



HAL
open science

Inhibiteurs photo-contrôlables de la famille TAM - Méthodologie de sulfénylation directe d'imidazopyridines

Julie Le Bescont

► **To cite this version:**

Julie Le Bescont. Inhibiteurs photo-contrôlables de la famille TAM - Méthodologie de sulfénylation directe d'imidazopyridines. Chimie organique. Université Paris-Saclay, 2020. Français. NNT : 2020UPASF016 . tel-03092007

HAL Id: tel-03092007

<https://theses.hal.science/tel-03092007>

Submitted on 1 Jan 2021

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.

Inhibiteurs photo-contrôlables de la
famille TAM
Méthodologie de sulfénylation directe
d'imidazopyridines

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, Inserm, Chimie et modélisation
pour la biologie du cancer, 91405, Orsay, France.
Réfèrent : Faculté des sciences d'Orsay

Thèse présentée et soutenue à Orsay, le 13 octobre 2020 par

Julie LE BESCONT

Composition du Jury

Delphine JOSEPH Professeure, Université Paris-Saclay, BioCis (UMR8076)	Présidente du jury
Alexandre SPECHT Directeur de recherche CNRS, Université de Strasbourg, CAMB (UMR7199)	Rapporteur et examinateur
Franck SUZENET Professeur, Université d'Orléans, ICOA (UMR7311)	Rapporteur et examinateur
Nicolas BLANCHARD Directeur de recherche CNRS, Université de Strasbourg, LIMA (UMR7042)	Examineur
Sandrine FIGUEL Maitresse de conférences, HDR, Université Paris-Saclay, CMBC (UMR9187-U1196)	Directrice de thèse

Table des matières

Table des matières.....	3
Remerciements	6
Abréviations.....	7
Introduction générale	9
I. Le noyau imidazopyridine.....	9
II. Objectifs du projet de thèse.....	10
Chapitre I : Conception, synthèse et évaluation biologique de nouveaux inhibiteurs de la famille TAM.....	13
I. Introduction.....	14
1. Protéines kinases.....	14
a. Rôle biologique des protéines kinases.....	14
b. Morphologie des protéines kinases	15
c. Inhibiteurs de protéines kinases.....	17
d. Défis et perspectives dans la recherche de nouveaux inhibiteurs de protéines kinases.....	18
2. Famille TAM.....	20
3. Inhibiteurs de la famille TAM dans la littérature	22
a. Inhibiteurs de Tyro3	22
b. Inhibiteurs d'Axl.....	23
c. Inhibiteurs de Mer.....	25
d. Inhibiteurs conçus au laboratoire.....	28
4. Objectifs du projet de thèse.....	29
II. Conception de nouveaux inhibiteurs par modélisation moléculaire	29
1. Introduction.....	29
2. Résultats.....	31
3. Détermination des molécules à synthétiser	33
III. Synthèse des nouveaux inhibiteurs potentiels.....	34
1. Molécules issues de la modélisation.....	34
2. Librairie de sulfonamides	35
IV. Evaluation biologique des nouveaux composés	37
1. Dosage de l'ADP par fluorométrie	37
a. Principe du test.....	37

b.	Mise au point des conditions	38
2.	Dosage de l'ADP par bioluminescence.....	40
a.	Principe du test.....	40
b.	Mise au point des conditions	42
c.	Mesure de l'activité des inhibiteurs potentiels synthétisés.....	45
	Conclusions et perspectives	47
	Chapitre II : Inhibiteurs photo-contrôlables de la famille TAM.....	51
I.	Introduction	52
1.	Photopharmacologie.....	52
a.	Molécules photo-clivables.....	52
b.	Photo-commutateurs	56
2.	Inhibiteurs de protéines kinases photo-contrôlables	58
a.	Inhibiteurs de kinases photo-clivables.....	58
c.	Inhibiteurs de kinases photo-commutables	61
3.	Objectif du projet de thèse.....	63
II.	Synthèse d'inhibiteurs photo-contrôlables	65
III.	Evaluation des propriétés de photo-clivage.....	72
1.	Cinétique de photoclivage.....	72
a.	Système Asahi Spectra Max -303	72
b.	Système Rayonet RPR-200	74
2.	Photostabilité des composés	76
IV.	Evaluation biologique des composés photo-activables.....	78
1.	Activité inhibitrice des composés portant le groupement photo-labile.....	78
2.	Restauration de l'activité inhibitrice sous irradiation	79
V.	Modélisation moléculaire.....	80
VI.	Deuxième génération d'inhibiteurs photo-contrôlables	86
1.	Synthèse des nouveaux inhibiteurs photo-contrôlables.....	86
2.	Cinétiques de photo-clivage	87
3.	Evaluation biologique.....	90
VII.	Conclusions et perspectives.....	92
	Chapitre III : Exploitation de la réactivité inhabituelle du DABCO(SO ₂) ₂ : sulfénylation directe d'imidazopyridines.....	97
I.	Introduction.....	98
1.	Sulfonylation d'hétérocycles.....	98
2.	Sulfénylation d'imidazo[1,2- <i>a</i>]pyridine	104

a.	Sulfénylations d'imidazo[1,2- <i>a</i>]pyridines métallo-catalysées.....	104
b.	Sulfénylations d'imidazo[1,2- <i>a</i>]pyridines non catalysées par des métaux	106
c.	Sulfénylations d'imidazo[1,2- <i>a</i>]pyridine par photocatalyse	108
II.	Résultats.....	108
1.	Optimisation des conditions	108
a.	Optimisation du catalyseur.....	109
b.	Optimisation du ligand	110
c.	Optimisation de la base	110
d.	Optimisation du solvant.....	111
e.	Optimisation de la température et de la durée de réaction	111
2.	Exemplification.....	112
3.	Hypothèses mécanistiques	114
III.	Conclusion	116
	Conclusion générale.....	117
	Partie expérimentale	121
	Chimie	122
	Evaluation biologique	166
	Modélisation moléculaire	167
	Photoclivages.....	168
	Références bibliographiques.....	169

Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse : Alexandre Specht et Franck Suzenet comme rapporteurs, Delphine Joseph et Nicolas Blanchard comme examinateurs.

J'adresse mes remerciements les plus sincères à ma directrice de thèse, Sandrine Piguel. Durant ces trois ans et demi, tu as été une encadrante modèle : toujours présente et réactive lorsque j'en avais besoin, me poussant à prendre des décisions (même si tu n'étais pas toujours convaincue) et m'aidant à prendre confiance en moi.

Je souhaite également remercier Marie Paule Teulade Fichou, directrice de l'unité CMBC de m'avoir accueillie dans son laboratoire.

Un grand merci à Liliane Mouawad, qui a pris le temps de m'enseigner les bases de la modélisation moléculaire, et à Sophie Bombard, toujours à mes côtés pour analyser mes résultats de tests biologiques.

Je tiens à remercier toute la bande des chimistes, pour les bons moments partagés au laboratoire :

- L'équipe Mahuteau, avec bien sûr Florence et tes discours enflammés, Pauline pour ton aide quand j'essaye de bricoler les pompes, Delphine et tes coups de mains en RMN, Claire pour ton aide sur le robot (même si ça n'a pas marché), Romain et ton calme olympien.
- L'équipe Teulade, avec Daniela et nos trajets en RER, Corinne qui a partagé le grand labo avec moi pendant plus de 3 ans avec douceur et humour, Thibaut l'imperturbable, Laurent qui a enfin retenu les jours de l'azote et Eugénie ton humour caustique murmuré discrètement.
- L'équipe Granzhan, avec Anton qui nous a aidés à progresser sur le mécanisme de sulfénylation, Anne toujours là pour mettre l'ambiance, Oksana qui a bientôt terminé (courage !) et Jaime que j'espère n'avoir pas trop terrorisé.
- Une pensée à ceux qui sont déjà partis : Laura qui m'a beaucoup appris au labo, et nos discussions en biophysique, Coralie et nos debriefs de l'ADP, Abijhit, Sounderya et Michela.

Une mention toute particulière pour Chloé et Marie (vous avez le droit à un paragraphe rien que pour vous) : sans vous, j'aurais sûrement beaucoup moins rigolé pendant ma thèse ! Chloé, formée par la meilleure, je suis heureuse que tu sois revenue pour ton M2 et ta thèse. Grâce à toi, on a pu sortir la méthodo (même si tu n'en peux plus). Le projet kinase est entre tes mains ! Marie, le grand labo est entre tes mains, bon courage pour le garder propre ! Nos discussions au labo, les pauses twix, les diners à la Casa del Condor vont me manquer.

Merci aux stagiaires qui ont contribué à leur niveau à mes projets de thèse : Margaux, Laurine, Mathieu, Antoine, Nolwenn, Théo.

Merci à tous ceux qui m'ont soutenu pendant ces trois années et m'ont permis de me changer les idées le temps d'une soirée, d'un week-end ou de vacances, ils se reconnaîtront.

Enfin Quentin. Tu es toujours à mes côtés pour m'encourager, me soutenir, croire en moi. Merci.

Abréviations

7-MCM : (7-méthoxycoumarin-4-yl)méthyle

AcOH : acide acétique

ACN : acétonitrile

ADN : acide désoxyribonucléique

ADP : adénosine diphosphate

ANBP : p-dialkylaminonitrobiphényle

ATP : adénosine triphosphate

BHT : 2,6-di-tert-butyl-4-méthylphénol

CuTC : thiophène-2-carboxylate de cuivre(I)

DABCO : 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane

dba : dibenzylidèneacétone

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

DCE : dichloroéthane

DCM : dichlorométhane

DEACM : [7-(diéthylamino)coumarin-4-yl)méthyle

DIPEA : diisopropyléthylamine

DMA : diméthylamine

DMAP : 4-diméthylaminopyridine

DMF : N,N-diméthylformamide

DMFDMA : N,N-Diméthylformamide diméthyl acétal

DMNB : diméthoxynitrobenzyle

DMSO : diméthylsulfoxyde

EDCI : 1-Éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide

Et₂O : diéthyl éther

EtOAc : acétate d'éthyle

EtOH : éthanol

FDA : Food and Drug Administration

GPL : groupement photo-labile

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

HPLC : chromatographie liquide haute performance
LC-MS : chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse
m-CPBA : acide métachloroperbenzoïque
MeOH : méthanol
 μ W : micro-ondes
NBS : N-bromosuccinimide
NCS : N-chlorosuccinimide
NDBF : nitrodibenzofurane
NPOM : 6-nitropiperonyloxyméthyle
n.t. : non testé
NVOC : 6-nitroveratryloxycarbonyle
PBS : tampon phosphate salin
PDB : Protein Data Bank
PtdSer : phosphatidylsérine
T3P : anhydride propylphosphonique
t.a. : température ambiante
TAM : Tyro3, Axl, Mer
TBHP : hydroperoxyde de tert-butyle
TBTU : 2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminium tetrafluoroborate
TEMPO : (2,2,6,6-tétraméthylpipéridin-1-yl)oxy
TFA : acide trifluoroacétique
THF : tétrahydrofurane
UV : ultra-violet
XantPhos : 4,5-Bis(diphenylphosphino)-9,9-dimethylxanthene

Introduction générale

I. Le noyau imidazopyridine

Le noyau imidazopyridine est constitué de la fusion d'une pyridine et d'un imidazole. Il est présent sous la forme de quatre isomères (Figure 1). Les liaisons de la pyridine sont nommées de a à c en partant de l'atome d'azote. Les atomes de l'imidazole sont numérotés selon la nomenclature habituelle. L'imidazopyridine est ensuite nommée selon les atomes et les liaisons qui ont fusionné.

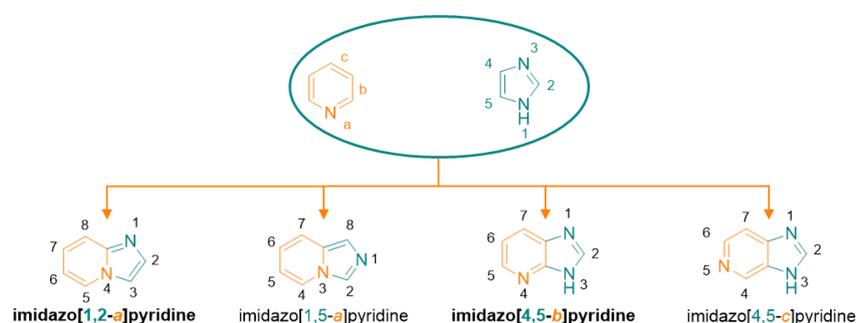


Figure 1 : Isomères imidazopyridines

Dans la suite du manuscrit, nous nous intéresserons plus particulièrement aux imidazo[1,2-*a*]pyridines et aux imidazo[4,5-*b*]pyridines. On retrouve de plus en plus le noyau imidazopyridine dans des composés à visée thérapeutique, dans le traitement du cancer, des maladies neurodégénératives, du diabète ou de l'hypertension.^{1,2} Les imidazo[1,2-*a*]pyridines sont les plus représentées, comme le Zolpidem, utilisé pour traiter les troubles du sommeil, ou le Zolimidine, un antiulcéreux.¹ Le Bamaluzole est une imidazo[4,5-*c*]pyridine brevetée par Merck comme anti-convulsant, mais jamais commercialisée.³ Le Tenatoprazole est une imidazo[4,5-*b*]pyridine actuellement en phase clinique II comme antiulcéreux.⁴

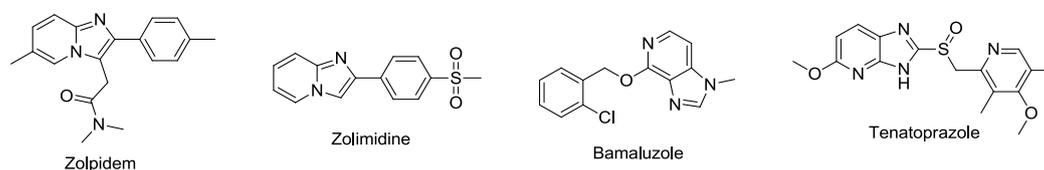


Figure 2 : Exemples d'imidazopyridines biologiquement actives

Depuis plusieurs années, notre laboratoire s'intéresse à ces hétérocycles azotés dans le cadre d'un projet de chimie médicinale portant sur des inhibiteurs de protéines kinases.⁵ D'autre part, il cherche également à développer de nouvelles méthodologies de fonctionnalisation directe de ces imidazopyridines.^{6,7}

II. Objectifs du projet de thèse

Le premier chapitre de ce manuscrit sera consacré à un projet multidisciplinaire de chimie médicinale consistant à la recherche de nouveaux inhibiteurs des protéines kinases de la famille TAM. La conception de nouvelles structures par modélisation moléculaire, leur synthèse et leur évaluation biologique seront successivement discutées.

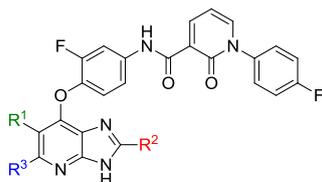


Figure 3 : Structure des inhibiteurs de la famille TAM

Dans un deuxième temps, nous avons souhaité appliquer les principes de la photopharmacologie à une librairie d'inhibiteurs de la famille TAM, afin de pouvoir contrôler leur activité grâce à la lumière. Pour cela, nous avons greffé des groupements photo-labiles sur ces composés. La synthèse, les photo-clivages, l'évaluation biologique des composés et la restauration de leur activité seront présentés dans le chapitre II.

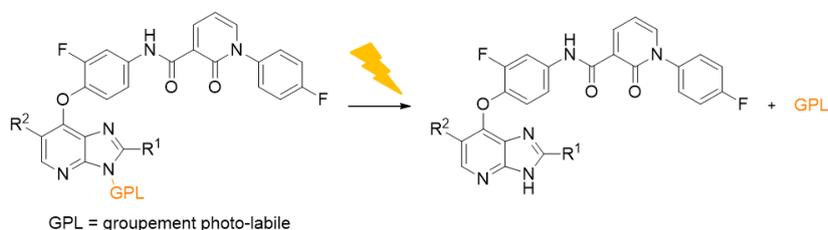


Schéma 1 : Inhibiteurs de TAM photo-contrôlables

Le dernier chapitre sera consacré à la mise au point de nouvelles conditions de sulfénylation d'imidazo[1,2-*a*]pyridines, en exploitant la réactivité inattendue du DABCO.(SO₂)₂, un précurseur de dioxyde de soufre qui n'avait jamais été utilisé en tant que donneur de soufre (Schéma 2).

