), 138.9 (C12), 140.1 (C13), 143.2 (C14), 158.4 (C6).

**HMRS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>I<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O: 517.8975. Found: 517.8960.

**IR** (cm<sup>-1</sup>): 3154, 1641, 1553, 1346, 1310, 1226.

***N*-(3-(imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)prop-2-yn-1-yl)-4,5-diiodo-1*H*-pyrrole-2-carboxamide (238).**



Chemical Formula: C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>I<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O  
Exact Mass: 515,894  
Molecular Weight: 516,081

Compound **238** was synthesized according to general procedure B using compounds **108** (171 mg, 0.43 mmol) and **172** (80 mg, 0.33 mmol). Purification afforded the title compound as a beige amorphous solid (55 mg, 33 %).

**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ : 4.43 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H, H8), 6.98 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H, H4), 7.11 (t, *J* = 6.7 Hz, 1H, H16), 7.39 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, H15), 7.68 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H14), 7.89 (br s, 1H, H12), 8.45 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H, H17), 8.66 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H, H7), 12.43 (s, 1H, H1).

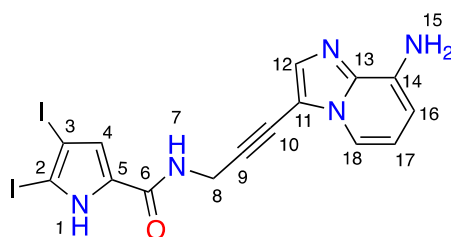
**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 29.2 (C8), 69.4 (C10), 76.2 (C3), 84.1 (C2), 97.3 (C9), 107.8 (C11), 113.6 (C16), 117.4 (C14), 118.6 (C4), 125.3 (C17), 126.2 (C15), 132.2 (C5), 137.6 (C12), 158.4 (C6).

One quaternary carbon too broad to be seen due to very slow relaxation.

**HMRS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>I<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O: 516.9022. Found: 516.906.

**IR** (cm<sup>-1</sup>) : 3148, 1643, 1562, 1383, 1305, 1231.

***N*-(3-(8-aminoimidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)prop-2-yn-1-yl)-4,5-diiodo-1*H*-pyrrole-2-carboxamide (**239**).**



Chemical Formula: C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>I<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O

Exact Mass: 530,905

Molecular Weight: 531,096

Compound **239** was synthesized according to general procedure B using compounds **108** (180 mg, 0.45 mmol) and **192** (207 mg, 0.45 mmol). Then the Boc-protected intermediate was dissolved in 2 mL of dry DCM under argon at 0°C. TFA (0.67 mL, 20 eq.) was added dropwise to the reaction mixture. After 2 h of reaction, 10 eq. of TFA (0.37 mL) were added to the mixture at 0°C. The reaction mixture was stirred 5 h at room temperature. The mixture was quenched with an aqueous solution of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and extracted with EtOAc. Collected organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under vacuum. Flash chromatographic purification (elution by gradient from 100 to 90/10 DCM/MeOH) afforded compound **239** as a beige amorphous solid (97 mg, 41 % over two steps).

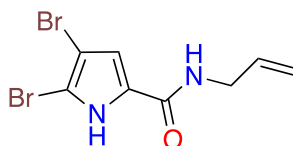
**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 4.41 (d, *J* = 5.3 Hz, 2H, H8), 5.78 (br s, 2H, H15), 6.38 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, H16), 6.82 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H17), 6.97 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H4), 7.69 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H, H18), 7.71 (s, 1H, H12), 8.65 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H, H7), 12.42 (s, 1H, H1).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 29.2 (C8), 70 (C10), 76.2 (C3), 84.1 (C2), 96.6 (C9), 101.9 (C16), 108.2 (C11), 112.7 (C18), 114.9 (C17), 118.6 (C4), 132.2 (C5), 135.5 (C12), 137.5 (C14), 139 (C13), 158.4 (C6).

**HMRS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>I<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O: 531.9131. Found: 531.9142.

**IR** (cm<sup>-1</sup>) : 3126, 1628, 1552, 1494, 1375, 1288.

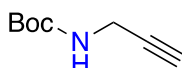
***N*-allyl-4,5-dibromo-1*H*-pyrrole-2-carboxamide (241).**



Chemical Formula: C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O  
Exact Mass: 305,900  
Molecular Weight: 307,973

Prepared according to the literature from compounds **81** and **243** (383 mg, 92 %).<sup>326</sup>

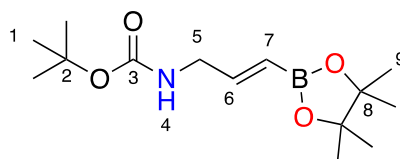
***Tert*-butyl prop-2-yn-1-ylcarbamate (254).**



Chemical Formula: C<sub>8</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub>  
Exact Mass: 155,095  
Molecular Weight: 155,197

Prepared according to the literature from compound **82** (4.39 g, 78 %).<sup>440</sup>

***Tert*-butyl(*E*)-(3-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)allyl)carbamate (255).**



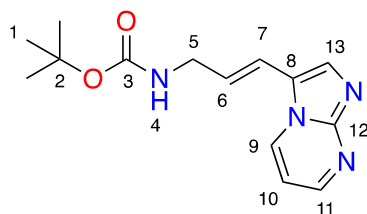
Chemical Formula: C<sub>14</sub>H<sub>26</sub>BNO<sub>4</sub>  
Exact Mass: 283,195  
Molecular Weight: 283,175

Alkyne **254** (200 mg, 1.29 mmol, 1eq.) was introduced in a dried flask and purged three times with argon. Pinacol borane (0.28 mL, 1.93 mmol, 1.5 eq.) was then added followed by Et<sub>3</sub>N (0.045 mL, 0.32 mmol, 0.25 eq.). Cp<sub>2</sub>ZrHCl (83 mg, 0.32 mmol, 0.25 eq.) was finally added. The reaction mixture was stirred under argon at 40°C for 2 days. The mixture was concentrated and purified by silica gel chromatography (elution gradient from 100 to 90/10 heptane/AcOEt) to afford **255** as a colorless oil (267 mg, 73 %).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.26 (s, 12H, H9), 1.44 (s, 9H, H1), 3.84 (s, 2H, H5), 4.63 (s, 1H, H4), 5.58 (d, *J* = 18.2 Hz, 1H, H7), 6.58 (dt, *J* = 4.5, 18.2 Hz, 1H, H6).

HMRS (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (2M+H)<sup>+</sup> C<sub>28</sub>H<sub>53</sub>B<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>: 567.3988. Found: 567.4037.

***Tert*-butyl(*E*)-(3-(imidazo[1,2-*a*]pyrimidin-3-yl)allyl)carbamate (256a).**



Chemical Formula:  $C_{14}H_{18}N_4O_2$   
 Exact Mass: 274,143  
 Molecular Weight: 274,324

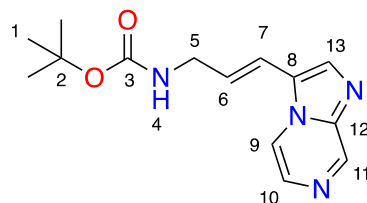
Compound **255** (106 mg, 0.37 mmol, 1.1 eq.) was dissolved in 2mL of dioxane with a degased aqueous solution of  $K_2CO_3$  2M (0.31 mL, 0.61 mmol, 1.8 eq.). It was purged three times with argon and then degased with argon.  $Pd(PPh_3)_4$  (20mg, 0.017 mmol, 5 mol %) was added followed by **79** (83.4 mg, 0.34 mmol, 1eq.). The mixture was stirred under argon at 80°C for 24 h. The mixture was quenched with water and extracted with EtOAc, washed with brine, dried over  $MgSO_4$  and concentrated. The product was purified by silica gel chromatography (elution gradient from 100 to 95/5 DCM/MeOH) to afford **256a** as a yellow amorphous solid (57 mg, 55 %).

**$^1H$  NMR** (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  1.46 (s, 9H, H1), 3.97 (t,  $J$  = 5.6 Hz, 1H, H5), 4.91 (s, 1H, H4), 6.25 (dt,  $J$  = 6, 15.7 Hz, 1H, H6), 6.59 (d,  $J$  = 15.7 Hz, 1H, H7), 6.92 (dd,  $J$  = 4, 6.9 Hz, 1H, H10), 7.88 (s, 1H, H13), 8.46 (dd,  $J$  = 2.0, 6.9 Hz, 1H, H9 or 11), 8.51 (dd,  $J$  = 2.0, 4.2 Hz, 1H, H9 or 11).

**$^{13}C$  NMR** (75 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  28.5 (C1), 42.9 (C5), 79.9 (C2), 109 (C10), 115.7 (C7), 121.6 (C8), 128.5 (C6), 131.2 (C9 or 11), 133.7 (C13), 148.9 (C12), 149.2 (C9 or 11), 155.9 (C3).

**HMRS** (ESI<sup>+</sup>)  $m/z$  Calcd for  $(M+H)^+$   $C_{14}H_{19}N_4O_2$ : 275.1508. Found: 275.1500.

#### ***Tert*-butyl(*E*)-(3-(imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3-yl)allyl)carbamate (256b).**



Chemical Formula:  $C_{14}H_{18}N_4O_2$   
 Exact Mass: 274,143  
 Molecular Weight: 274,324

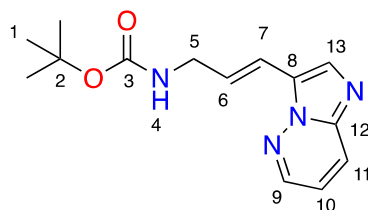
Prepared according to the same procedure as for compound **256a** from **255** and **167** to afford a yellow amorphous solid (70 mg, 47 %).

**$^1H$  NMR** (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  1.49 (s, 9H, H1), 4.01 (t,  $J$  = 5.4 Hz, 1H, H5), 4.79 (s, 1H, H4), 6.35 (dt,  $J$  = 5.9, 15.8 Hz, 1H, H6), 6.63 (d,  $J$  = 15.8 Hz, 1H, H7), 7.89 (s, 1H, H13), 7.93 (d,  $J$  = 4.6 Hz, 1H, H9 or 10), 8.03 (d,  $J$  = 4.6 Hz, 1H, H9 or 10), 9.08 (s, 1H, H11).

**HMRS** (ESI<sup>+</sup>)  $m/z$  Calcd for  $(M+H)^+$   $C_{14}H_{19}N_4O_2$ : 275.1508. Found: 275.1553.

#### ***Tert*-butyl(*E*)-(3-(imidazo[1,2-*b*]pyridazin-3-yl)allyl)carbamate (256c).**





Chemical Formula: C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>  
 Exact Mass: 274,143  
 Molecular Weight: 274,324

Prepared according to the same procedure as for compound **256a** from **255** (347 mg, 1.23 mmol, 1.5 eq.) and **169** (200 mg, 0.82 mmol, 1 eq.) to afford a yellow solid (323 mg). The compound was not completely pure but was directly involved in the further coupling.

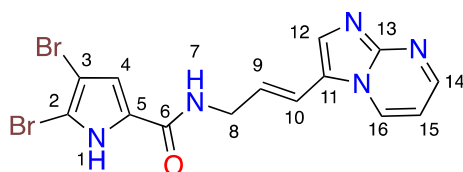
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 1.48 (s, 9H, H1), 4.01 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H, H5), 4.75 (s, 1H, H4), 6.75 (dt, *J* = 5.4, 16 Hz, 1H, H6), 6.88 (d, *J* = 16 Hz, 1H, H7), 7.07 (dd, *J* = 4.6, 9.2 Hz, 1H, H10), 7.86 (s, 1H, H13), 8.0 (dd, *J* = 1.7, 9.2 Hz, 1H, H11), 8.40 (dd, *J* = 1.7, 4.4 Hz, 1H, H9).

HMRS (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>: 275.1508. Found: 275.1494.

#### General Procedure C for Amidation (55-57).

Boc-protected amine **256a-c** (1 eq.) was dissolved in 2-6 mL of concentrated HCl under argon at room temperature. The reaction mixture was stirred 3-5 h until completion of reaction. The solvent was removed under vacuum. The residue was taken up with DMF and NaHCO<sub>3</sub> to form the free base. **14a** (1eq.) was added and the mixture was stirred overnight at room temperature. It was concentrated under vacuum and the product was purified by silica gel flash chromatography (elution by gradient from 100 to 95/5 DCM/MeOH) to yield the desired alkene.

#### (*E*)-4,5-dibromo-*N*-(3-(imidazo[1,2-*a*]pyrimidin-3-yl)allyl)-1*H*-pyrrole-2-carboxamide (**257**).



Chemical Formula: C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O  
 Exact Mass: 422,933  
 Molecular Weight: 425,084

Compound **257** was synthesized according to general procedure C using compounds **81** (108 mg, 0.29 mmol) and **256a** (80 mg, 0.29 mmol). Purification afforded the title compound as a yellow amorphous solid (52 mg, 42 %).

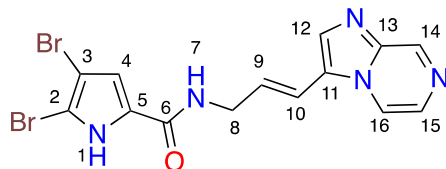
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 4.1 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H, H8), 6.38 (dt, *J* = 5.7, 16.1 Hz, 1H, H9), 6.89 (d, *J* = 16.1 Hz, 1H, H10), 7 (s, 1H, H4), 7.12 (dd, *J* = 4.4, 7 Hz, 1H, H15), 8.01 (s, 1H, H12), 8.42 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H, H7), 8.52 (dd, *J* = 1.9, 4.1 Hz, 1H, H16), 9.03 (dd, *J* = 1.9, 7.1 Hz, 1H, H14), 12.7 (s, 1H, H1).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 40.8 (C8), 97.8 (C3), 104.6 (C2), 109 (C15), 112.8 (C4), 115.6 (C10), 121.5 (C11), 127.3 (C9), 128.1 (C5), 132.4 (C12), 138.8 (C14), 148 (C13), 149.4 (C16), 158.7 (C6).

HMRS (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>Br<sub>2</sub>: 425.9388. Found: 425.9388.

IR (cm<sup>-1</sup>): 3102, 3048, 1619, 1562, 1511, 1243, 1151.

**(E)-4,5-dibromo-N-(3-(imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3-yl)allyl)-1H-pyrrole-2-carboxamide (258).**



Chemical Formula: C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O

Exact Mass: 422,933

Molecular Weight: 425,084

Compound **258** was synthesized according to general procedure C using compounds **81** (97 mg, 0.26 mmol) and **256b** (72 mg, 0.26 mmol). Purification afforded the title compound as a beige amorphous solid (57 mg, 51 %).

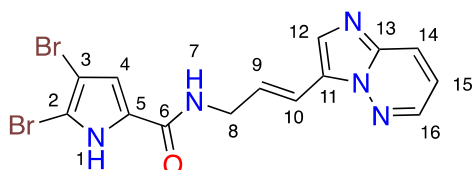
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 4.20 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H, H8), 6.59 (dt, *J* = 6, 16.1 Hz, 1H, H9), 7.06 (d, *J* = 16.1 Hz, 1H, H10), 7.12 (s, 1H, H4), 7.97 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H, H15), 8.14 (s, 1H, H12), 8.45 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H, H7), 8.7 (d, *J* = 5 Hz, 1H, H16), 9.04 (s, 1H, H14), 12.86 (s, 1H, H1).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 41.1 (C8), 98.6 (C3), 104.9 (C2), 113.1 (C4), 115.7 (C10), 117.9 (C16), 125.3 (C11), 129.6 (C9), 129.1 (C5), 130.1 (C15), 133.7 (C12), 141.2 (C13), 143.6 (C14), 159.3 (C6).

HMRS (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>Br<sub>2</sub>: 425.9388. Found: 425.9401.

IR (cm<sup>-1</sup>): 3377, 2647, 1624, 1511, 1487, 1410, 1313, 1161.

**(E)-4,5-dibromo-N-(3-(imidazo[1,2-*b*]pyridazin-3-yl)allyl)-1H-pyrrole-2-carboxamide (259).**



Chemical Formula: C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O

Exact Mass: 422,933

Molecular Weight: 425,084

Compound **259** was synthesized according to general procedure C using compounds **81** (332 mg, 0.9 mmol) and **256c** (224 mg, 0.82 mmol). Purification afforded the title compound as a beige amorphous solid (125 mg, 40 %).

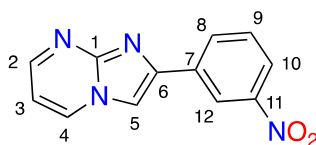
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 4.10 (t, *J* = 4.8 Hz, 1H, H8), 6.82 (m, 2H, H9-10), 7.0 (s, 1H, H4), 7.23 (dd, *J* = 4.6, 9.2 Hz, 1H, H15), 8.0 (s, 1H, H12), 8.13 (dd, *J* = 1.6, 9.2 Hz, 1H, H14), 8.49 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H, H7), 8.58 (dd, *J* = 1.5, 4.5 Hz, 1H, H16), 12.73 (s, 1H, H1).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 40.6 (C8), 97.9 (C3), 104.7 (C2), 112.7 (C4), 115.5 (C10), 116.9 (C15), 125.7 (C14), 125.8 (C11), 127.8 (C9), 128 (C5), 132.7 (C12), 139.3 (C13), 143.9 (C16), 158.7 (C6).

**HMRS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>Br<sub>2</sub>: 425.9388. Found: 425.9386.

**IR** (cm<sup>-1</sup>): 3107, 3065, 1644, 1565, 1522, 1317, 1239, 1151.

### 2-(3-nitrophenyl)imidazo[1,2-*a*]pyrimidine (**264**).



Chemical Formula: C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>

Exact Mass: 240,065

Molecular Weight: 240,222

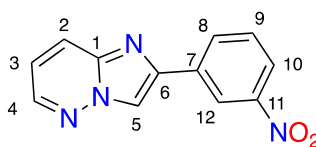
Compound **77** (1 g, 10.5 mmol, 1 eq.) was dissolved in 20 mL of EtOH under argon. 2-Bromo-3-nitroacetophenone **263** (3.33 g, 13.6 mmol, 1.3 eq.) was added. The reaction mixture was stirred at reflux 18 h. The mixture was basified with NaHCO<sub>3</sub> (aq), concentrated and purified with silica gel chromatography (elution gradient from 100 to 95/5 DCM/MeOH) to afford **264** as an orange amorphous solid (1.8 g, 71 %).

**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7.11 (dd, *J* = 4, 6.8 Hz, 1H, H3), 7.78 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, H9), 8.21 (ddd, *J* = 1.1, 2.3, 8.3 Hz, 1H, H8), 8.45 (dq, *J* = 1.1, 1.8, 7.9 Hz, 1H, H10), 8.59 (dd, *J* = 2.1, 4.2 Hz, 1H, H2), 8.62 (s, 1H, H5), 8.80 (t, *J* = 1.8 Hz, 1H, H12), 9.0 (dd, *J* = 2.1, 6.6 Hz, 1H, H4).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 109.1 (C5), 109.3 (C3), 119.9 (C12), 122.7 (C8), 130.5 (C9), 131.8 (C10), 135.2 (C6), 135.5 (C4), 142.8 (C7), 148.1 (C1), 148.4 (C11), 151.3 (C2).

**HMRS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>12</sub>H<sub>9</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>: 241.0726. Found: 241.0749.

### 2-(3-nitrophenyl)imidazo[1,2-*b*]pyridazine (**265**).



Chemical Formula: C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>

Exact Mass: 240,065

Molecular Weight: 240,222

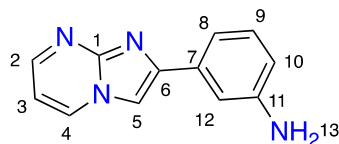
Prepared according to the literature from compound **168** (523 mg, 41 %).<sup>441</sup>

**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7.29 (dd, *J* = 4.6, 9.3 Hz, 1H, H3), 7.77 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H, H9), 8.19 (m, 2H, H2-8), 8.49 (dt, *J* = 1.5, 7.8 Hz, 1H, H10), 8.55 (dd, *J* = 1.7, 4.4 Hz, 1H, H4), 8.86 (t, *J* = 1.9 Hz, 1H, H12), 9.11 (s, 1H, H5).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 114.5 (C5), 118.5 (C3), 119.8 (C12), 122.6 (C8), 125.4 (C2), 130.4 (C9), 131.8 (C10), 135.2 (C6), 139.2 (C1), 142.1 (C7), 144.4 (C4), 148.5 (C11).

**HMRS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>12</sub>H<sub>9</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>: 241.0726. Found: 241.0712.

### 3-(imidazo[1,2-*a*]pyrimidin-2-yl)aniline (**266**).



Chemical Formula: C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>  
Exact Mass: 210,091  
Molecular Weight: 210,240

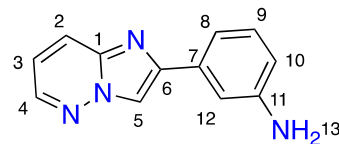
Compound **264** (1.28 g, 5.33 mmol, 1 eq.) was dissolved in 30 mL of EtOH and 7.5 mL of conc. HCl under argon. SnCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O (4.81 g, 21.32 mmol, 4 eq.) was added. The reaction mixture was stirred at reflux 30h. The mixture was basified with NaOH (5N), concentrated and purified by silica gel chromatography (elution gradient from 100 to 95/5 DCM/MeOH) to afford an orange amorphous solid (693 mg, 62 %).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 5.24 (br s, 2H, H13), 6.57 (dt, *J* = 1.8, 7.1 Hz, 1H, H10), 7.02 (dd, *J* = 4.1, 6.8 Hz, 1H, H3), 7.10 (m, 2H, H8-9), 7.28 (t, *J* = 1.8 Hz, 1H, H12), 8.21 (s, 1H, H5), 8.49 (dd, *J* = 2, 4.1 Hz, 1H, H2), 8.95 (dd, *J* = 2, 6.8 Hz, 1H, H4).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 107 (C5), 108.7 (C3), 111.3 (C12), 113.6 (C8), 114 (C10), 129.2 (C9), 133.8 (C7), 134.8 (C4), 146.2 (C6), 147.9 (C1), 149 (C11), 149.9 (C2).

HMRS (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>N<sub>4</sub>: 211.0984. Found: 211.0977.

### 3-(imidazo[1,2-*b*]pyridazin-2-yl)aniline (**267**).



Chemical Formula: C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>  
Exact Mass: 210,091  
Molecular Weight: 210,240

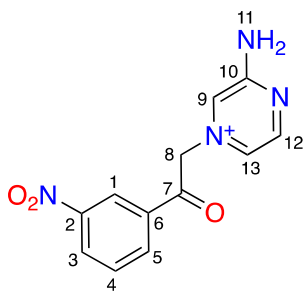
Prepared according to the same procedure as for compound **266** from **265** (317 mg, 78 %).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 5.15 (br s, 2H, H13), 6.57 (ddd, *J* = 1.1, 2.3, 7.6 Hz, 1H, H10), 7.09 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, H9), 7.17 (m, 1H, H8), 7.19 (m, 1H, H3), 7.32 (t, *J* = 1.9 Hz, 1H, H12), 8.08 (ddd, *J* = 0.6, 1.5, 9.3 Hz, 1H, H2), 8.46 (dd, *J* = 1.5, 4.6 Hz, 1H, H4), 8.65 (d, *J* = 0.6 Hz, 1H, H5).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 111.2 (C12), 112.6 (C5), 113.7 (C8), 114 (C10), 117.4 (C3), 124.8 (C2), 129.2 (C9), 133.8 (C7), 138.7 (C1), 143.6 (C4), 145.5 (C6), 148.9 (C11).

HMRS (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>N<sub>4</sub>: 211.0984. Found: 211.0979.

### 3-amino-1-(2-(3-nitrophenyl)-2-oxoethyl)pyrazin-1-ium (**269**).



Chemical Formula:  $C_{12}H_{11}N_4O_3^+$   
 Exact Mass: 259,083  
 Molecular Weight: 259,244

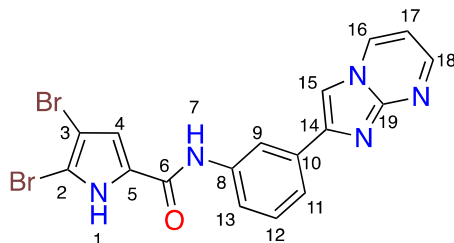
Compounds **169** (50 mg, 0.53 mmol, 1 eq.) and **263** (129 mg, 0.53 mmol, 1 eq.) were dissolved in 1 mL of ACN under argon at room temperature. The mixture was stirred overnight. The precipitate was filtered, washed with DCM to afford **269** as a beige amorphous solid (189 mg, quant.).

$^1\text{H NMR}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  6.47 (s, 2H, H8), 7.97 (t,  $J$  = 8.0 Hz, 1H, H4), 8.04 (dd,  $J$  = 1.0, 3.5 Hz, 1H, H13), 8.09 (s, 1H, H9), 8.14 (br s, 2H, H11), 8.47 (dt,  $J$  = 1.2, 8.0 Hz, 1H, H5), 8.61 (ddd,  $J$  = 1.0, 2.4, 8.3 Hz, 1H, H3), 8.74 (t,  $J$  = 1.9 Hz, 1H, H1), 8.79 (d,  $J$  = 3.5 Hz, 1H, H12).

$^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  66.7 (C8), 122.6 (C1), 123.8 (C13), 125.3 (C9), 128.7 (C3), 131 (C4), 134.4 (C5), 134.9 (C6), 148.1 (C2), 149.3 (C12), 158.7 (C10), 188.7 (C7).

HMRS (ESI $^+$ )  $m/z$  Calcd for  $(\text{M}+\text{H})^+ C_{12}H_{11}N_4O_3$ : 259.0831. Found: 259.0849.

#### 4,5-dibromo-*N*-(3-(imidazo[1,2-*a*]pyrimidin-2-yl)phenyl)-1*H*-pyrrole-2-carboxamide (**275**).



Chemical Formula:  $C_{17}H_{11}Br_2N_5O$   
 Exact Mass: 458,933  
 Molecular Weight: 461,117

Compound **266** (50 mg, 0.24 mmol, 1 eq.) was dissolved in 1 mL of  $\text{Et}_3\text{N}$  under argon. Pyrrole **81** (114 mg, 0.31 mmol, 1.3 eq.) was added to the mixture. The reaction mixture was stirred at 60°C overnight. The solvent was removed under vacuum and the product was purified by silica gel flash chromatography (elution by gradient from 100 to 98/2 DCM/MeOH) to yield **275** as a yellow amorphous solid (54 mg, 49 %).

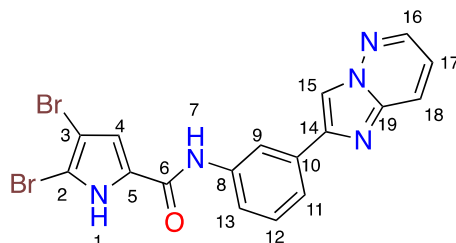
$^1\text{H NMR}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  7.07 (dd,  $J$  = 4.1, 6.9 Hz, 1H, H17), 7.30 (d,  $J$  = 2.7 Hz, 1H, H4), 7.43 (t,  $J$  = 7.7 Hz, 1H, H12), 7.69 (dt,  $J$  = 1.1, 8.2 Hz, 1H, H13 or 11), 7.83 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 1H, H13 or 11), 8.33 (s, 1H, H15), 8.35 (t,  $J$  = 1.8 Hz, 1H, H9), 8.54 (dd,  $J$  = 2.1, 4.1 Hz, 1H, H18), 8.98 (dd,  $J$  = 2.1, 6.7 Hz, 1H, H16), 9.99 (s, 1H, H7), 12.91 (s, 1H, H1).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 98.2 (C3), 105.9 (C2), 107.5 (C15), 108.9 (C17), 113.9 (C4), 117.3 (C9), 119.7 (C13), 120.8 (C11), 127.9 (C5), 129.2 (C12), 133.9 (C10), 135.1 (C16), 139.4 (C8), 145.1 (C14), 148 (C19), 150.4 (C18), 157.4 (C6).

**HMRS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>N<sub>5</sub>OBr<sub>2</sub>: 461.9388. Found: 461.9412.

**IR** (cm<sup>-1</sup>): 3149, 1610, 1558, 1400, 1223, 1198.

#### 4,5-dibromo-*N*-(3-(imidazo[1,2-*b*]pyridazin-2-yl)phenyl)-1*H*-pyrrole-2-carboxamide (276).



Chemical Formula: C<sub>17</sub>H<sub>11</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O

Exact Mass: 458,933

Molecular Weight: 461,117

Compound **274** (100 mg, 0.37 mmol, 1 eq.) was dissolved in 1 mL of anhydrous DCM and a few drops of DMF under argon atmosphere. (COCl)<sub>2</sub> (130 μL, 1.49 mmol, 4eq.) was added to the mixture. The mixture was stirred overnight. The solvent was removed under vacuum and 1 mL of pyridine and 2 mL of DCM were added followed by compound **267** (86 mg, 0.41 mmol, 1.1eq.). It was stirred at room temperature for 6 h. The reaction mixture was concentrated with toluene and purified by silica gel flash chromatography (elution by gradient from 100 to 90/10/MeOH) to afford **276** as a beige amorphous solid (77 mg, 72 %).

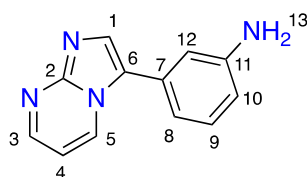
**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ : 7.24 (dd, *J* = 4.5, 9.2 Hz, 1H, H17), 7.3 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H4), 7.42 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, H12), 7.74 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H11), 7.81 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H13), 8.13 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H, H18), 8.40 (s, 1H, H9), 8.50 (dd, *J* = 1.5, 4.4 Hz, 1H, H16), 8.78 (s, 1H, H15), 9.98 (br s, 1H, H7), 12.9 (br s, 1H, H1).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 98.2 (C3), 105.9 (C2), 113.1 (C15), 113.9 (C4), 117.2 (C9), 117.8 (C17), 119.7 (C13), 121 (C11), 125 (C18), 127.9 (C5), 129.1 (C12), 133.8 (C10), 138.9 (C19), 139.3 (C8), 143.9 (C16), 144.4 (C14), 157.3 (C6).