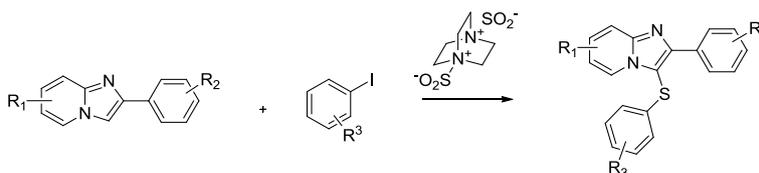


Schéma 2 : Méthodologie de sulfénylation d'imidazopyridines

Chapitre I : Conception, synthèse et évaluation biologique de nouveaux inhibiteurs de la famille TAM

I. Introduction

1. Protéines kinases

a. Rôle biologique des protéines kinases

Les protéines kinases sont une famille de protéines catalysant le transfert du groupement phosphate terminal de l'ATP sur des groupements hydroxyles de lipides, de sucres et d'acides aminés (Figure 4).⁸

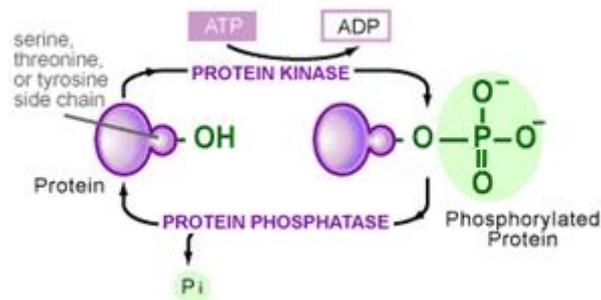


Figure 4 : Fonctionnement d'une protéine kinase

Ces réactions de phosphorylation jouent un rôle essentiel dans les voies de signalisation cellulaire et initient des processus de croissance cellulaire, de prolifération et d'apoptose.⁸⁻¹⁰ Les vingt dernières années, les protéines kinases ont émergé comme de nouvelles cibles en recherche pharmacologique. En effet, il a été montré que la surexpression ou le dysfonctionnement des protéines kinases était impliqué dans de nombreuses pathologies telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires, inflammatoires ou infectieuses.⁸

L'ensemble des protéines kinases humaines, appelé kinome, regroupe 518 protéines kinases¹¹, classées en familles selon leur degré d'homologie (Figure 5). Elles sont réparties en trois grandes catégories, selon le résidu qu'elles phosphorylent :

- Les tyrosines kinases
- Les sérines/thréonines kinases
- Les kinases bi-fonctionnelles, phosphorylant aussi bien les tyrosines que les sérines et les thréonines

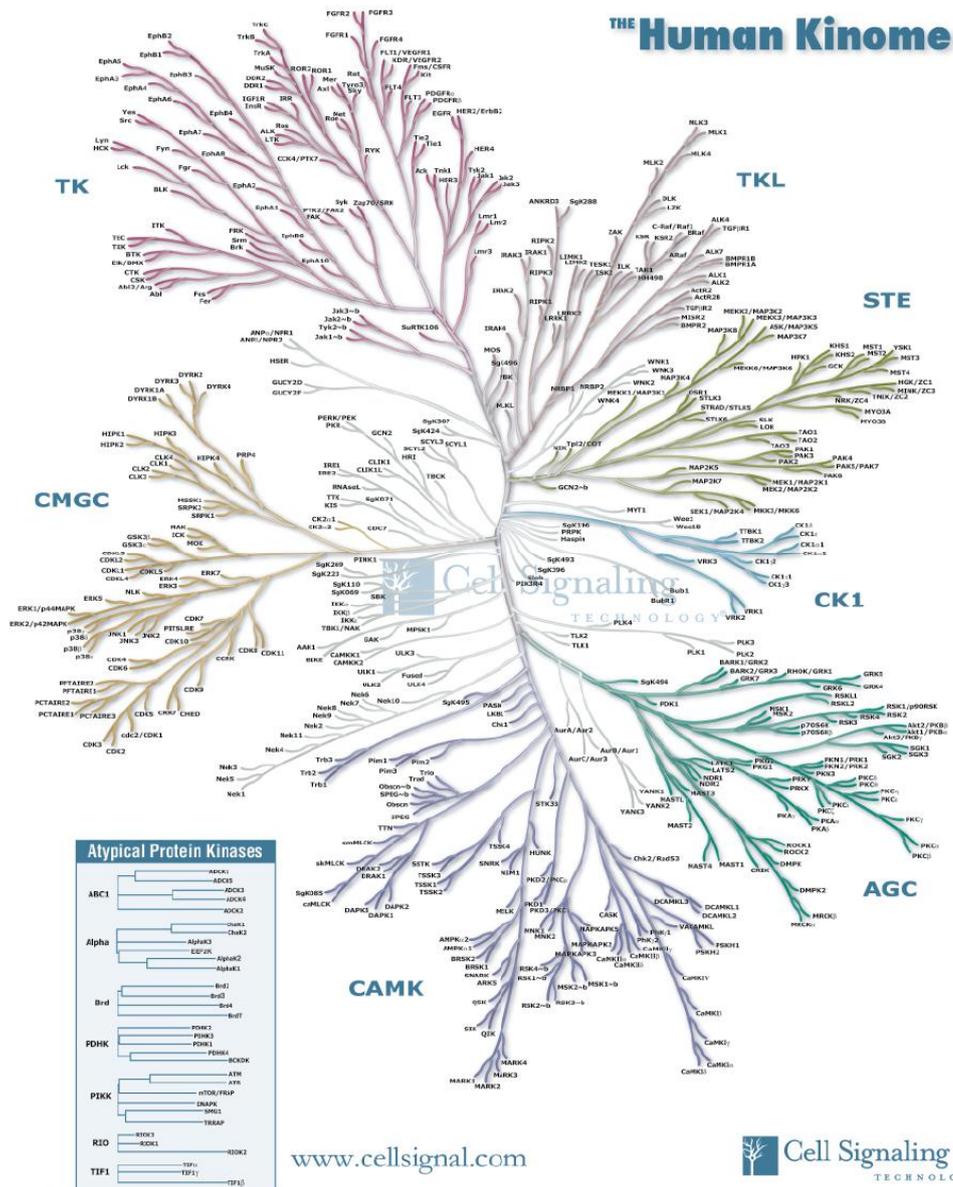


Figure 5 : Kinome humain
 Illustration reproduite avec l'aimable autorisation de Cell Signaling Technology, Inc. (www.cellsignal.com)

b. Morphologie des protéines kinases

Le domaine catalytique de la majorité des protéines kinases présente une structure bilobée composée des éléments suivants⁸ (Figure 6) :

- Un lobe supérieur appelé lobe N, constitué de 5 feuillets β et d'une hélice α appelée C-hélice. Une boucle riche en glycine (Gly-loop) située entre les deux premiers feuillets contribue à la coordination des groupements phosphates de l'ATP.
- Un lobe inférieur appelé lobe C, constitué majoritairement d'hélices α . Il contient la boucle d'activation, initiée par une triade DFG (aspartate, phénylalanine, glycine). Le résidu aspartate est lié à un des cations Mg^{2+} qui coordine les groupements phosphates de l'ATP afin de les positionner pour le transfert de phosphate.

- Ces deux lobes sont reliés par une région charnière (hinge) où se fixe l'ATP par liaisons hydrogène. Un résidu de la charnière appelé « gatekeeper » contrôle l'accès à une poche hydrophobe à l'arrière de la poche ATP.

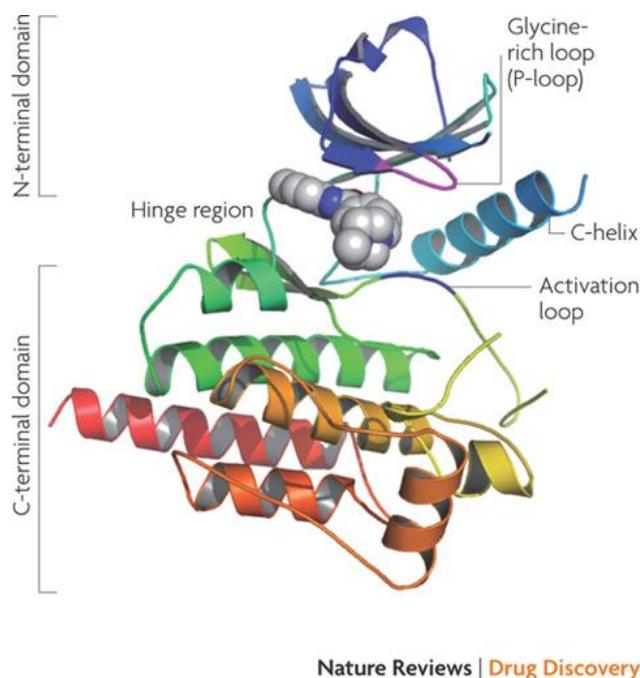


Figure 6 : Structure d'une protéine kinase¹²

La phosphorylation/déphosphorylation de la boucle d'activation permet d'activer/désactiver la protéine kinase.

Lorsque celle-ci est en conformation active (aussi appelée conformation DFG-in), le résidu aspartate de la triade DFG pointe à l'intérieur du site actif. La position de la C-hélice est également importante : en conformation active, elle est tournée vers le site actif grâce à une interaction entre un résidu glutamate de l'hélice et une lysine d'un feuillet β du lobe N.¹³

En conformation inactive (appelée conformation DFG-out), le motif DFG est renversé d'environ 180° , avec l'aspartate et la phénylalanine qui échangent leur position, ce qui empêche la coordination du cation Mg^{2+} . La C-hélice est poussée vers l'extérieur, ce qui ouvre une poche hydrophobe adjacente à la poche ATP. D'autres conformations de la boucle d'activation, de la C-hélice et du motif DFG peuvent mener à des conformations inactives de la kinase.^{13,14}

La figure ci-dessous compare la conformation active et inactive de la protéine kinase ABL, co-cristallisée avec le dasatinib (à gauche) et l'imatinib (à droite), deux inhibiteurs utilisés contre la leucémie myéloïde chronique (Figure 7). On voit que dans la conformation DFG-in, l'aspartate, la phénylalanine et la C-hélice sont proches les uns des autres. L'espace entre la boucle d'activation et l'hélice est trop restreint pour permettre le passage d'une molécule. L'inhibiteur se place dans la poche ATP. En conformation DFG-out, l'aspartate et la phénylalanine ont échangé leur position, et la C-hélice s'est éloignée, ouvrant le passage vers une poche allostérique hydrophobe dans laquelle l'inhibiteur peut se placer.

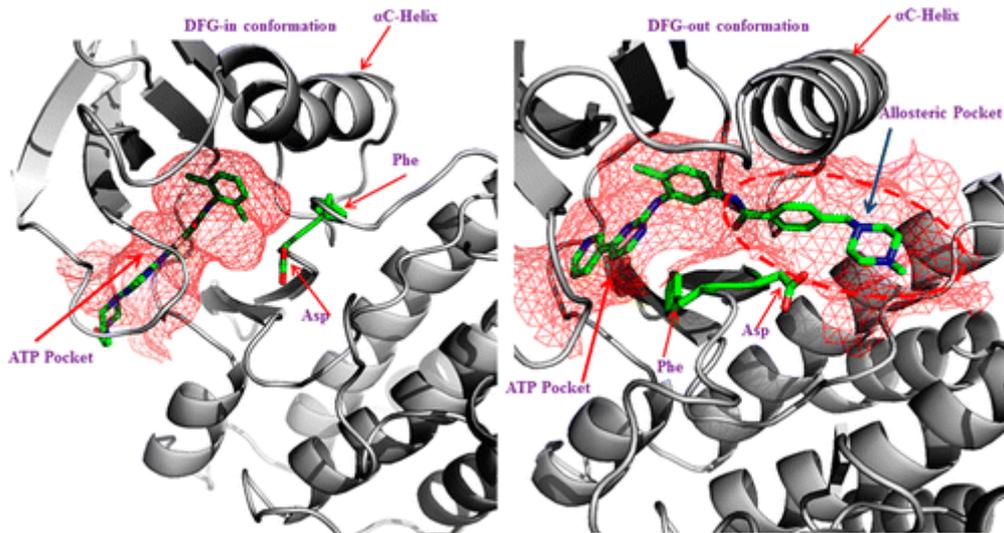


Figure 7 : Comparaison de la conformation active (à gauche) et inactive (à droite) de la kinase ABL

c. Inhibiteurs de protéines kinases

L'âge d'or des inhibiteurs de protéines kinases débute en 2001 avec la commercialisation de l'imatinib, ou Gleevec comme traitement contre la leucémie myéloïde chronique (Figure 8). Depuis, 55 inhibiteurs de protéines kinases ont été approuvés par la Food and Drug Administration (FDA).¹⁵



Figure 8 : Structure de l'imatinib (Gleevec)

Les inhibiteurs de kinases sont séparés en deux classes selon leur mode d'inhibition : réversible ou irréversible. Les inhibiteurs irréversibles se lient de façon covalente à un résidu cystéine proche du site de fixation de l'ATP et bloquent ce dernier de manière irréversible.¹⁶ Les inhibiteurs réversibles se répartissent en quatre catégories^{10,13} :

- Type I : inhibiteur compétitif de l'ATP, se plaçant dans la poche ATP de la protéine en conformation DFG-in (Figure 9, A).
- Type II : inhibiteur compétitif de l'ATP, interagissant avec la protéine en conformation DFG-out. La molécule se place dans la poche ATP et dans la poche hydrophobe à proximité ouverte dans la conformation inactive (Figure 9, B).
- Type III : ce sont des inhibiteurs allostériques se liant à une poche à proximité du site de fixation de l'ATP, sans réaliser d'interaction avec la poche ATP elle-même (Figure 9, C).
- Type IV : il s'agit d'inhibiteur allostérique se liant à une poche éloigné du site de fixation de l'ATP (Figure 9, D).