**HMRS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>N<sub>5</sub>OBr<sub>2</sub>: 461.9388. Found: 461.9420.

**IR** (cm<sup>-1</sup>): 3142, 1646, 1559, 1426, 1338, 1236.

#### 3-(imidazo[1,2-*a*]pyrimidin-3-yl)aniline (280a).



Chemical Formula: C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>

Exact Mass: 210,091

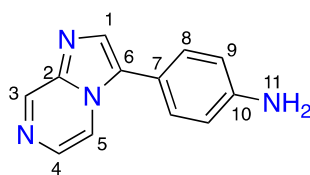
Molecular Weight: 210,240

Compound **79** (400 mg, 1.63 mmol, 1 eq) was dissolved in 3 mL of dioxane and 1 mL of H<sub>2</sub>O with K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (693 mg, 3.26 mmol, 2 eq.). The solution was degassed with bubbling argon. (3-nitrophenyl)boronic acid **277** (327 mg, 1.96 mmol, 1.2 eq.) was added followed by Pd-118 (53.2 mg, 0.081 mmol, 5 mol%). The mixture was stirred at 80°C for 18 h. The reaction mixture was concentrated under vacuum. Flash chromatographic purification of the crude (elution by gradient from 100 to 95/5 DCM/MeOH) afforded **279a** as a yellow amorphous solid (165 mg, 42 %). Then **279a** (163 mg, 0.68 mmol, 1 eq.) was dissolved in 10 mL of EtOH and 2 mL of HCl conc. SnCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (612 mg, 2.71 mmol, 4 eq.) was added. The mixture was stirred at reflux 2 h. The mixture was concentrated, basified with NaOH (5N) and extracted with EtOAc. The combined organic phases were dried over MgSO<sub>4</sub> and purified with silica gel column chromatography (elution by gradient from 100 to 95/5 DCM/MeOH) to afford **280a** as a yellow amorphous solid (140 mg, 98 %).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3.39 (br s, 2H, H13), 6.78 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H8 or 10), 6.85 (s, 1H, H12), 6.91 (m, 2H, H4 and H8 or 10), 7.33 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, H9), 7.89 (s, 1H, H1), 8.58 (m, 1H, H3), 8.71 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, H5).

HMRS (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>N<sub>4</sub>: 211.0984. Found: 211.0984.

#### 4-(imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3-yl)aniline (**280b**).



Chemical Formula: C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>  
Exact Mass: 210,091  
Molecular Weight: 210,240

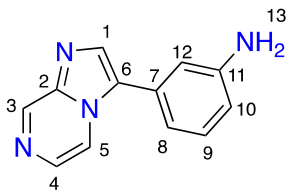
The preparation of compound **280b** was done as **280a** from compounds **167** (400 mg, 1.63 mmol, 1 eq.) and (4-nitrophenyl)boronic acid **278** (170 mg, 50 % over two steps).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 5.5 (s, 2H, H11), 6.74 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H9), 7.36 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H8), 7.85 (s, 1H, H1), 7.86 (d, *J* = 4.7 Hz, 1H, H4), 8.46 (dd, *J* = 1.6, 4.8 Hz, 1H, H5), 9.05 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, H3).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 114.2 (C9), 117.2 (C5), 127.4 (C7), 128.7 (C8), 129.3 (C4), 131.5 (C6), 133 (C1), 140.3 (C2), 143.3 (C3), 149.4 (C10).

HMRS (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>N<sub>4</sub>: 211.0984. Found: 211.0998.

#### 3-(imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3-yl)aniline (**280c**).



Chemical Formula: C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>  
 Exact Mass: 210,091  
 Molecular Weight: 210,240

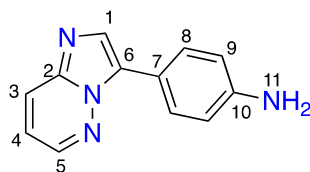
The preparation of **280c** was done according the described procedure in the literature from compounds **167** and (3-nitrophenyl)boronic acid **277**,<sup>350</sup> followed by the reduction according to the same procedure as for compound **280a** (236 mg, 69 % over two steps).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 5.32 (br s, 2H, H13), 6.68 (dd, *J* = 2.3, 8.1 Hz, 1H, H10), 6.82 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H8), 6.88 (t, *J* = 1.9 Hz, 1H, H12), 7.21 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, H9), 7.92 (d, *J* = 4.7 Hz, H4), 7.94 (s, 1H, H1), 8.54 (dd, *J* = 1.5, 4.7 Hz, 1H, H5), 9.11 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H3).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 112.4 (C12), 114.3 (C10), 114.8 (C8), 117.4 (C5), 127.1 (C7), 128 (C6), 129.6 (C4), 129.9 (C9), 133.9 (C1), 140.7 (C2), 143.6 (C3), 149.5 (C11).

HMRS (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>N<sub>4</sub>: 211.0984. Found: 211.0998.

#### 4-(imidazo[1,2-*b*]pyridazin-3-yl)aniline (**280d**).



Chemical Formula: C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>  
 Exact Mass: 210,091  
 Molecular Weight: 210,240

The preparation of **280d** was done as **280a** from compounds **169** (400 mg, 1.63 mmol, 1 eq.) and (4-nitrophenyl)boronic acid **278** (409 mg, 2.45 mmol, 1.5 eq.) to afford a yellow amorphous solid (131 mg, 38 % over two steps).

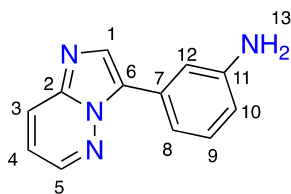
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 5.38 (s, 2H, H11), 6.68 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H9), 7.18 (dd, *J* = 4.6, 9.1 Hz, 1H, H4), 7.80 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H8), 8.02 (s, 1H, H1), 8.13 (dd, *J* = 1.6, 9.2 Hz, 1H, H3), 8.56 (dd, *J* = 1.5, 4.4 Hz, 1H, H5).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 113.8 (C9), 115.8 (C7), 115.9 (C4), 125.8 (C3), 127.7 (C8), 128.6 (C6), 130.8 (C1), 138.9 (C2), 143.6 (C5), 148.8 (C10).

HMRS (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>N<sub>4</sub>: 211.0984. Found: 211.0987.

#### 3-(imidazo[1,2-*b*]pyridazin-3-yl)aniline (**280e**).



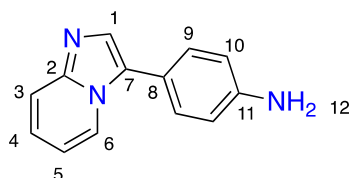


Chemical Formula: C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>  
 Exact Mass: 210,091  
 Molecular Weight: 210,240

The preparation of **280e** was done as **280a** from compounds **169** (400 mg, 1.63 mmol, 1 eq.) and (3-nitrophenyl)boronic acid **277** (409 mg, 2.45 mmol, 1.5 eq.) to afford **280e** as a yellow amorphous solid (200 mg, 72 %).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 5.27 (br s, 2H, H13), 6.61 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H10), 7.15 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, H9), 7.22 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H8), 7.29 (dd, *J* = 4.3, 9.1 Hz, 1H, H4), 7.34 (t, *J* = 1.5 Hz, 1H, H2), 8.08 (s, 1H, H1), 8.22 (dd, *J* = 1.5, 9.2 Hz, 1H, H3), 8.63 (dd, *J* = 1.5, 4.5 Hz, 1H, H5).

#### 4-(imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)aniline (**280f**).

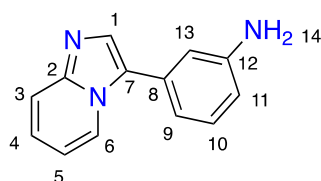


Chemical Formula: C<sub>13</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>  
 Exact Mass: 239,069  
 Molecular Weight: 239,234

The preparation of **280f** was done as **280a** from compounds **172** (400 mg, 1.64 mmol, 1 eq.) and (4-nitrophenyl)boronic acid **278** (356 mg, 2.13 mmol, 1.3 eq.). Purification of the title compound afforded **280f** as a brown oil (163 mg, 42 % over two steps).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 5.39 (br s, 2H, H12), 6.71 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H10), 6.89 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H, H5), 7.22 (t, *J* = 8.6 Hz, 1H, H4), 7.27 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H9), 7.55 (m, 2H, H3-1), 8.39 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H, H6).

#### 3-(imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)aniline (**280g**).



Chemical Formula: C<sub>13</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>  
 Exact Mass: 239,069  
 Molecular Weight: 239,234

The preparation of **280g** was done as **280a** from compounds **172** (400 mg, 1.64 mmol, 1 eq.) and (3-nitrophenyl)boronic acid **277** (356 mg, 2.13 mmol, 1.3 eq.). Purification of the title compound afforded **280g** as a brown amorphous solid (187 mg, 48 % over two steps).

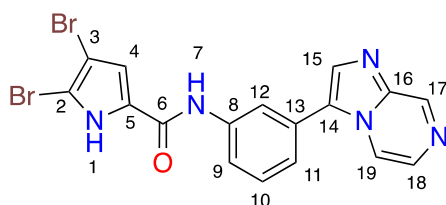
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 5.27 (br s, 2H, H14), 6.63 (ddd, *J* = 1.0, 2.2, 8.1 Hz, 1H, H11), 6.75 (dt, *J* = 1.0, 7.5 Hz, 1H, H9), 6.82 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H, H13), 6.95 (td, *J* = 1.3, 6.9 Hz, 1H, H5), 7.18 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, H10), 7.27 (ddd, *J* = 1.3, 6.6, 9.0 Hz, 1H, H4), 7.62 (dt, *J* = 1.1, 9.3 Hz, 1H, H3), 7.64 (s, 1H, H1), 8.51 (dt, *J* = 1.1, 7.0 Hz, 1H, H6).

HMRS (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>13</sub>H<sub>12</sub>N<sub>3</sub>: 210.1031. Found: 210.1006.

#### General Procedure D for Amidation with T<sub>3</sub>P.

4,5-dibromo-1H-pyrrole-2-carboxylic acid **274** (1eq.) was dissolved in EtOAc and pyridine (3eq.). T<sub>3</sub>P (1.5eq.) was added to the mixture. After 10 min, the corresponding aniline (1.1 eq.) was added with a few drops of DMF to have an homogeneous mixture. The reaction mixture was stirred at room temperature overnight. The solvent was removed under vacuum and the product and purified by silica gel flash chromatography (elution by gradient from 100 to 90/10 DCM/MeOH) to afford the desired product.

#### 4,5-dibromo-*N*-(3-(imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3-yl)phenyl)-1H-pyrrole-2-carboxamide (**284**).



Chemical Formula: C<sub>17</sub>H<sub>11</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O  
Exact Mass: 458,933  
Molecular Weight: 461,117

The title compound was synthesized according to general procedure D using compound **280c** (43 mg, 0.20 mmol) yielding **284** as a beige amorphous solid (55 mg, 64 %).

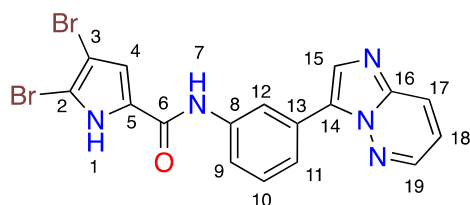
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 6.92 (br s, 1H, H4), 7.36 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, H11), 7.5 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, H10), 7.88 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, H9), 7.97 (d, *J* = 4.7 Hz, 1H, H18), 8.06 (s, 1H, H15), 8.12 (t, *J* = 1.9 Hz, 1H, H12), 8.67 (dd, *J* = 1.4, 4.8 Hz, 1H, H19), 9.15 (s, 1H, H17), 9.77 (s, 1H, H7), 13.05 (br s, 1H, H1).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 113.7 (C4), 117.5 (C19), 117.8 (C12), 119.3 (C9), 121.6 (C11), 126.4 (C14), 127.8 (C13), 129.7 (C10), 129.8 (C18), 134.4 (C15), 140.4 (C8), 140.9 (C16), 143.7 (C17), 159.8 (C6). Some quaternary carbons and aromatic CH are too broad to be seen due to very slow relaxation.

HMRS (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>N<sub>5</sub>OBr<sub>2</sub>: 461.9388. Found: 461.9385.

IR (cm<sup>-1</sup>): 2974, 1671, 1595, 1522, 1418, 1305.

#### 4,5-dibromo-*N*-(3-(imidazo[1,2-*b*]pyridazin-3-yl)phenyl)-1H-pyrrole-2-carboxamide (**285**).



Chemical Formula: C<sub>17</sub>H<sub>11</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O  
 Exact Mass: 458,933  
 Molecular Weight: 461,117

The title compound was synthesized according to general procedure D using compound **280e** (86 mg, 0.41 mmol) yielding **285** as a beige amorphous solid (45 mg, 26 %).

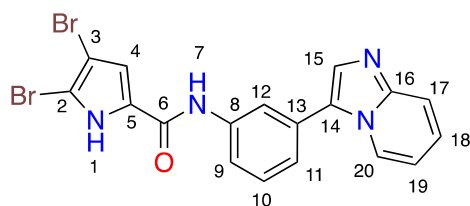
**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7.31 (m, 1H, H18), 7.34 (s, 1H, H4), 7.48 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, H10), 7.80 (br s, 1H, H11), 7.83 (br s, 1H, H9), 8.21 (m, 1H, H15), 8.23 (m, 1H, H17), 8.55 (s, 1H, H12), 8.65 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H, H19), 10.25 (s, 1H, H7), 13.07 (s, 1H, H1).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 98.2 (C3), 105.8 (C2), 114.4 (C4), 127.9 (C5), 117.2 (C18), 117.9 (C12), 119.6 (C9), 121.7 (C11), 126.1 (C17), 127.3 (C13), 128.8 (C8), 129 (C10), 132.8 (C15), 139.2 (C14), 140.2 (C16), 143.9 (C19), 157.4 (C6).

**HMRS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>N<sub>5</sub>OBr<sub>2</sub>: 461.9388. Found: 461.9383.

**IR** (cm<sup>-1</sup>): 3157, 1665, 1562, 1433, 1291, 1233.

#### 4,5-dibromo-*N*-(3-(imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)phenyl)-1*H*-pyrrole-2-carboxamide (**286**).



Chemical Formula: C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O  
 Exact Mass: 457,938  
 Molecular Weight: 460,129

The title compound was synthesized according to general procedure D using compound **280g** (182 mg, 0.87 mmol) yielding **286** as a beige amorphous solid (225 mg, 56 %).

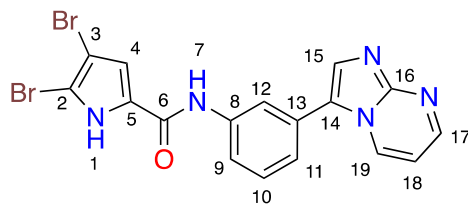
**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7.0 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H, H19), 7.29 (s, 1H, H4), 7.30 (m, 1H, H18), 7.37 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H11), 7.52 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, H10), 7.68 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H, H17), 7.78 (s, 1H, H15), 7.80 (m, 1H, H9), 8.08 (s, 1H, H12), 8.62 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H, H20), 10.12 (s, 1H, H7), 13.02 (s, 1H, H1).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 98.2 (C3), 106.1 (C2), 113 (C19), 114.2 (C4), 117.7 (C17), 118.3 (C12), 119.2 (C9), 122.5 (C11), 124 (C18), 124.6 (C20), 125 (C13), 127.8 (C5), 129.2 (C8), 129.8 (C10), 132.5 (C15), 139.6 (C14), 145.6 (C16), 157.5 (C6).

**HMRS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>18</sub>H<sub>13</sub>N<sub>4</sub>OBr<sub>2</sub>: 460.9436. Found: 460.9459.

**IR** (cm<sup>-1</sup>): 3158, 1661, 1609, 1523, 1422, 1233.

**4,5-dibromo-*N*-(3-(imidazo[1,2-*a*]pyrimidin-3-yl)phenyl)-1*H*-pyrrole-2-carboxamide (287).**



Chemical Formula: C<sub>17</sub>H<sub>11</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O  
Exact Mass: 458,933  
Molecular Weight: 461,117

The title compound was synthesized according to general procedure D using compound **280a** (100 mg, 0.48 mmol) yielding **287** as a beige amorphous solid (80 mg, 36 %).

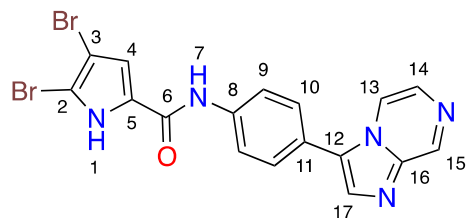
**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 7.06 (dd, *J* = 4.3, 6.8 Hz, 1H, H18), 7.31 (s, 1H, H4), 7.43 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, H10), 7.69 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H11), 7.83 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H9), 8.33 (s, 1H, H15), 8.36 (s, 1H, H12), 8.54 (dd, *J* = 2.0, 4.2 Hz, 1H, H17), 8.98 (dd, *J* = 2.0, 6.7 Hz, 1H, 19), 10.01 (s, 1H, H7), 12.92 (s, 1H, H1).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 98.2 (C3), 105.9 (C2), 107.5 (C15), 108.9 (C18), 114 (C4), 117.3 (C12), 119.7 (C9), 120.8 (C11), 127.9 (C5), 129.1 (C10), 133.8 (C13), 135.1 (C19), 139.4 (C8), 145.1 (C14), 148 (C16), 150.4 (C17), 157.3 (C6).

**HMRS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>N<sub>5</sub>OBr<sub>2</sub>: 461.9388. Found: 461.9412.

**IR** (cm<sup>-1</sup>): 3188, 1667, 1612, 1560, 1416, 1222.

**4,5-dibromo-*N*-(4-(imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3-yl)phenyl)-1*H*-pyrrole-2-carboxamide (288).**



Chemical Formula: C<sub>17</sub>H<sub>11</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O  
Exact Mass: 458,933  
Molecular Weight: 461,117

The title compound was synthesized according to general procedure D using compound **280b** (43 mg, 0.20 mmol) yielding **288** as a beige amorphous solid (44 mg, 51 %).

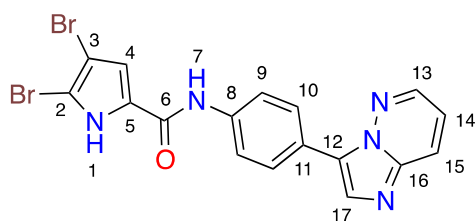
**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) 7.17 (s, 1H, H4), 7.70 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H10), 7.94 (m, 3H, H9 and H14), 8.02 (s, 1H, H17), 8.61 (d, *J* = 4.7 Hz, 1H, H13), 9.12 (br s, 1H, H7), 12.86 (br s, 1H, H1).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 97.6 (3), 107.4 (C2), 114 (C4), 117.5 (C13), 120.1 (C9), 122 (C11 or 12), 126.2 (C11 or 12), 128.1 (C10), 128.6 (C5), 129.7 (C14), 134.1 (C17), 139.5 (C8), 140.7 (C16), 143.5 (C15), 158.2 (C6).

**HMRS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>N<sub>5</sub>OBr<sub>2</sub>: 461.9388. Found: 461.9369.

**IR** (cm<sup>-1</sup>): 3177, 1639, 1524, 1412, 1332.

**4,5-dibromo-*N*-(4-(imidazo[1,2-*b*]pyridazin-3-yl)phenyl)-1*H*-pyrrole-2-carboxamide (289).**



Chemical Formula: C<sub>17</sub>H<sub>11</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O  
Exact Mass: 458,933  
Molecular Weight: 461,117

The title compound was synthesized according to general procedure D using compound **280d** (123 mg, 0.59 mmol) yielding **289** as a beige amorphous solid (98 mg, 40 %).

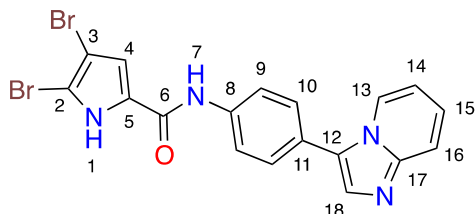
**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 7.28 (m, 2H, H4-14), 7.87 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, H9), 8.15 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, H10), 8.20 (dd, *J* = 1.6, 8.9 Hz, 1H, H15), 8.24 (s, 1H, H17), 8.64 (dd, *J* = 1.6, 4.5 Hz, 1H, H13), 10.0 (s, 1H, H7), 12.95 (s, 1H, H1).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 98.2 (C3), 106.1 (C2), 114 (C4), 116.8 (C14), 119.9 (C9), 123.5 (C11), 126 (C15), 126.7 (C10), 127.2 (C12), 127.9 (C5), 132.3 (C17), 138.4 (C8), 139.6 (C16), 143.8 (C13), 157.3 (C6).

**HMRS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>N<sub>5</sub>OBr<sub>2</sub>: 461.9388. Found: 461.9390.

**IR** (cm<sup>-1</sup>): 3179, 1637, 1598, 1525, 1409, 1333, 1159, 1022.

**4,5-dibromo-*N*-(4-(imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)phenyl)-1*H*-pyrrole-2-carboxamide (290).**



Chemical Formula: C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O  
Exact Mass: 457,938  
Molecular Weight: 460,129

The title compound was synthesized according to general procedure D using compound **280f** (161 mg, 0.77 mmol), yielding **290** as a beige amorphous solid (140 mg, 40 %).

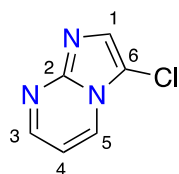
**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 6.97 (t, *J* = 6.7 Hz, 1H, H14), 7.29 (m, 2H, H4-15), 7.65 (d, *J* = 8.0 Hz, 3H, H10-16), 7.75 (s, 1H, H18), 7.93 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, H9), 8.57 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H, H13), 10.05 (s, 1H, H7), 12.99 (s, 1H, H1).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 98.2 (C3), 106.1 (C2), 112.8 (C14), 114.1 (C4), 117.4 (C16), 120.4 (C9), 123.7 (C11), 124.1 (C13), 124.5 (C15), 124.9 (C12), 127.8 (C5), 128 (C10), 132 (C18), 138.6 (C8), 145.2 (C17), 157.4 (C6).

**HMRS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>18</sub>H<sub>13</sub>N<sub>4</sub>OBr<sub>2</sub>: 460.9436. Found: 460.9435.

IR (cm<sup>-1</sup>): 3169, 1634, 1595, 1410, 1310, 1030.

### 3-chloroimidazo[1,2-*a*]pyrimidine (294).



Chemical Formula: C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>ClN<sub>3</sub>

Exact Mass: 153,009

Molecular Weight: 153,569

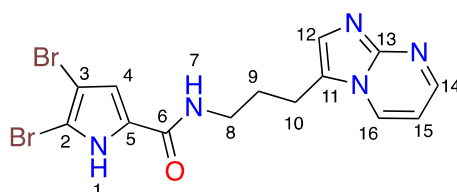
Compound **78** (1 g, 10.5 mmol, 1 eq.) was dissolved in 30 mL of EtOH under argon atmosphere. Chloroacetaldehyde (2 mL, 15.8 mmol, 1.5 eq.) was added. The mixture was stirred at reflux during 4.5 h. The mixture was basified with NaHCO<sub>3</sub> (aq), extracted with DCM, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated. It was then dissolved in 20 mL of DCM, and NCS (1.55 g, 11.6 mmol, 1.1 eq.) was added. It was stirred overnight at room temperature. The mixture was concentrated and purified by silica gel flash chromatography (elution by gradient from 100 to 95/5 DCM/MeOH) to afford the desired product. Although the reaction was quantitative, there was a lot of residual succinimide, which was removed by water washing to isolate pure **294** as a beige amorphous solid (0.5 g, 31 %).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7.23 (dd, *J* = 4.1, 7.0 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 7.88 (s, 1H, H<sub>1</sub>), 8.63 (dd, *J* = 2.1, 4.1 Hz, 1H, H<sub>3</sub>), 8.84 (dd, *J* = 2.1, 6.8 Hz, 1H, H<sub>5</sub>)

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 107.5 (C<sub>6</sub>), 109.6 (C<sub>4</sub>), 131.2 (C<sub>1</sub>), 132 (C<sub>5</sub>), 146.5 (C<sub>2</sub>), 150.4 (C<sub>3</sub>)

HMRS (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>N<sub>3</sub>Cl: 154.0172. Found: 154.0160.

### 4,5-dibromo-*N*-(3-(imidazo[1,2-*a*]pyrimidin-3-yl)propyl)-1*H*-pyrrole-2-carboxamide (296).



Chemical Formula: C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O

Exact Mass: 424,949

Molecular Weight: 427,100

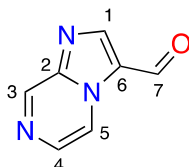
A solution of bromine (50 μL, 0.96 mmol, 2.0 eq.) in 2 mL of DCM was added dropwise over 30 min to a solution of compound **301** (130 mg, 0.48 mmol, 1.0 eq.) in DCM (10 mL). At the end of addition, the reaction mixture was washed with a saturated solution of NaHCO<sub>3</sub> and extracted four times with DCM. The organic layers were collected and dried over MgSO<sub>4</sub>. The solvents were removed under reduced pressure. Purification by column chromatography on silicagel (DCM saturated in ammonia/MeOH 99/1 to 95/5) yielded **302** as a yellow amorphous solid (33 mg, 16 %) and eq.as a yellow amorphous solid (14 mg, 7 %).

**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 2.05 (m, 2H, H<sub>9</sub>), 2.99 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, H<sub>10</sub>), 3.44 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, H<sub>8</sub>), 6.78 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 7.07 (dd, *J* = 4.0, 6.8 Hz, 1H, H<sub>15</sub>), 7.59 (s, 1H, H<sub>12</sub>), 8.53 (dd, *J* = 1.6, 4.0 Hz, 1H, H<sub>16</sub>), 8.73 (dd, *J* = 1.6, 6.8 Hz, 1H, H<sub>14</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 21.8 (C<sub>10</sub>), 28.1 (C<sub>9</sub>), 39.9 (C<sub>8</sub>), 100.1 (C<sub>3</sub>), 106.2 (C<sub>2</sub>), 110.1 (C<sub>15</sub>), 114.3 (C<sub>4</sub>), 125.0 (C<sub>11</sub>), 129.0 (C<sub>5</sub>), 132.1 (C<sub>12</sub>), 134.0 (C<sub>14</sub>), 149.6 (C<sub>13</sub>), 151.1 (C<sub>16</sub>), 162.0 (6).

**HMRS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>N<sub>5</sub>Br<sub>2</sub>: 425.9565. Found: 425.9571.

### Imidazo[1,2-*a*]pyrazine-3-carbaldehyde (**307**).

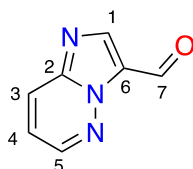


Chemical Formula: C<sub>7</sub>H<sub>5</sub>N<sub>3</sub>O  
Exact Mass: 147,043  
Molecular Weight: 147,137

Dry DMF (0.23 mL, 3.5 eq.) and POCl<sub>3</sub> (241 μL, 2.52 mmol, 3 eq.) were stirred under argon at room temperature. Compound **166** (100 mg, 0.84 mmol, 1 eq.) in 0.5 mL of dry DMF was added to the mixture, and stirred at 100 °C overnight. The reaction was quenched with ice and filtered to afford **307** as a clear solid (22 mg, 18 %).

**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.30 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 8.69 (s, 1H, H<sub>1</sub>), 9.26 (dd, *J* = 1.3, 4.4 Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 9.39 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H, H<sub>3</sub>), 10.11 (s, 1H, H<sub>7</sub>).

### Imidazo[1,2-*b*]pyridazine-3-carbaldehyde (**308**).

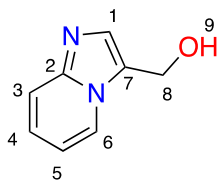


Chemical Formula: C<sub>7</sub>H<sub>5</sub>N<sub>3</sub>O  
Exact Mass: 147,043  
Molecular Weight: 147,137

Compound **308** was synthesized as for **307** from compound **306** (100 mg, 0.84 mmol, 1 eq.). The crude was not purified and analyzed by NMR which indicated a 5:1 ratio between **306** and the expected product **308** (17 %).

**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 7.59 (dd, *J* = 4.6, 9.2 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 8.37 (dd, *J* = 1.7, 9.2 Hz, 1H, H<sub>3</sub>), 8.80 (dd, *J* = 1.7, 4.6 Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 10.23 (s, 1H, H<sub>7</sub>). H<sub>1</sub> not visible, probably hidden by the signals of **306**.

### Imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-ylmethanol (**309**).



Chemical Formula: C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>N<sub>2</sub>O  
 Exact Mass: 148,064  
 Molecular Weight: 148,165

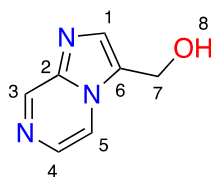
Compound **171** (100 mg, 0.85 mmol, 1eq.) was dissolved in 1 mL of a solution of paraformaldehyde 37 %. The mixture was stirred at 90°C overnight. The mixture was neutralized with NaHCO<sub>3</sub> (aq) and concentrated. The crude was purified by silica gel flash chromatography (elution by gradient from 100 to 90/10 DCM/MeOH) to afford **309** as a white amorphous solid (100 mg, 80 %).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 4.81 (s, 2H, H8), 5.24 (s, 1H, H9), 6.94 (td, *J* = 1.2, 6.9 Hz, 1H, H5), 7.26 (ddd, *J* = 1.3, 6.9, 9.2 Hz, 1H, H4), 7.50 (s, 1H, H1), 7.56 (dt, *J* = 1.1, 9.2 Hz, 1H, H3), 8.40 (dt, *J* = 1.1, 6.8 Hz, 1H, H6).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 52.6 (C8), 111.8 (C5), 117 (C3), 124.2 (C4), 124.6 (C7), 125.1 (C6), 131.9 (C1), 145 (C2).

HMRS (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>N<sub>2</sub>O: 149.0715. Found: 149.0701.

#### Imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3-ylmethanol (**310**).



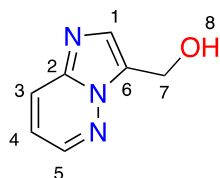
Chemical Formula: C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>N<sub>3</sub>O  
 Exact Mass: 149,059  
 Molecular Weight: 149,153

The procedure was used according to the literature from compound **166**, purification afforded **310** as a beige amorphous solid (63 mg, 50 %).<sup>442</sup>

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 4.86 (d, *J* = 5.1 Hz, 2H, H7), 5.58 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H, H8), 7.76 (s, 1H, H1), 7.94 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H, H4), 8.46 (dd, *J* = 1.5, 4.6 Hz, 1H, H5), 9.06 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, H3).

HMRS (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>N<sub>3</sub>O: 150.0667. Found: 150.0659.

#### Imidazo[1,2-*b*]pyridazin-3-ylmethanol (**311**).



Chemical Formula: C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>N<sub>3</sub>O  
 Exact Mass: 149,059  
 Molecular Weight: 149,153

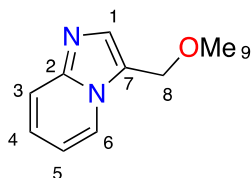


The preparation of compound **311** was done as **310** from **306** (200 mg, 1.68 mmol, 1 eq.). Purification afforded **311** as a white amorphous solid (191 mg, 73 %).

**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 4.83 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H, H7), 5.26 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, H8), 7.22 (dd, *J* = 4.4, 9.2 Hz, 1H, H4), 7.73 (s, 1H, H1), 8.11 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H, H3), 8.55 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H, H5).

**HMRS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>N<sub>3</sub>O: 150.0667. Found: 150.0649.

### 3-(methoxymethyl)imidazo[1,2-*a*]pyridine (**315**).



Chemical Formula: C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O

Exact Mass: 162,079

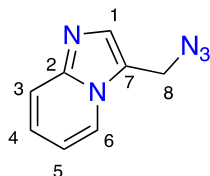
Molecular Weight: 162,192

Compound **309** (30 mg, 0.20 mmol, 1 eq.) was dissolved with SOCl<sub>2</sub> (50 μL), the mixture was stirred at 80 °C for 20 min. The reaction was quenched with DCM. The precipitate was filtered and washed with DCM and then ether. The resulting solid was dissolved in MeOH and concentrated (15 mg, 46 %).

**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 3.25 (s, 3H, H9), 4.77 (s, 2H, H8), 7.02 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H, H5), 7.36 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, H4), 7.64 (m, 2H, H3-1), 8.40 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H, H6).

**HMRS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O: 163.0871. Found: 163.0860.

### 3-(azidomethyl)imidazo[1,2-*a*]pyridine (**316**).



Chemical Formula: C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>N<sub>5</sub>

Exact Mass: 173,070

Molecular Weight: 173,179

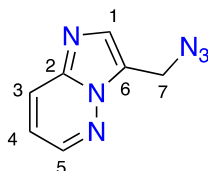
The procedure was used according to the literature from compound **309** (250 mg, 1.69 mmol, 1 eq.).<sup>370</sup> Purification afforded the title compound as an oil (225 mg, 77 %).

**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4.66 (s, 2H, H8), 6.91 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H, H5), 7.27 (ddd, *J* = 1.2, 6.8, 9.2 Hz, 1H, H4), 7.66 (m, 2H, H1-3), 8.09 (dt, *J* = 1.1, 6.9 Hz, 1H, H6).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 44.4 (C8), 113 (C5), 118.3 (C3), 123.9 (C6), 125.3 (C4), 134.2 (C1), 146.9 (C2). Some quaternary carbons and aromatic CH are too broad to be seen due to very slow relaxation.

**HMRS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>N<sub>5</sub>: 174.0780. Found: 174.0763.

### 3-(azidomethyl)imidazo[1,2-*b*]pyridazine (317).



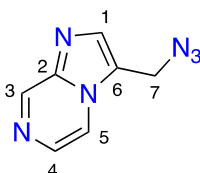
Chemical Formula: C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>N<sub>6</sub>  
Exact Mass: 174,065  
Molecular Weight: 174,167

The procedure was used according to the literature from compound **311** (149 mg, 1 mmol, 1 eq.).<sup>370</sup> Purification afforded the title compound as an oil (132 mg, 76 %).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4.72 (s, 2H, H7), 7.04 (dd, *J* = 4.4, 9.2 Hz, 1H, H4), 7.75 (s, 1H, H1), 7.93 (dd, *J* = 1.5, 9.2 Hz, 1H, H3), 8.34 (dd, *J* = 1.2, 4.5 Hz, 1H, H5).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 43.4 (C7), 117.4 (C4), 123.3 (C6), 126.1 (C3), 133.7 (C1), 140.1 (C2), 143.4 (C5).

### 3-(azidomethyl)imidazo[1,2-*a*]pyrazine (318).



Chemical Formula: C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>N<sub>6</sub>  
Exact Mass: 174,065  
Molecular Weight: 174,167

The procedure was used according to the literature from compound **310** (223 mg, 1.3 mmol, 1.5 éq.).<sup>370</sup> Purification afforded the title compound as a white amorphous solid (145 mg, 56 %).

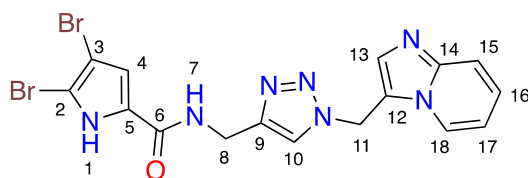
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4.73 (s, 2H, H7), 7.83 (s, 1H, H1), 8.02 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H, H4), 8.08 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H, H5), 9.18 (s, 1H, H3).

HMRS (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>N<sub>6</sub>: 175.0732. Found: 175.0715.

### General Procedure E for Click Reaction.

Corresponding azide (1 eq.) was dissolved in DMF/H<sub>2</sub>O (10:2). The mixture was degassed with bubbling argon. Then sodium ascorbate (10 mol %) was added followed by the alkyne **83** (1 eq.). CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (1 mol %) was finally added to the reaction mixture. It was stirred at room temperature overnight under argon. The mixture was filtered, rinsed with DCM then with water. The resulting solid was dried to afford the desired triazole.

### 4,5-dibromo-*N*-((1-(imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-ylmethyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-1*H*-pyrrole-2-carboxamide (322).



Chemical Formula: C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>7</sub>O

Exact Mass: 476,955

Molecular Weight: 479,136

The title compound was synthesized according to general procedure E using **3** compounds **16** (202 mg, 1.2 mmol) and **83** (356 mg, 1.2 mmol), yielding **322** as a white amorphous solid (349 mg, 63 %).

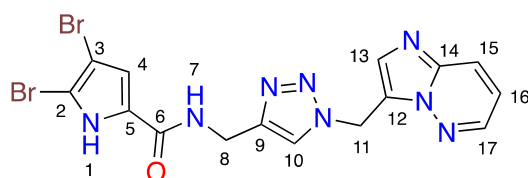
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 4.41 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H, H8), 6.03 (s, 2H, H11), 6.91 (s, 1H, H4), 7.0 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H, H17), 7.31 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H, H16), 7.62 (m, 1H, H15), 7.78 (m, 1H, H13), 7.99 (s, 1H, H10), 8.55 (m, 1H, H16), 8.6 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H, H7), 12.69 (s, 1H, H1).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 34.1 (C8), 42.2 (C11), 97.8 (C3), 104.7 (C2), 112.5 (C17), 112.9 (C4), 117.2 (C15), 122.8 (C10), 124.8 (C18), 125 (C16), 127.9 (C5), 134.3 (C13), 145.2 (C9), 147 (C14), 158.7 (C6). Some quaternary carbons and aromatic CH are too broad to be seen due to very slow relaxation.

HMRS (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>7</sub>O: 479.9606. Found: 479.9621.

IR (cm<sup>-1</sup>): 3263, 1629, 1519, 1501, 1407, 1317, 1227.

#### 4,5-dibromo-*N*-((1-(imidazo[1,2-*b*]pyridazin-3-ylmethyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-1*H*-pyrrole-2-carboxamide (**323**).



Chemical Formula: C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>8</sub>O

Exact Mass: 477,950

Molecular Weight: 480,124

The title compound was synthesized according to general procedure E using compounds **317** (127 mg, 0.73 mmol) and **83** (223 mg, 0.73 mmol), yielding **323** as a white amorphous solid (310 mg, 89 %).

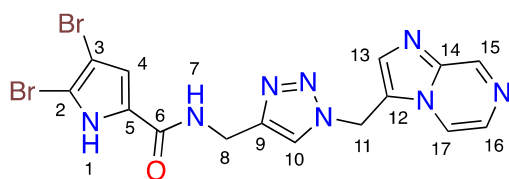
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 4.41 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H, H8), 5.99 (s, 2H, H11), 6.92 (s, 1H, H4), 7.30 (dd, *J* = 4.6, 9.2 Hz, 1H, H16), 7.95 (s, 2H, H10-13), 8.18 (dd, *J* = 1.5, 9.2 Hz, 1H, H15), 8.58 (m, 2H, H7-17), 12.69 (s, 1H, H1).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 34.1 (C8), 41.9 (C11), 97.8 (C3), 104.7 (C2), 112.8 (C4), 118 (C16), 122.3 (C12), 122.9 (C10), 125.9 (C15), 127.9 (C5), 134.2 (C13), 144 (C17), 145 (C9), 146.2 (C14), 158.7 (C6).

HMRS (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>8</sub>O: 480.9559. Found: 480.9564.

IR (cm<sup>-1</sup>): 3146, 3128, 1635, 1566, 1523, 1243.

**4,5-dibromo-*N*-((1-(imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3-ylmethyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-1*H*-pyrrole-2-carboxamide (324).**



Chemical Formula: C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>8</sub>O  
Exact Mass: 477,950  
Molecular Weight: 480,124

The title compound was synthesized according to general procedure E using compounds **318** (146 mg, 0.84 mmol) and **83** (256 mg, 0.84 mmol), yielding **324** as a white amorphous solid (310 mg, 77 %).

**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 4.42 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H, H8), 6.09 (s, 2H, H11), 6.92 (s, 1H, H4), 8.01 (m, 2H, H13-16), 8.06 (s, 1H, H10), 8.59 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H, H7), 8.64 (m, 1H, H17), 9.12 (s, 1H, H15), 12.69 (s, 1H, H1).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 34.1 (C8), 41.6 (C11), 97.8 (C3), 104.8 (C2), 112.9 (C4), 118.2 (C17), 123 (C10), 123.7 (C12), 127.9 (C5), 129.3 (C16), 136 (C13), 143.3 (C15), 145.3 (C9), 158.8 (C6). Some quaternary carbons and aromatic CH are too broad to be seen due to very slow relaxation.

**HMRS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* Calcd for (M+H)<sup>+</sup> C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>8</sub>O: 480.9559. Found: 480.9598.

**IR** (cm<sup>-1</sup>): 3443, 3277, 1630, 1564, 1525, 1405, 1229.

## 2. Biological assays

### a. Protein kinase assays

Kinase enzymatic activities were assayed in 384-well plates using the ADP-Glo™ assay kit (Promega, Madison, WI). This assay provides an homogeneous and high-throughput screening method to measure kinase activity by quantifying the amount of ADP produced during a kinase reaction.<sup>443</sup> Briefly, the reactions were carried out in a final volume of 6 μl for 30 min at 30°C in appropriate kinase buffer, with either protein or peptide as substrate in the presence of 10 μM ATP (40mM Tris pH 7.5, 20mM MgCl<sub>2</sub> and 0.1mg/ml of BSA). Afterwards, 6 μl of ADP-Glo™ Kinase Reagent was added to stop the kinase reaction. After an incubation time of 50 min at room temperature, 12 μl of Kinase Detection Reagent was added for one hour at room temperature. The transmitted signal was measured using the Envision (PerkinElmer, Waltham, MA) microplate luminometer and expressed in Relative Light Unit (RLU). In order to determine the half maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>), the assays were performed in duplicate in the absence or presence of increasing doses of the tested compounds. Kinase activities are expressed in % of maximal activity, i.e. measured in the absence of inhibitor. Peptide substrates were obtained from Proteogenix (Schiltigheim, France). Aurora B kinase assay was validated using a model inhibitor

employed under the same conditions as those for the tested compounds: ZM-447439 (#S1103, Selleckchem).

Buffers: (A) 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 25 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 µg/ml heparin; (B) 25 mM MOPS, pH7.2, 12.5 mM β-glycerophosphate, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM EGTA, 2 mM EDTA, 0.25 mM DTT.

In this study the following protein kinases were analyzed: AuroraB (human, recombinant, expressed by baculovirus in Sf9 insect cells, SignalChem, product #A31-10G) was assayed in buffer B with 0.2 µg/µl of myelin basic protein (MBP) as substrate; CDK2/CyclinA (cyclin-dependent kinase-2, human kindly provided by Dr. A. Echaliier-Glazer, Leicester, UK) was assayed in buffer A with 0.8 µg/µl of histone H1 as substrate; CDK5/p25 (human, recombinant, expressed in bacteria) was assayed in buffer A with 0.8 µg/µl of histone H1 as substrate; CDK9/CyclinT (human, recombinant, expressed by baculovirus in Sf9 insect cells) was assayed in buffer A with 0.27 µg/µl of the following peptide: YSPTSPSYSPTSPSYSPTSPSKKKK, as substrate; GSK3β (human, recombinant, expressed by baculovirus in Sf9 insect cells) were assayed in buffer A with 0.010 µg/µl of GS-1 peptide, a GSK-3-selective substrate (YRRAAVPPSPSLSRHSSPHQSpEDEEE); CK1ε (human, recombinant, expressed by baculovirus in Sf9 insect cells) was assayed in buffer A with 0.022 µg/µl of the following peptide: RRKHAAGSpAYSITA ("Sp" stands for phosphorylated serine) as CK1-specific substrate; Haspin-kd (human, kinase domain, amino acids 470 to 798, recombinant, expressed in bacteria) was assayed in buffer A with 0.007 µg/µl of Histone H3 (1-21) peptide (ARTKQTARKSTGGKAPRKQLA) as substrate; Pim-1 (human proto-oncogene, recombinant, expressed in bacteria) was assayed in buffer A with 0.8 µg/µl of histone H1 (Sigma #H5505) as substrate; *Mm*CLK1 (from *Mus musculus*, recombinant, expressed in bacteria) was assayed in buffer A with 0.027µg/µl of the following peptide: GRSRSRSRSRSR as substrate; *Rn*DYRK1A-kd (*Rattus norvegicus*, amino acids 1 to 499 including the kinase domain, recombinant, expressed in bacteria, DNA vector kindly provided by Dr. W. Becker, Aachen, Germany) was assayed in buffer A with 0.033 µg/µl of the following peptide: KKISGRLSPIMTEQ as substrate.

### **b. ATP competition assay**

Human recombinant Aurora B activity was assayed *in vitro*, according to the ADP-Glo method (Promega), in the absence or presence of **194** (2; 1; 0.5 or 0.1 µM) and increasing concentrations of ATP (3.125 to 50 µM). The kinase assay was performed, in triplicate, in buffer B with 0.2 µg/µl of MBP (0.2 µg/µl) as substrate in buffer B and carried out in a final volume of 6 µl for 30 min at 30°C. The reaction was then continued as described above (cf. part Protein kinase assays). The signals obtained, expressed in RLU, allow drawing of a double-reciprocal plot of the Michaelis-Menten equation (also known as the Lineweaver-Burk plot).

### **c. Immunofluorescence**

For immunofluorescence experiments, cells were grown on glass coverslips, fixed with 4% paraformaldehyde in PBS, permeabilized by 0.15% Triton-X100 for 2 minutes and processed using

standard protocols. Images were acquired with a Coolsnap HQ2 CCD camera (Photometrics) on a Zeiss Axio microscope (Carl Zeiss) using a 100x NA 1.40 objective. Image acquisition and processing were performed using Metamorph (Molecular Device). Deconvolution was performed using the AutoQuant module in Metamorph. Quantification of signal intensity was performed using ImageJ software (NIH). Primary antibodies used in this study included rabbit polyclonal anti-phospho-Ser10 Histone H3 (1/1000 dilution, Millipore), rabbit polyclonal anti-Aurora B (1/100, Life Technologies) and mouse monoclonal anti- $\alpha$ -Tubulin (Clone B512, Sigma).

#### **d. Cell Culture and Proliferation Assay**

Cancer cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) or from the European collection of cell culture (ECACC, England) and were cultured according to the supplier's instructions. K562R (doxorubicin-resistant) leukemia cells were a generous gift from Pr. J.P. Marie (France). Human HCT-116 colorectal carcinoma, MCF7 breast adenocarcinoma, A549 lung carcinoma, U-2OS osteosarcoma and SK-OV-3 ovary carcinoma were grown in Gibco McCoy's 5A supplemented with 10% fetal calf serum and 1% glutamine. K562 and K562R leukemia cells were grown in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal calf serum and 1% glutamine. hTERT-RPE1 cells were cultured in DMEM/F12 medium containing 10% fetal calf serum and 1% glutamine. Cells were maintained at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>.

Cell viability was determined by a luminescent assay according to the manufacturer's instructions (Promega, Madison, WI, USA). For IC<sub>50</sub> determination, the cells were seeded in 96-well plates (3 × 10<sup>3</sup> cells/well) containing 90  $\mu$ L of growth medium. After 24 h of culture, the cells were treated with the tested compounds at 10 different final concentrations. Each concentration was obtained from serial dilutions in culture medium starting from the stock solution. Control cells were treated with the vehicle. Experiments were performed in triplicate.

After 72 h of incubation, 100  $\mu$ L of CellTiter Glo Reagent was added for 15 min before recording luminescence with a spectrophotometric plate reader PolarStar Omega (BMG LabTech). The dose-response curves were plotted with Graph Prism software and the IC<sub>50</sub> values were calculated using the Graph Prism software from polynomial curves (four or five-parameter logistic equations).

#### **e. Cell cycle analysis**

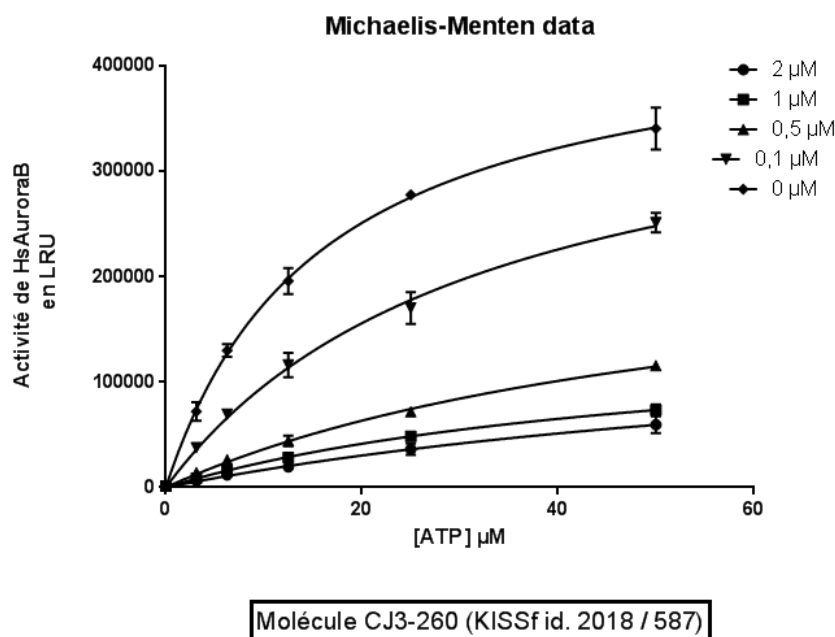
After 24 h of treatment with **194**, K562 cells were fixed in 70% ethanol and permeabilized with 1% Triton-X 100 in 1X PBS for 20 min. Cells were stained with propidium iodide solution containing RNase A. DNA content was further determined by flow cytometry using FC500 (Beckman Coulter).

### 3. Molecular docking

Three-dimensional structures of the ligands were generated using CORINA 4.2.0 (Molecular Networks GmbH, Germany and Altamira, LLC, USA). Molecular docking calculations were performed using the GOLD software<sup>444</sup> from the CCDC\_2020 suite, with the Aurora B structure 4AF3<sup>409</sup> as receptor and the GoldScore scoring function. The site "F" was defined as a sphere with 10 Å diameter around a virtual point situated at mid-distance between the atoms CE2 of Phe72 and CZ of Phe101. The site "F" was defined as a sphere with 10 Å diameter around the atom CD1 of Ile150. All other parameters had default values and 50 conformers were generated for each site. The analysis of docking poses was performed with UCSF Chimera,<sup>445</sup> as well as the generation of

## Annexes

### Annexe 1-A : Courbes de Michealis-Menten pour le composé 164



### Annexe 1-B : Courbes de Lineweaver-Burk pour le composé 164

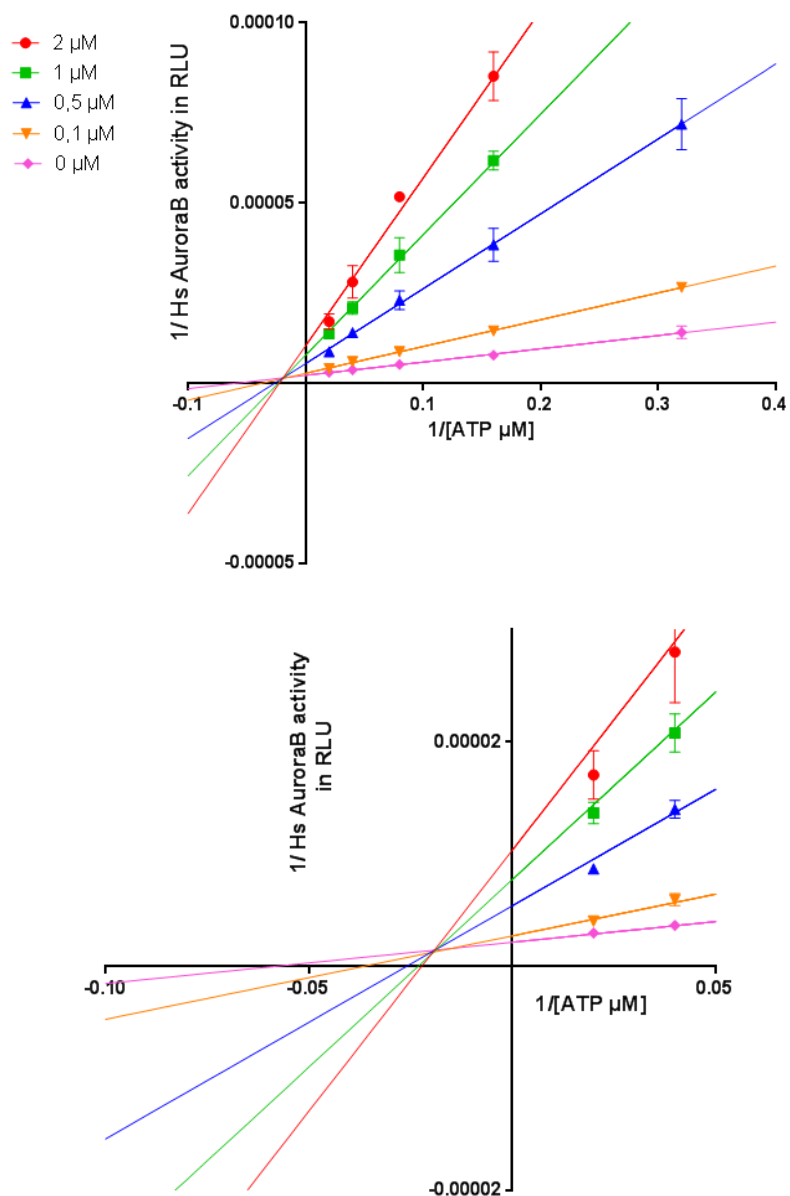


Figure 124 – Agrandissement de la zone d'intersection des droites



**Annexe 2 : % d'inhibition du criblage complet des 82 composés sur le panel de kinases à 10 et 1 µM**

Produit	Concentration	Hs_AurB	Hs_Haspine	Hs_CDK2/CyclinA	Hs_CDK5/p25	Hs_CDK9/CyclinT	Hs_CK1ε	Hs_GSK3β	Hs_PIM1	Rn_DYRK1A	Mm_CLK1	Ssc_GSK3 α/β
<b>EL228</b>	10 µM	78	7	0	0	37	8		14	47		
	1 µM	54	19	34	0	13	0		11	35		
<b>99a</b>	10 µM	0	0	21	0	0			0		6	4
	1 µM	1	0	1	0	0			0		0	0
<b>99b</b>	10 µM	21	0	0	0	3			5		0	0
	1 µM	1	0	0	0	1			0		1	0
<b>99c</b>	10 µM	32	0	5	0	18			0		0	0
	1 µM	9	0	0	0	0			0		4	6
<b>99d</b>	10 µM	0	0	17	0	0			0		0	0
	1 µM	0	2	0	0	10			0		3	0
<b>103</b>	10 µM	15	16	0	7	20	7		0	19		
	1 µM	4	7	2	2	2	13		1	17		
<b>104</b>	10 µM	7	0	0	0	8	0		0	28		
	1 µM	2	0	0	0	8	0		0	18		
<b>109</b>	10 µM	70	30	0	0	16	46	59	0			
	1 µM	25	18	0	2	0	12	18	0			
<b>110</b>	10 µM	60	33	0	0	20	36	37	0			
	1 µM	21	0	9	0	0	0	0	0			
<b>122</b>	10 µM	3	8	0	0	19	12	3	8			
	1 µM	8	0	0	0	17	9	0	0			
<b>127</b>	10 µM	0	0	0	7	17	12	6	0			
	1 µM	0	29	0	14	13	0	1	29			
<b>128</b>	10 µM	25	0	7	0	46	2	4	0			

	1 $\mu$ M	0	0	2	0	22	14	31	0		
<b>130a</b>	10 $\mu$ M	11	8	0	9		9		5	26	
	1 $\mu$ M	11	27	0	0		4		0	33	
<b>130b</b>	10 $\mu$ M	3	0	0	0		5		0	11	
	1 $\mu$ M	19	19	0	0		0		7	35	
<b>130c</b>	10 $\mu$ M	42	13	0	2		0		0	26	
	1 $\mu$ M	45	18	24	0		3		7	30	
<b>130d</b>	10 $\mu$ M	10	2	10	8		10		0	16	
	1 $\mu$ M	12	26	0	0		0		0	27	
<b>136</b>	10 $\mu$ M	25	19	20	3		0		0	43	
	1 $\mu$ M	18	22	20	0		7		51	42	
<b>140</b>	10 $\mu$ M	5	4	0	4	5			3	0	0
	1 $\mu$ M	5	7	23	0	0			0	0	0
<b>141</b>	10 $\mu$ M	6	4	29	0	43			8	21	0
	1 $\mu$ M	10	0	0	0	0			0	0	0
<b>142</b>	10 $\mu$ M	7	23	4	1	16	8		14	23	
	1 $\mu$ M	0	12	19	5	8	0		0	40	
<b>146</b>	10 $\mu$ M	11	45		0	79			44	69	9
	1 $\mu$ M	8	3		0	11			0	12	0
<b>156</b>	10 $\mu$ M	19	43	3	0	22	34	1	0		
	1 $\mu$ M	28	27	0	0	17	0	0	0		
<b>160</b>	10 $\mu$ M	0	33	0	11	32	47	15	0		
	1 $\mu$ M	0	8	3	0	18	0	0	1		
<b>161</b>	10 $\mu$ M	97	3		0	36			0	15	2
	1 $\mu$ M	87	0		0	0			0	0	0
<b>163</b>	10 $\mu$ M	95	63		2	41			3	51	1
	1 $\mu$ M	83	17		0	0			1	25	0
<b>164</b>	10 $\mu$ M	83	46	0	0	32	36	27	29		0

	1 $\mu$ M	90	0	39	0	23	11	12	0			0
<b>190</b>	10 $\mu$ M	94	52	3	0	0	31	51	36	13	12	
	1 $\mu$ M	88	8	0	0	24	4	21	0	25	0	
<b>194</b>	10 $\mu$ M	97	64	12	16	68	50	70	0	29	10	
	1 $\mu$ M	92	29	11	28	24	1	33	0	35	11	
<b>202</b>	10 $\mu$ M	94	63	0	32	63	57	69	3	31	58	
	1 $\mu$ M	63	37	0	0	32	0	26	0	26	0	
<b>206</b>	10 $\mu$ M	77	18	0	3	23	28	29	27			
	1 $\mu$ M	48	28	6	0	1	0	0	47			
<b>207</b>	10 $\mu$ M	86	29	0	0	28	46	53	47			
	1 $\mu$ M	78	35	15	0	22	5	0	0			
<b>208</b>	10 $\mu$ M	73	39	0	0	8	9	17	91			
	1 $\mu$ M	81	15	1	0	17	5	10	22			
<b>209</b>	10 $\mu$ M	77	31	0	4	16	26	14	34			
	1 $\mu$ M	85	3	0	5	5	7	0	7			
<b>210</b>	10 $\mu$ M	77	24	0	0	29	32	32	54			
	1 $\mu$ M	72	26	0	0	23	6	19	21			
<b>211</b>	10 $\mu$ M	61	21	4	15	11	13	1	7			
	1 $\mu$ M	61	16	0	0	15	0	7	20			
<b>212</b>	10 $\mu$ M	92	30	0	0	34	11	16	39			
	1 $\mu$ M	83	14	0	0	17	0	12	4			
<b>213</b>	10 $\mu$ M	88	26	7	9	32	12	36	30			
	1 $\mu$ M	49	4	0	2	7	14	13	18			
<b>214</b>	10 $\mu$ M	10	18	0	0	28	34	30	16			
	1 $\mu$ M	8	21	0	0	9	16	14	18			
<b>217</b>	10 $\mu$ M	73	69	0	0	44	36	53	33			
	1 $\mu$ M	59	30	0	0	27	15	24	8			
<b>221</b>	10 $\mu$ M	93	76	7	15	90	61	66	47			

	1 $\mu$ M	81	41	23	2	68	28	27	0	
<b>223a</b>	10 $\mu$ M	2	24	1	0	0	0		11	29
	1 $\mu$ M	0	0	19	0	0	0		0	28
<b>223b</b>	10 $\mu$ M	0	15	6	6	0	0		11	21
	1 $\mu$ M	1	0	7	0	0	0		0	24
<b>223c</b>	10 $\mu$ M	0	0	8	0	0	0		0	20
	1 $\mu$ M	0	5	0	0	2	0		0	24
<b>223d</b>	10 $\mu$ M	0	0	8	0	5	6		0	14
	1 $\mu$ M	4	1	0	0	9	0		0	24
<b>224a</b>	10 $\mu$ M	0	0	0	0	0	0		0	29
	1 $\mu$ M	0	5	13	0	11	0		0	14
<b>224b</b>	10 $\mu$ M	0	17	0	0	13	4		5	6
	1 $\mu$ M	0	0	10	0	0	12		0	25
<b>224c</b>	10 $\mu$ M	0	0	0	0	22	7		0	0
	1 $\mu$ M	0	0	5	0	0	9		0	19
<b>224d</b>	10 $\mu$ M	0	0		0	0			0	0
	1 $\mu$ M	0	0		0	0			0	0
<b>225a</b>	10 $\mu$ M	10	9	0	0	10	3		0	35
	1 $\mu$ M	0	0	4	0	0	1		0	35
<b>225b</b>	10 $\mu$ M	4	21	0	0	14	0		14	37
	1 $\mu$ M	0	1	3	0	1	11		0	35
<b>225c</b>	10 $\mu$ M	3	3	7	4	13	0		0	23
	1 $\mu$ M	4	0	8	0	2	0		0	18
<b>225d</b>	10 $\mu$ M	3	0		0	0			41	0
	1 $\mu$ M	2	0		0	0			0	0
<b>226</b>	10 $\mu$ M	71	39	0	14	21	17	22	0	
	1 $\mu$ M	29	24	9	0	18	19	8	0	
<b>227</b>	10 $\mu$ M	72	26	5	9	12	15	6	59	

	1 $\mu$ M	38	25	0	0	31	4	6	0		
<b>228</b>	10 $\mu$ M	28	0	0	6	27	32	45	23		
	1 $\mu$ M	12	0	0	0	15	14	13	0		
<b>229</b>	10 $\mu$ M	71	9	0	0	31	42	30	0		
	1 $\mu$ M	13	14	0	0	26	17	1	48		
<b>230</b>	10 $\mu$ M	88	28	26	14	62	5	12	0		
	1 $\mu$ M	69	9	2	0	30	26	11	11		
<b>231</b>	10 $\mu$ M	87	32	0	0	73	14	19	15		
	1 $\mu$ M	64	14	0	0	37	6	0	37		
<b>232</b>	10 $\mu$ M	90	8		0	5			0	5	0
	1 $\mu$ M	55	0		0	0			0	0	0
<b>233</b>	10 $\mu$ M	90	75		0	20			3	60	0
	1 $\mu$ M	57	30		0	0			0	18	0
<b>234</b>	10 $\mu$ M	95	29	0	8	10	29	29	8		
	1 $\mu$ M	67	21	0	0	0	3	22	0		
<b>235</b>	10 $\mu$ M	86	29	0	3	9	27	45	0		
	1 $\mu$ M	82	16	0	0	3	18	26	4		
<b>236</b>	10 $\mu$ M	97	41	0	17	17	45	58	21		
	1 $\mu$ M	92	30	0	4	4	19	25	12		
<b>237</b>	10 $\mu$ M	97	33	0	2	21	38	50	18		
	1 $\mu$ M	75	31	0	0	0	8	28	17		
<b>238</b>	10 $\mu$ M	85	26	0	12	9	40	56	4		
	1 $\mu$ M	72	11	0	14	2	0	0	0		
<b>239</b>	10 $\mu$ M	94	22	0	0	18	32	39	21		
	1 $\mu$ M	79	0	0	13	1	0	0	0		
<b>257</b>	10 $\mu$ M	31	46	0	14	45	11	46	0	29	7
	1 $\mu$ M	0	45	13	12	12	0	35	0	23	27
<b>258</b>	10 $\mu$ M	90	76	18	0	41	42	58	8	39	42