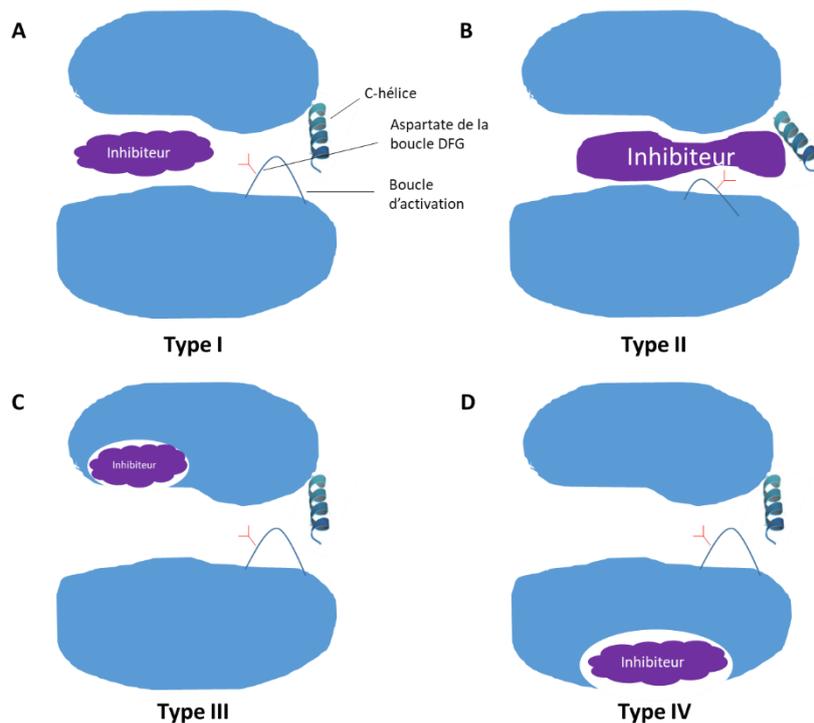


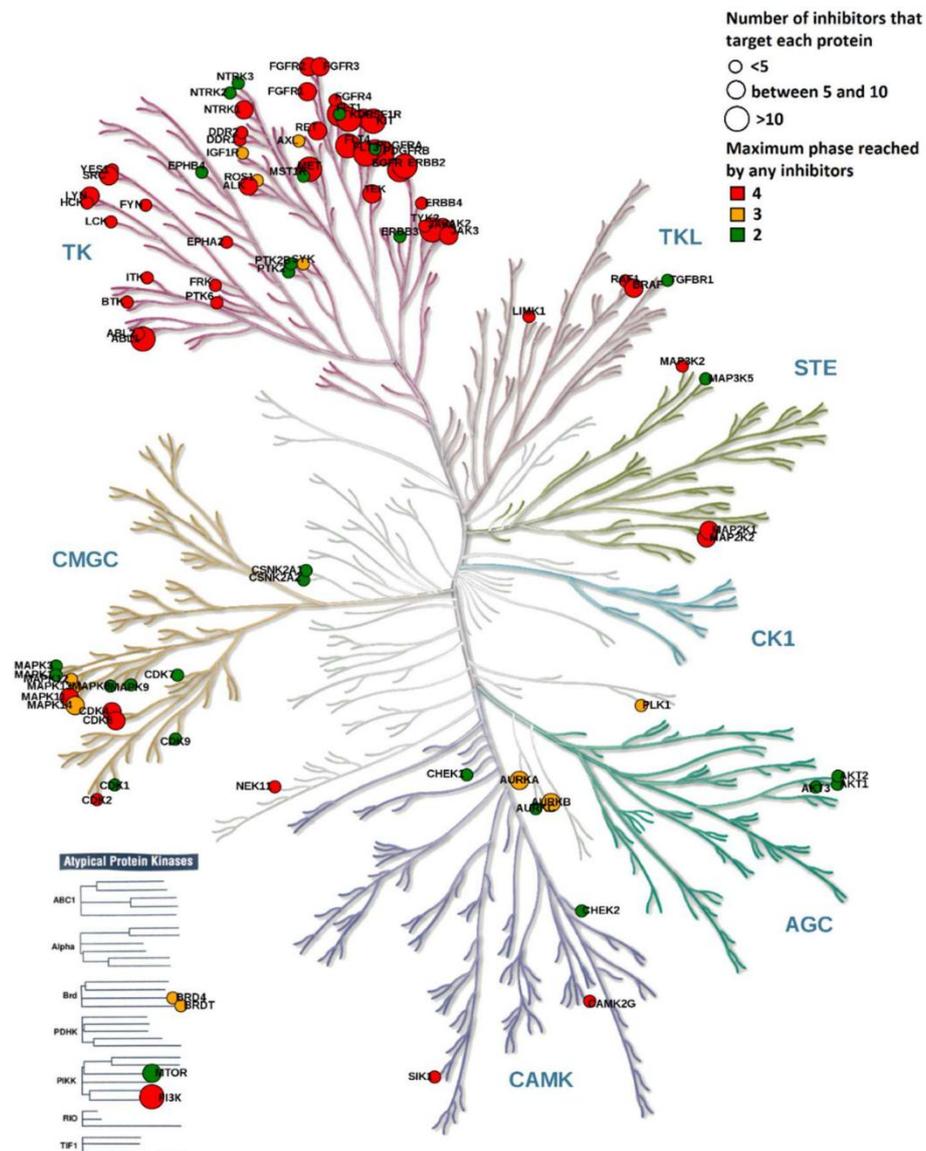
Figure 9 : Classes d'inhibiteurs

d. Défis et perspectives dans la recherche de nouveaux inhibiteurs de protéines kinases

Malgré l'essor considérable des inhibiteurs de protéines kinases ces vingt dernières années, ceux-ci souffrent de plusieurs inconvénients. Tout d'abord, la grande majorité des molécules sur le marché sont des inhibiteurs compétitifs de l'ATP, qu'ils se fixent dans la conformation active ou inactive de la protéine. Or le site de fixation de l'ATP est très largement conservé, ce qui conduit à une faible sélectivité au sein du kinome. Le sujet de la sélectivité des inhibiteurs de kinase est controversé. Plusieurs études ont montré que le manque de sélectivité des inhibiteurs dans un contexte oncologique était favorable à la guérison du patient.^{8,17} En effet, les cancers étant des pathologies multifactorielles, l'action d'une molécule sur plusieurs cibles peut être bénéfique. Toutefois, il semble important de développer des outils moléculaires spécifiques afin d'étudier et d'identifier des cibles thérapeutiques précises. Enfin, l'utilisation d'inhibiteurs de protéines kinases dans le cadre de maladies chroniques (inflammatoires, cardio-vasculaires) nécessite là aussi le développement de molécules sélectives afin de limiter les effets secondaires pour le patient.^{8,10}

Une autre limitation dans le développement d'inhibiteurs de kinases est l'émergence de résistance. La plupart sont dues à des mutations d'acides aminés dans le site de fixation de l'ATP, ce qui diminue l'affinité de l'inhibiteur pour le site actif. Pour les inhibiteurs de type II, une mutation du résidu appelé « gatekeeper » contrôlant l'accès à la poche hydrophobe située derrière la poche ATP peut empêcher l'entrée de l'inhibiteur dans la cavité. D'autres changements au sein de la cellule, comme un métabolisme accru par le cytochrome P450, la capture des inhibiteurs dans des vésicules acides, ou des changements dans les voies de signalisation des protéines kinases peuvent diminuer l'efficacité des composés.⁸

Le domaine des inhibiteurs de protéines kinases reste toutefois toujours très prometteur, les molécules mises sur le marché ne s'intéressant qu'à une fraction du kinome humain (Figure 10).¹⁵ L'arbre ci-dessous représente le champ d'action des inhibiteurs de kinases en développement ou mis sur le marché. On constate que la majorité des molécules cible la famille des tyrosines kinases. Le champ de recherche est donc très large pour découvrir des inhibiteurs pour les autres familles de kinases.



"Illustration reproduced courtesy of Cell Signaling Technology, Inc. (www.cellsignal.com)"

Figure 10 : Inhibiteurs de protéines kinases représentés sur le kinome humain

L'intérêt de notre laboratoire pour les protéines kinases a commencé par une collaboration avec l'équipe du Dr. François Radvanyi, qui a montré que la tyrosine kinase Tyro3 était impliquée dans 70 % des cas de cancers de la vessie.^{18,19} Cette protéine fait partie de la famille TAM.

2. Famille TAM

La famille TAM est identifiée au début des années 1990. Elle regroupe trois tyrosines kinases trans-membranaires : Tyro3 (aussi appelée Sky, Brt, Dtk, Rse, Tif, Etk2, Rek), Axl (Ark, Ufo, Tyro7), du grec *Anaxelekto* signifiant « incontrôlé » et Mer (MerTK, Nyk, Eyk, Tyro12) isolée de mélanocytes et de tissus épithéliaux et reproducteurs.²⁰ Ces trois protéines présentent une similarité structurelle importante : 52-57% dans la partie extracellulaire et 72-75% dans le domaine intracellulaire.

Elles sont constituées de deux domaines de type immunoglobuline (Ig) et de deux domaines fibronectine (FNIII) dans leur partie extracellulaire, tandis que le domaine kinase intracellulaire contient une séquence d'acides aminés unique à la famille TAM : KW(I/L)A(I/L)ES (Figure 11).²⁰

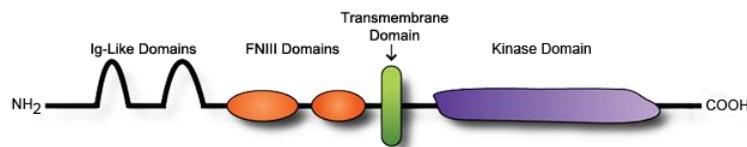


Figure 11 : Structure des protéines kinases de la famille TAM

Les récepteurs de la famille TAM sont activés par le ligand Gas-6 (Growth arrest-specific protein), et Tyro3 et Mer sont également activés par la protéine S.^{20,21} Ces ligands sont capables de se lier à des lipides de type phosphatidylserines (PtdSer), ce qui permet à Tyro3, Axl et Mer de détecter et se lier à des cellules présentant des membranes lipidiques PtdSer (Figure 12).²²

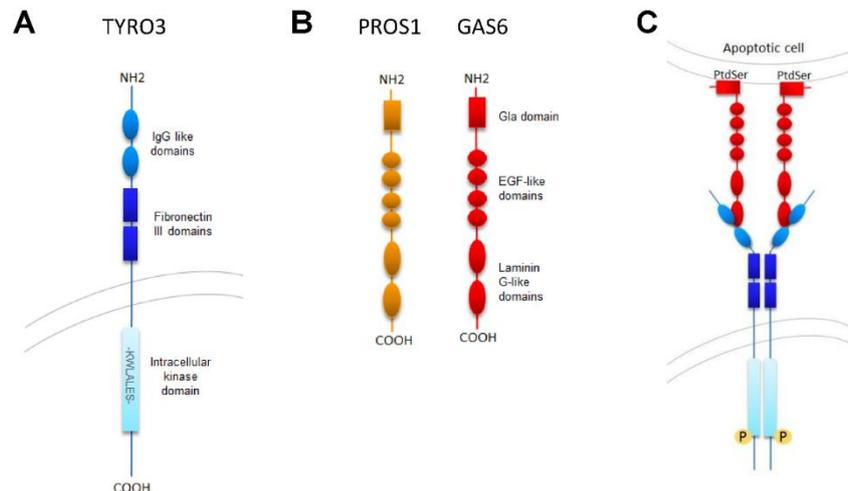


Figure 12 : A) Structure de Tyro3 ; B) Structure des ligands (Protéine S et Gas-6) ; C) Activation de Tyro3 par Gas-6. Liaison avec des phosphatidylserines membranaires d'une cellule apoptotique

Plusieurs structures cristallographiques du domaine kinase des protéines humaines co-cristallisé avec un inhibiteur ont été publiées : 13 structures de Mer entre 2009 et 2019, la majorité en conformation DFG-*in*²³⁻³⁰, Axl en conformation active et inactive en 2017.²⁹ Pour

Tyro3, seule la structure de la protéine murine en conformation active a été élucidée en 2012 et 2013.^{31,32}

Les trois tyrosines kinases de la famille TAM sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires (Figure 13).²² Dans la figure ci-dessous, on peut voir par exemple que Tyro3 régule des voies de signalisation importantes pour la prolifération cellulaire, la régulation du cycle cellulaire, d'apoptose ou de modulation immunitaire.

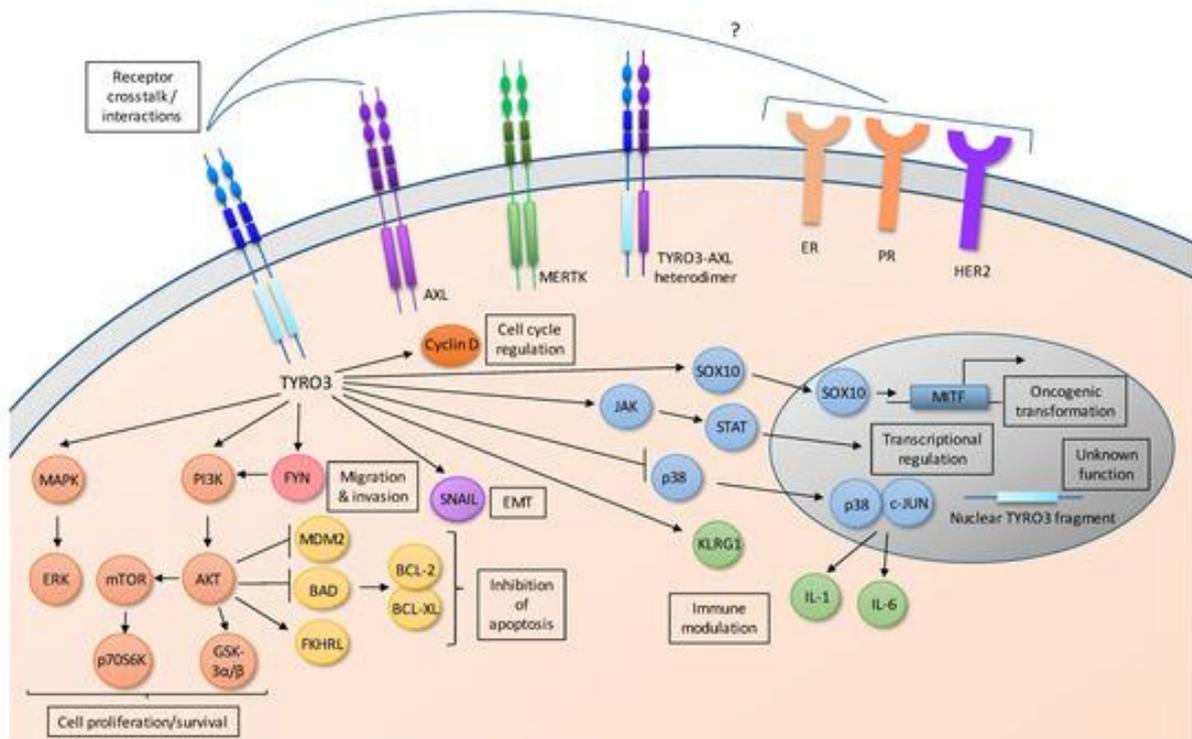


Figure 13 : Voies de signalisation cellulaire régulées par Tyro3

L'une des fonctions les plus étudiées de Mer est son rôle dans l'efférocytose (phagocytose des cellules apoptotiques par des macrophages). Un dysfonctionnement de la protéine kinase peut ainsi mener à des maladies auto-immunes et inflammatoires.³³⁻³⁵ Des études montrent également que l'expression des PtdSer à la surface de certains virus et leur reconnaissance par les récepteurs TAM faciliterait les infections.³⁶ Récemment, l'implication d'Axl dans l'infection au virus Zika a été démontrée.^{37,38}

Les tyrosines kinases de la famille TAM sont surexprimées dans un grand nombre de cancers : leucémie myéloïde, colon, foie, prostate, sein.²¹ Elles sont impliquées dans au moins trois des six fonctions cellulaires acquises par les cellules cancéreuses : la migration et l'invasion, l'angiogenèse et la survie cellulaire et la croissance tumorale.²⁰

Les nombreuses implications des récepteurs TAM dans diverses maladies infectieuses, inflammatoires, auto-immunes et cancers en font donc des cibles thérapeutiques privilégiées. Toutefois, peu d'inhibiteurs ont été spécifiquement conçus pour cette famille de tyrosines kinases, avec un intérêt accru envers Axl et Mer.

3. Inhibiteurs de la famille TAM dans la littérature

La plupart des inhibiteurs de la famille TAM ont été développés pour d'autres protéines kinases et identifiés par la suite comme inhibiteurs des récepteurs TAM par profils de sélectivité. Cependant, quelques molécules ont été conçues pour inhiber spécifiquement les protéines de la famille TAM.³⁹

a. Inhibiteurs de Tyro3

Tyro3 est le membre de la famille TAM le moins étudié. Les premiers inhibiteurs spécifiquement dédiés à cette protéine datent de 2012, où un criblage de la chimiothèque de Pfizer a permis d'identifier le spiroindoline-2-carboxindole **1**, structure très originale pour un inhibiteur de protéine kinase (Figure 14).³¹ Le co-cristal du composé et de Tyro3 montre qu'il s'agit d'un inhibiteur de type I compétitif de l'ATP. Le 2-carboxyindole forme deux liaisons hydrogène avec le résidu Met596 de la région charnière tandis que les cycles pyrrolidine et pipéridine interagissent avec les résidus Asp663 et Arg649. Cette structure cristalline révèle également la présence d'une poche formée par l'Ala571 qui n'est pas présente dans Axl et Mer et dont l'occupation par le phényle du spiroindole explique sûrement la sélectivité envers Tyro3. Toutefois les tests préliminaires d'absorption, distribution, métabolisme, excrétion (ADME) ont montré une faible solubilité dans l'eau, une biodisponibilité orale modérée et un métabolisme par le CYP2D6 importante, ce qui a stoppé son développement.