	1 µM	59	47	0	0	23	0	44	3	13	2
<b>259</b>	10 µM	83	67	18	0	40	36	36	26	14	39
	1 µM	45	44	0	7	21	0	22	5	11	12
<b>275</b>	10 µM	15	18	55	0	36	34	0	32		0
	1 µM	23	24	0	0	22	5	13	0		0
<b>276</b>	10 µM	0	0	32	0	19	19	35	34		0
	1 µM	0	9	15	0	15	3	24	0		0
<b>284</b>	10 µM	26	0	23	2	27	52	86	0		
	1 µM	18	3	36	0	26	9	23	0		
<b>285</b>	10 µM	45	41	44	0	44	49	63	29		
	1 µM	19	32	42	12	40	34	40	0		
<b>286</b>	10 µM	68	35	40	18	45	55	45	18		
	1 µM	18	34	32	10	49	34	30	0		
<b>287</b>	10 µM	25	0	30	6	42	47	39	0		
	1 µM	15	29	36	0	30	2	30	0		
<b>288</b>	10 µM	54	0	7	14	0	56	77	27		
	1 µM	9	0	11	7	5	5	9	0		
<b>289</b>	10 µM	72	36	34	3	28	45	42	0		
	1 µM	42	53	31	11	40	34	28	0		
<b>290</b>	10 µM	94	43	27	22	50	70	39	0		
	1 µM	91	45	28	14	35	35	32	0		
<b>296</b>	10 µM	9	7	13	0	42	0	9	4		0
	1 µM	2	28	24	0	31	4	86	0		0
<b>322</b>	10 µM	27	6	0	10	10	10	17	12		
	1 µM	15	0	0	2	0	2	7	0		
<b>323</b>	10 µM	28	9	20	15	2	12	0	0		
	1 µM	10	5	29	15	14	8	0	0		
<b>324</b>	10 µM	4	9	0	0	1	13	26	3		

1  $\mu$ M

1

22

0

0

0

16

12

0

# Bibliographie

- (1) International Agency for Research on Cancer. Cancer tomorrow <http://gco.iarc.fr/tomorrow/home> (accessed Jun 9, 2020).
- (2) Siegel, R. L.; Miller, K. D.; Jemal, A. Cancer Statistics, 2019. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **2019**, *69* (1), 7–34. <https://doi.org/10.3322/caac.21551>.
- (3) Vader, G.; Lens, S. M. A. The Aurora Kinase Family in Cell Division and Cancer. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, **2008**, *1786* (1), 60–72. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2008.07.003>.
- (4) Keen, N.; Taylor, S. Aurora-Kinase Inhibitors as Anticancer Agents. *Nature Reviews Cancer*, **2004**, *4* (12), 927–936. <https://doi.org/10.1038/nrc1502>.
- (5) Carmena, M.; Ruchaud, S.; Earnshaw, W. C. Making the Auroras Glow: Regulation of Aurora A and B Kinase Function by Interacting Proteins. *Current Opinion in Cell Biology*, **2009**, *21* (6), 796–805. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.09.008>.
- (6) Tang, A.; Gao, K.; Chu, L.; Zhang, R.; Yang, J.; Zheng, J. Aurora Kinases: Novel Therapy Targets in Cancers. *Oncotarget* **2017**, *8* (14), 23937–23954. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14893>.
- (7) Martins, A.; Vieira, H.; Gaspar, H.; Santos, S. Marketed Marine Natural Products in the Pharmaceutical and Cosmeceutical Industries: Tips for Success. *Marine Drugs*, **2014**, *12* (2), 1066–1101. <https://doi.org/10.3390/md12021066>.
- (8) Blunt, J. W.; Carroll, A. R.; Copp, B. R.; Davis, R. A.; Keyzers, R. A.; Prinsep, M. R. Marine Natural Products. *Natural Product Reports*, **2018**, *35* (1), 8–53. <https://doi.org/10.1039/C7NP00052A>.
- (9) Wang, S.; Dong, G.; Sheng, C. Structural Simplification of Natural Products. *Chemical Reviews*, **2019**, *119* (6), 4180–4220. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00504>.
- (10) Dernières données mondiales sur le cancer : le fardeau du cancer atteint 18,1 millions de nouveaux cas et 9,6 millions de décès par cancer en 2018. Communiqué de presse 263; Centre International de Recherche sur le Cancer, **2018**.
- (11) Hanahan, D.; Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, **2011**, *144* (5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- (12) Torry, D. S.; Cooper, G. M. Proto-Oncogenes in Development and Cancer. *American Journal of Reproductive Immunology*, **1991**, *25* (3), 129–132. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.1991.tb01080.x>.
- (13) Morris, L. G. T.; Chan, T. A. Therapeutic Targeting of Tumor Suppressor Genes: Therapeutic Targeting of Tumors. *Cancer*, **2015**, *121* (9), 1357–1368. <https://doi.org/10.1002/cncr.29140>.
- (14) Torre, L. A.; Siegel, R. L.; Ward, E. M.; Jemal, A. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, **2016**, *25* (1), 16–27. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-15-0578>.
- (15) Wang, J.-J.; Han, K. F. L. Tumor Microenvironment: Recent Advances in Various Cancer Treatments. *Tumor microenvironment*, **2018**, *22*, 3855–3864.
- (16) Lee, Y. T.; Tan, Y. J.; Oon, C. E. Molecular Targeted Therapy: Treating Cancer with Specificity. *European Journal of Pharmacology*, **2018**, *834*, 188–196. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.07.034>.
- (17) Helmy, K. Y.; Patel, S. A.; Nahas, G. R.; Rameshwar, P. Cancer Immunotherapy: Accomplishments to Date and Future Promise. *Therapeutic Delivery*, **2013**, *4* (10), 1307–1320. <https://doi.org/10.4155/tde.13.88>.
- (18) Meijer, L. Le cycle de division cellulaire et sa régulation. *Oncologie*, **2003**, *5*, 311–326.
- (19) Schafer, K. A. The Cell Cycle: A Review. *Veterinary Pathology*, **1998**, *35* (6), 461–478.
- (20) Gavard, O. Modélisation et analyse d'un interactome de la kinase humaine Aurora A (Thèse de Doctorat). Université Rennes 1, 2015. NNT : 2015REN1S160.



- (21) Ding, L.; Cao, J.; Lin, W.; Chen, H.; Xiong, X.; Ao, H.; Yu, M.; Lin, J.; Cui, Q. The Roles of Cyclin-Dependent Kinases in Cell-Cycle Progression and Therapeutic Strategies in Human Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, **2020**, *21* (6), 1-28. <https://doi.org/10.3390/ijms21061960>.
- (22) Malumbres, M.; Barbacid, M. Cell Cycle Kinases in Cancer. *Current Opinion in Genetics & Development*, **2007**, *17* (1), 60–65. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2006.12.008>.
- (23) Lee, K.; Rhee, K. PLK1 Phosphorylation of Pericentrin Initiates Centrosome Maturation at the Onset of Mitosis. *The Journal of Cell Biology*, **2011**, *195* (7), 1093–1101. <https://doi.org/10.1083/jcb.201106093>.
- (24) Jackson, J. R.; Patrick, D. R.; Dar, M. M.; Huang, P. S. Targeted Anti-Mitotic Therapies: Can We Improve on Tubulin Agents? *Nature Reviews Cancer*, **2007**, *7* (2), 107–117. <https://doi.org/10.1038/nrc2049>.
- (25) Hagstrom, K. A.; Meyer, B. J. Condensin and Cohesin: More than Chromosome Compactor and Glue. *Nature Reviews Genetics*, **2003**, *4* (7), 520–534. <https://doi.org/10.1038/nrg1110>.
- (26) Lara-Gonzalez, P.; Westhorpe, F. G.; Taylor, S. S. The Spindle Assembly Checkpoint. *Current Biology*, **2012**, *22* (22), 966–980. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.10.006>.
- (27) De Gramont, A.; Cohen-Fix, O. The Many Phases of Anaphase. *Trends in Biochemical Sciences*, **2005**, *30* (10), 559–568. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2005.08.008>.
- (28) Bakhoun, S. F.; Compton, D. A. Chromosomal Instability and Cancer: A Complex Relationship with Therapeutic Potential. *Journal of Clinical Investigation*, **2012**, *122* (4), 1138–1143. <https://doi.org/10.1172/JCI59954>.
- (29) Giam, M.; Rancati, G. Aneuploidy and Chromosomal Instability in Cancer: A Jackpot to Chaos. *Cell Division*, **2015**, *10* (1), 1138–1143. <https://doi.org/10.1186/s13008-015-0009-7>.
- (30) Manning, G.; Whyte, D. B.; Martinez, R.; Hunter, T.; Sudarsanam, S. The Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Science*, **2002**, *298* (5600), 1912–1934. <https://doi.org/10.1126/science.1075762>.
- (31) Schwartz, P. A.; Murray, B. W. Protein Kinase Biochemistry and Drug Discovery. *Bioorganic Chemistry*, **2011**, *39* (5–6), 192–210. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2011.07.004>.
- (32) Weber, T. J. 2.24 - Protein Kinases. In *Comprehensive Toxicology (Second Edition)*; McQueen, C. A., Ed.; Elsevier: Oxford, **2010**, 473–493. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00225-6>.
- (33) Gelens, L.; Qian, J.; Bollen, M.; Saurin, A. T. The Importance of Kinase–Phosphatase Integration: Lessons from Mitosis. *Trends in Cell Biology*, **2018**, *28* (1), 6–21. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2017.09.005>.
- (34) Bhullar, K. S.; Lagarón, N. O.; McGowan, E. M.; Parmar, I.; Jha, A.; Hubbard, B. P.; Rupasinghe, H. P. V. Kinase-Targeted Cancer Therapies: Progress, Challenges and Future Directions. *Molecular Cancer*, **2018**, *17* (48), 1-20. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0804-2>.
- (35) Kannaiyan, R.; Mahadevan, D. A Comprehensive Review of Protein Kinase Inhibitors for Cancer Therapy. *Expert Review of Anticancer Therapy*, **2018**, *18* (12), 1249–1270. <https://doi.org/10.1080/14737140.2018.1527688>.
- (36) Manning, G. The Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Science*, **2002**, *298* (5600), 1912–1934. <https://doi.org/10.1126/science.1075762>.
- (37) Glover, D. M.; Leibowitz, M. H.; McLean, D. A.; Parry, H. Mutations in Aurora Prevent Centrosome Separation Leading to the Formation of Monopolar Spindles. *Cell*, **1995**, *81* (1), 95–105. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90374-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90374-7).
- (38) Katayama, H.; Brinkley, W. R.; Sen, S. The Aurora Kinases: Role in Cell Transformation and Tumorigenesis. *Cancer and Metastasis Reviews*, **2003**, *22*, 451-464.
- (39) Carmena, M.; Earnshaw, W. C. The Cellular Geography of Aurora Kinases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **2003**, *4* (11), 842–854. <https://doi.org/10.1038/nrm1245>.

- (40) Gavriilidis, P.; Giakoustidis, A.; Giakoustidis, D. Aurora Kinases and Potential Medical Applications of Aurora Kinase Inhibitors: A Review. *Journal of Clinical Medicine Research*, **2015**, *7* (10), 742–751. <https://doi.org/10.14740/jocmr2295w>.
- (41) Willems, E.; Dedobbeleer, M.; Digregorio, M.; Lombard, A.; Lumapat, P. N.; Rogister, B. The Functional Diversity of Aurora Kinases: A Comprehensive Review. *Cell Division*, **2018**, *13* (1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s13008-018-0040-6>.
- (42) Littlepage, L. E.; Wu, H.; Andresson, T.; Deanehan, J. K.; Amundadottir, L. T.; Ruderman, J. V. Identification of Phosphorylated Residues That Affect the Activity of the Mitotic Kinase Aurora-A. *Cell Biology*, **2002**, 15440–15445.
- (43) Fu, J.; Bian, M.; Liu, J.; Jiang, Q.; Zhang, C. A Single Amino Acid Change Converts Aurora-A into Aurora-B-like Kinase in Terms of Partner Specificity and Cellular Function. *PNAS* **2009**, *106* (17), 6939–6944. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900833106>.
- (44) Gogondeau, D.; Guichard, P.; Tassin, A.-M. Purification of Centrosomes from Mammalian Cell Lines. In *Methods in Cell Biology*, Elsevier, **2015**, Vol. 129, 171–189. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2015.03.004>.
- (45) Hirota, T.; Kunitoku, N.; Sasayama, T.; Marumoto, T.; Zhang, D.; Nitta, M.; Hatakeyama, K.; Saya, H. Aurora-A and an Interacting Activator, the LIM Protein Ajuba, Are Required for Mitotic Commitment in Human Cells. *Cell*, **2003**, *114* (5), 585–598. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00642-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00642-1).
- (46) Kufer, T. A.; Silljé, H. H. W.; Körner, R.; Gruss, O. J.; Meraldi, P.; Nigg, E. A. Human TPX2 Is Required for Targeting Aurora-A Kinase to the Spindle. *Journal of Cell Biology*, **2002**, *158* (4), 617–623. <https://doi.org/10.1083/jcb.200204155>.
- (47) Asteriti, I. A.; Rensen, W. M.; Lindon, C.; Lavia, P.; Guarguaglini, G. The Aurora-A/TPX2 Complex: A Novel Oncogenic Holoenzyme? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, **2010**, *1806* (2), 230–239. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2010.08.001>.
- (48) Giubettini, M.; Asteriti, I. A.; Scrofani, J.; De Luca, M.; Lindon, C.; Lavia, P.; Guarguaglini, G. Control of Aurora-A Stability through Interaction with TPX2. *Journal of Cell Science*, **2011**, *124* (1), 113–122. <https://doi.org/10.1242/jcs.075457>.
- (49) Asteriti, I. A.; Daidone, F.; Colotti, G.; Rinaldo, S.; Lavia, P.; Guarguaglini, G.; Paiardini, A. Identification of Small Molecule Inhibitors of the Aurora-A/TPX2 Complex. *Oncotarget*, **2017**, *8* (19). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16738>.
- (50) Van Vugt, M. A. T. M.; Brás, A.; Medema, R. H. Polo-like Kinase-1 Controls Recovery from a G2 DNA Damage-Induced Arrest in Mammalian Cells. *Molecular Cell*, **2004**, *15* (5), 799–811. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.07.015>.
- (51) Cazales, M.; Schmitt, E.; Montembault, E.; Dozier, C.; Prigent, C.; Ducommun, B. CDC25B Phosphorylation by Aurora A Occurs at the G2/M Transition and Is Inhibited by DNA Damage. *Cell Cycle*, **2005**, *4* (9), 1233–1238. <https://doi.org/10.4161/cc.4.9.1964>.
- (52) Lindqvist, A.; Källström, H.; Lundgren, A.; Barsoum, E.; Rosenthal, C. K. Cdc25B Cooperates with Cdc25A to Induce Mitosis but Has a Unique Role in Activating Cyclin B1–Cdk1 at the Centrosome. *Journal of Cell Biology*, **2005**, *171* (1), 35–45. <https://doi.org/10.1083/jcb.200503066>.
- (53) Carmena, M.; Wheelock, M.; Funabiki, H.; Earnshaw, W. C. The Chromosomal Passenger Complex (CPC): From Easy Rider to the Godfather of Mitosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **2012**, *13* (12), 789–803. <https://doi.org/10.1038/nrm3474>.
- (54) Ducat, D.; Zheng, Y. Aurora Kinases in Spindle Assembly and Chromosome Segregation. *Experimental Cell Research*, **2004**, *301* (1), 60–67. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2004.08.016>.
- (55) Van der Waal, M. S.; Hengeveld, R. C. C.; van der Horst, A.; Lens, S. M. A. Cell Division Control by the Chromosomal Passenger Complex. *Experimental Cell Research*, **2012**, *318* (12), 1407–1420. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2012.03.015>.

- (56) Goto, H.; Yasui, Y.; Nigg, E. A.; Inagaki, M. Aurora-B Phosphorylates Histone H3 at Serine28 with Regard to the Mitotic Chromosome Condensation. *Genes to Cells*, **2002**, *7* (1), 11–17. <https://doi.org/10.1046/j.1356-9597.2001.00498.x>.
- (57) Papini, D.; Fant, X.; Ogawa, H.; Desban, N.; Samejima, K.; Feizbakhsh, O.; Askin, B.; Ly, T.; Earnshaw, W. C.; Ruchaud, S. Cell Cycle-Independent Furrowing Triggered by Phosphomimetic Mutations of the INCENP STD Motif Requires Plk1. *Journal of Cell Science*, **2019**, *132* (21), 1–16. <https://doi.org/10.1242/jcs.234401>.
- (58) Ruchaud, S.; Carmena, M.; Earnshaw, W. C. Chromosomal Passengers: Conducting Cell Division. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **2007**, *8* (10), 798–812. <https://doi.org/10.1038/nrm2257>.
- (59) Sessa, F.; Mapelli, M.; Ciferri, C.; Tarricone, C.; Areces, L. B.; Schneider, T. R.; Stukenberg, P. T.; Musacchio, A. Mechanism of Aurora B Activation by INCENP and Inhibition by Hesperadin. *Molecular Cell*, **2005**, *18* (3), 379–391. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.03.031>.
- (60) Delacour-Larose, M.; My Nhung Hoang, T.; Molla, A. Survivre, la petite reine du complexe passager: *Chek-up* pour son dixième anniversaire. *Medecine Sciences*, **2008**, *24* (10), 828–832. <https://doi.org/10.1051/medsci/20082410828>.
- (61) Feizbakhsh, O.; Place, M.; Fant, X.; Buron, F.; Routier, S.; Ruchaud, S. The Mitotic Protein Kinase Haspin and Its Inhibitors. In *Protein Phosphorylation*, Prigent, C., Ed.; InTech, **2017**. <https://doi.org/10.5772/intechopen.70732>.
- (62) Wang, F.; Ulyanova, N. P.; van der Waal, M. S.; Patnaik, D.; Lens, S. M. A.; Higgins, J. M. G. A Positive Feedback Loop Involving Haspin and Aurora B Promotes CPC Accumulation at Centromeres in Mitosis. *Current Biology* **2011**, *21* (12), 1061–1069. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.05.016>.
- (63) Krenn, V.; Musacchio, A. The Aurora B Kinase in Chromosome Bi-Orientation and Spindle Checkpoint Signaling. *Frontiers in Oncology*, **2015**, *5*. <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00225>.
- (64) Jelluma, N.; Brenkman, A. B.; van den Broek, N. J. F.; Crujisen, C. W. A.; van Osch, M. H. J.; Lens, S. M. A.; Medema, R. H.; Kops, G. J. P. L. Mps1 Phosphorylates Borealin to Control Aurora B Activity and Chromosome Alignment. *Cell*, **2008**, *132* (2), 233–246. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.046>.
- (65) Hauf, S.; Watanabe, Y. Kinetochore Orientation in Mitosis and Meiosis. *Cell*, **2004**, *119* (3), 317–327. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.10.014>.
- (66) Cheeseman, I. M.; Chappie, J. S.; Wilson-Kubalek, E. M.; Desai, A. The Conserved KMN Network Constitutes the Core Microtubule-Binding Site of the Kinetochore. *Cell*, **2006**, *127* (5), 983–997. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.039>.
- (67) Liu, D.; Vader, G.; Vromans, M. J. M.; Lampson, M. A.; Lens, S. M. A. Sensing Chromosome Bi-Orientation by Spatial Separation of Aurora B Kinase from Kinetochore Substrates. *Science*, **2009**, *323* (5919), 1350–1353. <https://doi.org/10.1126/science.1167000>.
- (68) DeLuca, J. G.; Gall, W. E.; Ciferri, C.; Cimini, D.; Musacchio, A.; Salmon, E. D. Kinetochore Microtubule Dynamics and Attachment Stability Are Regulated by Hec1. *Cell*, **2006**, *127* (5), 969–982. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.047>.
- (69) Lan, W.; Zhang, X.; Kline-Smith, S. L.; Rosasco, S. E.; Barrett-Wilt, G. A.; Shabanowitz, J.; Hunt, D. F.; Walczak, C. E.; Stukenberg, P. T. Aurora B Phosphorylates Centromeric MCAK and Regulates Its Localization and Microtubule Depolymerization Activity. *Current Biology*, **2004**, *14* (4), 273–286. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.01.055>.
- (70) Andrews, P. D.; Ovechkina, Y.; Morrice, N.; Wagenbach, M.; Duncan, K.; Wordeman, L.; Swedlow, J. R. Aurora B Regulates MCAK at the Mitotic Centromere. *Developmental Cell*, **2004**, *6* (2), 253–268. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(04\)00025-5](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(04)00025-5).
- (71) Sarangapani, K. K.; Asbury, C. L. Catch and Release: How Do Kinetochores Hook the Right Microtubules during Mitosis? *Trends in Genetics*, **2014**, *30* (4), 150–159. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2014.02.004>.

- (72) Maresca, T. J.; Salmon, E. D. Welcome to a New Kind of Tension: Translating Kinetochore Mechanics into a Wait-Anaphase Signal. *Journal of Cell Science*, **2010**, *123* (6), 825–835. <https://doi.org/10.1242/jcs.064790>.
- (73) Meraldi, P.; Honda, R.; Nigg, E. A. Aurora Kinases Link Chromosome Segregation and Cell Division to Cancer Susceptibility. *Current Opinion in Genetics & Development*, **2004**, *14* (1), 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2003.11.006>.
- (74) Cleveland, D. W.; Mao, Y.; Sullivan, K. F. Centromeres and Kinetochores: From Epigenetics to Mitotic Checkpoint Signaling. *Cell* **2003**, *112* (4), 407–421. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00115-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00115-6).
- (75) Peters, J.-M. The Anaphase Promoting Complex/Cyclosome: A Machine Designed to Destroy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **2006**, *7* (9), 644–656. <https://doi.org/10.1038/nrm1988>.
- (76) Vader, G.; Medema, R. H.; Lens, S. M. A. The Chromosomal Passenger Complex: Guiding Aurora-B through Mitosis. *Journal of Cell Biology*, **2006**, *173* (6), 833–837. <https://doi.org/10.1083/jcb.200604032>.
- (77) Ratheesh, A.; Priya, R.; Yap, A. S. Coordinating Rho and Rac. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, Elsevier, **2013**; Vol. 116, 49–68. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394311-8.00003-0>.
- (78) Goto, H.; Yasui, Y.; Kawajiri, A.; Nigg, E. A.; Terada, Y.; Tatsuka, M.; Nagata, K.; Inagaki, M. Aurora-B Regulates the Cleavage Furrow-Specific Vimentin Phosphorylation in the Cytokinetic Process. *Journal of Biological Chemistry*, **2003**, *278* (10), 8526–8530. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210892200>.
- (79) M. Murata-Hori. Light Chain as a Novel Substrate Kinase from Rat. *Journal of Biochemistry*, **2000**, *128* (6), 903–907.
- (80) Kawajiri, A.; Yasui, Y.; Goto, H.; Tatsuka, M.; Takahashi, M.; Nagata, K.; Inagaki, M. Functional Significance of the Specific Sites Phosphorylated in Desmin at Cleavage Furrow: Aurora-B May Phosphorylate and Regulate Type III Intermediate Filaments during Cytokinesis Coordinatedly with Rho-Kinase. *Molecular Biology of the Cell*, **2003**, *14* (4), 1489–1500. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-09-0612>.
- (81) Tseng, T.-C.; Chen, S.-H.; Hsu, Y.-P. P.; Tang, T. K. Protein Kinase Profile of Sperm and Eggs: Cloning and Characterization of Two Novel Testis-Specific Protein Kinases (AIE1, AIE2) Related to Yeast and Fly Chromosome Segregation Regulators. *DNA and Cell Biology*, **1998**, *17* (10), 823–833. <https://doi.org/10.1089/dna.1998.17.823>.
- (82) Harbuz, R.; Zouari, R.; Dieterich, K.; Nikas, Y.; Lunardi, J.; Hennebicq, S.; Ray, P.-F. Rôle d'aurora kinase C (AURKC) dans la reproduction humaine. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*, **2009**, *37* (6), 546–551. <https://doi.org/10.1016/j.gyobfe.2009.04.002>.
- (83) Sasai, K.; Katayama, H.; Stenoien, D. L.; Fujii, S.; Honda, R.; Kimura, M.; Okano, Y.; Tatsuka, M.; Suzuki, F.; Nigg, E. A.; Earnshaw, W. C.; Brinkley, W. R.; Sen, S. Aurora-C Kinase Is a Novel Chromosomal Passenger Protein That Can Complement Aurora-B Kinase Function in Mitotic Cells. *Cell Motility*, **2004**, *59* (4), 249–263. <https://doi.org/10.1002/cm.20039>.
- (84) Sasai, K.; Katayama, H.; Hawke, D. H.; Sen, S. Aurora-C Interactions with Survivin and INCENP Reveal Shared and Distinct Features Compared with Aurora-B Chromosome Passenger Protein Complex. *PLoS ONE* **2016**, *11* (6), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157305>.
- (85) Lin, B.-W.; Wang, Y.-C.; Chang-Liao, P.-Y.; Lin, Y.-J.; Yang, S.-T.; Tsou, J.-H.; Chang, K.-C.; Liu, Y.-W.; Tseng, J. T.; Lee, C.-T.; Lee, J.-C.; Hung, L.-Y. Overexpression of Aurora-C Interferes with the Spindle Checkpoint by Promoting the Degradation of Aurora-B. *Cell Death and Disease*, **2014**, *5* (3), 1106–1106. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.37>.
- (86) Evan, G. I.; Vousden, K. H. Proliferation, Cell Cycle and Apoptosis in Cancer. *Nature*, **2001**, *411* (6835), 342–348. <https://doi.org/10.1038/35077213>.

- (87) Yan, M.; Wang, C.; He, B.; Yang, M.; Tong, M.; Long, Z.; Liu, B.; Peng, F.; Xu, L.; Zhang, Y.; Liang, D.; Lei, H.; Subrata, S.; Kelley, K. W.; Lam, E. W.-F.; Jin, B.; Liu, Q. Aurora-A Kinase: A Potent Oncogene and Target for Cancer Therapy: AURORA-A KINASE IN CANCER. *Medicinal Research Reviews*, **2016**, *36* (6), 1036–1079. <https://doi.org/10.1002/med.21399>.
- (88) Descamps, S.; Prigent, C. Aurora-A, -B et -C : À l'aube d'une nouvelle connexion entre l'amplification des centrosomes, l'aneuploïdie et le cancer ? *Medecine/Sciences*, **2002**, *18* (4), 474–480. <https://doi.org/10.1051/medsci/2002184474>.
- (89) Bischoff, J. R. A Homologue of Drosophila Aurora Kinase Is Oncogenic and Amplified in Human Colorectal Cancers. *The EMBO Journal*, **1998**, *17* (11), 3052–3065. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.11.3052>.
- (90) Katayama, H.; Sasai, K.; Kawai, H.; Yuan, Z.-M.; Bondaruk, J.; Suzuki, F.; Fujii, S.; Arlinghaus, R. B.; Czerniak, B. A.; Sen, S. Phosphorylation by Aurora Kinase A Induces Mdm2-Mediated Destabilization and Inhibition of P53. *Nature Genetics*, **2004**, *36* (1), 55–62. <https://doi.org/10.1038/ng1279>.
- (91) Liu, Q.; Kaneko, S.; Yang, L.; Feldman, R. I.; Nicosia, S. V.; Chen, J.; Cheng, J. Q. Aurora-A Abrogation of P53 DNA Binding and Transactivation Activity by Phosphorylation of Serine 215. *Journal of Biological Chemistry*, **2004**, *279* (50), 52175–52182. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406802200>.
- (92) Pinel, S.; Barbault-Foucher, S.; Lott-Desroches, M.-C.; Astier, A. Les inhibiteurs des kinases Aurora. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, **2009**, *67* (2), 69–77. <https://doi.org/10.1016/j.pharma.2008.12.005>.
- (93) Nikonova, A. S.; Astsaturov, I.; Serebriiskii, I. G.; Dunbrack, R. L.; Golemis, E. A. Aurora A Kinase (AURKA) in Normal and Pathological Cell Division. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **2013**, *70* (4), 661–687. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1073-7>.
- (94) Zhou, H.; Kuang, J.; Zhong, L.; Kuo, W.; Gray, J.; Sahin, A.; Brinkley, B.; Sen, S. Tumour Amplified Kinase STK15/BTAK Induces Centrosome Amplification, Aneuploidy and Transformation. *Nature Genetics*, **1998**, *20* (2), 189–193. <https://doi.org/10.1038/2496>.
- (95) Li, C.-C.; Chu, H.-Y.; Yang, C.-W.; Chou, C.-K.; Tsai, T.-F. Aurora-A Overexpression in Mouse Liver Causes P53-Dependent Premitotic Arrest during Liver Regeneration. *Molecular Cancer Research*, **2009**, *7* (5), 678–688. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-08-0483>.
- (96) Meraldi, P.; Honda, R.; Nigg, E. A. Aurora-A Overexpression Reveals Tetraploidization as a Major Route to Centrosome Amplification in P53-/- Cells. *The EMBO Journal*, **2002**, *21* (4), 483–492.
- (97) Duijf, P. H. G.; Schultz, N.; Benezra, R. Cancer Cells Preferentially Lose Small Chromosomes. *International Journal of Cancer*, **2013**, *132* (10), 2316–2326. <https://doi.org/10.1002/ijc.27924>.
- (98) Hindriksen, S.; Meppelink, A.; Lens, S. M. A. Functionality of the Chromosomal Passenger Complex in Cancer. *Biochemical Society Transactions*, **2015**, *43* (1), 23–32. <https://doi.org/10.1042/BST20140275>.
- (99) Gully, C. P.; Velazquez-Torres, G.; Shin, J.-H.; Fuentes-Mattei, E.; Wang, E.; Carlock, C.; Chen, J.; Rothenberg, D.; Adams, H. P.; Choi, H. H.; Guma, S.; Phan, L.; Chou, P.-C.; Su, C.-H.; Zhang, F.; Chen, J.-S.; Yang, T.-Y.; Yeung, S.-C. J.; Lee, M.-H. Aurora B Kinase Phosphorylates and Instigates Degradation of P53. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **2012**, *109* (24), 1513–1522. <https://doi.org/10.1073/pnas.1110287109>.
- (100) Adams, R. R.; Eckley, M. D.; Vagnarelli, P.; Wheatley, S. P.; Gerloff, D. L.; Mackay, A. M.; Svingen, P. A.; Kaufmann, S. H.; Earnshaw, W. C. Human INCENP Colocalizes with the Aurora-B/AIRK2 Kinase on Chromosomes and Is Overexpressed in Tumour Cells. *Chromosoma*, **2001**, *110* (2), 65–74. <https://doi.org/10.1007/s004120100130>.
- (101) Altieri, D. C. The Molecular Basis and Potential Role of Survivin in Cancer Diagnosis and Therapy. *Trends in Molecular Medicine*, **2001**, *7* (12), 542–547. [https://doi.org/10.1016/S1471-4914\(01\)02243-2](https://doi.org/10.1016/S1471-4914(01)02243-2).
- (102) Wheatley, S.; Mcneish, I. Survivin: A Protein with Dual Roles in Mitosis and Apoptosis. *International Review of Cytology*, **2005**, *247*, 35–88. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(05\)47002-3](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(05)47002-3).