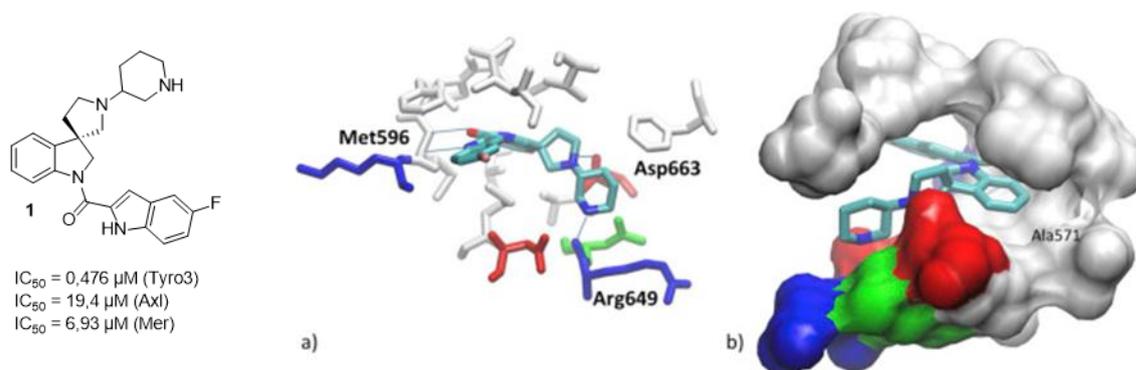


Figure 14 : Structure de **1** et structure cristalline de **1** dans le site actif de Tyro3 (code PBB : 3QUP)³⁹

Le même groupe a également publié en 2013 une série d'inhibiteurs basée sur le noyau pyrimidine (Figure 15).³² La structure cristalline du composé **2** montre que le cycle 2-aminopyrimidine-5-carboxamide forme une liaison hydrogène avec la Pro594 et deux avec la Met596 de la région charnière, tandis que le groupement pyridinéthyle ne pointe pas vers l'Ala571 comme attendu, mais vers la Lys450 et l'Asp663. En remplaçant ce groupement par une chaîne plus courte, la sélectivité envers Tyro3 est améliorée. Le co-cristal de **3** dans le site actif montre que le composé entre plus profondément dans la cavité et que le groupement 2-méthoxybenzyle occupe cette fois-ci la poche alanine (Figure 15b).

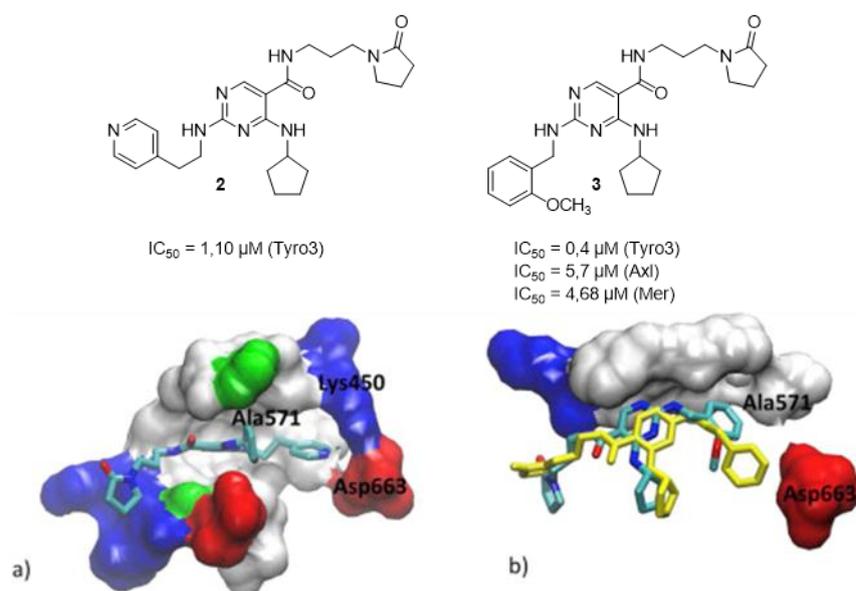


Figure 15 : Structures de 2 et 3 (en haut). a) Structure cristalline de 2 dans Tyro3 (code PDB : 4FEQ). b) Superposition des structures cristallines de 2 (en jaune) et de 3 (code PDB : 4FF8)³⁹

En 2018, l'équipe de Kim a également publié une série de pyrimidines inhibant sélectivement Tyro3 (Figure 16).⁴⁰ Il semblerait que la substitution du cycle phénylamine soit déterminante pour l'activité du composé, ce qui n'est toutefois pas appuyé par les expériences de modélisation moléculaire effectuées.

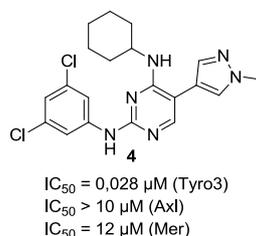


Figure 16 : Pyrimidine inhibiteur sélectif de Tyro3

b. Inhibiteurs d'Axl

Axl est le membre de la famille TAM le plus étudié, du fait de ces multiples implications dans différents types de cancers. En 2018, le Gilteritinib est approuvé par la FDA comme traitement de la leucémie myéloïde aiguë.⁴¹ Le Bemcentinib est quant à lui en phase clinique II contre le cancer des poumons non à petites cellules et contre le cancer du sein triple négatif (Figure 17).^{15,42}

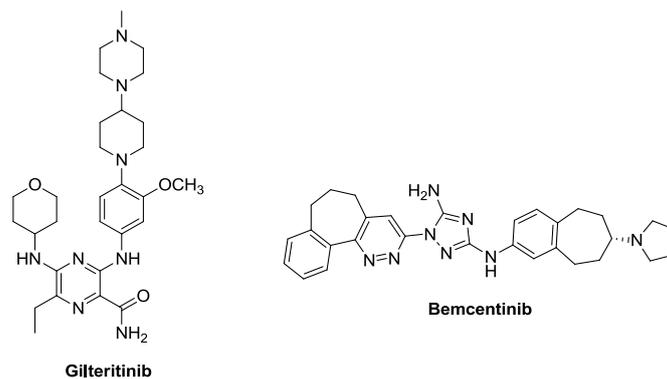


Figure 17 : Structures du Gilteritinib et du Bemcentinib

Plusieurs composés de type pyrimidine ont été identifiés comme inhibiteurs d'Axl. L'Amuvatinib, identifié initialement comme inhibiteur de c-Kit et c-Met, montre une inhibition de la phosphorylation d'Axl dans les tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST) sensibles et résistantes à l'Imatinib (Figure 18).⁴³ Les pyrimidines **5** et **6** ont été identifiées en 2011 comme inhibiteurs potentiels suite à un criblage virtuel dans un modèle du site actif d'Axl.⁴⁴ L'introduction d'un groupement sulfonamide pouvant se coordonner au cation Mg^{2+} améliore drastiquement l'activité. Toutefois, le composé **5** a également montré une forte activité sur les autres membres de la famille TAM, ainsi que sur d'autres kinases comme les sérines/thréonines kinases Aurora A et B.

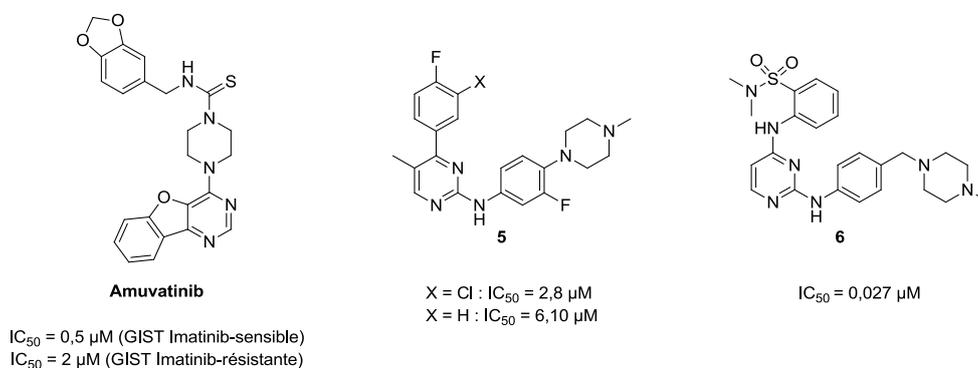


Figure 18 : Inhibiteurs d'Axl

En 2018, l'équipe d'Orfi propose une série de sulfonamides inhibant plus efficacement Axl que leur homologue possédant une fonction urée (Figure 19).⁴⁵

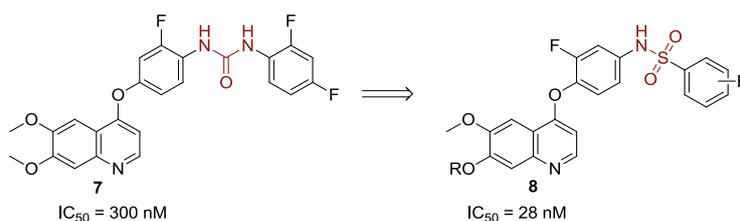


Figure 19 : Série de sulfonamides inhibiteurs d'Axl

c. Inhibiteurs de Mer

En 2009, un criblage d'une librairie de 157 composés a mené à l'identification de 5 composés inhibant Mer.²³ Plus important, l'ADP ainsi qu'un des ligands ont été co-cristallisés avec la protéine, ce qui a été le point de départ pour des criblages virtuels et l'identification d'autres inhibiteurs potentiels. Le composé **9**, dérivé de purine, montre une activité inhibitrice modérée avec une IC_{50} de 11,3 μ M (Figure 20). Il établit une liaison hydrogène avec le résidu Met674 de la région charnière, tandis que le groupement hydroxyle est orienté vers le solvant, faisant face à un résidu aspartate.

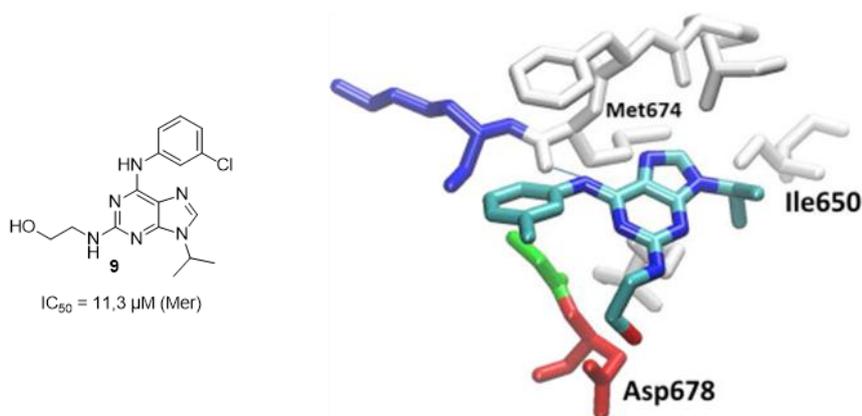


Figure 20 : Composé **9** et sa structure cristalline dans Mer

L'équipe de Stephen Frye de l'Université de Caroline du Nord travaille intensivement sur les inhibiteurs de Mer. En 2012, elle publie une série de pyrazolopyrimidines portant une fonction amine en position 6 (Figure 21).³⁰ Le composé **10** montre une activité 40 fois supérieure sur Mer que sur Tyro3, et 9 fois supérieure par rapport à Axl. La présence de l'amine secondaire est indispensable pour l'activité de la molécule. En effet, la substitution de la pyrazolopyrimidine en 6 par une amine tertiaire conduit à une perte drastique d'activité. Ces résultats sont confirmés par le co-cristal d'UNC569 dans Mer, où l'on voit que le NH en position 6 établit une liaison hydrogène avec la Pro672 de la région charnière. Cependant, la présence de l'amine primaire sur le cyclohexyle induit une activité hERG (gène codant pour les canaux potassiques dont l'inhibition conduit à des irrégularités du rythme cardiaque).

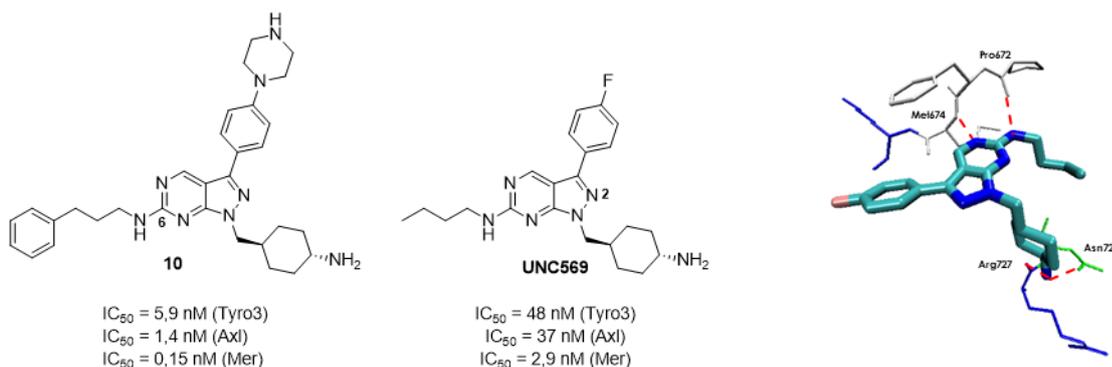
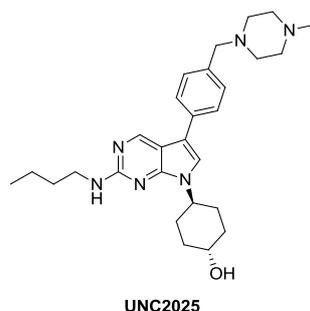


Figure 21 : Structures de pyrazolopyrimidines inhibiteurs de Mer et structure cristalline d'UNC569 dans Mer

Pour résoudre ce problème, l'équipe a remplacé l'amine primaire par un hydroxyle.⁴⁶ Constatant également que l'azote N2 du pyrazole n'était impliqué dans aucune interaction avec la protéine, celui-ci a été remplacé par un atome de carbone, menant à une série de pyrrolopyrimidines.⁴⁷ Le composé UNC2025 montre une très bonne activité sur Mer ($IC_{50} = 0,74$ nM), une bonne solubilité, une faible clairance et une grande biodisponibilité orale (Figure 22).

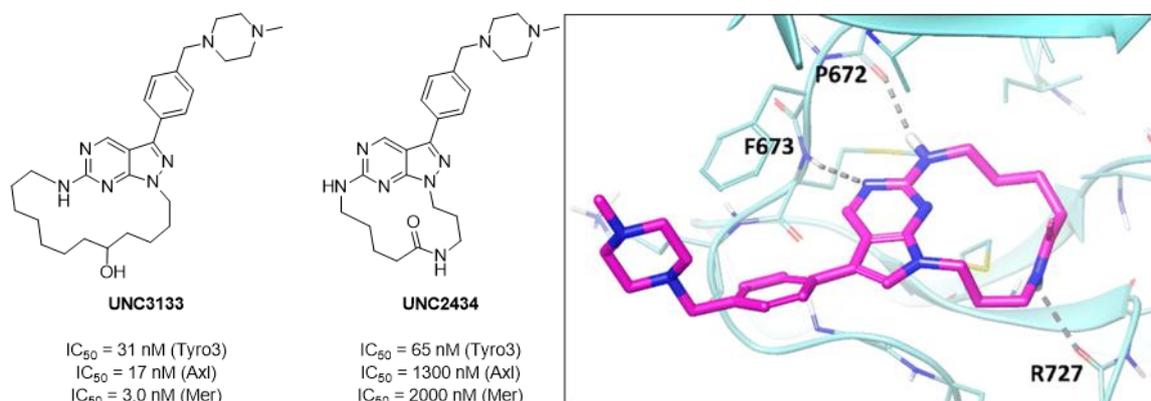


UNC2025

$IC_{50} = 17$ nM (Tyr03)
 $IC_{50} = 14$ nM (Axl)
 $IC_{50} = 0,74$ nM (Mer)

Figure 22 : Structure d'UNC2025, inhibiteur de Mer

A l'aide des structures cristallines de leurs composés en complexe avec Mer, l'équipe de Frye a également développé en 2016 des analogues macrocycliques de leurs pyrrolopyrimidines.²⁵ La pré-organisation induite par la présence d'un cycle flexible peut favoriser les interactions avec la protéine en diminuant l'entropie et améliorer la sélectivité. Le composé UNC3133 présente de bonnes activités envers les trois protéines de la famille TAM (Figure 23). La taille du macrocycle et la position du groupement donneur de liaison hydrogène sont déterminantes pour l'activité des molécules. Le co-cristal d'UNC2434 dans Mer montre que les interactions avec la protéine sont similaires à celles observées pour UNC569.



UNC3133

$IC_{50} = 31$ nM (Tyr03)
 $IC_{50} = 17$ nM (Axl)
 $IC_{50} = 3,0$ nM (Mer)

UNC2434

$IC_{50} = 65$ nM (Tyr03)
 $IC_{50} = 1300$ nM (Axl)
 $IC_{50} = 2000$ nM (Mer)

Figure 23 : Structure d'inhibiteurs macrocycliques de Mer et structure cristalline d'UNC2434 en complexe avec Mer

La même équipe a également développé depuis 2013 des inhibiteurs basés sur le noyau pyrimidine, acycliques^{24,48} et macrocycliques²⁷ (Figure 24). La présence d'une liaison hydrogène

intramoléculaire permet de rigidifier l'ensemble et potentiellement d'améliorer les interactions avec la protéine. Les deux composés ci-dessous montrent une bonne activité sur Mer et une bonne sélectivité avec des activités sur Tyro3 et Axl 27 à 129 fois supérieures à celles sur Mer.

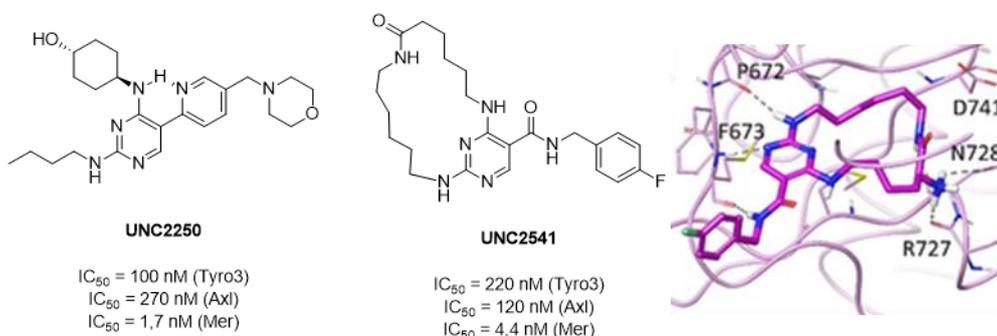


Figure 24 : Inhibiteurs pyrimidines de Mer et structure cristalline d'UNC2541 dans Mer

Tous les inhibiteurs de Mer que nous avons pu voir jusqu'ici sont des inhibiteurs de type I, se fixant au site actif de la protéine en conformation DFG-in. Grâce à la modélisation moléculaire, l'équipe de Frye a été capable de transformer ces composés en inhibiteurs de type II, se liant à la protéine en conformation inactive (Figure 25).²⁸ A partir d'une structure pyridine-pyrimidine, semblable à celles déjà développées,⁴⁸ les auteurs ont ajouté des fragments capables d'atteindre la poche allostérique accessible en conformation inactive. Le composé UNC4042 ainsi obtenu présente de très bonnes activités sur chacune des protéines de la famille TAM. La molécule UNC3437 montre une activité légèrement sélective pour Mer. Sa co-cristallisation avec la protéine montre que la partie alcyne-pyridine se fixe bien dans la poche allostérique derrière la poche ATP.

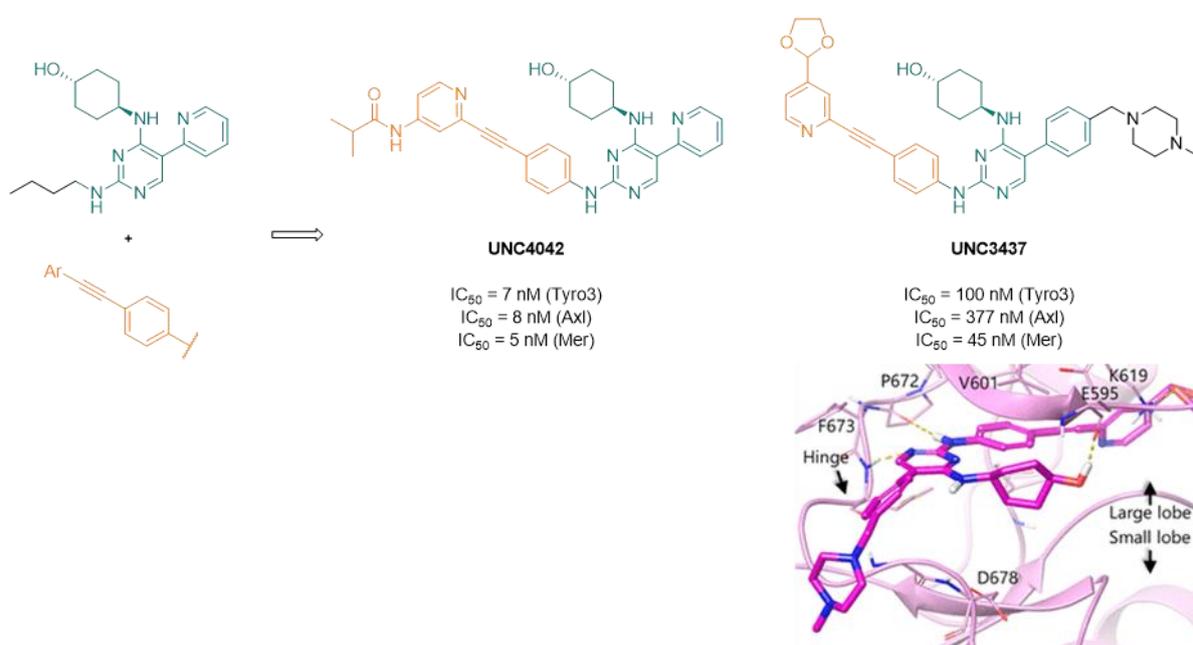


Figure 25 : Structures d'inhibiteurs de type II de Mer et structure cristalline d'UNC3437 dans Mer

d. Inhibiteurs conçus au laboratoire

Le BMS-777607 est un inhibiteur de la protéine kinase c-Met identifié pour également inhiber les kinases de la famille TAM.⁴⁹ Il a été co-cristallisé avec c-Met en 2009, montrant qu'il s'agit d'un inhibiteur de type II interagissant avec la protéine en conformation DFG-out (Figure 26, code PDB : 3F82). La partie 2-aminopyridine établit des liaisons hydrogène avec la région charnière tandis que la chaîne latérale à motif pyridone s'installe dans la poche allostérique accessible en conformation inactive. Les IC_{50} sur la famille TAM sont comprises entre 1,1 et 4,3 nM.

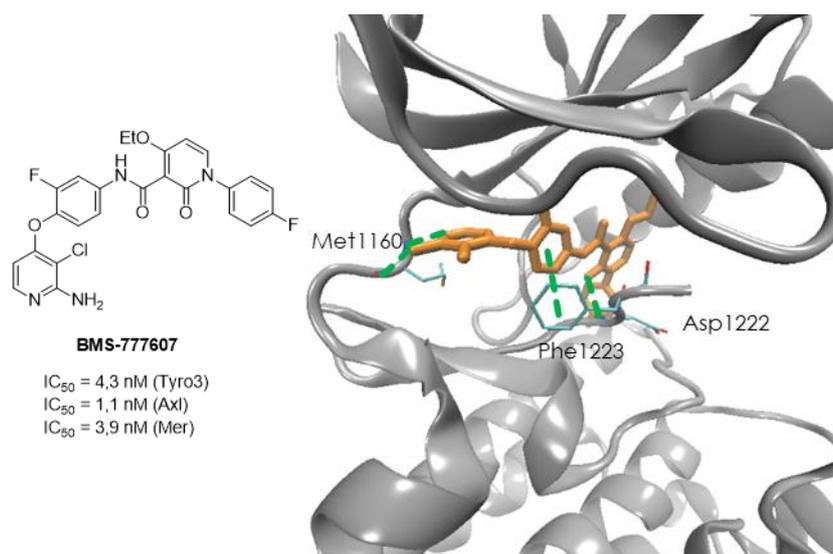


Figure 26 : Structure cristalline de BMS-777607 dans c-Met

A partir du BMS-777607, plusieurs bibliothèques de composés ont été conçues au laboratoire en modifiant la 2-aminopyridine par un noyau purine⁵⁰, pyrimidine⁵¹ ou imidazo[4,5-*b*]pyridine⁵ (Figure 27). En série purine, divers essais de raccourcissement de la chaîne latérale ont tous menés à une perte totale d'activité, ce qui prouve que la chaîne pyridone est indispensable pour l'activité inhibitrice. Le remplacement du lien éther entre la purine et la chaîne latérale par un lien amine est également délétère. Dans tous les cas, la plateforme hétérocyclique conserve une fonction NH nécessaire à l'interaction avec le résidu méthionine de la région charnière. Initialement créés comme inhibiteurs de Tyro3, on peut constater que ces composés sont plus actifs sur Axl ou Mer.

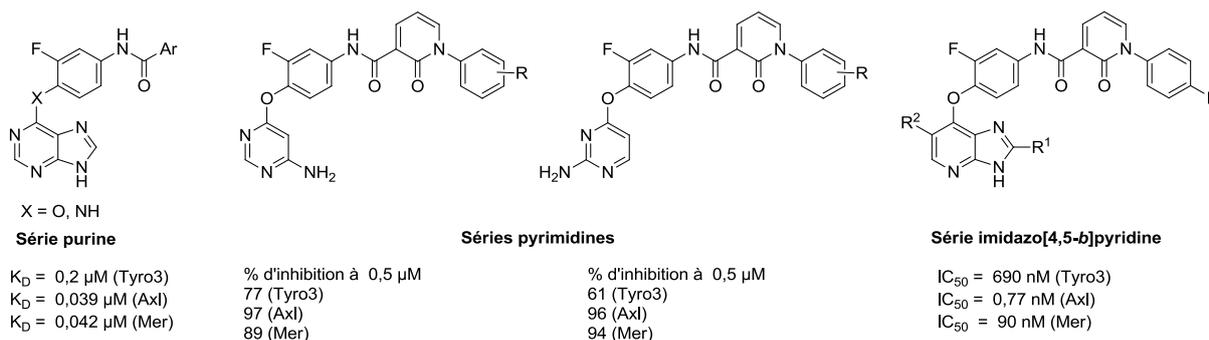


Figure 27 : Structures d'inhibiteurs de TAM synthétisés au laboratoire

4. Objectifs du projet de thèse

Dans la continuité des travaux réalisés au laboratoire, l'objectif de ce premier volet de ma thèse est d'améliorer l'activité des inhibiteurs de type imidazo[4,5-*b*]pyridine en travaillant sur des substitutions en position 2 et 5 (Figure 28).

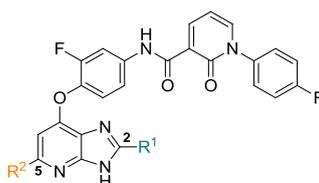


Figure 28 : Structures des nouveaux inhibiteurs de TAM

Dans un premier temps, l'identification des nouveaux candidats par modélisation moléculaire sera discutée. La voie de synthèse des molécules sélectionnées sera ensuite présentée. Enfin, l'activité biologique des composés sera évaluée par des tests enzymatiques.

II. Conception de nouveaux inhibiteurs par modélisation moléculaire

1. Introduction

Afin de déterminer les molécules à synthétiser, j'ai réalisé un travail de criblage virtuel sur les structures cristallines de Tyro, Axl et Mer (codes PDB 3QUP, 5U6B et 3BRB respectivement), avec l'aide du Dr. Liliane Mouawad. Il s'agit pour Tyro3 de la protéine murine, et pour Axl et Mer de protéines humaines. Nous avons choisi de travailler sur les conformations actives (DFG-*in*), bien que la structure soit dérivée du BMS-777607, un inhibiteur de *c*-Met de type II, pour les raisons suivantes :

- Lorsque le criblage a été réalisé en 2017, seule la structure d'Axl en conformation DFG-*out* avait été cristallisée, les structures de Tyro3 et de Mer correspondant toutes à une

conformation active. En 2019, la structure de Mer en conformation inactive a été élucidée.²⁸

- Les protéines utilisées dans les tests enzymatiques sont achetées sous une forme phosphorylée qui sous-entend une conformation active.^{52,53}

Les expériences d'amarrage moléculaires sont réalisées avec le logiciel Glide de la suite Maestro.

Nous avons choisi de ne modifier que les substituants de l'imidazopyridine, qui réalise les interactions les plus importantes avec le site actif de la protéine. Les précédents travaux de modélisation⁵ et les tests *in vitro* ont permis d'établir des critères de sélection des différents groupements fonctionnels :

- le groupement R¹ doit être de petite taille. Nous avons donc choisi un atome d'hydrogène ou un atome d'halogène.
- il est possible d'établir une nouvelle liaison hydrogène entre le groupement R² et le site actif. Nous avons donc testé des chaînes possédant une fonction éther-oxyde, amine secondaire, ester, amide et sulfonamide, toutes terminées par une fonction hydroxyle ou une amine primaire.

Enfin, nous avons voulu voir si l'installation d'une amine comme groupement R³ permettait de réaliser une nouvelle liaison hydrogène avec la protéine (Figure 29).

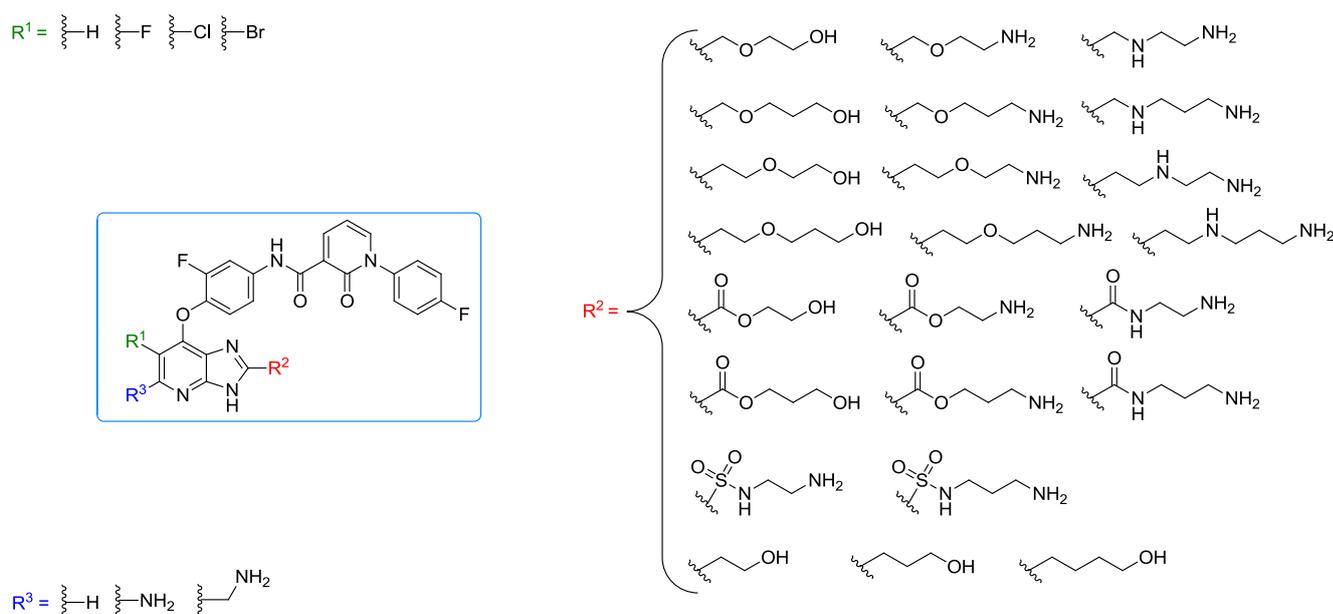


Figure 29 : Série de molécules évaluées en modélisation

Dans le même temps, nous avons criblé une autre série de molécules possédant les mêmes groupements R¹, R² et R³, mais sans la chaîne latérale à motif pyridone (Figure 30). Nous avons ainsi voulu voir si cette partie de la molécule était indispensable à l'activité. Le cas échéant, la synthèse serait simplifiée.