- (103) Mittal, R.; Jaiswal, P.; Goel, A. Survivin: A Molecular Biomarker in Cancer. *Indian Journal of Medical Research*, **2015**, *141*, 389-397. <https://doi.org/10.4103/0971-5916.159250>.
- (104) Zhang, Y.; Yan, H.; Li, R.; Guo, Y.; Zheng, R. High Expression of Survivin Predicts Poor Prognosis in Cervical Squamous Cell Carcinoma Treated with Paclitaxel and Carboplatin: *Medicine*, **2019**, *98* (20), 1-7. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000015607>.
- (105) Martínez-García, D.; Manero-Rupérez, N.; Quesada, R.; Korrodi-Gregório, L.; Soto-Cerrato, V. Therapeutic Strategies Involving Survivin Inhibition in Cancer. *Medicinal Research Reviews*, **2019**, *39* (3), 887-909. <https://doi.org/10.1002/med.21547>.
- (106) Xia, H.; Chen, S.; Huang, H.; Ma, H. Survivin Over-Expression Is Correlated with a Poor Prognosis in Esophageal Cancer Patients. *Clinica Chimica Acta*, **2015**, *446*, 82-85. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.04.009>.
- (107) Lens, S. M. A.; Medema, R. H. Cytokinesis Defects and Cancer. *Nature Reviews Cancer*, **2019**, *19* (1), 32-45. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0084-6>.
- (108) Tsou, J.-H.; Chang, K.-C.; Chang-Liao, P.-Y.; Yang, S.-T.; Lee, C.-T.; Chen, Y.-P.; Lee, Y.-C.; Lin, B.-W.; Lee, J.-C.; Shen, M.-R.; Chuang, C.-K.; Chang, W.-C.; Wang, J.-M.; Hung, L.-Y. Aberrantly Expressed AURKC Enhances the Transformation and Tumourigenicity of Epithelial Cells. *The Journal of Pathology*, **2011**, *225* (2), 243-254. <https://doi.org/10.1002/path.2934>.
- (109) Khan, J.; Ezan, F.; Crémet, J.-Y.; Fautrel, A.; Gilot, D.; Lambert, M.; Benaud, C.; Troadec, M.-B.; Prigent, C. Overexpression of Active Aurora-C Kinase Results in Cell Transformation and Tumour Formation. *PLoS One*, **2011**, *6* (10), 1-10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026512>.
- (110) Takahashi, T.; Futamura, M.; Yoshimi, N.; Sano, J.; Katada, M.; Takagi, Y.; Kimura, M.; Yoshioka, T.; Okano, Y.; Saji, S. Centrosomal Kinases, HsAIRK1 and HsAIRK3, Are Overexpressed in Primary Colorectal Cancers. *Japanese Journal of Cancer Research*, **2000**, *91* (10), 1007-1014. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2000.tb00878.x>.
- (111) Kimmins, S.; Crosio, C.; Kotaja, N.; Hirayama, J.; Monaco, L.; Höög, C.; van Duin, M.; Gossen, J. A.; Sassone-Corsi, P. Differential Functions of the Aurora-B and Aurora-C Kinases in Mammalian Spermatogenesis. *Molecular Endocrinology*, **2007**, *21* (3), 726-739. <https://doi.org/10.1210/me.2006-0332>.
- (112) Yang, K.-T.; Tang, C.-J. C.; Tang, T. K. Possible Role of Aurora-C in Meiosis. *Frontiers in Oncology*, **2015**, *5*, 1-7. <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00178>.
- (113) Wu, P.; Givskov, M.; Nielsen, T. E. Kinase Inhibitors. In *Methods and Principles in Medicinal Chemistry*, Handler, N., Buschmann, H., Eds.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, **2017**, 31-53. <https://doi.org/10.1002/9783527674381.ch2>.
- (114) Gagic, Z.; Ruzic, D.; Djokovic, N.; Djikic, T.; Nikolic, K. In Silico Methods for Design of Kinase Inhibitors as Anticancer Drugs. *Frontiers in Chemistry*, **2020**, *7* (873), 1-25. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00873>.
- (115) Rask-Andersen, M.; Zhang, J.; Fabbro, D.; Schiöth, H. B. Advances in Kinase Targeting: Current Clinical Use and Clinical Trials. *Trends in Pharmacological Sciences*, **2014**, *35* (11), 604-620. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2014.09.007>.
- (116) Roskoski, R. Properties of FDA-Approved Small Molecule Protein Kinase Inhibitors. *Pharmacological Research*, **2019**, *144*, 19-50. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.03.006>.
- (117) Cicenas, J.; Cicenas, E. Multi-Kinase Inhibitors, AURKs and Cancer. *Medical Oncology*, **2016**, *33* (43), 1-11. <https://doi.org/10.1007/s12032-016-0758-4>.
- (118) Karaman, M. W.; Herrgard, S.; Treiber, D. K.; Gallant, P.; Atteridge, C. E.; Campbell, B. T.; Chan, K. W.; Ciceri, P.; Davis, M. I.; Edeen, P. T.; Faraoni, R.; Floyd, M.; Hunt, J. P.; Lockhart, D. J.; Milanov, Z. V.; Morrison, M. J.; Pallares, G.; Patel, H. K.; Pritchard, S.; Wodicka, L. M.; Zarrinkar, P. P. A Quantitative

- Analysis of Kinase Inhibitor Selectivity. *Nature Biotechnology*, **2008**, *26* (1), 127–132. <https://doi.org/10.1038/nbt1358>.
- (119) Roskoski, R. Classification of Small Molecule Protein Kinase Inhibitors Based upon the Structures of Their Drug-Enzyme Complexes. *Pharmacological Research*, **2016**, *103*, 26–48. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.10.021>.
- (120) Huang, K.; Wang, Y.-H.; Brown, A.; Sun, G. Identification of N-Terminal Lobe Motifs That Determine the Kinase Activity of the Catalytic Domains and Regulatory Strategies of Src and Csk Protein Tyrosine Kinases. *Journal of Molecular Biology*, **2009**, *386* (4), 1066–1077. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.01.012>.
- (121) McClendon, C. L.; Kornev, A. P.; Gilson, M. K.; Taylor, S. S. Dynamic Architecture of a Protein Kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **2014**, *111* (43), 4623–4631. <https://doi.org/10.1073/pnas.1418402111>.
- (122) Modi, V.; Dunbrack, R. L. Defining a New Nomenclature for the Structures of Active and Inactive Kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **2019**, *116* (14), 6818–6827. <https://doi.org/10.1073/pnas.1814279116>.
- (123) Treiber, D. K.; Shah, N. P. Ins and Outs of Kinase DFG Motifs. *Chemistry & Biology*, **2013**, *20* (6), 745–746. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.06.001>.
- (124) Fabbro, D.; Cowan-Jacob, S. W.; Moebitz, H. Ten Things You Should Know about Protein Kinases: IUPHAR Review 14: Ten Things You Should Know about Protein Kinases. *British Journal of Pharmacology*, **2015**, *172* (11), 2675–2700. <https://doi.org/10.1111/bph.13096>.
- (125) Fabbro, D. 25 Years of Small Molecular Weight Kinase Inhibitors: Potentials and Limitations. *Molecular Pharmacology*, **2015**, *87* (5), 766–775. <https://doi.org/10.1124/mol.114.095489>.
- (126) Zuccotto, F.; Ardini, E.; Casale, E.; Angiolini, M. Through the “Gatekeeper Door”: Exploiting the Active Kinase Conformation. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2010**, *53* (7), 2681–2694. <https://doi.org/10.1021/jm901443h>.
- (127) Wong, M. L.; Murphy, J.; Harrington, E.; Gower, C. M.; Jain, R. K.; Schirle, M.; Thomas, J. R. Examining the Influence of Specificity Ligands and ATP-Competitive Ligands on the Overall Effectiveness of Bivalent Kinase Inhibitors. *Proteome Science*, **2016**, *15* (17), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12953-017-0125-1>.
- (128) Wu, P.; Nielsen, T. E.; Clausen, M. H. FDA-Approved Small-Molecule Kinase Inhibitors. *Trends in Pharmacological Sciences*, **2015**, *36* (7), 422–439. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2015.04.005>.
- (129) Roskoski, R. Properties of FDA-Approved Small Molecule Protein Kinase Inhibitors: A 2020 Update. *Pharmacological Research*, **2020**, *152*, 104609. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104609>.
- (130) Borisa, A. C.; Bhatt, H. G. A Comprehensive Review on Aurora Kinase: Small Molecule Inhibitors and Clinical Trial Studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2017**, *140*, 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.08.045>.
- (131) Janeček, M.; Rossmann, M.; Sharma, P.; Emery, A.; Huggins, D. J.; Stockwell, S. R.; Stokes, J. E.; Tan, Y. S.; Almeida, E. G.; Hardwick, B.; Narvaez, A. J.; Hyvönen, M.; Spring, D. R.; McKenzie, G. J.; Venkitaraman, A. R. Allosteric Modulation of AURKA Kinase Activity by a Small-Molecule Inhibitor of Its Protein-Protein Interaction with TPX2. *Scientific Reports*, **2016**, *6*, 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep28528>.
- (132) Karthigeyan, D.; Surabhi, S.; Mizar, P.; Soumik, S.; Banerjee, A.; Sinha, S. H.; Dasgupta, D.; Narayana, C.; Kundu, T. K. A Dual Non-ATP Analogue Inhibitor of Aurora Kinases A and B, Derived from Resorcinol with a Mixed Mode of Inhibition. *Chemical Biology and Drug Design*, **2016**, *87* (6), 958–967. <https://doi.org/10.1111/cbdd.12728>.
- (133) Keen, N.; Taylor, S. Mitotic Drivers—Inhibitors of the Aurora B Kinase. *Cancer and Metastasis Reviews*, **2009**, *28* (1–2), 185–195. <https://doi.org/10.1007/s10555-009-9184-9>.

- (134) Lens, S. M. A.; Voest, E. E.; Medema, R. H. Shared and Separate Functions of Polo-like Kinases and Aurora Kinases in Cancer. *Nature Reviews Cancer*, **2010**, *10* (12), 825–841. <https://doi.org/10.1038/nrc2964>.
- (135) R. Kelly, K.; Ecsedy, J.; Mahalingam, D.; T. Nawrocki, S.; Padmanabhan, S.; J. Giles, F.; S. Carew, J. Targeting Aurora Kinases in Cancer Treatment. *Current Drug Targets*, **2011**, *12* (14), 2067–2078. <https://doi.org/10.2174/138945011798829410>.
- (136) Sells, T. B.; Chau, R.; Ecsedy, J. A.; Gershman, R. E.; Hoar, K.; Huck, J.; Janowick, D. A.; Kadambi, V. J.; LeRoy, P. J.; Stirling, M.; Stroud, S. G.; Vos, T. J.; Weatherhead, G. S.; Wysong, D. R.; Zhang, M.; Balani, S. K.; Bolen, J. B.; Manfredi, M. G.; Claiborne, C. F. MLN8054 and Alisertib (MLN8237): Discovery of Selective Oral Aurora A Inhibitors. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, **2015**, *6* (6), 630–634. <https://doi.org/10.1021/ml500409n>.
- (137) Bavetsias, V.; Linardopoulos, S. Aurora Kinase Inhibitors: Current Status and Outlook. *Frontiers in Oncology*, **2015**, *5*. <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00278>.
- (138) Green, M. R.; Woolery, J. E.; Mahadevan, D. Update on Aurora Kinase Targeted Therapeutics in Oncology. *Expert Opinion on Drug Discovery*, **2011**, *6* (3), 291–307. <https://doi.org/10.1517/17460441.2011.555395>.
- (139) Gadea, B. B.; Ruderman, J. V. Aurora Kinase Inhibitor ZM447439 Blocks Chromosome-Induced Spindle Assembly, the Completion of Chromosome Condensation, and the Establishment of the Spindle Integrity Checkpoint in *Xenopus* Egg Extracts. *Molecular Biology of the Cell*, **2005**, *16* (3), 1305–1318. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-10-0891>.
- (140) Dreier, M. R.; Grabovich, A. Z.; Katusin, J. D.; Taylor, W. R. Short and Long-Term Tumor Cell Responses to Aurora Kinase Inhibitors. *Experimental Cell Research*, **2009**, *315* (7), 1085–1099. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2009.02.008>.
- (141) Hauf, S.; Cole, R. W.; LaTerra, S.; Zimmer, C.; Schnapp, G.; Walter, R.; Heckel, A.; van Meel, J.; Rieder, C. L.; Peters, J.-M. The Small Molecule Hesperadin Reveals a Role for Aurora B in Correcting Kinetochores–Microtubule Attachment and in Maintaining the Spindle Assembly Checkpoint. *The Journal of Cell Biology*, **2003**, *161* (2), 281–294. <https://doi.org/10.1083/jcb.200208092>.
- (142) Harrington, E. A.; Bebbington, D.; Moore, J.; Rasmussen, R. K.; Ajose-Adeogun, A. O.; Nakayama, T.; Graham, J. A.; Demur, C.; Hercend, T.; Diu-Hercend, A.; Su, M.; Golec, J. M. C.; Miller, K. M. VX-680, a Potent and Selective Small-Molecule Inhibitor of the Aurora Kinases, Suppresses Tumor Growth in Vivo. *Nature Medicine*, **2004**, *10* (3), 262–267. <https://doi.org/10.1038/nm1003>.
- (143) Tavanti, E.; Sero, V.; Vella, S.; Fanelli, M.; Michelacci, F.; Landuzzi, L.; Magagnoli, G.; Versteeg, R.; Picci, P.; Hattinger, C. M.; Serra, M. Preclinical Validation of Aurora Kinases-Targeting Drugs in Osteosarcoma. *British Journal of Cancer*, **2013**, *109* (10), 2607–2618. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.643>.
- (144) Kollareddy, M.; Zheleva, D.; Dzubak, P.; Brahmikshatriya, P. S.; Lepsik, M.; Hajduch, M. Aurora Kinase Inhibitors: Progress towards the Clinic. *Investigational New Drugs*, **2012**, *30* (6), 2411–2432. <https://doi.org/10.1007/s10637-012-9798-6>.
- (145) Coumar, M. S.; Cheung, C. H. A.; Chang, J.-Y.; Hsieh, H.-P. Advances in Aurora Kinase Inhibitor Patents: This Review Is One of a Two Part Series on Aurora Kinase Inhibitors. The Other Part 'Aurora Kinase Inhibitors in Clinical and Preclinical Testing' Will Appear in Expert Opinion in Investigational Drugs. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, **2009**, *19* (3), 321–356. <https://doi.org/10.1517/13543770802646949>.
- (146) Gohard, F. H.; St-Cyr, D. J.; Tyers, M.; Earnshaw, W. C. Targeting the INCENP IN-Box-Aurora B Interaction to Inhibit CPC Activity in Vivo. *Open Biology*, **2014**, *4* (11), 140163–140163. <https://doi.org/10.1098/rsob.140163>.



- (147) Chieffi, P. Aurora B: A New Promising Therapeutic Target in Cancer. *Intractable & Rare Diseases Research*, **2018**, *7* (2), 141-144. <https://doi.org/10.5582/irdr.2018.01018>.
- (148) Boss, D. S.; Beijnen, J. H.; Schellens, J. H. M. Clinical Experience with Aurora Kinase Inhibitors: A Review. *The Oncologist*, **2009**, *14* (8), 780-793. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2009-0019>.
- (149) Yeung, S.-C.; Gully, C.; Lee, M.-H. Aurora-B Kinase Inhibitors for Cancer Chemotherapy. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, **2008**, *8* (14), 1514-1525. <https://doi.org/10.2174/138955708786786480>.
- (150) Adams, N. D.; Adams, J. L.; Burgess, J. L.; Chaudhari, A. M.; Copeland, R. A.; Donatelli, C. A.; Drewry, D. H.; Fisher, K. E.; Hamajima, T.; Hardwicke, M. A.; Huffman, W. F.; Koretke-Brown, K. K.; Lai, Z. V.; McDonald, O. B.; Nakamura, H.; Newlander, K. A.; Oleykowski, C. A.; Parrish, C. A.; Patrick, D. R.; Plant, R.; Sarpong, M. A.; Sasaki, K.; Schmidt, S. J.; Silva, D. J.; Sutton, D.; Tang, J.; Thompson, C. S.; Tummino, P. J.; Wang, J. C.; Xiang, H.; Yang, J.; Dhanak, D. Discovery of GSK1070916, a Potent and Selective Inhibitor of Aurora B/C Kinase. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2010**, *53* (10), 3973-4001. <https://doi.org/10.1021/jm901870q>.
- (151) McLaughlin, J.; Markovtsov, V.; Li, H.; Wong, S.; Gelman, M.; Zhu, Y.; Franci, C.; Lang, D. W.; Pali, E.; Lasaga, J.; Low, C.; Zhao, F.; Chang, B.; Gururaja, T. L.; Xu, W.; Baluom, M.; Sweeny, D.; Carroll, D.; Sran, A.; Thota, S.; Parmer, M.; Romane, A.; Clemens, G.; Grossbard, E.; Qu, K.; Jenkins, Y.; Kinoshita, T.; Taylor, V.; Holland, S. J.; Argade, A.; Singh, R.; Pine, P.; Payan, D. G.; Hitoshi, Y. Preclinical Characterization of Aurora Kinase Inhibitor R763/AS703569 Identified through an Image-Based Phenotypic Screen. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, **2010**, *136* (1), 99-113. <https://doi.org/10.1007/s00432-009-0641-1>.
- (152) Bain, J.; Plater, L.; Elliott, M.; Shpiro, N.; Hastie, C. J.; Mclauchlan, H.; Klevernic, I.; Arthur, J. S. C.; Alessi, D. R.; Cohen, P. The Selectivity of Protein Kinase Inhibitors: A Further Update. *Biochemical Journal*, **2007**, *408* (3), 297-315. <https://doi.org/10.1042/BJ20070797>.
- (153) Phadke, M. S.; Sini, P.; Smalley, K. S. M. The Novel ATP-Competitive MEK/Aurora Kinase Inhibitor BI-847325 Overcomes Acquired BRAF Inhibitor Resistance through Suppression of Mcl-1 and MEK Expression. *Molecular Cancer Therapeutics*, **2015**, *14* (6), 1354-1364. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-14-0832>.
- (154) Maitland, M. L.; Piha-Paul, S.; Falchook, G.; Kurzrock, R.; Nguyen, L.; Janisch, L.; Karovic, S.; McKee, M.; Hoening, E.; Wong, S.; Munasinghe, W.; Palma, J.; Donawho, C.; Lian, G. K.; Ansell, P.; Ratain, M. J.; Hong, D. Clinical Pharmacodynamic/Exposure Characterisation of the Multikinase Inhibitor Ilorasertib (ABT-348) in a Phase 1 Dose-Escalation Trial. *British Journal of Cancer*, **2018**, *118* (8), 1042-1050. <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0020-2>.
- (155) Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*, **2016**, *79* (3), 629-661. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01055>.
- (156) Bharate, S. B.; Sawant, S. D.; Singh, P. P.; Vishwakarma, R. A. Kinase Inhibitors of Marine Origin. *Chemical Reviews*, **2013**, *113* (8), 6761-6815. <https://doi.org/10.1021/cr300410v>.
- (157) Mayer, A. M. S.; Glaser, K. B.; Cuevas, C.; Jacobs, R. S.; Kem, W.; Little, R. D.; McIntosh, J. M.; Newman, D. J.; Potts, B. C.; Shuster, D. E. The Odyssey of Marine Pharmaceuticals: A Current Pipeline Perspective. *Trends in Pharmacological Sciences*, **2010**, *31* (6), 255-265. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2010.02.005>.
- (158) Marston, A. Natural Products as a Source of Protein Kinase Activators and Inhibitors. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **2011**, *11* (11), 1333-1339. <https://doi.org/10.2174/156802611795589575>.
- (159) Sánchez, C.; Méndez, C.; Salas, J. A. Indolocarbazole Natural Products: Occurrence, Biosynthesis, and Biological Activity. *Natural Product Reports*, **2006**, *23* (6), 1007-1045. <https://doi.org/10.1039/B601930G>.

- (160) Knapper, S.; Burnett, A. K.; Littlewood, T.; Kell, W. J.; Agrawal, S.; Chopra, R.; Clark, R.; Levis, M. J.; Small, D. A Phase 2 Trial of the FLT3 Inhibitor Lestaurtinib (CEP701) as First-Line Treatment for Older Patients with Acute Myeloid Leukemia Not Considered Fit for Intensive Chemotherapy. *Blood*, **2006**, *108* (10), 3262–3270. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-04-015560>.
- (161) Hexner, E. O.; Serdikoff, C.; Jan, M.; Swider, C. R.; Robinson, C.; Yang, S.; Angeles, T.; Emerson, S. G.; Carroll, M.; Ruggeri, B.; Dobrzanski, P. Lestaurtinib (CEP701) Is a JAK2 Inhibitor That Suppresses JAK2/STAT5 Signaling and the Proliferation of Primary Erythroid Cells from Patients with Myeloproliferative Disorders. *Blood*, **2008**, *111* (12), 5663–5671. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-04-083402>.
- (162) Graff, J. R.; McNulty, A. M.; Hanna, K. R.; Konicek, B. W.; Lynch, R. L.; Bailey, S. N.; Banks, C.; Capen, A.; Goode, R.; Lewis, J. E.; Sams, L.; Huss, K. L.; Campbell, R. M.; Iversen, P. W.; Neubauer, B. L.; Brown, T. J.; Musib, L.; Geeganage, S.; Thornton, D. The Protein Kinase C $\beta$ -Selective Inhibitor, Enzastaurin (LY317615.HCl), Suppresses Signaling through the AKT Pathway, Induces Apoptosis, and Suppresses Growth of Human Colon Cancer and Glioblastoma Xenografts. *Cancer Research*, **2005**, *65* (16), 7462–7469. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0071>.
- (163) Cuadrado, A.; García-Fernández, L. F.; González, L.; Suárez, Y.; Losada, A.; Alcaide, V.; Martínez, T.; Fernández-Sousa, J.; Sánchez-Puelles, J. M.; Muñoz, A. Aplidin<sup>TM</sup> Induces Apoptosis in Human Cancer Cells via Glutathione Depletion and Sustained Activation of the Epidermal Growth Factor Receptor, Src, JNK, and P38 MAPK. *Journal of Biological Chemistry*, **2003**, *278* (1), 241–250. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201010200>.
- (164) Ortin, A. PharmaMar Has Submitted a Phase II Clinical Trial of Aplidin® (Plitidepsin) for the Treatment of COVID-19 to the Spanish Medicines Agency. **2020**.
- (165) Canals, A.; Arribas-Bosacoma, R.; Albericio, F.; Álvarez, M.; Aymamí, J.; Coll, M. Intercalative DNA Binding of the Marine Anticancer Drug Variolin B. *Scientific Reports*, **2017**, *7* (39680), 1–5. <https://doi.org/10.1038/srep39680>.
- (166) Al-Mourabit, A.; Zancanella, M. A.; Tilvi, S.; Romo, D. Biosynthesis, Asymmetric Synthesis, and Pharmacology, Including Cellular Targets, of the Pyrrole-2-Aminoimidazole Marine Alkaloids. *Natural Product Reports*, **2011**, *28*, 1229–1260. <https://doi.org/10.1039/c0np00013b>.
- (167) Singh, K. S.; Majik, M. S. Pyrrole-Derived Alkaloids of Marine Sponges and Their Biological Properties. In *Studies in Natural Products Chemistry*; Elsevier, **2019**, Vol. 62, 377–409. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64185-4.00010-1>.
- (168) Hoffmann, H.; Lindel, T. Synthesis of the Pyrrole-Imidazole Alkaloids. *Synthesis*, **2003**, *12*, 1753–1783. <https://doi.org/10.1055/s-2003-41005>.
- (169) Morales, J. J.; Rodríguez, A. D. The Structure of Clathrocin, a Novel Alkaloid Isolated from the Caribbean Sea Sponge *Agelas Clathrodes*. *Journal of Natural Products*, **1991**, *54* (2), 629–631. <https://doi.org/10.1021/np50074a051>.
- (170) Kobayashi, J.; Ohizumi, Y.; Nakamura, H.; Hirata, Y. A Novel Antagonist of Serotonergic Receptors, Hymenidin, Isolated from the Okinawan Marine Sponge *Hymeniacidon* Sp. *Experientia*, **1986**, *42* (10), 1176–1177. <https://doi.org/10.1007/BF01941300>.
- (171) Forenza, S.; Minale, L.; Riccio, R.; Fattorusso, E. New Bromo-Pyrrole Derivatives from the Sponge *Agelas Oroides*. *Journal of the Chemical Society D: Chemical Communications*, **1971**, No. 18, 1129. <https://doi.org/10.1039/c29710001129>.
- (172) Lindel, T. Chemistry and Biology of the Pyrrole-Imidazole Alkaloids. In *The Alkaloids: Chemistry and Biology*; Elsevier, **2017**; Vol. 77, 117–219. <https://doi.org/10.1016/bs.alkal.2016.12.001>.
- (173) Forte, B.; Malgesini, B.; Piutti, C.; Quartieri, F.; Scolaro, A.; Papeo, G. A Submarine Journey: The Pyrrole-Imidazole Alkaloids. *Marine Drugs*, **2009**, *7* (4), 705–753. <https://doi.org/10.3390/md7040705>.

- (174) Al-Mourabit, A.; Potier, P. Sponge's Molecular Diversity Through the Ambivalent Reactivity of 2-Aminoimidazole: A Universal Chemical Pathway to the Oroidin-Based Pyrrole-Imidazole Alkaloids and Their Palau'amine Congeners. *European Journal of Organic Chemistry*, **2001**, 237–243.
- (175) Richards, J. J.; Ballard, T. E.; Huigens, R. W.; Melander, C. Synthesis and Screening of an Oroidin Library against *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilms. *ChemBioChem*, **2008**, *9* (8), 1267–1279. <https://doi.org/10.1002/cbic.200700774>.
- (176) Zidar, N.; Montalvão, S.; Hodnik, Ž.; Nawrot, D.; Žula, A.; Ilaš, J.; Kikelj, D.; Tammela, P.; Mašič, L. Antimicrobial Activity of the Marine Alkaloids, Clathrocin and Oroidin, and Their Synthetic Analogues. *Marine Drugs*, **2014**, *12* (2), 940–963. <https://doi.org/10.3390/md12020940>.
- (177) Cafieri, F.; Fattorusso, E.; Mangoni, A.; Taglialatela-Scafati, O. Dispacamides, Anti-Histamine Alkaloids from Caribbean Agelas Sponges. *Tetrahedron Letters*, **1996**, *37* (20), 3587–3590. [https://doi.org/10.1016/0040-4039\(96\)00629-6](https://doi.org/10.1016/0040-4039(96)00629-6).
- (178) Lindel, T.; Hoffmann, H.; Rtel, M. H.; Pawlik, J. R. Structure-Activity Relationship of Inhibition of Fish Feeding by Sponge-Derived and Synthetic Pyrrole-Imidazole Alkaloids. *Journal of Chemical Ecology*, **2000**, *26* (6), 1477–1496.
- (179) Sharma, G. M.; Buyer, J. S.; Pomerantz, M. W. Characterization of a Yellow Compound Isolated from the Marine Sponge *Phakellia Flabellata*. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, **1980**, 10, 435–436. <https://doi.org/10.1039/c39800000435>.
- (180) Supriyono, A.; Schwarz, B.; Wray, V.; Witte, L.; Müller, W. E.; van Soest, R.; Sumaryono, W.; Proksch, P. Bioactive Alkaloids from the Tropical Marine Sponge *Axinella Carteri*. *Z. Naturforsch., C, Journal of Biosciences*, **1995**, *50* (9–10), 669–674. <https://doi.org/10.1515/znc-1995-9-1012>.
- (181) Williams, D. H.; Faulkner, D. J. Isomers and Tautomers of Hymenialdisine and Debromohymenialdisine. *Natural Product Letters*, **1996**, *9* (1), 57–64. <https://doi.org/10.1080/10575639608043579>.
- (182) Patil, A. D.; Freyer, A. J.; Killmer, L.; Hofmann, G.; Johnson, R. K. Z-Axinohydantoin and Debromo-Z-Axinohydantoin from the Sponge *Stylotella Aurantium*: Inhibitors of Protein Kinase C. *Natural Product Letters*, **1997**, *9* (3), 201–207. <https://doi.org/10.1080/10575639708048315>.
- (183) Pettit, G. R.; McNulty, J.; Herald, D. L.; Doubek, D. L.; Chapuis, J.-C.; Schmidt, J. M.; Tackett, L. P.; Boyd, M. R. Antineoplastic Agents. 362. Isolation and X-Ray Crystal Structure of Dibromophakellstatin from the Indian Ocean Sponge *Phakellia Mauritian*. *Journal of Natural Products*, **1997**, *60* (2), 180–183. <https://doi.org/10.1021/np9606106>.
- (184) D'Ambrosio, M.; Guerriero, A.; Debitus, C.; Ribes, O.; Pusset, J.; Leroy, S.; Pietra, F. Agelastatin a, a New Skeleton Cytotoxic Alkaloid of the Oroidin Family. Isolation from the Axinellid Sponge *Agelas Dendromorpha* of the Coral Sea. *Journal of Chemical Society, Chemical Communications*, **1993**, *16*, 1305–1306. <https://doi.org/10.1039/c39930001305>.
- (185) Tsukamoto, S.; Kato, H.; Hirota, H.; Fusetani, N. Mauritiamine, a New Antifouling Oroidin Dimer from the Marine Sponge *Agelas Mauritian*. *Journal of Natural Products*, **1996**, *59* (5), 501–503. <https://doi.org/10.1021/np960113p>.
- (186) Yasuda, T.; Araki, A.; Kubota, T.; Ito, J.; Mikami, Y.; Fromont, J.; Kobayashi, J. Bromopyrrole Alkaloids from Marine Sponges of the Genus *Agelas*. *Journal of Natural Products*, **2009**, *72* (3), 488–491. <https://doi.org/10.1021/np800645q>.
- (187) Cychon, C.; Lichte, E.; Köck, M. The Marine Sponge *Agelas Citrina* as a Source of the New Pyrrole-Imidazole Alkaloids Citrinamines A–D and *N*-Methylagelongine. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, **2015**, *11*, 2029–2037. <https://doi.org/10.3762/bjoc.11.220>.
- (188) Endo, T.; Tsuda, M.; Okada, T.; Mitsuhashi, S.; Shima, H.; Kikuchi, K.; Mikami, Y.; Fromont, J.; Kobayashi, J. Nagelamides A–H, New Dimeric Bromopyrrole Alkaloids from Marine Sponge *Agelas* Species. *Journal of Natural Products*, **2004**, *67* (8), 1262–1267. <https://doi.org/10.1021/np034077n>.