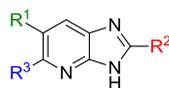


Figure 30 : Série de molécules sans chaîne latérale

2. Résultats

L'étude du positionnement des meilleures molécules déterminées par le logiciel ont révélé trois orientations possibles.

Dans la première, le noyau imidazopyridine établit deux liaisons hydrogène avec une méthionine. Le groupement R^2 est dirigé vers l'entrée de la cavité et peut établir une liaison hydrogène avec un résidu du site actif, comme un acide aspartique par exemple. Le groupement R^3 étant un NH_2 , il peut ainsi établir une quatrième liaison hydrogène avec une proline. Nous appellerons cette orientation canonique (Figure 31).

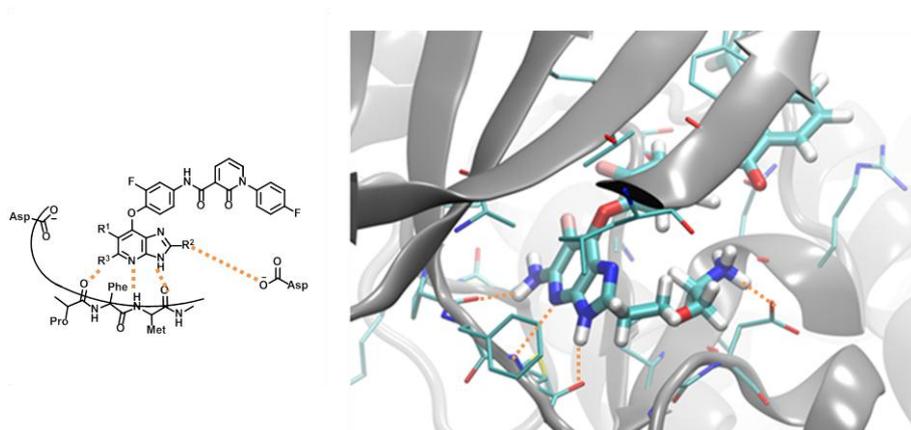


Figure 31 : Orientation canonique

Dans la seconde orientation, le noyau imidazopyridine n'établit qu'une seule liaison hydrogène avec le site actif, entre une méthionine et l'azote de la pyridine. Le groupement R^2 est dirigé vers le fond de la cavité, permettant l'établissement de plusieurs liaisons hydrogène, notamment avec un acide aspartique. Le groupement R^3 est un atome d'hydrogène. Nous appellerons cette orientation non-canonique (Figure 32).

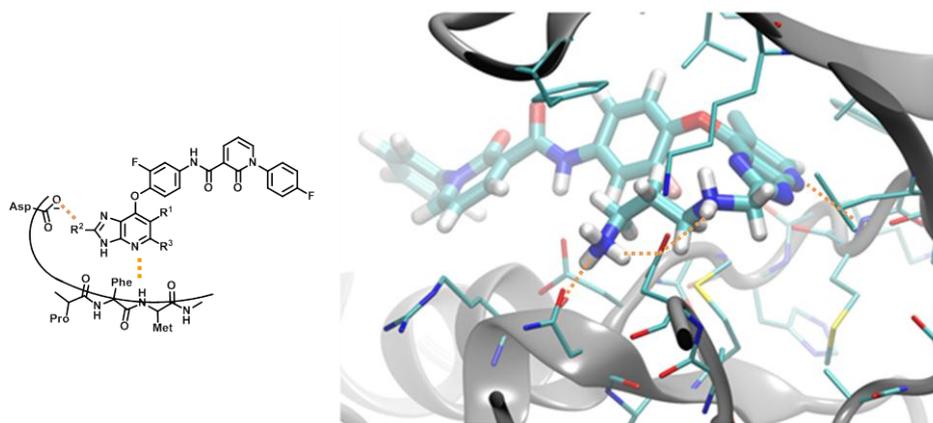


Figure 32 : Orientation non-canonique

Enfin dans la dernière orientation, la molécule se place en travers de la cavité, permettant l'établissement de deux liaisons hydrogène : entre l'amine en position 5 et une proline, et entre l'azote N-3 et un acide aspartique au fond de la cavité. Nous appellerons cette orientation twistée (Figure 33).

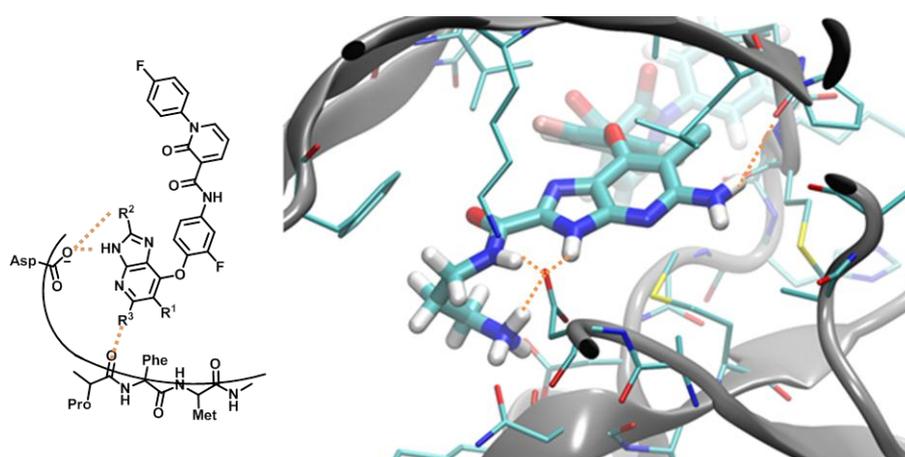


Figure 33 : Orientation twistée

De toutes les orientations, c'est celle canonique qui nous semble pouvoir conduire à la meilleure activité, puisqu'elle permet d'établir quatre interactions entre les résidus de la cavité et la molécule. L'orientation non-canonique ne présente plus qu'une interaction entre l'imidazopyridine et le site actif, mais le groupement R² se trouve alors à proximité d'au moins deux résidus avec lesquels il peut établir des liaisons hydrogène. L'orientation qui nous semble la moins convaincante est celle twistée, pour laquelle les molécules sont généralement repliées sur elles-mêmes et où un même résidu est souvent engagé dans plusieurs liaisons hydrogène.

3. Détermination des molécules à synthétiser

A partir de ces résultats, nous avons déterminé les molécules à synthétiser. Nous avons choisi préférentiellement des molécules adoptant une orientation canonique ou non canonique et figurant parmi les dix premières du classement sur au moins deux protéines. Nous avons aussi inclus quelques molécules montrant une orientation twistée, afin d'essayer d'établir des corrélations entre la modélisation moléculaire et les tests *in vitro*. Enfin, nous avons choisi la molécule sans chaîne latérale à motif pyridone **17** bien classée sur Mer, pour étudier l'influence de la chaîne sur l'activité.

Deux séries se dégagent (Figure 34) : les molécules **11** à **13** possèdent une fonction amine en position 5 de l'imidazopyridine. Les groupements R² en position 2 sont variés, avec des esters, des amides, des éthers-oxydes et des chaînes aliphatiques. Le groupement R¹ semble être indifféremment un hydrogène ou un halogène. La deuxième série rassemble les molécules **14** à **16** avec en position 5 un atome d'hydrogène. Le groupement R² contient une fonction amine secondaire ou un sulfonamide.

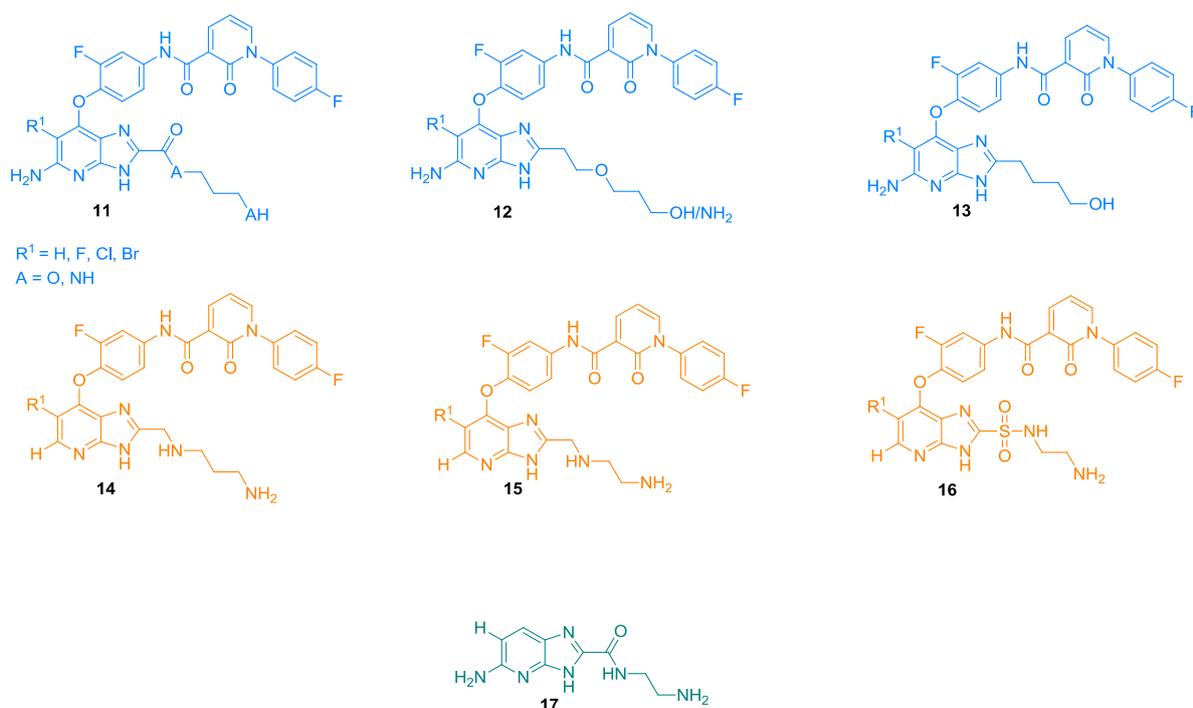


Figure 34 : Molécules cibles

Dans un premier temps, nous nous sommes attachés à la synthèse du composé **17**, afin de déterminer si la chaîne pyridone était indispensable à l'activité.

III. Synthèse des nouveaux inhibiteurs potentiels

1. Molécules issues de la modélisation

Nous avons choisi de synthétiser en premier lieu la molécule **17** qui ne porte pas la chaîne latérale à motif pyridone, afin d'évaluer l'importance de celle-ci pour l'activité inhibitrice.

Nous avons envisagé une voie de synthèse à partir de la 2,6-dichloro-3-nitropyridine **18** commerciale (Schéma 3).

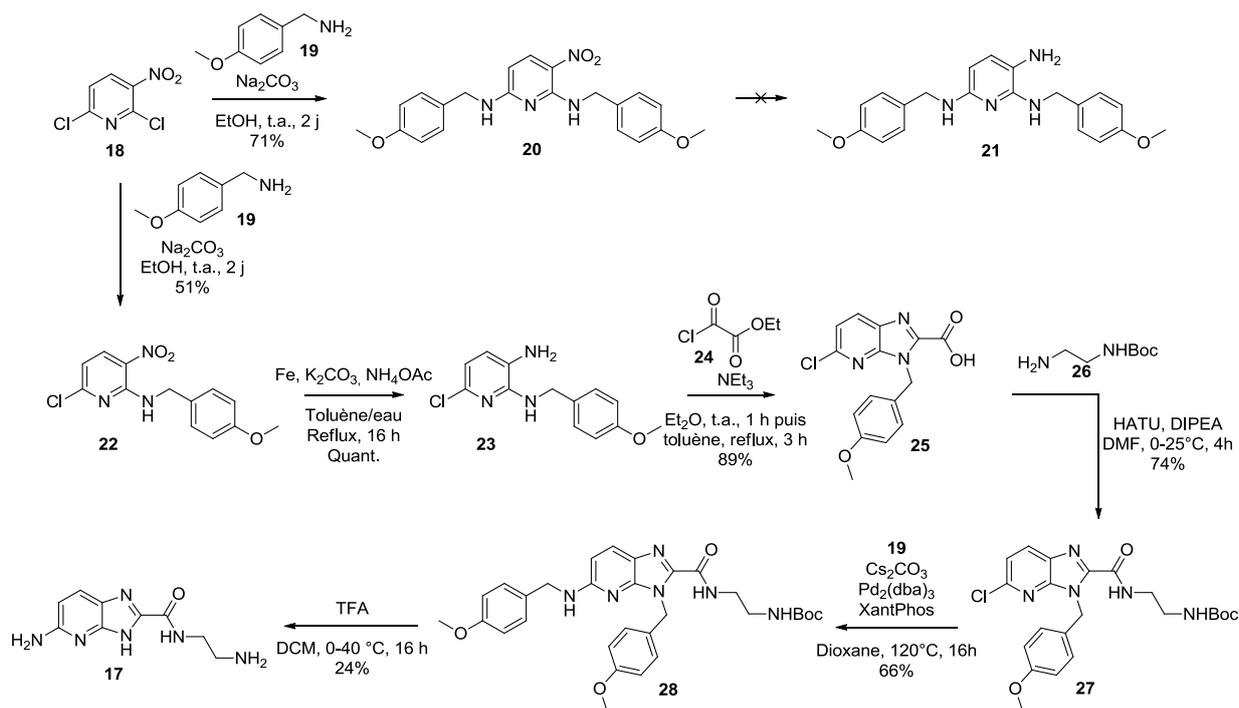
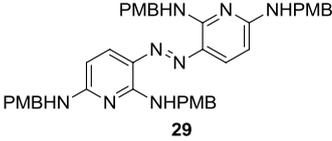
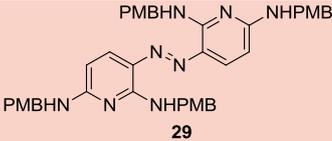


Schéma 3 : Synthèse du composé **17**

L'insertion simultanée de deux fonctions amines protégées par un *p*-méthoxybenzyle a été réalisée par substitution nucléophile aromatique avec la *p*-méthoxybenzylamine avec un rendement de 71%.⁵⁴ L'étape suivante de réduction de la fonction nitro en amine a en revanche échoué. Les essais de réduction par le fer ou l'étain en milieu acide ou basique ont laissé le composé de départ intact (Tableau 1, entrées 1 à 3). Les essais d'hydrogénation catalysée par le palladium sur charbon ou le zinc en milieu basique ont montré par LC-MS la formation du composé azopyridine **29** (entrées 4 et 5).