- (189) Patel, K.; Laville, R.; Martin, M.-T.; Tilvi, S.; Moriou, C.; Gallard, J.-F.; Ermolenko, L.; Debitus, C.; Al-Mourabit, A. Unprecedented Stylistazoles A–C from *Stylissa Carteri*: Another Dimension for Marine Pyrrole-2-Aminoimidazole Metabolite Diversity. *Angewandte Chemie International Edition*, **2010**, *49* (28), 4775–4779. <https://doi.org/10.1002/anie.201000444>.
- (190) Walker, R. P.; Faulkner, D. J.; Engen, D. V.; Clardy, J. Scepterin, an Antimicrobial Agent from the Sponge *Agelas Scepterum*. *Journal of the American Chemical Society*, **1981**, *102*, 6772–6773.
- (191) Richelle-Maurer, E.; De Kluijver, M. J.; Feio, S.; Gaudêncio, S.; Gaspar, H.; Gomez, R.; Tavares, R.; Van de Vyver, G.; Van Soest, R. W. M. Localization and Ecological Significance of Oroidin and Scepterin in the Caribbean Sponge *Agelas Conifera*. *Biochemical Systematics and Ecology*, **2003**, *31* (10), 1073–1091. [https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(03\)00072-3](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(03)00072-3).
- (192) Keifer, P. A.; Schwartz, R. E.; Koker, M. E. S.; Hughes, R. G.; Rittschof, D.; Rinehart, K. L. Bioactive Bromopyrrole Metabolites from the Caribbean Sponge *Agelas Conifera*. *Journal of Organic Chemistry*, **1991**, *56* (9), 2965–2975. <https://doi.org/10.1021/jo00009a008>.
- (193) Shen, X.; Perry, T. L.; Dunbar, C. D.; Kelly-Borges, M.; Hamann, M. T. Debromoscepterin, an Alkaloid from the Caribbean Sponge *Agelas Conifera*. *Journal of Natural Products*, **1998**, *61* (10), 1302–1303. <https://doi.org/10.1021/np980129a>.
- (194) Cafieri, F.; Carnuccio, R.; Fattorusso, E.; Tagliatela-Scafati, O.; Vallefucio, T. Anti-Histaminic Activity of Bromopyrrole Alkaloids Isolated from Caribbean *Agelas* Sponges. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **1997**, *7* (17), 2283–2288. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(97\)00415-0](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(97)00415-0).
- (195) Vassas, A.; Bourdy, G.; Paillard, J.; Lavayre, J.; País, M.; Quirion, J.; Debitus, C. Naturally Occurring Somatostatin and Vasoactive Intestinal Peptide Inhibitors. Isolation of Alkaloids from Two Marine Sponges. *Planta Medica*, **1996**, *62* (1), 28–30. <https://doi.org/10.1055/s-2006-957790>.
- (196) Appenzeller, J.; Tilvi, S.; Martin, M.-T.; Gallard, J.-F.; El-bitar, H.; Dau, E. T. H.; Debitus, C.; Laurent, D.; Moriou, C.; Al-Mourabit, A. Benzosceptrins A and B with a Unique Benzocyclobutane Skeleton and Nagelamide S and T from Pacific Sponges. *Organic Letters*, **2009**, *11* (21), 4874–4877. <https://doi.org/10.1021/ol901946h>.
- (197) Tilvi, S.; Moriou, C.; Martin, M.-T.; Gallard, J.-F.; Sorres, J.; Patel, K.; Petek, S.; Debitus, C.; Ermolenko, L.; Al-Mourabit, A. Agelastatin E, Agelastatin F, and Benzoscepterin C from the Marine Sponge *Agelas Dendromorpha*. *Journal of Natural Products*, **2010**, *73* (4), 720–723. <https://doi.org/10.1021/np900539j>.
- (198) Kubota, T.; Araki, A.; Yasuda, T.; Tsuda, M.; Fromont, J.; Aoyama, K.; Mikami, Y.; Wälchli, M. R.; Kobayashi, J. Benzoscepterin C, a New Dimeric Bromopyrrole Alkaloid from Sponge *Agelas* Sp. *Tetrahedron Letters*, **2009**, *50* (52), 7268–7270. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2009.10.017>.
- (199) Muñoz, J.; Moriou, C.; Gallard, J.-F.; Marie, P. D.; Al-Mourabit, A. Donnazoles A and B from *Axinella* *Donnani* Sponge: Very Close Derivatives from the Postulated Intermediate 'Pre-Axinellamine.' *Tetrahedron Letters*, **2012**, *53* (44), 5828–5832. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2012.07.110>.
- (200) Nishimura, S.; Matsunaga, S.; Shibasaki, M.; Suzuki, K.; Furihata, K.; van Soest, R. W. M.; Fusetani, N. Massadine, a Novel Geranylgeranyltransferase Type I Inhibitor from the Marine Sponge *Stylissa aff. massa*. *Organic Letters*, **2003**, *5* (13), 2255–2257. <https://doi.org/10.1021/ol034564u>.
- (201) Kinnel, R. B.; Gehrken, H. P.; Scheuer, P. J. Palau'amine: A Cytotoxic and Immunosuppressive Hexacyclic Bisguanidine Antibiotic from the Sponge *Stylotella Agminata*. *Journal of the American Chemical Society*, **1993**, *115* (8), 3376–3377. <https://doi.org/10.1021/ja00061a065>.
- (202) Grube, A.; Köck, M. Stylissadines A and B: The First Tetrameric Pyrrole–Imidazole Alkaloids †. *Organic Letters*, **2006**, *8* (21), 4675–4678. <https://doi.org/10.1021/ol061317s>.
- (203) Meijer, L.; Thunnissen, A.-M.; White, A.; Garnier, M.; Nikolic, M.; Tsai, L.-H.; Walter, J.; Cleverley, K.; Salinas, P.; Wu, Y.-Z.; Biernat, J.; Mandelkow, E.-M.; Kim, S.-H.; Pettit, G. Inhibition of Cyclin-Dependent

- Kinases, GSK-3 $\beta$  and CK1 by Hymenialdisine, a Marine Sponge Constituent. *Chemistry & Biology*, **2000**, 7(1), 51–63. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(00\)00063-6](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(00)00063-6).
- (204) Skropeta, D.; Pastro, N.; Zivanovic, A. Kinase Inhibitors from Marine Sponges. *Marine Drugs*, **2011**, 9(10), 2131–2154. <https://doi.org/10.3390/md9102131>.
- (205) Nguyen, T.; Tepe, J. Preparation of Hymenialdisine, Analogues and Their Evaluation as Kinase Inhibitors. *Current Medicinal Chemistry*, **2009**, 16 (24), 3122–3143. <https://doi.org/10.2174/092986709788803015>.
- (206) He, Q.; Chen, W.; Qin, Y. Synthesis of 2-Substituted Endo-Hymenialdisine Derivatives. *Tetrahedron Letters*, **2007**, 48 (11), 1899–1901. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2007.01.114>.
- (207) Mangu, N.; Kaiser, H. M.; Kar, A.; Spannenberg, A.; Beller, M.; Tse, M. K. Synthesis of Novel Hymenialdisine Analogues Using Solvent-Free and Silica Gel-Promoted Ring Opening of Epoxides. *Tetrahedron*, **2008**, 64 (30–31), 7171–7177. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2008.05.092>.
- (208) Parmentier, J.-G.; Portevin, B.; Golsteyn, R. M.; Pierré, A.; Hickman, J.; Gloanec, P.; De Nanteuil, G. Synthesis and CHK1 Inhibitory Potency of Hymenialdisine Analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2009**, 19 (3), 841–844. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.12.001>.
- (209) Wan, Y.; Hur, W.; Cho, C. Y.; Liu, Y.; Adrian, F. J.; Lozach, O. Synthesis and Target Identification of Hymenialdisine Analogs. *Chemistry and Biology*, **2004**, 11, 247–259.
- (210) Tasdemir, D.; Mallon, R.; Greenstein, M.; Feldberg, L. R.; Kim, S. C.; Collins, K.; Wojciechowicz, D.; Mangalindan, G. C.; Concepción, G. P.; Harper, M. K.; Ireland, C. M. Aldisine Alkaloids from the Philippine Sponge *Stylissa m Assa* Are Potent Inhibitors of Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase-1 (MEK-1). *Journal of Medicinal Chemistry*, **2002**, 45 (2), 529–532. <https://doi.org/10.1021/jm0102856>.
- (211) Nakao, Y.; Fusetani, N. Enzyme Inhibitors from Marine Invertebrates. *Journal of Natural Products*, **2007**, 70 (4), 689–710. <https://doi.org/10.1021/np060600x>.
- (212) Zöllinger, M.; Kelter, G.; Fiebig, H.-H.; Lindel, T. Antitumor Activity of the Marine Natural Product Dibromophakellstatin in Vitro. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2007**, 17 (2), 346–349. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2006.10.046>.
- (213) Kobayashi, J.; Inaba, K.; Tsuda, M. Tauroacidins A and B, New Bromopyrrole Alkaloids Possessing a Taurine Residue from Hymeniacidon Sponge. *Tetrahedron*, **1997**, 53 (49), 16679–16682. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(97\)10097-7](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(97)10097-7).
- (214) Corbin, M. Formation de liaisons carbone-azote: application à la synthèse de benzazoles et de produits naturels marins bioactifs (Thèse de Doctorat). **2016**, Université Paris-Saclay. NNT: 2016SACLS324.
- (215) Benchekroun, M.; Ermolenko, L.; Tran, M. Q.; Vagneux, A.; Nedev, H.; Delehouzé, C.; Souab, M.; Baratte, B.; Josselin, B.; Iorga, B. I.; Ruchaud, S.; Bach, S.; Al-Mourabit, A. Discovery of Simplified Benzazole Fragments Derived from the Marine Benzosceptrin B as Necroptosis Inhibitors Involving the Receptor Interacting Protein Kinase-1. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2020**, 112337. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112337>.
- (216) Tran, M. Q.; Ermolenko, L.; Retaillieu, P.; Nguyen, T. B.; Al-Mourabit, A. Reaction of Quinones and Guanidine Derivatives: Simple Access to Bis-2-Aminobenzimidazole Moiety of Benzosceptrin and Other Benzazole Motifs. *Organic Letters*, **2014**, 16, 920–923.
- (217) Tran, M. Q.; Nguyen, T. B.; Sawadogo, W. R.; Ermolenko, L.; Song, S.; Retaillieu, P.; Diederich, M.; Al-Mourabit, A. Unaromatized Tetrahydrobenzimidazole Synthesis from *p*-Benzoquinone and *N*-Arylamidines and Their Cytotoxic Potential: Unaromatized Tetrahydrobenzimidazole Synthesis from *p*-Benzoquinone and *N*-Arylamidines and Their Cytotoxic Potential. *European Journal of Organic Chemistry*, **2018**, 2018 (42), 5878–5884. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201801077>.
- (218) Song, S.; Lee, J.-Y.; Ermolenko, L.; Mazumder, A.; Ji, S.; Ryu, H.; Kim, H.; Kim, D.-W.; Lee, J. W.; Dicato, M.; Christov, C.; Schneckenger, M.; Cerella, C.; Gérard, D.; Orlikova-Boyer, B.; Al-Mourabit, A.;

- Diederich, M. Tetrahydrobenzimidazole TMQ0153 Triggers Apoptosis, Autophagy and Necroptosis Crosstalk in Chronic Myeloid Leukemia. *Cell Death and Disease*, **2020**, *11* (109), 1-20. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2304-8>.
- (219) Sasmal, P. K.; Chandrasekhar, A.; Sridhar, S.; Iqbal, J. Novel One-Step Method for the Conversion of Isothiocyanates to 2-Alkyl(Aryl)Aminothiazoles. *Tetrahedron*, **2008**, *64* (49), 11074–11080. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2008.09.074>.
- (220) Rival, Y.; Grassyl, G.; Taudou, A.; Ecalle, R. Antifungal Activity in Vitro of Some Imidazo[1,2-*Al*]pyrimidine Derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **1991**, *26*, 13–18.
- (221) Ravi, C.; Adimurthy, S. Synthesis of Imidazo[1,2-*a*]Pyridines: C-H Functionalization in the Direction of C-S Bond Formation. *The Chemical Record*, **2017**, *17* (10), 1019–1038. <https://doi.org/10.1002/tcr.201600146>.
- (222) Sonogashira, K.; Tohda, Y.; Hagihara, N. A Convenient Synthesis of Acetylenes: : Catalytic Substitutions of Acetylenic Hydrogen with Bromoalkenes, Iodarenes and Dromopyridines. *Tetrahedron Letters*, **1975**, *50*, 4467–4470.
- (223) Stephens, R. D.; Castro, C. E. The Substitution of Aryl Iodides with Cuprous Acetylides. A Synthesis of Tolanes and Heterocyclics. *Journal of Organic Chemistry*, **1963**, *28* (12), 3313–3315. <https://doi.org/10.1021/jo01047a008>.
- (224) Chinchilla, R.; Nájera, C. The Sonogashira Reaction: A Booming Methodology in Synthetic Organic Chemistry. *Chemical Reviews*, **2007**, *107*(3), 874–922. <https://doi.org/10.1021/cr050992x>.
- (225) Chinchilla, R.; Nájera, C. Recent Advances in Sonogashira Reactions. *Chemical Society Reviews*, **2011**, *40*, 5084–5121. <https://doi.org/10.1039/c1cs15071e>.
- (226) Bleicher, L.; Cosford, N. Aryl- and Heteroaryl-Alkyne Coupling Reactions Catalyzed by Palladium on Carbon and CuI in an Aqueous Medium. *Synlett*, **1995**, *11*, 1115–1116. <https://doi.org/10.1055/s-1995-5220>.
- (227) Batchu, V. R.; Subramanian, V.; Parasuraman, K.; Swamy, N. K.; Kumar, S.; Pal, M. Pd/C-Mediated Coupling of Aryl Halides with Terminal Alkynes in Water. *Tetrahedron*, **2005**, *61* (41), 9869–9877. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2005.06.056>.
- (228) Jover, J.; Spuhler, P.; Zhao, L.; McArdle, C.; Maseras, F. Toward a Mechanistic Understanding of Oxidative Homocoupling: The Glaser–Hay Reaction. *Catalysis Science Technology*, **2014**, *4* (12), 4200–4209. <https://doi.org/10.1039/C4CY00322E>.
- (229) Allmann, T. C.; Moldovan, R.-P.; Jones, P. G.; Lindel, T. Synthesis of Hydroxypyrrone Carboxamides Employing Selectfluor. *Chemistry: A European Journal*, **2016**, *22* (1), 111–115. <https://doi.org/10.1002/chem.201503695>.
- (230) Huigens III, R. W.; Rogers, S. A.; Steinhauer, A. T.; Melander, C. Inhibition of *Acinetobacter Baumannii*, *Staphylococcus Aureus* and *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilm Formation with a Class of TAGE-Triazole Conjugates. *Organic & Biomolecular Chemistry*, **2009**, *7* (4), 794. <https://doi.org/10.1039/b817926c>.
- (231) Essa, A. H.; Lerrick, R. I.; Tuna, F.; Harrington, R. W.; Clegg, W.; Hall, M. J. Reduction of 2,2,2-Trichloro-1-Aryl-Ethanones by RMgX: Mechanistic Investigations and the Synthesis of Substituted  $\alpha,\alpha$ -Dichloro-Ketones. *Chemical Communications*, **2013**, *49*, 2756–2758.
- (232) Cheng, P.; Clive, D. L. J.; Fernandopulle, S.; Chen, Z. Racemic Marinopyrrole B by Total Synthesis. *Chemical Communications*, **2013**, *49* (6), 558–560. <https://doi.org/10.1039/C2CC37110C>.
- (233) Guihéneuf, S.; Paquin, L.; Carreaux, F.; Durieu, E.; Meijer, L.; Bazureau, J. P. An Efficient Approach to Dispacamide A and Its Derivatives. *Organic & Biomolecular Chemistry*, **2012**, *10* (5), 978–987. <https://doi.org/10.1039/C1OB06161E>.

- (234) Barker, W. T.; Chandler, C. E.; Melander, R. J.; Ernst, R. K.; Melander, C. Tryptamine Derivatives Disarm Colistin Resistance in Polymyxin-Resistant Gram-Negative Bacteria. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2019**, *27*(9), 1776–1788. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.03.019>.
- (235) Ahmad, S.; Alam, O.; Naim, Mohd. J.; Shaquiquzzaman, M.; Alam, M. M.; Iqbal, M. Pyrrole: An Insight into Recent Pharmacological Advances with Structure Activity Relationship. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2018**, *157*, 527–561. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.08.002>.
- (236) Gholap, S. S. Pyrrole: An Emerging Scaffold for Construction of Valuable Therapeutic Agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2016**, *110*, 13–31. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.12.017>.
- (237) Tzankova, D.; Vladimirova, S.; Peikova, L.; Georgieva, M. Synthesis of pyrrole and substituted pyrroles (Review). *Journal of Chemical technology and Metallurgy*, **2018**, *53*(3), 451–464.
- (238) Khaghaninejad, S.; Heravi, M. M. Paal–Knorr Reaction in the Synthesis of Heterocyclic Compounds. In *Advances in Heterocyclic Chemistry*, Elsevier, **2014**; Vol. 111, 95–146. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420160-6.00003-3>.
- (239) Amarnath, V.; Anthony, D. C.; Amarnath, K.; Valentine, W. M.; Wetterau, L. A.; Graham, D. G. Intermediates in the Paal–Knorr Synthesis of Pyrroles. *Journal of Organic Chemistry*, **1991**, *56*(24), 6924–6931. <https://doi.org/10.1021/jo00024a040>.
- (240) Jones, R. A. *Pyrroles, Part 1*; John Wiley & Sons, **2009**.
- (241) Fischer, H.; Fink, E. A New Synthesis of Pyrroles. *Z. Physiol. Chem.* **1948**, *283*, 152–161.
- (242) Roomi, M. W.; MacDonald, S. F. The Hantzsch Pyrrole Synthesis. *Canadian Journal of Chemistry*, **1970**, *48*(11), 1689–1697. <https://doi.org/10.1139/v70-279>.
- (243) Barton, D. H. R.; Zard, S. Z. A New Synthesis of Pyrroles from Nitroalkenes. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, **1985**, *16*, 1098–1100. <https://doi.org/10.1039/c39850001098>.
- (244) Wang, Z. Trofimov Reaction. In *Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents*, John Wiley & Sons, Inc., **2010**.
- (245) Leeper, F. J.; Kelly, J. M. Synthesis of 3,4-Disubstituted Pyrroles. A Review. *Organic Preparations and Procedures International*, **2013**, *45*(3), 171–210. <https://doi.org/10.1080/00304948.2013.786590>.
- (246) Ma, Z.; Ma, Z.; Zhang, D. Synthesis of Multi-Substituted Pyrrole Derivatives Through [3+2] Cycloaddition with Tosylmethyl Isocyanides (TosMICs) and Electron-Deficient Compounds. *Molecules*, **2018**, *23*(10), 2666. <https://doi.org/10.3390/molecules23102666>.
- (247) Lopchuk, J. M. Chapter 4.2 - Five-Membered Ring Systems: Pyrroles and Benzo Analogs. In *Progress in Heterocyclic Chemistry*, Gribble, G. W., Joule, J. A., Eds.; Elsevier, **2013**; Vol. 25, 137–182. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-099406-2.00007-8>.
- (248) Chandrashaker, V.; Taniguchi, M.; Ptaszek, M.; Lindsey, J. S. Competing Knorr and Fischer–Fink Pathways to Pyrroles in Neutral Aqueous Solution. *Tetrahedron*, **2012**, *68*(34), 6957–6967. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2012.05.080>.
- (249) Rapoport, H.; Harbuct, J. W. Mechanism of a Modified Knorr Pyrrole Condensation. *Journal of Organic Chemistry*, **1971**, *36*(6), 853–855. <https://doi.org/10.1021/jo00805a030>.
- (250) Paine, J. B.; Dolphin, D. Pyrrole Chemistry. An Improved Synthesis of Ethyl Pyrrole-2-Carboxylate Esters from Diethyl Aminomalonate. *Journal of Organic Chemistry*, **1985**, *50*(26), 5598–5604. <https://doi.org/10.1021/jo00350a033>.
- (251) Chen, W.; Zhao, C.; Deng, X. Synthesis of Deuterium-Labeled 2-Quinoxalinecarboxylic Acid and 3-Methylquinoxaline-2-Carboxylic Acid from Deuterium Aniline. *Journal of Labelled Compounds Radiopharmaceuticals*, **2018**, *61*(14), 1043–1047. <https://doi.org/10.1002/jlcr.3679>.
- (252) Jr, I. R. C.; Moran, P. J. S. Diastereoselective Reduction of E and Z  $\alpha$ -Alkoxyimino-[ $\alpha$ ]-Ketoesters by Sodium Borohydride. *Tetrahedron*, **1999**, *12*.

- (253) Wallace, M. Preparation of 4,5-Dialkyl-3-Acyl-Pyrrole-2-Carboxylic Acid Derivatives by Fischer-Fink Synthesis and Subsequent Acylation. WO2005/042484, **2005**.
- (254) Dasgupta, R.; Rajulu, G., Govinda; Dickson, J., K. Novel Oxazole Compounds as  $\beta$ -Catenin Modulators and Uses Thereof. WO2016/81451, **2016**.
- (255) Yasui, K.; Morioka, Y.; Hanasaki, K. Antipuritics. EP1477186, **2004**.
- (256) Sekiguchi, Y.; Kanuma, K.; Omodera, K.; Sato, K.; Hayashi, M.; Yamamoto, S. Pyridine Derivatives and Their Use as Medicaments for Treating Diseases Related to Mch Receptor. WO2006/035967A1, **2006**.
- (257) Kuwano, R.; Kashiwabara, M.; Ohsumi, M.; Kusano, H. Catalytic Asymmetric Hydrogenation of 2,3,5-Trisubstituted Pyrroles. *Journal of the American Chemical Society, Communications*, **2008**, *130*, 808-809. <https://doi.org/10.1021/ja7102422>.
- (258) Clezy, P. S.; Nichol, A. W. Chemistry of Pyrrolic Compounds. *Australian Journal of Chemistry*, **1965**, *18*, 1977-1987.
- (259) Falk, H.; Hofer, O.; Lehner, H. Zum Problem der Selektivitiit yon Pyrrosynthesen: Isomere und Homologe bei Synthesen naeh Fischer-Fink. *Monatshefte Fur Chemie*, **1973**, *104*, 925-932.
- (260) Gribble, G. Biological Activity of Recently Discovered Halogenated Marine Natural Products. *Marine Drugs*, **2015**, *13* (7), 4044-4136. <https://doi.org/10.3390/md13074044>.
- (261) Faulkner, D. *Marine Natural Products Chemistry*, Springer Science & Business Media, **2012**.
- (262) Thomson, R. H. *International Symposium on Marine Natural Products: Plenary Lectures Presented at the International Symposium on Marine Natural Products, Aberdeen, Scotland, 8 - 11 September 1975*; Elsevier, **2013**.
- (263) Cooper, R.; Snyder, J. K. *The Biology - Chemistry Interface: A Tribute To Koji Nakanishi*; CRC Press, **1999**.
- (264) Hernandes, M.; Cavalcanti, S. M.; Moreira, D. R.; de Azevedo Junior, W.; Leite, A. C. Halogen Atoms in the Modern Medicinal Chemistry: Hints for the Drug Design. *Current Drug Targets*, **2010**, *11* (3), 303-314. <https://doi.org/10.2174/138945010790711996>.
- (265) Cavallo, G.; Metrangolo, P.; Milani, R.; Pilati, T.; Priimagi, A.; Resnati, G.; Terraneo, G. The Halogen Bond. *Chemical Reviews*, **2016**, *116* (4), 2478-2601. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00484>.
- (266) Shinada, N. K.; de Brevern, A. G.; Schmidtke, P. Halogens in Protein-Ligand Binding Mechanism: A Structural Perspective. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2019**, *62* (21), 9341-9356. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01453>.
- (267) Mendez, L.; Henriquez, G.; Sirimulla, S.; Narayan, M. Looking Back, Looking Forward at Halogen Bonding in Drug Discovery. *Molecules*, **2017**, *22* (9), 1397. <https://doi.org/10.3390/molecules22091397>.
- (268) Meanwell, N. A. Fluorine and Fluorinated Motifs in the Design and Application of Bioisosteres for Drug Design. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2018**, *61* (14), 5822-5880. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01788>.
- (269) Hagmann, W. K. The Many Roles for Fluorine in Medicinal Chemistry. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2008**, *51* (15), 4359-4369. <https://doi.org/10.1021/jm800219f>.
- (270) Corr, M. J.; Smith, D. R. M.; Goss, R. J. M. One-Pot Access to l-5,6-Dihalotryptophans and l-Alknyltryptophans Using Tryptophan Synthase. *Tetrahedron*, **2016**, *72* (46), 7306-7310. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2016.02.016>.
- (271) Hashmi, A. S. K.; Schuster, A. M.; Rominger, F. Gold Catalysis: Isolation of Vinylgold Complexes Derived from Alkynes. *Angewandte Chemie International Edition*, **2009**, *48* (44), 8247-8249. <https://doi.org/10.1002/anie.200903134>.
- (272) Hashmi, A. S. K.; Lothschütz, C.; Graf, K.; Häffner, T.; Schuster, A.; Rominger, F. A Short Way to Switchable Carbenes. *Advanced Synthesis & Catalysis*, **2011**, *353* (9), 1407-1412. <https://doi.org/10.1002/adsc.201100183>.



- (273) Hashmi, A. S. K.; Schuster, A. M.; Litters, S.; Rominger, F.; Pernpointner, M. Gold Catalysis: 1,3-Oxazines by Cyclisation of Allene Amides. *Chemistry: A European Journal*, **2011**, *17* (20), 5661–5667. <https://doi.org/10.1002/chem.201100132>.
- (274) Hashmi, A. S. K.; Schuster, A. M.; Schmuck, M.; Rominger, F. Gold-Catalyzed Cyclization of Nonterminal Propargylic Amides to Substituted Alkylideneoxazolines and -Oxazines. *European Journal of Organic Chemistry*, **2011**, *2011* (24), 4595–4602. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201100342>.
- (275) Crisp, G. T.; Flynn, B. L. Palladium-Catalyzed Coupling of Terminal Alkynes with 5-(Trifluoromethanesulfonyloxy)Pyrimidine Nucleosides. *Journal of Organic Chemistry*, **1993**, *58* (24), 6614–6619. <https://doi.org/10.1021/jo00076a019>.
- (276) Baltus, C. B.; Jorda, R.; Marot, C.; Berka, K.; Bazgier, V.; Kryštof, V.; Prié, G.; Viaud-Massuard, M.-C. Synthesis, Biological Evaluation and Molecular Modeling of a Novel Series of 7-Azaindole Based Tri-Heterocyclic Compounds as Potent CDK2/Cyclin E Inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2016**, *108*, 701–719. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.12.023>.
- (277) Tasch, B. O. A.; Merkul, E.; Müller, T. J. J. One-Pot Synthesis of Diazine-Bridged Bisindoles and Concise Synthesis of the Marine Alkaloid Hyrtinadine A. *European Journal of Organic Chemistry*, **2011**, *2011* (24), 4532–4535. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201100680>.
- (278) Merkul, E.; Klukas, F.; Dorsch, D.; Grädler, U.; Greiner, H. E.; Müller, T. J. J. Rapid Preparation of Triazolyl Substituted NH-Heterocyclic Kinase Inhibitors via One-Pot Sonogashira Coupling–TMS-Deprotection–CuAAC Sequence. *Organic & Biomolecular Chemistry*, **2011**, *9* (14), 5129. <https://doi.org/10.1039/c1ob05586k>.
- (279) Huang, R. Y.; Franke, P. T.; Nicolaus, N.; Lautens, M. Domino C–H Functionalization Reactions of Gem-Dibromoolefins: Synthesis of N-Fused Benzo[c]Carbazoles. *Tetrahedron*, **2013**, *69*(22), 4395–4402. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2013.01.001>.
- (280) Diefenbacher, C.; Gideon, Engler, T., Albert; li, H.-Y.; Malhotra, S.; Sawyer, J., Scott; Wang, Y. TGF-Beta Inhibitors. WO2006/52568, **2006**.
- (281) Marhadour, S. Synthèse et Évaluation Biologique d’imidazo[1,2-a]Pyridines et d’imidazo[1,2-a]Pyrazines Substituées (Thèse de Doctorat). Université de Nantes, **2012**.
- (282) Goel, R.; Luxami, V.; Paul, K. Recent Advances in Development of Imidazo[1,2-a]Pyrazines: Synthesis, Reactivity and Their Biological Applications. *Organic & Biomolecular Chemistry*, **2015**, *13*(12), 3525–3555. <https://doi.org/10.1039/C4OB01380H>.
- (283) Yu, T.; Zhang, Y.; Kerekes, A. D.; Tagat, J. R.; Doll, R. J.; Xiao, Y.; Esposito, S.; Hruza, A.; Belanger, D. B.; Voss, M.; Rainka, M. P.; Basso, A.; Liu, M.; Liang, L.; Sui, N.; Prelusky, D.; Rindgen, D.; Zhang, L. Discovery of a Highly Potent Orally Bioavailable Imidazo-[1, 2- a]Pyrazine Aurora Inhibitor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2018**, *28* (8), 1397–1403. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.02.037>.
- (284) Belanger, D. B.; Curran, P. J.; Hruza, A.; Voigt, J.; Meng, Z.; Mandal, A. K.; Siddiqui, M. A.; Basso, A. D.; Gray, K. Discovery of Imidazo[1,2-a]Pyrazine-Based Aurora Kinase Inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2010**, *20* (17), 5170–5174. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.07.008>.
- (285) Bendjeddou, L. Z.; Loaëc, N.; Villiers, B.; Prina, E.; Späth, G. F.; Galons, H.; Meijer, L.; Oumata, N. Exploration of the Imidazo[1,2-b]Pyridazine Scaffold as a Protein Kinase Inhibitor. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2017**, *125*, 696–709. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.09.064>.
- (286) Devi, N.; Singh, D.; K. Rawal, R.; Bariwal, J.; Singh, V. Medicinal Attributes of Imidazo[1,2-a]Pyridine Derivatives: An Update. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **2016**, *16* (26), 2963–2994. <https://doi.org/10.2174/1568026616666160506145539>.
- (287) Sablayrolles, C.; Milhavet, J. C.; Rechenq, E.; Chapat, J. P.; Cros, G. H.; Boucard, M.; Serrano, J. J.; McNeill, J. H. Synthesis of Imidazo[1,2-a]Pyrazine Derivatives with Uterine-Relaxing, Antibronchospastic, and Cardiac-Stimulating Properties. *Journal of Medicinal Chemistry*, **1984**, *27* (2), 206–212. <https://doi.org/10.1021/jm00368a018>.

- (288) Enguehard, C.; Renou, J.-L.; Collot, V.; Hervet, M.; Rault, S.; Gueiffier, A. Reactivity of 3-Iodoimidazo[1,2- *a* ]Pyridines Using a Suzuki-Type Cross-Coupling Reaction. *The Journal of Organic Chemistry*, **2000**, *65* (20), 6572–6575. <https://doi.org/10.1021/jo000698z>.
- (289) Jingtao, C.; Xuanping, G.; Meng, H.; Xinsheng, L. Method for Synthesizing 3-Iodoimidazo[1,2-*b*]Pyrazine. CN105218549A, **2016**.
- (290) Löber, S.; Hübner, H.; Gmeiner, P. Azaindole Derivatives with High Affinity for the Dopamine D4 Receptor: Synthesis, Ligand Binding Studies and Comparison of Molecular Electrostatic Potential Maps. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **1999**, *9* (1), 97–102. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(98\)00692-1](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(98)00692-1).
- (291) Paolini, J. P.; Robins, R. K. Aromaticity in Heterocyclic Systems. IV. Substitution Reactions of Imidazo[1,2-*a*]Pyridine and Related Methyl Derivatives <sup>1</sup>. *Journal of Organic Chemistry*, **1965**, *30* (12), 4085–4090. <https://doi.org/10.1021/jo01023a024>.
- (292) Wang, Z.; Zhang, Y.; Pinkas, D. M.; Fox, A. E.; Luo, J.; Huang, H.; Cui, S.; Xiang, Q.; Xu, T.; Xun, Q.; Zhu, D.; Tu, Z.; Ren, X.; Brekken, R. A.; Bullock, A. N.; Liang, G.; Ding, K.; Lu, X. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of 3-(Imidazo[1,2- *a* ]Pyrazin-3-Ylethynyl)-4-Isopropyl- *N* -(3-((4-Methylpiperazin-1-Yl)methyl)-5-(Trifluoromethyl)Phenyl)Benzamide as a Dual Inhibitor of Discoidin Domain Receptors 1 and 2. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2018**, *61* (17), 7977–7990. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01045>.
- (293) Linz, S.; Müller, J.; Hübner, H.; Gmeiner, P.; Troschütz, R. Design, Synthesis and Dopamine D4 Receptor Binding Activities of New N-Heteroaromatic 5/6-Ring Mannich Bases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2009**, *17* (13), 4448–4458. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.05.015>.
- (294) Firmansyah, D.; Deperasińska, I.; Vakuliuk, O.; Banasiewicz, M.; Tasiar, M.; Makarewicz, A.; Cyrański, M. K.; Kozankiewicz, B.; Gryko, D. T. Double Head-to-Tail Direct Arylation as a Viable Strategy towards the Synthesis of the Aza-Analog of DihydrocyclopentaAceanthrylene – an Intriguing Antiaromatic Heterocycle. *Chemical Communications*, **2016**, *52* (6), 1262–1265. <https://doi.org/10.1039/C5CC08716C>.
- (295) Bischoff, F.; Berthelot, D.; De Cleyn, M.; Macdonald, G.; Minne, G.; Oehlich, D.; Pieters, S.; Surkyn, M.; Trabanco, A. A.; Tresadern, G.; Van Brandt, S.; Velter, I.; Zaja, M.; Borghys, H.; Masungi, C.; Mercken, M.; Gijzen, H. J. M. Design and Synthesis of a Novel Series of Bicyclic Heterocycles As Potent  $\gamma$ -Secretase Modulators. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2012**, *55* (21), 9089–9106. <https://doi.org/10.1021/jm201710f>.
- (296) Reddy, K.; Martinez Botella, G.; Griffin, A., Mark; Marron, B., Edward. Compounds and Their Methods of Use. WO2018098500A1, **2018**.
- (297) Belanger, D., B.; Siddiqui, A.; Curran, P., J.; Hamann, B.; Zhao, L.; Reddy, P., Adulla, P.; Tadikonda, P., K.; Shipps, G., W. Jr.; Mansoor, U., Faruk. Novel JNK Inhibitors. WO2008/82487, **2008**.
- (298) Berdini, V.; Carr, M., Grazia; Congreve, M., Stuart; Frederickson, M.; Griffiths-Jones, C., Mary; Hamlett, C., Charles, Frederick; Madin, A.; Murray, C., William; Benning, R. K.; Saxty, G. The Imidazopyridine Derivatives as Inhibitors of Receptor Tyrosine Kinases. WO2009/150240, **2009**.
- (299) Poli, D.; Falsini, M.; Varano, F.; Betti, M.; Varani, K.; Vincenzi, F.; Pugliese, A. M.; Pedata, F.; Dal Ben, D.; Thomas, A.; Palchetti, I.; Bettazzi, F.; Catarzi, D.; Colotta, V. Imidazo[1,2-*a*]Pyrazin-8-Amine Core for the Design of New Adenosine Receptor Antagonists: Structural Exploration to Target the A3 and A2A Subtypes. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2017**, *125*, 611–628. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.09.076>.
- (300) Guasconi, M.; Lu, X.; Massarotti, A.; Caldarelli, A.; Ciralo, E.; Tron, G. C.; Hirsch, E.; Sorba, G.; Pirali, T. Groebke Multicomponent Reaction and Subsequent Nucleophilic Aromatic Substitution for a Convenient Synthesis of 3,8-Diaminoimidazo[1,2-*a*]Pyrazines as Potential Kinase Inhibitors. *Organic & Biomolecular Chemistry*, **2011**, *9* (11), 4144. <https://doi.org/10.1039/c1ob05336a>.

- (301) Garamvölgyi, R.; Dobos, J.; Sipos, A.; Boros, S.; Illyés, E.; Baska, F.; Kékesi, L.; Szabadkai, I.; Szántai-Kis, C.; Kéri, G.; Órfi, L. Design and Synthesis of New Imidazo[1,2- a ]Pyridine and Imidazo[1,2- a ]Pyrazine Derivatives with Antiproliferative Activity against Melanoma Cells. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2016**, *108*, 623–643. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.12.001>.
- (302) Rees, C. W. Smith, D. I. Peri-Substituted Lmidazo[1,2-a]Pyridines. A New Reductive Elimination Reaction. *Journal of the Chemical Society, Perkin Trans*, **1987**, 1159-1163.
- (303) Takahashi, K.; Yamagishi, G.; Hiramatsu, T.; Hosoya, A.; Onoe, K.; Doi, H.; Nagata, H.; Wada, Y.; Onoe, H.; Watanabe, Y.; Hosoya, T. Practical Synthesis of Precursor of [N-Methyl-11C]Vorzozole, an Efficient PET Tracer Targeting Aromatase in the Brain. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2011**, *19* (4), 1464–1470. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.12.057>.
- (304) Wang, L.; Wang, X.; Cui, J.; Ren, W.; Meng, N.; Wang, J.; Qian, X. Preparation of Chiral Trans-5-Substituted-Acenaphthene-1,2-Diols by Baker's Yeast-Mediated Reduction of 5-Substituted-Acenaphthylene-1,2-Diones. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2010**, *21* (7), 825–830. <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2010.04.048>.
- (305) Wilding, B.; Vidovic, C.; Klempier, N. A Convenient Synthetic Route to Substituted Pyrrolo[2,3- b ]Pyridines via a Novel Ethylene-Bridged Compound. *Tetrahedron Letters*, **2015**, *56* (47), 6606–6609. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2015.10.031>.
- (306) Eipert, M.; Maichle-Mössmer, C.; Maier, M. E. Use of Epoxidation and Epoxide Opening Reactions for the Synthesis of Highly Functionalized 1-Oxaspiro[4.5]Decan-2-Ones and Related Compounds. *Tetrahedron*, **2003**, *59* (40), 7949–7960. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2003.08.010>.
- (307) MCGOWAN, M. A.; FONG, K. C.; ANTHONY, N. J.; ZHOU, H.; KATZ, J., D.; YANG, L.; LI, C.; TIAN, Y.; MU, C. C.; YE, B.; SHI, F.; ZHAI, X.; FU, J. Purine Inhibitors of Human Phosphatidylinositol 3-Kinase Delta. WO2015/188369, **2015**.
- (308) Tichenor, M. S.; Keith, J. M.; Jones, W. M.; Pierce, J. M.; Merit, J.; Hawryluk, N.; Seierstad, M.; Palmer, J. A.; Webb, M.; Karbarz, M. J.; Wilson, S. J.; Wennerholm, M. L.; Woestenborghs, F.; Beerens, D.; Luo, L.; Brown, S. M.; Boeck, M. D.; Chaplan, S. R.; Breitenbucher, J. G. Heteroaryl Urea Inhibitors of Fatty Acid Amide Hydrolase: Structure–Mutagenicity Relationships for Arylamine Metabolites. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2012**, *22* (24), 7357–7362. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.10.076>.
- (309) Huang, W.-S.; Metcalf, C. A.; Sundaramoorthi, R.; Wang, Y.; Zou, D.; Thomas, R. M.; Zhu, X.; Cai, L.; Wen, D.; Liu, S.; Romero, J.; Qi, J.; Chen, I.; Banda, G.; Lentini, S. P.; Das, S.; Xu, Q.; Keats, J.; Wang, F.; Wardwell, S.; Ning, Y.; Snodgrass, J. T.; Broudy, M. I.; Russian, K.; Zhou, T.; Commodore, L.; Narasimhan, N. I.; Mohemmad, Q. K.; Iulicci, J.; Rivera, V. M.; Dalgarno, D. C.; Sawyer, T. K.; Clackson, T.; Shakespeare, W. C. Discovery of 3-[2-(Imidazo[1,2- b ]Pyridazin-3-Yl)Ethynyl]-4-Methyl- N -{4-[(4-Methylpiperazin-1-Yl)Methyl]-3-(Trifluoromethyl)Phenyl}benzamide (AP24534), a Potent, Orally Active Pan-Inhibitor of Breakpoint Cluster Region-Abelson (BCR-ABL) Kinase Including the T315I Gatekeeper Mutant. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2010**, *53* (12), 4701–4719. <https://doi.org/10.1021/jm100395q>.
- (310) Gyorkos, A., Charles; Corrette, C., Peter; Cho, S., Young; Turner, T., Mark; Pratt, S., Alan; Aso, K.; Kori, M.; Gyoten, M. Nitrogen-Containing Fused Heterocyclic Compounds. WO2005/44793, 2005.
- (311) Ishikawa, T.; Iizawa, Y.; Okonogi, K.; Miyake, A. Studies on Anti-MRSA Parenteral Cephalosporins I. Synthesis and Antibacterial Activity of 7 $\beta$ -[2-(5-Amino-L52, 4-Thiadiazol-3-Yl)-2(Z)-Hydroxyiminoacetamido]-3-(Substituted Imidazo[1, 2-6]-Pyridazinium-1-Yl)Methyl-3-Cephem-4-Carboxylates and Related Compounds. *The Journal of Antibiotics*, **2000**, *53* (10), 1053–1070.
- (312) Dwyer, M. P.; Paruch, K.; Alvarez, C.; Doll, R. J.; Keertikar, K.; Duca, J.; Fischmann, T. O.; Hruza, A.; Madison, V.; Lees, E.; Parry, D.; Seghezzi, W.; Sgambellone, N.; Shanahan, F.; Wiswell, D.; Guzi, T. J. Versatile Templates for the Development of Novel Kinase Inhibitors: Discovery of Novel CDK Inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2007**, *17* (22), 6216–6219. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.09.018>.

- (313) Chunshen, Z.; Chao, H.; Li, L. Preparation Process of 8-Iodo-6-Nitroimidazo[1,2-a]Pyridine. CN107129496, **2017**.
- (314) Aicher, T., D.; Van Huis, C. A.; Maclean, J., K.; Andresen, B., M.; Barr, K. J.; Bienstock, C., E.; Anthony, N. J.; Daniels, M.; Liu, Y.; White, C. M.; Lapointe, B. T.; Sciammett, N.; Simov, V.; Trotter, W., B.; Liu, K. 2-Acylamidomethyl and Sulfonylamidomethyl Benzoxazine Carbamates for Inhibition of RORgamma Activity and the Treatment of Disease. WO2015/95788, **2015**.
- (315) El Akkaoui, A.; Bassoude, I.; Koubachi, J.; Berteina-Raboin, S.; Mouaddib, A.; Guillaumet, G. Pd-Catalyzed Regiocontrolled Sonogashira and Suzuki Cross-Coupling Reaction of 3,6-Dihalogenoimidazo[1,2-a]Pyridines: One-Pot Double-Coupling Approach. *Tetrahedron*, **2011**, *67* (37), 7128–7138. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2011.06.108>.
- (316) Kaiser, C.; Spagnuolo, C. J.; Adams, T. C.; Audia, V. H.; Dupont, A. C.; Hatoum, H.; Lowe, V. C.; Prosser, J. C.; Sturm, B. L.; Noronha-Blob, L. Synthesis and Antimuscarinic Properties of Some N-Substituted 5-(Aminomethyl)-3,3-Diphenyl-2(3H)-Furanones. *Journal of Medicinal Chemistry*, **1992**, *35* (23), 4415–4424. <https://doi.org/10.1021/jm00101a019>.
- (317) Ebetino, F.; Hallock; Mazur, A.; Lundy, M., Walden; Russell, R., Graham Goodwin. Imidazo[1,2-a]Pyridinyl Biphosphonates. WO2010/33978, **2010**.
- (318) Mu, B.; Li, J.; Zou, D.; Wu, Y.; Chang, J.; Wu, Y. Pd-Catalyzed Tandem Cyclization via C–H Arylation and Acylation for the Construction of Polycyclic Scaffolds. *Organic Letters*, **2016**, *18* (20), 5260–5263. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.6b02571>.
- (319) Koppitz, M.; Klar, U.; Wengner, A.; Neuhaus, R.; Siemeister, G. Substituted Imidazopyridines and Intermediates Thereof. WO2012/136531, **2012**.
- (320) Wermuth, C. G.; Lesuisse, D. Preparation of Water-Soluble Compounds by Covalent Attachment of Solubilizing Moieties. In *The Practice of Medicinal Chemistry*; Elsevier, **2015**; 723–745. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417205-0.00030-4>.
- (321) Desroy, N.; Housseman, C.; Bock, X.; Joncour, A.; Bienvenu, N.; Cherel, L.; Labeguere, V.; Rondet, E.; Peixoto, C.; Grassot, J.-M.; Picolet, O.; Annot, D.; Triballeau, N.; Monjardet, A.; Wakselman, E.; Roncoroni, V.; Le Tallec, S.; Blanque, R.; Cottreaux, C.; Vandervoort, N.; Christophe, T.; Mollat, P.; Lamers, M.; Auberval, M.; Hrvacic, B.; Ralic, J.; Oste, L.; van der Aar, E.; Brys, R.; Heckmann, B. Discovery of 2-[[2-Ethyl-6-[4-[2-(3-Hydroxyazetidino-1-yl)-2-oxoethyl]piperazin-1-yl]-8-methylimidazo[1,2-a]pyridin-3-yl]methylamino]-4-(4-fluorophenyl)thiazole-5-carbonitrile (GLPG1690), a First-in-Class Autotaxin Inhibitor Undergoing Clinical Evaluation for the Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2017**, *60* (9), 3580–3590. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00032>.
- (322) Véron, J.-B.; Enguehard-Gueiffier, C.; Snoeck, R.; Andrei, G.; De Clercq, E.; Gueiffier, A. Influence of 6 or 8-Substitution on the Antiviral Activity of 3-Phenethylthiomethylimidazo[1,2-a]Pyridine against Human Cytomegalovirus (HCMV) and Varicella-Zoster Virus (VZV). *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2007**, *15* (22), 7209–7219. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.03.061>.
- (323) Enguehard, C.; Allouchi, H.; Gueiffier, A.; Buchwald, S. L. Easy Access to Novel Substituted 6-Aminoimidazo[1,2-a]Pyridines Using Palladium- and Copper-Catalyzed Aminations. *The Journal of Organic Chemistry*, **2003**, *68* (11), 4367–4370. <https://doi.org/10.1021/jo0341463>.
- (324) Pennington, L. D.; Moustakas, D. T. The Necessary Nitrogen Atom: A Versatile High-Impact Design Element for Multiparameter Optimization. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2017**, *60* (9), 3552–3579. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01807>.
- (325) Bazzini, P.; Wermuth, C. G. Substituent Groups. In *The Practice of Medicinal Chemistry*; Elsevier, **2008**; 319–357. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417205-0.00013-4>.
- (326) Lindel, T.; Hoffmann, H.; Rtel, M. H.; Pawlik, J. R. Structure-Activity Relationship of Inhibition of Fish Feeding by Sponge-Derived and Synthetic Pyrrole-Imidazole Alkaloids. *Journal of Chemical Ecology*, **2000**, *26*, 1477–1496.

- (327) Bhattacharya, S., Kumar; Prakash, C., Aggarwal. Bicyclic Derivatives for the Treatment of Abnormal Cell Growth. WO2006/129168, **2006**.
- (328) Commandeur, M.; Commandeur, C.; Cossy, J. Synthesis of a Platform To Access Bistramides and Their Analogues. *Organic Letters*, **2011**, *13* (22), 6018–6021. <https://doi.org/10.1021/ol202483u>.
- (329) Ripin, D. H. B.; Bourassa, D. E.; Brandt, T.; Castaldi, M. J.; Frost, H. N.; Hawkins, J.; Johnson, P. J.; Massett, S. S.; Neumann, K.; Phillips, J.; Raggon, J. W.; Rose, P. R.; Rutherford, J. L.; Sitter, B.; Stewart, A. M.; Vetelino, M. G.; Wei, L. Evaluation of Kilogram-Scale Sonagashira, Suzuki, and Heck Coupling Routes to Oncology Candidate CP-724,714. *Organic Process Research & Development*, **2005**, *9* (4), 440–450. <https://doi.org/10.1021/op050039u>.
- (330) Xia, G.; Li, D.; Zuo, H.; Wu, G.; Duan, L.; Zhang, J.; Mao, Y.; Liu, Y. Nitrogenous Heterocyclic Compounds, Preparation Method, Intermediate, Composition and Use. EP3424928, **2019**.
- (331) Mahmood, A.; Alkhatlan, H.; Parvez, S.; Khan, M.; Shahzad, S. Chelation-Assisted Substrate-Controlled Asymmetric Lithiation-Allylboration of Chiral Carbamate 1,2,4-Butanetriol Acetonide. *Molecules*, **2015**, *20* (6), 9890–9905. <https://doi.org/10.3390/molecules20069890>.
- (332) Song, Z.; Takahashi, T. 8.23 Hydrozirconation of Alkenes and Alkynes. In *Comprehensive Organic Synthesis II*; Elsevier, **2014**, 838–876. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-097742-3.00825-9>.
- (333) Cole, T. E.; Rodewald, S.; Watson, C. L. Migration of Alkyl Groups from Zirconium to Various Haloboranes. *Tetrahedron Letters*, **1992**, *33* (37), 5295–5298. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)79076-9](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)79076-9).
- (334) Wang, Y. D.; Kimball, G.; Prashad, A. S.; Wang, Y. Zr-Mediated Hydroboration: Stereoselective Synthesis of Vinyl Boronic Esters. *Tetrahedron Letters*, **2005**, *46* (50), 8777–8780. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2005.10.031>.
- (335) Hoves, S.; Lisha, W.; Yun, H.; Weixing, Z.; Zhu, W. Benzazepine Dicarboxamide Compounds. US2016257653, **2016**.
- (336) Roy, I. D.; Burns, A. R.; Pattison, G.; Michel, B.; Parker, A. J.; Lam, H. W. A Second-Generation Ligand for the Enantioselective Rhodium-Catalyzed Addition of Arylboronic Acids to Alkenylazaarenes. *Chemical Communications*, **2014**, *50* (22), 2865–2868. <https://doi.org/10.1039/C4CC00340C>.
- (337) Zhang, H.; Huang, W.; Wang, T.; Meng, F. Cobalt-Catalyzed Diastereo- and Enantioselective Hydroalkenylation of Cyclopropenes with Alkenylboronic Acids. *Angewandte Chemie*, **2019**, *58* (32), 11049–11053. <https://doi.org/10.1002/anie.201904994>.
- (338) Berrée, F.; Girard-Le Bleis, P.; Carboni, B. Synthesis of the Marine Sponge Alkaloid Oroidin and Its Analogues via Suzuki Cross-Coupling Reactions. *Tetrahedron Letters*, **2002**, *43* (28), 4935–4938. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(02\)00947-4](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(02)00947-4).
- (339) Zhang, Y.-J.; Shen, L.-L.; Cheon, H.-G.; Xu, Y.-N.; Jeong, J.-H. Synthesis and Biological Evaluation of Glucagon-like Peptide-1 Receptor Agonists. *Archives of Pharmacal Research*, **2014**, *37* (5), 588–599. <https://doi.org/10.1007/s12272-013-0253-9>.
- (340) Marchand, P.; Bazin, M.-A.; Pagniez, F.; Rivière, G.; Boderio, L.; Marhadour, S.; Nourrisson, M.-R.; Picot, C.; Ruchaud, S.; Bach, S.; Baratte, B.; Sauvain, M.; Pareja, D. C.; Vaisberg, A. J.; Le Pape, P. Synthesis, Antileishmanial Activity and Cytotoxicity of 2,3-Diaryl- and 2,3,8-Trisubstituted Imidazo[1,2-a]Pyrazines. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2015**, *103*, 381–395. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.09.002>.
- (341) Zidar, N.; Jakopin, Ž.; Madge, D. J.; Chan, F.; Tytgat, J.; Peigneur, S.; Dolenc, M. S.; Tomašić, T.; Ilaš, J.; Mašič, L. P.; Kikelj, D. Substituted 4-Phenyl-2-Aminoimidazoles and 4-Phenyl-4,5-Dihydro-2-Aminoimidazoles as Voltage-Gated Sodium Channel Modulators. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2014**, *74*, 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.12.034>.
- (342) Liang, F.; Mishra, P. K.; Molteni, V.; Nagle, A. S.; Supek, F.; Tan, L. J.; Vidal, A. Compounds and Compositions for the Treatment of Parasitic Diseases. US2014/275119, **2014**.

- (343) Xu, Y.; Wang, N.-Y.; Song, X.-J.; Lei, Q.; Ye, T.-H.; You, X.-Y.; Zuo, W.-Q.; Xia, Y.; Zhang, L.-D.; Yu, L.-T. Discovery of Novel N-(5-(Tert-Butyl)Isoxazol-3-yl)-N'-Phenylurea Analogs as Potent FLT3 Inhibitors and Evaluation of Their Activity against Acute Myeloid Leukemia in Vitro and in Vivo. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2015**, *23* (15), 4333–4343. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.06.033>.
- (344) Myadaraboina, S.; Alla, M.; Saddanapu, V.; Bommena, V. R.; Addlagatta, A. Structure Activity Relationship Studies of Imidazo[1,2-a]Pyrazine Derivatives against Cancer Cell Lines. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2010**, *45* (11), 5208–5216. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.08.035>.
- (345) Spitzer, W. A.; Victor, F.; Pollock, G. D.; Hayes, J. S. Imidazo[1,2-a]Pyrimidines and Imidazo[1,2-a]Pyrazines: The Role of Nitrogen Position in Inotropic Activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, **1988**, *31* (8), 1590–1595. <https://doi.org/10.1021/jm00403a018>.
- (346) Bandini, M.; Bottoni, A.; Eichholzer, A.; Miscione, G. P.; Stenta, M. Asymmetric Phase-Transfer-Catalyzed Intramolecular N-Alkylation of Indoles and Pyrroles: A Combined Experimental and Theoretical Investigation. *Chemistry - A European Journal*, **2010**, *16* (41), 12462–12473. <https://doi.org/10.1002/chem.201000560>.
- (347) Gjorgjieva, M.; Tomašič, T.; Barančokova, M.; Katsamakos, S.; Ilaš, J.; Tammela, P.; Peterlin Mašič, L.; Kikelj, D. Discovery of Benzothiazole Scaffold-Based DNA Gyrase B Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2016**, *59* (19), 8941–8954. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00864>.
- (348) Zidar, N.; Tomašič, T.; Macut, H.; Sirc, A.; Brvar, M.; Montalvão, S.; Tammela, P.; Ilaš, J.; Kikelj, D. New N-Phenyl-4,5-Dibromopyrrolamides and N-Phenylindolamides as ATPase Inhibitors of DNA Gyrase. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2016**, *117*, 197–211. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.03.079>.
- (349) Tomašič, T.; Mirt, M.; Barančoková, M.; Ilaš, J.; Zidar, N.; Tammela, P.; Kikelj, D. Design, Synthesis and Biological Evaluation of 4,5-Dibromo-N-(Thiazol-2-yl)-1H-Pyrrole-2-Carboxamide Derivatives as Novel DNA Gyrase Inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2017**, *25* (1), 338–349. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.10.038>.
- (350) Lee, H.-J.; Cho, C.-W. Chemoselective Suzuki Cross-Coupling Reactions of Chiral Pyrrolizines. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, **2011**, *32* (1), 359–362. <https://doi.org/10.5012/bkcs.2011.32.1.359>.
- (351) Tang, C.; Ren, Q.; Yin, J.; Yi, K.; Zhang, Y. Inhibitors of Influenza Virus Replication, Application Methods and Uses Thereof. WO2018041091, **2018**.
- (352) Kota, T. V. R.; Gandham, H.; Sanasi, P. D. Synthesis, Characterization, and Antidiabetic Activity of 6-methoxyimidazo[1,2-*b*]pyridazine Derivatives. *Journal of the Chinese Chemical Society*, **2019**, *66* (6), 630–637. <https://doi.org/10.1002/jccs.201800332>.
- (353) Toussaint, M.; Debreu-Fontaine, M.-A.; Maurice, T.; Melnyk, P. New Synthesis of Tic-Hydantoins Sigma-1 Ligands and Pharmacological Evaluation on Cocaine-Induced Stimulant Effects. *Medicinal Chemistry*, **2010**, *6* (6), 355–373. <https://doi.org/10.2174/157340610793563956>.
- (354) Baldwin, J., J.; Cacatian, S.; Claremon, D., A.; Dillard, L., W.; Flaherty, P., T.; Ishchenko, A., V.; Jia, L.; McGeehan, G.; Simpson, R., D.; Singh, S., B.; Tice, C., M.; Xu, Z.; Yuan, J.; Zhao, W. Renin Inhibitors. US2010190829, **2010**.
- (355) Lazarus, M. B.; Shokat, K. M. Discovery and Structure of a New Inhibitor Scaffold of the Autophagy Initiating Kinase ULK1. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2015**, *23* (17), 5483–5488. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.07.034>.
- (356) Picon, S. Réaction de couplage oxydatif de la guanidine avec des oléfines : application à la synthèse d'analogues de métabolites marins (Thèse de Doctorat). Université de Paris-Sud XI, **2008**.
- (357) Bonandi, E.; Christodoulou, M. S.; Fumagalli, G.; Perdicchia, D.; Rastelli, G.; Passarella, D. The 1,2,3-Triazole Ring as a Bioisostere in Medicinal Chemistry. *Drug Discovery Today*, **2017**, *22* (10), 1572–1581. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.05.014>.