Tableau 1 : Réduction du composé **20**

Entrée	Conditions	Produit obtenu
1	HCl, Fe EtOH, reflux, 2 j	20
2	SnCl ₂ (H ₂ O) ₂ EtOH, reflux, 4 j	20
3	NH ₄ OAc, K ₂ CO ₃ , Fe Eau/toluène (1 : 1), reflux, 15 h	20
4	H ₂ , Pd/C EtOH, t.a., 4 j	 <p>29</p>
5	NH ₄ OAc, NH ₄ Cl, Zn MeOH/THF (1 : 1), t.a., 5 h	 <p>29</p>

Nous avons donc repris la réaction entre la dichloropyridine **18** et la *p*-méthoxybenzylamine en s'arrêtant à la mono substitution en position 2, avec un rendement de 51%. Le groupement nitro est alors réduit par le fer en milieu basique quantitativement. Le cycle imidazo[4,5-*b*]pyridine est formé par condensation avec le chlorure d'oxalate d'éthyle, menant à la formation du composé hydrolysé **25** avec un rendement de 89%. Le couplage avec le *N*-Boc-éthylènediamine permet d'obtenir l'amide avec un rendement de 74%. La seconde amine protégée est introduite en position 5 par un couplage de Buchwald-Hartwig, avec un rendement de 66%. Enfin, tous les groupements protecteurs sont clivés en milieu acide. Toutefois l'isolement de la molécule finale a été délicate, car celle-ci est partiellement soluble dans l'eau, et se complexe au sulfate de magnésium et de sodium utilisé pour sécher la phase organique. Finalement, le composé a été isolé par simple évaporation du milieu réactionnel et purification par HPLC préparative en phase inverse. Le composé **17** est ainsi obtenu sous forme de sel d'acide trifluoroacétique avec un rendement de 24%.

La molécule **30** issue de la déprotection partielle de **28** a également été isolée (Figure 35).

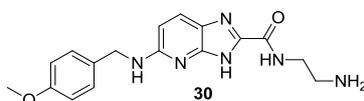


Figure 35 : Composé **30**

2. Librairie de sulfonamides

Nous avons aussi voulu synthétiser une série de molécules comportant un lien sulfonamide. En effet, l'équipe d'Orfi a développé en 2018 une série d'inhibiteurs d'Axl en remplaçant une fonction urée par un groupement sulfonamide⁴⁵ (Figure 36).

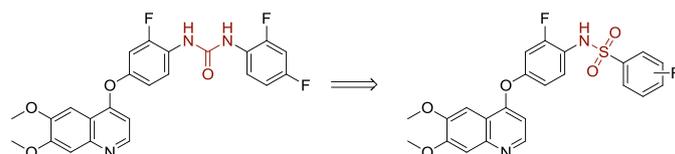


Figure 36 : Librerie de sulfonamides inhibant Axl

De la même manière, nous voulions voir si le remplacement de l'amide-pyridone de nos inhibiteurs par un sulfonamide pouvait améliorer l'activité de ceux-ci (Figure 37).

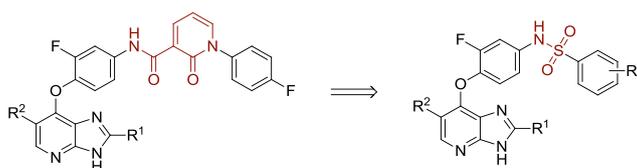


Figure 37 : Librerie de sulfonamides

La voie de synthèse est présentée ci-dessous (Schéma 4). L'aminophénol protégé **32** réagit en milieu basique avec la 2-amino-4-chloro-3-nitropyridine commerciale **31** par substitution nucléophile aromatique. Le groupement nitro est réduit par hydrogénation catalysée par le palladium sur charbon de manière quantitative. Le cycle imidazo[4,5-*b*]pyridine est formé par condensation avec l'orthoformate de méthyle en milieu acide avec un rendement de 65%. Les différents sulfonamides sont obtenus par couplage de l'amine libre avec les chlorures de sulfonyle correspondants.

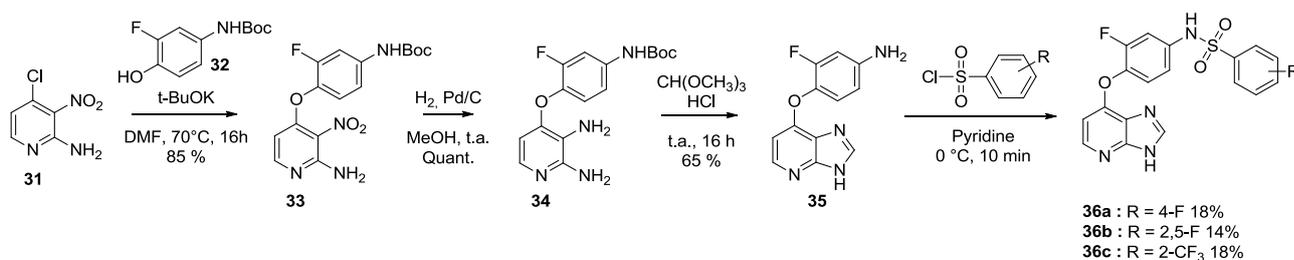


Schéma 4 : Voie de synthèse des sulfonamides

Les rendements de la dernière étape sont modestes, car la réaction du chlorure de sulfonyle a également été observée sur l'azote N3 de l'imidazopyridine, conduisant à la formation d'un composé disulfonamide avec des rendements de 10 à 30 %.

Deux autres séries avec un groupement isopropyle en 2, et un brome en 6 ont été synthétisées par Chloé Breton-Patient dans le cadre de son stage de master 2 (Figure 38).

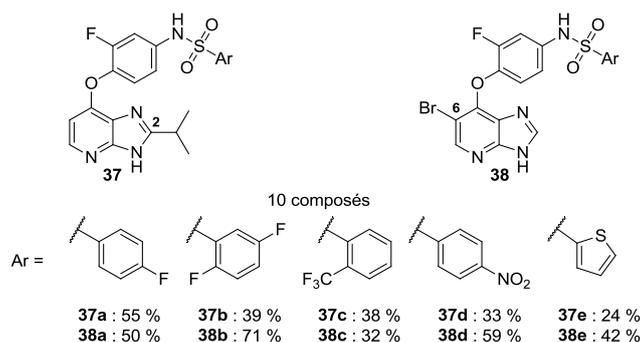


Figure 38 : Deux autres séries de sulfonamides synthétisés

IV. Evaluation biologique des nouveaux composés

1. Dosage de l'ADP par fluorométrie

a. Principe du test

J'ai pu tester l'activité des composés synthétisés grâce au kit *ADP Fluorometric Assay* vendu par Abcam, qui avait déjà été utilisé au laboratoire pour l'évaluation biologique sur la famille TAM.⁵ Le principe général du test est décrit ci-dessous.

Dans le cas sans inhibiteur, la protéine est tout d'abord incubée avec ses substrats naturels (l'ATP et un peptide Glu-Ala-Tyr) dans le tampon fourni dans le kit (étape **I**). Les résidus tyrosines du peptide sont phosphorylés par la protéine. L'ATP est transformée en ADP au cours de ce processus (Figure 39).

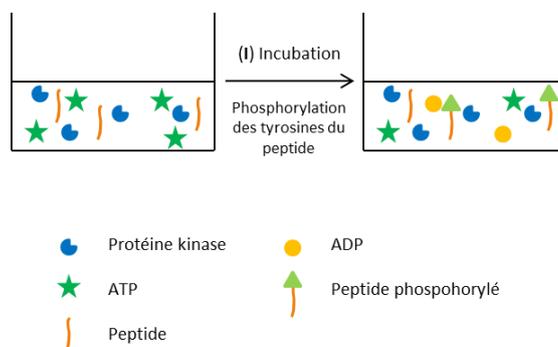


Figure 39 : Protéine incubée avec l'ATP et le peptide poly Glu-Ala-Tyr

Un mélange de réactifs fourni par le kit et appelé « Reaction Mix » est ensuite ajouté (Figure 40). Ce mélange contient une enzyme capable de transformer l'ADP en ATP et en pyruvate fluorescent. La fluorescence est donc proportionnelle à la quantité d'ADP dans le milieu, c'est-à-dire à la quantité d'ATP transformée initialement par la protéine kinase.

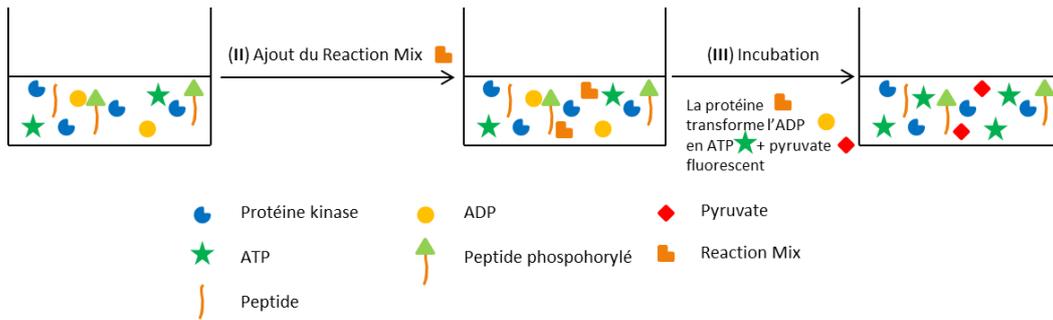


Figure 40 : Ajout du Reaction Mix

La lecture de fluorescence est faite après 30 minutes d'incubation. Grâce à une courbe d'étalonnage établie à l'aide de puits standards où la concentration en ADP est connue, on peut connaître la concentration en ADP dans chaque puits. La valeur d'IC₅₀ de chaque composé est déterminée en représentant la concentration d'ADP en fonction de la concentration en inhibiteur.

Lorsqu'une petite molécule est incubée avec la protéine et ses substrats naturels, elle peut se fixer à la protéine et ainsi bloquer partiellement la phosphorylation des résidus tyrosine (Figure 41). La production d'ADP sera donc moins élevée, et l'intensité de fluorescence lue sera diminuée.

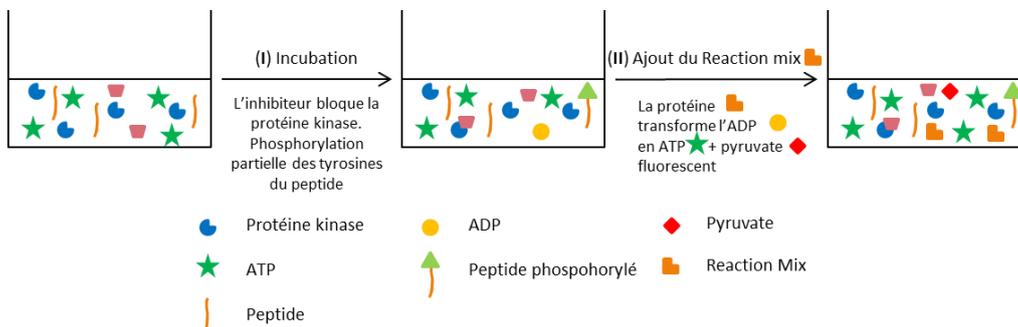


Figure 41 : Cas avec un inhibiteur

b. Mise au point des conditions

Pour utiliser le kit dans les meilleures conditions, il a tout d'abord fallu déterminer la concentration optimale en protéine. En effet, lors d'une réaction enzymatique, la vitesse de réaction est tout d'abord quasi-linéaire, puis atteint un plateau (Figure 42). Si l'on se place au niveau de ce plateau, l'effet d'un inhibiteur ne sera pas observable, car l'enzyme est saturée. Il faut donc se placer dans la zone de linéarité, appelée état quasi-stationnaire.

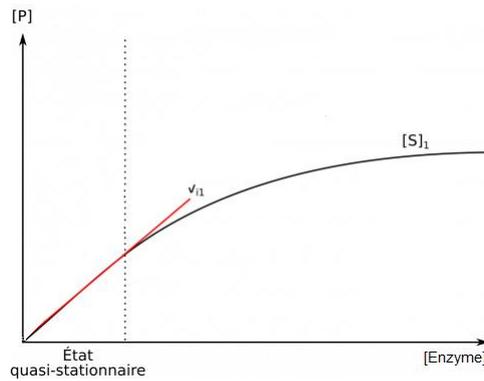


Figure 42 : Cinétique enzymatique

Dans un premier temps, nous avons repris les conditions précédemment mises au point au laboratoire pour déterminer la concentration d'enzyme nécessaire. Différentes concentrations de protéines sont incubées 10 minutes avec 30 μL de solution tampon contenant l'ATP (5.2 μM) et le peptide poly (Ala-Glu-Tyr) (7 $\mu\text{g}/\text{mL}$), et 10 μL d'eau. Après l'ajout du « Reaction Mix » et 30 minutes d'incubation, la fluorescence est mesurée. La concentration en ADP dans chaque puits est extrapolée grâce à une courbe d'étalonnage, puis exprimée en fonction de la concentration en enzyme (Figure 43). On peut voir que le plateau est rapidement atteint, sans toutefois correspondre à la quantité initiale en ATP pour Axl et Mer (0,156 nmol/puits). Cela indique que la protéine est peu active, car elle ne convertit pas la totalité de l'ATP fournie.

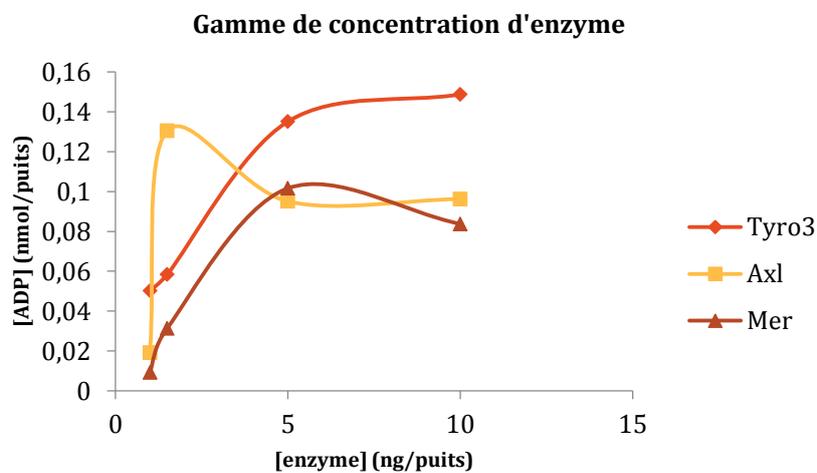


Figure 43 : Gamme de concentration d'enzyme

Pour la suite, nous avons choisi de travailler à des concentrations de 5 ng/puits pour Tyro3 et Mer, et de 1,5 ng/puits pour Axl. Ces concentrations correspondent à la fin de l'état quasi-stationnaire.

Dans un second temps, il a fallu déterminer le temps d'incubation optimal de la protéine avec ses substrats (l'ATP et le peptide), pour se placer de la même façon dans l'état quasi-stationnaire. Cette étude cinétique a d'abord été réalisée sur Mer.

Nous avons malheureusement fait face à de nombreuses difficultés lors de cette étude. La quantité d'ADP produite ne varie presque pas en fonction du temps, et n'atteint pas la quantité initiale d'ATP (0.156 nmol/puits) (Figure 44). Cela reflète là aussi le manque d'activité de la protéine.