- (358) Pedersen, D. S.; Abell, A. 1,2,3-Triazoles in Peptidomimetic Chemistry. *European Journal of Organic Chemistry*, **2011**, 2399–2411. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201100157>.
- (359) Zhou, C. H.; Wang, Y. Recent Researches in Triazole Compounds as Medicinal Drugs. *Current Medicinal Chemistry*, **2012**, *19* (2), 239–280. <https://doi.org/10.2174/092986712803414213>.
- (360) Blažewska, K. M.; Ni, F.; Haiges, R.; Kashemirov, B. A.; Coxon, F. P.; Stewart, C. A.; Baron, R.; Rogers, M. J.; Seabra, M. C.; Ebetino, F. H.; McKenna, C. E. Synthesis, Stereochemistry and SAR of a Series of Minodronate Analogues as RGGT Inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2011**, *46* (10), 4820–4826. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.04.063>.
- (361) Gueiffier, A.; Lhassani, M.; Elhakmaoui, A.; Snoeck, R.; Andrei, G.; Chavignon, O.; Teulade, J.-C.; Kerbal, A.; Essassi, E. M.; Debouzy, J.-C.; Witvrouw, M.; Blache, Y.; Balzarini, J.; De Clercq, E.; Chapat, J.-P. Synthesis of Acyclo- C -Nucleosides in the Imidazo[1,2- a ]Pyridine and Pyrimidine Series as Antiviral Agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, **1996**, *39* (14), 2856–2859. <https://doi.org/10.1021/jm9507901>.
- (362) Teulade, J.-C.; Bonnet, P.-A.; Rieu, J., N.; Viols, H.; Chapat, J., P.; Grassy, G.; Caroy, A. C-3 Hydroxyalkylation of Some Imidazo[1,2-a]Azines. *Journal of Chemical Research*, **1986**, No. 6, 202–203. <https://doi.org/10.1002/chin.198643115>.
- (363) Gueiffier, A.; Mavel, S.; Lhassani, M.; Elhakmaoui, A.; Snoeck, R.; Andrei, G.; Chavignon, O.; Teulade, J.-C.; Witvrouw, M.; Balzarini, J.; De Clercq, E.; Chapat, J.-P. Synthesis of Imidazo[1,2- a ]Pyridines as Antiviral Agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, **1998**, *41* (25), 5108–5112. <https://doi.org/10.1021/jm981051y>.
- (364) Bonnet, P. A.; Michel, A.; Laurent, F.; Sablayrolles, C.; Rechencq, E.; Mani, J. C.; Boucard, M.; Chapat, J. P. Synthesis and Antibronchospastic Activity of 8-Alkoxy- and 8-(Alkylamino)Imidazo[1,2-a]Pyrazines. *Journal of Medicinal Chemistry*, **1992**, *35* (18), 3353–3358. <https://doi.org/10.1021/jm00096a008>.
- (365) Kitamura, Y.; Masegi, Y.; Ogawa, S.; Nakashima, R.; Akao, Y.; Ueno, Y.; Kitade, Y. Chemically Modified siRNAs and miRNAs Bearing Urea/Thiourea-Bridged Aromatic Compounds at Their 3' -End for RNAi Therapy. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2013**, *21* (15), 4494–4501. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.05.046>.
- (366) Khedar, P.; Pericherla, K.; Kumar, A. Exploration of the CuAAC Reaction for the Synthesis of Novel 3-(Triazol-1-Yl)Methyl-Imidazo[1,2-a]Pyridines. *Synlett*, **2012**, *23* (18), 2609–2614. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1317379>.
- (367) Bevilacqua, V.; King, M.; Chaumontet, M.; Nothisen, M.; Gabillet, S.; Buisson, D.; Puente, C.; Wagner, A.; Taran, F. Copper-Chelating Azides for Efficient Click Conjugation Reactions in Complex Media. *Angewandte Chemie International Edition*, **2014**, *53* (23), 5872–5876. <https://doi.org/10.1002/anie.201310671>.
- (368) Thompson, A.; Grabowski, E., J. Alcohol to Azide Sn2 Conversion. WO95/01970, **1995**.
- (369) Ogawa, yasuyuki; Okuyama, R.; Shibuya, S.; Toda, N.; Cao, Z.; Fu, Z.; Hao, X.; Kim, Y.; Li, L.; Lively, S., E.; Lizarzaburu, M.; Tian, H.; Yu, M. N-Aryl Pyrazole Compounds for Use against Diabetes. WO2008/45484, **2008**.
- (370) Giovannini, R.; Cui, Y.; Doods, H.; Ferrara, M.; Just, S.; Kuelzer, R.; Lingard, I.; Mazzaferro, R.; Rudolf, K. New Somatostatin Receptor Subtype 4 (SSTR4) Agonists. WO2014/184275, **2014**.
- (371) Beaulieu, P., Louis; Brochu, C.; Chabot, C.; Jolicoeur, E.; Kawai, S.; Poupart, M.-A.; Tsantrizos, Y., S. Viral Polymerase Inhibitors. WO2004/65367, **2004**.
- (372) Chenot, E.-D.; Rodríguez-Domínguez, J. C.; Comel, A.; Kirsch, G.; Hannewald, P. Synthesis of Potentially Photoactivatable Coumarin Derivatives *via* a 1,3-Dipolar Cycloaddition. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, **2008**, *45* (5), 1429–1435. <https://doi.org/10.1002/jhet.5570450528>.
- (373) Chopin, N.; Decamps, S.; Gouger, A.; Médebielle, M.; Picot, S.; Bienvenu, A.-L.; Pilet, G. ClickEnam. 1. Synthesis of Novel 1,4-Disubstituted-[1,2,3]-Triazole-Derived  $\beta$ -Aminovinyl Trifluoromethylated

- Ketones and Their Copper(II) Complexes. *Journal of Fluorine Chemistry*, **2011**, *132* (10), 850–857. <https://doi.org/10.1016/j.jfluchem.2011.05.011>.
- (374) Siles, R.; Kawasaki, Y.; Ross, P.; Freire, E. Synthesis and Biochemical Evaluation of Triazole/Tetrazole-Containing Sulfonamides against Thrombin and Related Serine Proteases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2011**, *21* (18), 5305–5309. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.07.023>.
- (375) Talele, T. T. Acetylene Group, Friend or Foe in Medicinal Chemistry. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2020**, *acs.jmedchem.9b01617*. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01617>.
- (376) Cromm, P. M.; Wallraven, K.; Glas, A.; Bier, D.; Fürstner, A.; Ottmann, C.; Grossmann, T. N. Constraining an Irregular Peptide Secondary Structure through Ring-Closing Alkyne Metathesis. *ChemBioChem*, **2016**, *17* (20), 1915–1919. <https://doi.org/10.1002/cbic.201600362>.
- (377) Assadieskandar, A.; Yu, C.; Maisonneuve, P.; Kurinov, I.; Sicheri, F.; Zhang, C. Rigidification Dramatically Improves Inhibitor Selectivity for RAF Kinases. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, **2019**, *10* (7), 1074–1080. <https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.9b00194>.
- (378) Patrick, G. L. *An Introduction to Medicinal Chemistry*, Oxford University Press, **2017**.
- (379) Liu, X.; Kung, A.; Malinoski, B.; Prakash, G. K. S.; Zhang, C. Development of Alkyne-Containing Pyrazolopyrimidines To Overcome Drug Resistance of Bcr-Abl Kinase. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2015**, *58* (23), 9228–9237. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01125>.
- (380) Zhou, T.; Commodore, L.; Huang, W.-S.; Wang, Y.; Thomas, M.; Keats, J.; Xu, Q.; Rivera, V. M.; Shakespeare, W. C.; Clackson, T.; Dalgarno, D. C.; Zhu, X. Structural Mechanism of the Pan-BCR-ABL Inhibitor Ponatinib (AP24534): Lessons for Overcoming Kinase Inhibitor Resistance. *Chemical Biology & Drug Design*, **2011**, *77* (1), 1–11. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2010.01054.x>.
- (381) Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2001**, *24*.
- (382) Arnott, J. A.; Planey, S. L. The Influence of Lipophilicity in Drug Discovery and Design. *Expert Opinion on Drug Discovery*, **2012**, *7* (10), 863–875. <https://doi.org/10.1517/17460441.2012.714363>.
- (383) Johnson, T. W.; Gallego, R. A.; Edwards, M. P. Lipophilic Efficiency as an Important Metric in Drug Design. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2018**, *61* (15), 6401–6420. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00077>.
- (384) Waring, M. J. Lipophilicity in Drug Discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, **2010**, *5* (3), 235–248. <https://doi.org/10.1517/17460441003605098>.
- (385) Hopkins, A. L.; Keserü, G. M.; Leeson, P. D.; Rees, D. C.; Reynolds, C. H. The Role of Ligand Efficiency Metrics in Drug Discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, **2014**, *13* (2), 105–121. <https://doi.org/10.1038/nrd4163>.
- (386) Tsopeles, F.; Giaginis, C.; Tsantili-Kakoulidou, A. Lipophilicity and Biomimetic Properties to Support Drug Discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, **2017**, *12* (9), 885–896. <https://doi.org/10.1080/17460441.2017.1344210>.
- (387) Kratochwil, N. A.; Huber, W.; Müller, F.; Kansy, M.; Gerber, P. R. Predicting Plasma Protein Binding of Drugs: A New Approach. *Biochemical Pharmacology*, **2002**, *64* (9), 1355–1374. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(02\)01074-2](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(02)01074-2).
- (388) Cai, J.; Li, L.; Hong, K. H.; Wu, X.; Chen, J.; Wang, P.; Cao, M.; Zong, X.; Ji, M. Discovery of 4-Aminoquinazoline—Urea Derivatives as Aurora Kinase Inhibitors with Antiproliferative Activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2014**, *22* (21), 5813–5823. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2014.09.029>.
- (389) Ditchfield, C.; Johnson, V. L.; Tighe, A.; Ellston, R.; Haworth, C.; Johnson, T.; Mortlock, A.; Keen, N.; Taylor, S. S. Aurora B Couples Chromosome Alignment with Anaphase by Targeting BubR1, Mad2, and Cenp-E to Kinetochores. *The Journal of Cell Biology*, **2003**, *161* (2), 267–280. <https://doi.org/10.1083/jcb.200208091>.



- (390) Lang, Q.; Zhang, H.; Li, J.; Xie, F.; Zhang, Y.; Wan, B.; Yu, L. 3-Hydroxyflavone Inhibits Endogenous Aurora B and Induces Growth Inhibition of Cancer Cell Line. *Molecular Biology Reports*, **2010**, *37* (3), 1577–1583. <https://doi.org/10.1007/s11033-009-9562-y>.
- (391) Girdler, F.; Gascoigne, K. E.; Evers, P. A.; Hartmuth, S.; Crafter, C.; Foote, K. M.; Keen, N. J.; Taylor, S. S. Validating Aurora B as an Anti-Cancer Drug Target. *Journal of Cell Science*, **2006**, *119* (17), 3664–3675. <https://doi.org/10.1242/jcs.03145>.
- (392) Moy, C.; Oleykowski, C. A.; Plant, R.; Greshock, J.; Jing, J.; Bachman, K.; Hardwicke, M. A.; Wooster, R.; Degenhardt, Y. High Chromosome Number in Hematological Cancer Cell Lines Is a Negative Predictor of Response to the Inhibition of Aurora B and C by GSK1070916. *Journal of Translational Medicine*, **2011**, *9* (1), 110. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-9-110>.
- (393) Grandjean, F.; Brémaud, L.; Verdier, M.; Robert, J.; Ratinaud, M.-H. Sequential Gene Expression of P-Glycoprotein (P-Gp), Multidrug Resistance-Associated Protein (MRP) and Lung Resistance Protein: Functional Activity of P-Gp and MRP Present in the Doxorubicin-Resistant Human K562 Cell Lines. *Anti-Cancer Drugs*, **2001**, *12* (3), 247–258.
- (394) Barbier, M.; Gray, B. D.; Muirhead, K. A.; Ronot, X.; Boutonnat, J. A Flow Cytometric Assay for Simultaneous Assessment of Drug Efflux, Proliferation, and Apoptosis. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, **2004**, *59B* (1), 46–53. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.20004>.
- (395) Beaulieu, É.; Demeule, M.; Ghitescu, L.; Béliveau, R. P-Glycoprotein Is Strongly Expressed in the Luminal Membranes of the Endothelium of Blood Vessels in the Brain. *Biochemical Journal*, **1997**, *326* (2), 539–544. <https://doi.org/10.1042/bj3260539>.
- (396) Failes, T. W.; Mitic, G.; Abdel-Halim, H.; Po'uha, S. T.; Liu, M.; Hibbs, D. E.; Kavallaris, M. Evolution of Resistance to Aurora Kinase B Inhibitors in Leukaemia Cells. *PLoS One*, **2012**, *7* (2), e30734. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030734>.
- (397) *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*, 3rd ed.; Ortiz de Montellano, P. R., Ed.; Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York, **2005**.
- (398) *Fifty Years of Cytochrome P450 Research*; Yamazaki, H., Ed.; Springer Japan: Tokyo, **2014**. <https://doi.org/10.1007/978-4-431-54992-5>.
- (399) Stepan, A. F.; Walker, D. P.; Bauman, J.; Price, D. A.; Baillie, T. A.; Kalgutkar, A. S.; Aleo, M. D. Structural Alert/Reactive Metabolite Concept as Applied in Medicinal Chemistry to Mitigate the Risk of Idiosyncratic Drug Toxicity: A Perspective Based on the Critical Examination of Trends in the Top 200 Drugs Marketed in the United States. *Chemical Research in Toxicology*, **2011**, *24* (9), 1345–1410. <https://doi.org/10.1021/tx200168d>.
- (400) Moraski, G. C.; Markley, L. D.; Cramer, J.; Hipskind, P. A.; Boshoff, H.; Bailey, M. A.; Alling, T.; Ollinger, J.; Parish, T.; Miller, M. J. Advancement of Imidazo[1,2-*a*]Pyridines with Improved Pharmacokinetics and NM Activity vs. *Mycobacterium Tuberculosis*. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, **2013**, *4* (7), 675–679. <https://doi.org/10.1021/ml400088y>.
- (401) Mota, C.; Coelho, C.; Leimkühler, S.; Garattini, E.; Terao, M.; Santos-Silva, T.; Romão, M. J. Critical Overview on the Structure and Metabolism of Human Aldehyde Oxidase and Its Role in Pharmacokinetics. *Coordination Chemistry Reviews*, **2018**, *368*, 35–59. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2018.04.006>.
- (402) Yoshino, M.; Murakami, K. A Graphical Method for Determining Inhibition Constants. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, **2009**, *24* (6), 1288–1290. <https://doi.org/10.3109/14756360902829766>.
- (403) Burlingham, B. T.; Widlanski, T. S. A More General Use for the Dixon Plot. *Science and Education* **5**.

- (404) Girdler, F.; Sessa, F.; Patercoli, S.; Villa, F.; Musacchio, A.; Taylor, S. Molecular Basis of Drug Resistance in Aurora Kinases. *Chemistry & Biology*, **2008**, *15* (6), 552–562. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2008.04.013>.
- (405) Guo, J.; Anderson, M. G.; Tapang, P.; Palma, J. P.; Rodriguez, L. E.; Niquette, A.; Li, J.; Bouska, J. J.; Wang, G.; Semizarov, D.; Albert, D. H.; Donawho, C. K.; Glaser, K. B.; Shah, O. J. Identification of Genes That Confer Tumor Cell Resistance to the Aurora B Kinase Inhibitor, AZD1152. *Pharmacogenomics Journal*, **2009**, *9*(2), 90–102. <https://doi.org/10.1038/tpj.2008.20>.
- (406) McIntyre, P. J.; Collins, P. M.; Vrzal, L.; Birchall, K.; Arnold, L. H.; Mpamhanga, C.; Coombs, P. J.; Burgess, S. G.; Richards, M. W.; Winter, A.; Veverka, V.; Delft, F. von; Merritt, A.; Bayliss, R. Characterization of Three Druggable Hot-Spots in the Aurora-A/TPX2 Interaction Using Biochemical, Biophysical, and Fragment-Based Approaches. *ACS Chemical Biology*, **2017**, *12* (11), 2906–2914. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b00537>.
- (407) Zhang, R.; McIntyre, P. J.; Collins, P. M.; Foley, D. J.; Arter, C.; von Delft, F.; Bayliss, R.; Warriner, S.; Nelson, A. Construction of a Shape-Diverse Fragment Set: Design, Synthesis and Screen against Aurora-A Kinase. *Chemical European Journal*, **2019**, *25* (27), 6831–6839. <https://doi.org/10.1002/chem.201900815>.
- (408) Xu, Z.; Ogawa, H.; Vagnarelli, P.; Bergmann, J. H.; Hudson, D. F.; Ruchaud, S.; Fukagawa, T.; Earnshaw, W. C.; Samejima, K. INCENP–Aurora B Interactions Modulate Kinase Activity and Chromosome Passenger Complex Localization. *Journal of Cell Biology*, **2009**, *187* (5), 637–653. <https://doi.org/10.1083/jcb.200906053>.
- (409) Elkins, J. M.; Santaguida, S.; Musacchio, A.; Knapp, S. Crystal Structure of Human Aurora B in Complex with INCENP and VX-680. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2012**, *55* (17), 7841–7848. <https://doi.org/10.1021/jm3008954>.
- (410) Gavrin, L. K.; Saiah, E. Approaches to Discover Non-ATP Site Kinase Inhibitors. *Medicinal Chemistry Communications*, **2013**, *4*(1), 41–51. <https://doi.org/10.1039/C2MD20180A>.
- (411) Tyler, R. K.; Shpiro, N.; Marquez, R.; Evers, P. A. VX-680 Inhibits Aurora A and Aurora B Kinase Activity in Human Cells. *Cell Cycle*, **2007**, *6*(22), 2846–2854. <https://doi.org/10.4161/cc.6.22.4940>.
- (412) Fu, J.; Bian, M.; Jiang, Q.; Zhang, C. Roles of Aurora Kinases in Mitosis and Tumorigenesis. *Molecular Cancer Research*, **2007**, *5*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-06-0208>.
- (413) Steigemann, P.; Wurzenberger, C.; Schmitz, M. H. A.; Held, M.; Guizetti, J.; Maar, S.; Gerlich, D. W. Aurora B-Mediated Abscission Checkpoint Protects against Tetraploidization. *Cell*, **2009**, *136* (3), 473–484. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.12.020>.
- (414) Azzariti, A.; Bocci, G.; Porcelli, L.; Fioravanti, A.; Sini, P.; Simone, G. M.; Quatrala, A. E.; Chiarappa, P.; Mangia, A.; Sebastian, S.; Del Bufalo, D.; Del Tacca, M.; Paradiso, A. Aurora B Kinase Inhibitor AZD1152: Determinants of Action and Ability to Enhance Chemotherapeutics Effectiveness in Pancreatic and Colon Cancer. *British Journal of Cancer*, **2011**, *104* (5), 769–780. <https://doi.org/10.1038/bjc.2011.21>.
- (415) Crosio, C.; Fimia, G. M.; Loury, R.; Kimura, M.; Okano, Y.; Zhou, H.; Sen, S.; Allis, C. D.; Sassone-Corsi, P. Mitotic Phosphorylation of Histone H3: Spatio-Temporal Regulation by Mammalian Aurora Kinases. *Molecular and Cellular Biology*, **2002**, *22* (3), 874–885. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.3.874-885.2002>.
- (416) Hsu, J.-Y.; Sun, Z.-W.; Li, X.; Reuben, M.; Tatchell, K.; Bishop, D. K.; Grushcow, J. M.; Brame, C. J.; Caldwell, J. A.; Hunt, D. F.; Lin, R.; Smith, M. M.; Allis, C. D. Mitotic Phosphorylation of Histone H3 Is Governed by Ipl1/Aurora Kinase and Glc7/PP1 Phosphatase in Budding Yeast and Nematodes. *Cell*, **2000**, *102* (3), 279–291. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00034-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00034-9).
- (417) Zhou, Y.; Shan, S.; Li, Z.-B.; Xin, L.-J.; Pan, D.-S.; Yang, Q.-J.; Liu, Y.-P.; Yue, X.-P.; Liu, X.-R.; Gao, J.-Z.; Zhang, J.-W.; Ning, Z.-Q.; Lu, X.-P. CS2164, a Novel Multi-Target Inhibitor against Tumor Angiogenesis,

- Mitosis and Chronic Inflammation with Anti-Tumor Potency. *Cancer Science*, **2017**, *108* (3), 469–477. <https://doi.org/10.1111/cas.13141>.
- (418) Suzuki, T.; Miyazaki, K.; Kita, K.; Ochi, T. Trivalent Dimethylarsenic Compound Induces Histone H3 Phosphorylation and Abnormal Localization of Aurora B Kinase in HepG2 Cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **2009**, *241* (3), 275–282. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.08.017>.
- (419) Kaestner, P.; Stolz, A.; Bastians, H. Determinants for the Efficiency of Anticancer Drugs Targeting Either Aurora-A or Aurora-B Kinases in Human Colon Carcinoma Cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, **2009**, *8* (7), 2046–2056. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-09-0323>.
- (420) Baldini, E.; Tuccilli, C.; Prinzi, N.; Sorrenti, S.; Antonelli, A.; Gnessi, L.; Morrone, S.; Moretti, C.; Bononi, M.; Arlot-Bonnemains, Y.; D'Armiento, M.; Ulisse, S. Effects of Selective Inhibitors of Aurora Kinases on Anaplastic Thyroid Carcinoma Cell Lines. *Endocrine Related Cancer*, **2014**, *21* (5), 797–811. <https://doi.org/10.1530/ERC-14-0299>.
- (421) Ting, T.-C.; Chang, M.-Y.; Hsu, T.-Y.; Wang, W.-P.; Hsieh, Y.-J.; Chang, C.-J. Vanadocene Dichloride Inhibits Cell Proliferation by Targeting Aurora B. *Metallomics*, **2018**, *10* (8), 1099–1106. <https://doi.org/10.1039/C8MT00089A>.
- (422) Pampalona, J.; Roscioli, E.; Silkworth, W. T.; Bowden, B.; Genescà, A.; Tusell, L.; Cimini, D. Chromosome Bridges Maintain Kinetochore-Microtubule Attachment throughout Mitosis and Rarely Break during Anaphase. *PLoS One*, **2016**, *11* (1), e0147420. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147420>.
- (423) Gang, X.; Qian, W.; Zhang, T.; Yang, X.; Xia, Q.; Cheng, D. Aurora B Kinase Is Required for Cell Cycle Progression in Silkworm. *Gene*, **2017**, *599*, 60–67. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.11.015>.
- (424) Carmena, M. Abscission Checkpoint Control: Stuck in the Middle with Aurora B. *Open Biology*, **2012**, *2* (7), 120095. <https://doi.org/10.1098/rsob.120095>.
- (425) Wang, F.; Dai, J.; Daum, J. R.; Niedzialkowska, E.; Banerjee, B.; Stukenberg, P. T.; Gorbsky, G. J.; Higgins, J. M. G. Histone H3 Thr-3 Phosphorylation by Haspin Positions Aurora B at Centromeres in Mitosis. *Science*, **2010**, *330* (6001), 231–235. <https://doi.org/10.1126/science.1189435>.
- (426) Andaloussi, M.; Moreau, E.; Masurier, N.; Lacroix, J.; Gaudreault, R. C.; Chezal, J.-M.; El Laghdach, A.; Canitrot, D.; Debiton, E.; Teulade, J.-C.; Chavignon, O. Novel Imidazo[1,2-a]Naphthyridinic Systems (Part 1): Synthesis, Antiproliferative and DNA-Intercalating Activities. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2008**, *43* (11), 2505–2517. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2008.02.017>.
- (427) Buesking, A., W.; Sparks, R., B.; Combs, A., P.; Douty, B.; Falahatpisheh, N.; Shao, L.; Shepard, S.; Yue, E., W. Heterocyclic Compounds as PI3K-Y Inhibitors. US 2018/0009816, **2018**.
- (428) He, S.; Moutaoufik, M. T.; Islam, S.; Persad, A.; Wu, A.; Aly, K. A.; Fonge, H.; Babu, M.; Cayabyab, F. S. HERG Channel and Cancer: A Mechanistic Review of Carcinogenic Processes and Therapeutic Potential. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, **2020**, *1873* (2), 188355. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2020.188355>.
- (429) Sawa, M. Strategies for the Design of Selective Protein Kinase Inhibitors. *Mini-reviews in Medicinal Chemistry*, **2008**, *8* (12), 1291–1297. <https://doi.org/10.2174/138955708786141043>.
- (430) Garrido, A.; Lepailleur, A.; Mignani, S. M.; Dallemagne, P.; Rochais, C. HERG Toxicity Assessment: Useful Guidelines for Drug Design. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2020**, *195*, 112290. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112290>.
- (431) Deng, M.; Shi, Y.; Chen, K.; Zhao, H.; Wang, Y.; Xie, S.; Zhao, J.; Luo, Y.; Fang, Z.; Fan, Y.; Xu, B. CS2164 Exerts an Antitumor Effect against Human Non-Hodgkin's Lymphomas in Vitro and in Vivo. *Experimental Cell Research*, **2018**, *369* (2), 356–362. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2018.05.038>.
- (432) Yu, X.; Liang, Q.; Liu, W.; Zhou, L.; Li, W.; Liu, H. Deguelin, an Aurora B Kinase Inhibitor, Exhibits Potent Anti-Tumor Effect in Human Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *EBioMedicine*, **2017**, *26*, 100–111. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.10.030>.

- (433) Franken, N. A. P.; Rodermond, H. M.; Stap, J.; Haveman, J.; van Bree, C. Clonogenic Assay of Cells in Vitro. *Nature Protocols*, **2006**, *1* (5), 2315–2319. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.339>.
- (434) Gutiérrez, L.; Stepien, G.; Gutiérrez, L.; Pérez-Hernández, M.; Pardo, J.; Pardo, J.; Grazú, V.; de la Fuente, J. M. Nanotechnology in Drug Discovery and Development. In *Comprehensive Medicinal Chemistry III*; Elsevier, **2017**; 264–295. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.12292-9>.
- (435) Lee, J. W.; Parameswaran, J.; Sandoval-Schaefer, T.; Eoh, K. J.; Yang, D.; Zhu, F.; Mehra, R.; Sharma, R.; Gaffney, S. G.; Perry, E. B.; Townsend, J. P.; Serebriiskii, I. G.; Golemis, E. A.; Issaeva, N.; Yarbrough, W. G.; Koo, J. S.; Burtness, B. Combined Aurora Kinase A (AURKA) and WEE1 Inhibition Demonstrates Synergistic Antitumor Effect in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Clinical Cancer Research*, **2019**, *25* (11), 3430–3442. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-0440>.
- (436) Tang, J.; Gautam, P.; Gupta, A.; He, L.; Timonen, S.; Akimov, Y.; Wang, W.; Szwajda, A.; Jaiswal, A.; Turei, D.; Yadav, B.; Kankainen, M.; Saarela, J.; Saez-Rodriguez, J.; Wennerberg, K.; Aittokallio, T. Network Pharmacology Modeling Identifies Synergistic Aurora B and ZAK Interaction in Triple-Negative Breast Cancer. *NPJ Systems Biology and Applications*, **2019**, *5* (1), 20. <https://doi.org/10.1038/s41540-019-0098-z>.
- (437) Huang, M.; Feng, X.; Su, D.; Wang, G.; Wang, C.; Tang, M.; Paulucci-Holthausen, A.; Hart, T.; Chen, J. Genome-Wide CRISPR Screen Uncovers a Synergistic Effect of Combining Haspin and Aurora Kinase B Inhibition. *Oncogene*, **2020**, *39* (21), 4312–4322. <https://doi.org/10.1038/s41388-020-1296-2>.
- (438) Clark, B. R.; O'Connor, S.; Fox, D.; Leroy, J.; Murphy, C. D. Production of Anticancer Polyenes through Precursor-Directed Biosynthesis. *Organic and Biomolecular Chemistry*, **2011**, *9* (18), 6306. <https://doi.org/10.1039/c1ob05667k>.
- (439) Kuwano, R.; Kashiwabara, M.; Ohsumi, M.; Kusano, H. Catalytic Asymmetric Hydrogenation of 2,3,5-Trisubstituted Pyrroles. *Journal of the American Chemical Society*, **2008**, *130* (3), 808–809. <https://doi.org/10.1021/ja7102422>.
- (440) Molander, G. A.; Cadoret, F. Synthesis of the Stereogenic Triad of the Halicyclamine A Core. *Tetrahedron Letters*, **2011**, *52* (17), 2199–2202. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2010.11.162>.
- (441) Loubidi, M.; Jouha, J.; Tber, Z.; Khouili, M.; Suzenet, F.; Akssira, M.; Erdogan, M. A.; Köse, F. A.; Dagci, T.; Armagan, G.; Saso, L.; Guillaumet, G. Efficient Synthesis and First Regioselective C-6 Direct Arylation of Imidazo[2,1-*c*][1,2,4]Triazine Scaffold and Their Evaluation in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Induced Oxidative Stress. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2018**, *145*, 113–123. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.12.081>.
- (442) Mavel, S. Influence of 2-Substituent on the Activity of Imidazo[1,2-*a*] Pyridine Derivatives Against Human Cytomegalovirus. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2002**, *10* (4), 941–946. [https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(01\)00347-9](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(01)00347-9).
- (443) Zegzouti, H.; Zdanovskaia, M.; Hsiao, K.; Goueli, S. A. ADP-Glo: A Bioluminescent and Homogeneous ADP Monitoring Assay for Kinases. *ASSAY and Drug Development Technologies*, **2009**, *7* (6), 560–572. <https://doi.org/10.1089/adt.2009.0222>.
- (444) Verdonk, M. L.; Cole, J. C.; Hartshorn, M. J.; Murray, C. W.; Taylor, R. D. Improved Protein–Ligand Docking Using GOLD. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, **2003**, *52* (4), 609–623. <https://doi.org/10.1002/prot.10465>.
- (445) Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M.; Meng, E. C.; Ferrin, T. E. UCSF Chimera?A Visualization System for Exploratory Research and Analysis. *Journal of Computational Chemistry*, **2004**, *25* (13), 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>.



**Titre :** Conception, synthèse et évaluation pharmacologique d'analogues simplifiés de métabolites marins, inhibiteurs de la kinase Aurora B à visée anticancéreuse

**Mots clés :** Chimie médicinale, métabolites marins, imidazo[1,2-a]pyridine, inhibiteurs de kinases, cancer, Aurora

**Résumé :** Ce manuscrit porte sur la conception, la synthèse et l'évaluation biologique d'analogues de l'oroïdine, monomère de la benzosceptrine C. Ces molécules sont issues de la famille des pyrrole-2-aminoimidazoles, isolées d'éponges marines. La stratégie de simplification et de diversification structurale a conduit à l'identification d'un hit sélectif, inhibiteur de la kinase Aurora B. Celle-ci joue un rôle essentiel dans la division cellulaire et son inhibition conduit à des anomalies mitotiques sévères. De plus, elle est surexprimée dans de nombreux cancers, en faisant une cible thérapeutique de choix en oncologie. L'objectif du projet, à l'interface entre la chimie et la biologie, était de synthétiser un composé chef de file pouvant conduire à un candidat médicament à visée anticancéreuse. Le squelette du hit est constitué de trois parties : une partie 4,5-dibromopyrrole, une partie imidazo[1,2-a]pyrimidine et enfin un linker alcyne. Le travail de chimie médicinal s'est articulé autour de ces trois sites de modulation structurale, qui ont été successivement modifiés et font l'objet des chapitres II à IV, après le chapitre I dédié à l'introduction. Finalement, quatre-vingt-deux dérivés ont été synthétisés et évalués

*in vitro* sur Aurora B et un panel de kinases impliquées dans différentes pathologies. Plusieurs analogues se sont avérés très actifs, avec des IC<sub>50</sub> allant jusqu'à 34 nM, soit 150 fois plus actifs que le hit initial. Le dernier chapitre porte sur l'étude du mode d'action des inhibiteurs les plus actifs. Des études de cinétiques enzymatiques ont mis en évidence un mode d'inhibition non-ATP compétitif, jusqu'alors très peu décrit pour Aurora B. Par ailleurs, des expériences d'immunomarquage ont permis d'évaluer et de quantifier les effets du meilleur composé sur les cellules traitées, montrant des résultats cohérents avec l'inhibition d'Aurora B. Enfin, des études de modélisation moléculaire avec le meilleur inhibiteur nous ont permis de situer le site de fixation potentiel de nos inhibiteurs afin de poursuivre les pharmacomodulations et l'étude SAR. Le manuscrit se termine par une conclusion générale et des perspectives qui proposent des pistes pour optimiser les propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques afin d'améliorer les propriétés nécessaires à un candidat médicament.

**Title :** Conception, synthesis and biological evaluation of simplified analogs from marine metabolites as Aurora B kinase inhibitors for cancer therapy

**Keywords :** Medicinal chemistry, marine metabolites, imidazo[1,2-a]pyridine, kinase inhibitors, cancer, Aurora

**Abstract :** This manuscript describes the design, synthesis and biological evaluation of oroidin analogs. Oroidin is a monomer of benzosceptrin C, belonging to the pyrrole-2-aminoimidazole family, isolated from marine sponges. The simplification and structural diversification approaches led us to the identification of a non-natural hit displaying selective inhibitory activity against the kinase Aurora B. This kinase plays a key role in cell division and its inhibition leads to severe mitotic abnormalities. Aurora B is found to be up-regulated in many human cancers, indicating that this kinase is a cancer-relevant target. The objective of the study at the interface between chemistry and biology is to optimize the discovered hit into a lead. The hit scaffold is divided in three parts: the 4,5-dibromopyrrole, the imidazo[1,2-a]pyrimidine and the alkyne moieties. After the first introductory chapter, chapters II to IV are dedicated to the pharmacomodulations of each part. We finally managed to synthesize eighty-two analogs for *in vitro*

evaluations toward Aurora B and a panel of kinases involved in diverse human pathologies. Several compounds were found to be very active with IC<sub>50</sub> down to 34 nM, displaying a 150-fold higher activity than the initial hit. The last chapter discusses the mode of action of the most active inhibitors from the hit expansion. The enzymatic kinetic assays revealed an allosteric mode of action seldom observed of Aurora B. Immunostaining experiments highlighted the typical effects of Aurora B inhibition in treated cells as well as its quantification. At last, molecular docking study with the best inhibitor showed the most probable allosteric binding pocket of Aurora B, providing crucial support in hit-to-lead optimization. In conclusion and perspectives, the efforts to be pursued in order to improve physicochemical and pharmacokinetic properties in the lead-to-candidate process are pointed.