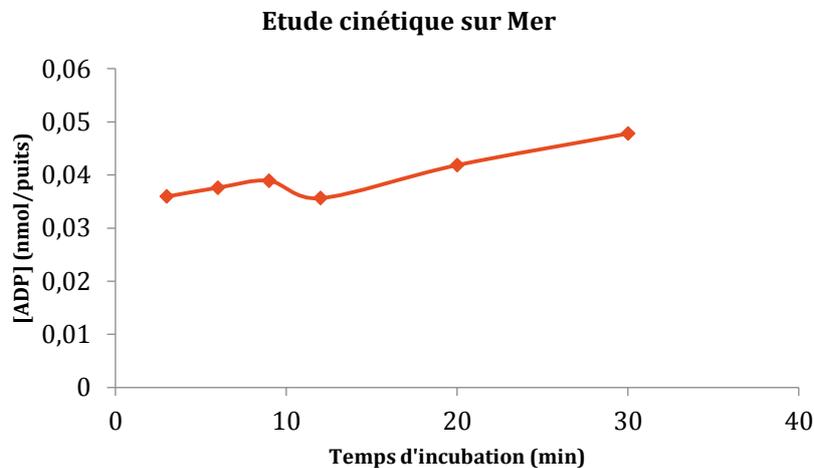


Figure 44 : Etude cinétique sur Mer

De plus, le bruit de fond de fluorescence est toujours très élevé. De ce fait, la différence de fluorescence entre le puits de référence sans ADP et les puits contenant l'ADP n'est pas significative, et les résultats peu fiables. Nous avons donc décidé de changer de kit et d'utiliser un test de dosage de l'ADP par luminescence spécialement conçu pour les protéines kinases appelé ADP-Glo, commercialisé par Promega.

2. Dosage de l'ADP par bioluminescence

a. Principe du test

Le principe du test est similaire à celui du dosage par fluorométrie (Figure 45) et est décrit ci-dessous.

Dans le cas sans inhibiteur, la protéine est incubée pendant 2 heures avec ses substrats naturels (l'ATP et un peptide poly Glu-Ala-Tyr) (étape **(I)**). Cette étape conduit à la phosphorylation du peptide et à la transformation de l'ATP en ADP. Un premier réactif, appelé « ADP-Glo Reagent » est ensuite ajouté (étape **(II)**). Il permet de retirer l'ATP restant dans le milieu. Après 40 minutes d'incubation, un second réactif, appelé « Kinase Detection Reagent » est ajouté à son tour. Ce mélange permet dans un premier temps de transformer l'ADP en ATP (étape **(III)**). Dans un second temps, la luciférase contenue dans le mélange va utiliser l'ATP pour catalyser une réaction de bioluminescence, qui va émettre un photon (étape **(IV)**).

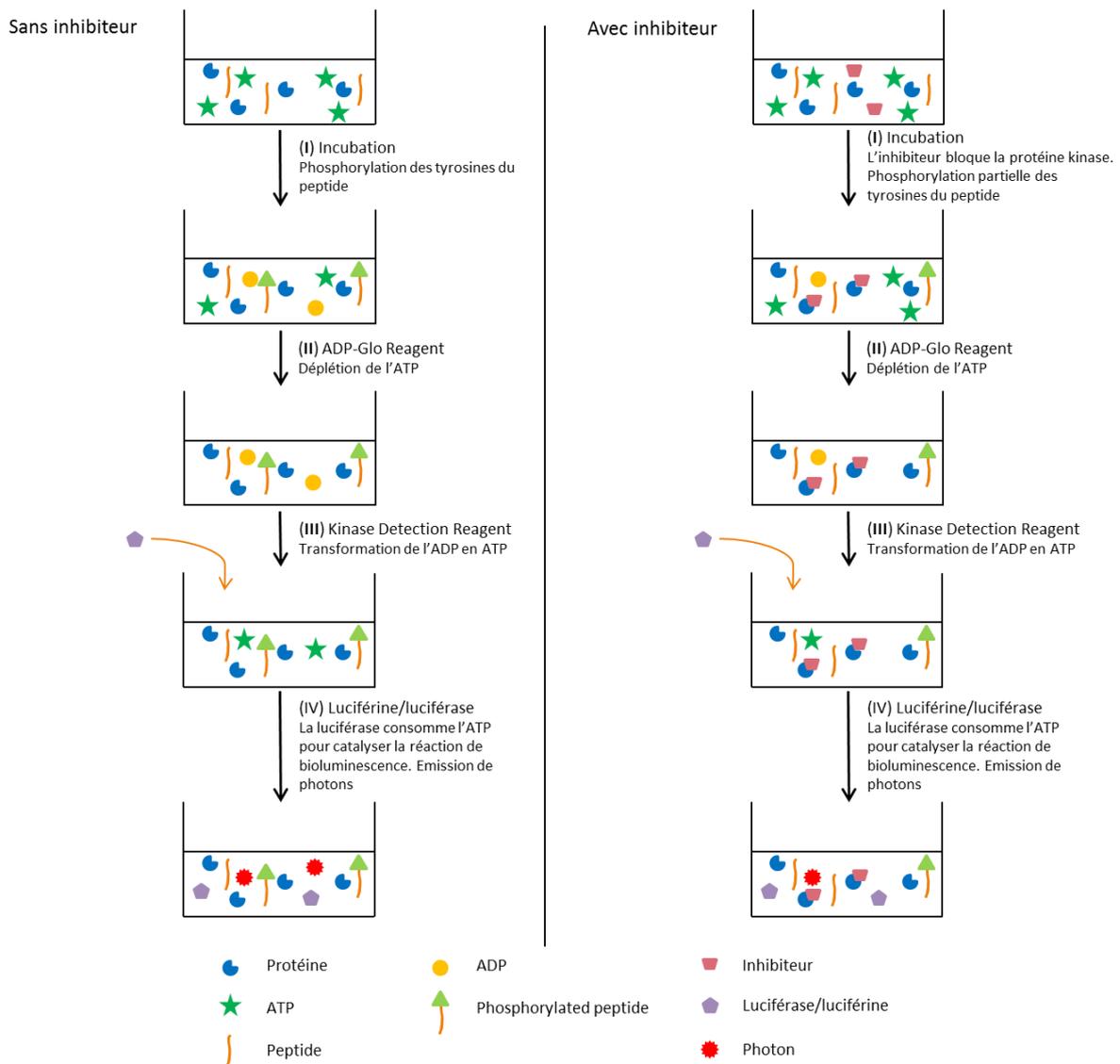


Figure 45 : Principe du dosage de l'ADP par luminescence

La quantité de photons émise, et donc l'intensité de luminescence lue, sera proportionnelle à la quantité d'ADP retransformée, c'est-à-dire à la quantité d'ATP initialement transformée par la protéine.

En présence d'un inhibiteur, la petite molécule va se fixer sur la protéine, limitant la phosphorylation du peptide. La quantité d'ADP produite va donc diminuer, et l'intensité de luminescence lue également.

Grâce à une droite d'étalonnage, on pourra déterminer la quantité d'ADP dans chaque puits. L'IC₅₀ de chaque molécule sera déterminée en exprimant la concentration en ADP en fonction de la concentration en inhibiteur.

b. Mise au point des conditions

i. *Tyro3*

Comme pour le kit de dosage par fluorométrie, il a tout d'abord fallu déterminer les conditions optimales. Nous avons commencé en étudiant l'influence des concentrations en substrats (ATP et peptide poly Glu-Ala-Tyr) sur Tyro3 à 5 ng/puits, après 10 minutes d'incubation (Figure 46). Dans un souci d'économies, seuls deux points expérimentaux ont été réalisés, afin de vérifier la tendance.

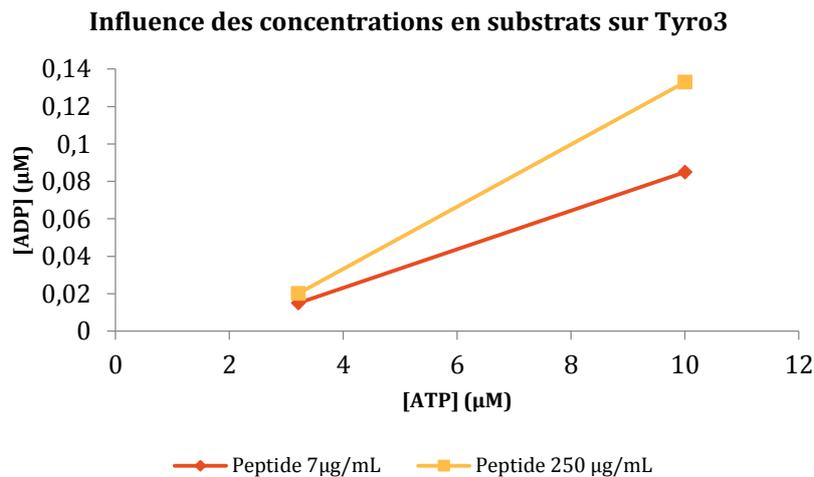


Figure 46 : Influence des concentrations en substrats sur Tyro3

On peut voir que la production d'ADP augmente lorsqu'on augmente la quantité d'ATP initiale, ce qui est la tendance normale. De plus, plus la concentration en peptide est élevée, plus la concentration en ADP est grande, ce qui là aussi est cohérent. En revanche, le pourcentage de conversion d'ATP en ADP est très faible (entre 0,5 et 1,3%), ce qui traduit une très faible activité de la protéine.

Dans un deuxième temps, nous avons donc essayé d'augmenter la quantité d'enzyme, en gardant la concentration en peptide à 250 µg/mL, en augmentant la concentration en ATP à 20 µM, et en incubant pendant 2 heures (Figure 47).

Influence de la quantité d'enzyme

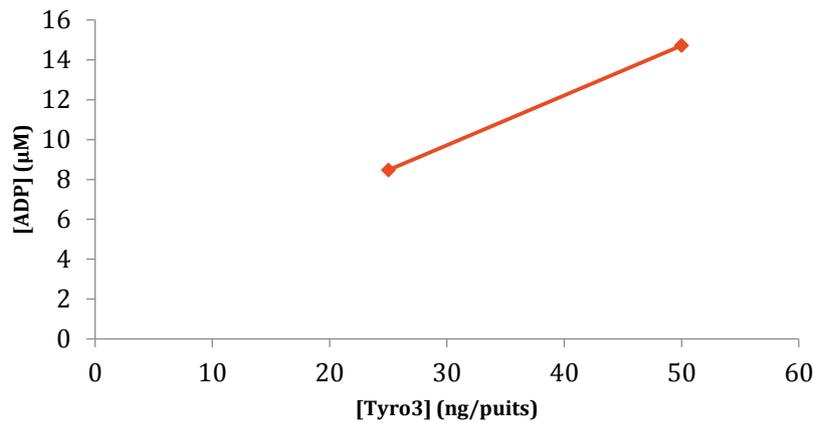


Figure 47 : Influence de la quantité d'enzyme

On peut voir que la concentration en ADP double lorsqu'on double la quantité d'enzyme. Cette fois-ci, le taux de conversion de l'ATP en ADP est bien meilleur, entre 42 et 74%.

Forts de ces résultats, nous avons décidé de réaliser un test d'inhibition avec un inhibiteur de Tyro3 commercial, le BMS-777607, afin d'affiner les conditions. L'inhibiteur à différentes concentrations est incubé avec Tyro3 à 50 ng/puits, le peptide à 250 µg/mL, différentes concentrations d'ATP (10 ou 20 µM) pendant 10 minutes ou 2 heures. Le pourcentage de conversion de l'ATP est ensuite exprimé en fonction de la concentration en inhibiteur afin de calculer l'IC₅₀ (Figure 48).

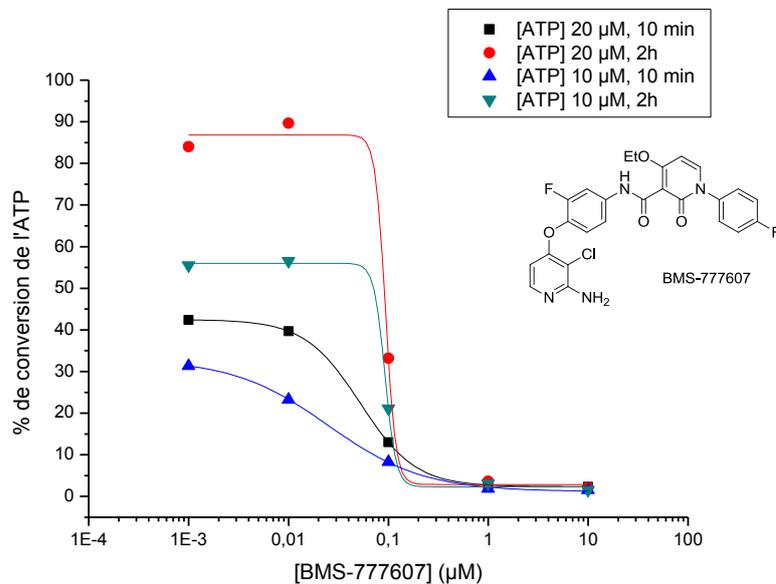


Figure 48 : Inhibition de Tyro3 par BMS-777607, influence de la concentration en ATP et du temps d'incubation

Les valeurs d'IC₅₀ obtenues varient entre 34 et 96 nM. En effet, plus la concentration en ATP et plus le temps d'incubation sont grands, plus il y a de compétition entre l'ATP et l'inhibiteur, et donc plus l'IC₅₀ augmente.

Les conditions optimales de fonctionnement de la protéine semblent donc être avec 50 ng/puits d'enzyme, 20 μM d'ATP, 250 μg/mL de peptide et 2 heures d'incubation, car le taux de conversion de l'ATP en ADP est de 90%. Toutefois, pour des raisons d'économies, nous avons souhaité diminuer les quantités de protéine utilisées. Pour savoir quelle était la quantité minimale d'enzyme permettant de garder un taux de conversion et un rapport signal/bruit correct, nous avons fait un nouveau test d'inhibition de Tyro3 avec le BMS-777607, en diminuant la concentration en protéine, avec une concentration en ATP de 10 μM (Figure 49).

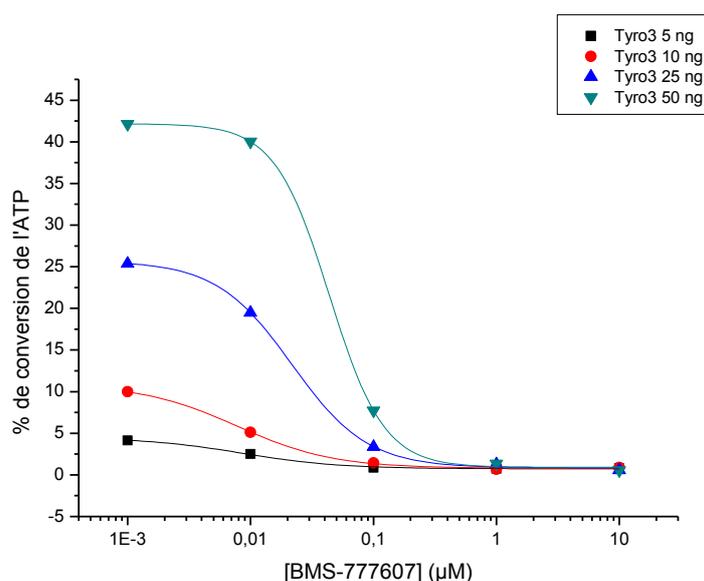


Figure 49 : Inhibition de Tyro3 par BMS-777607, influence de la quantité de protéine

Lorsqu'on diminue la quantité d'enzyme à 5 ng/puits, le taux de conversion de l'ATP en ADP chute à 5%. Toutefois, le rapport signal/bruit reste très bon (S/B = 16), avec un bruit de fond très faible. Nous avons donc choisi de mesurer l'activité de nos composés en utilisant ces conditions.

ii. Axl et Mer

Les conditions d'utilisation du kit avec les protéines Mer et Axl ont été optimisées de la même façon que pour Tyro3. Toutefois, les deux protéines sont apparues beaucoup moins actives. Les quantités d'enzyme et d'ATP ont donc été augmentées afin d'avoir une luminescence et un rapport signal/bruit convenable. Pour Axl, nous avons choisi de travailler avec 50 ng/puits d'enzyme, 50 μM d'ATP, 250 μg/mL de peptide poly Glu-Ala-Tyr 1:1:1 avec 2 heures d'incubation.

Avec Mer, les conditions choisies sont 25 ng/puits d'enzyme, 20 μM d'ATP, 250 μg/mL de peptide et 2 heures d'incubation.

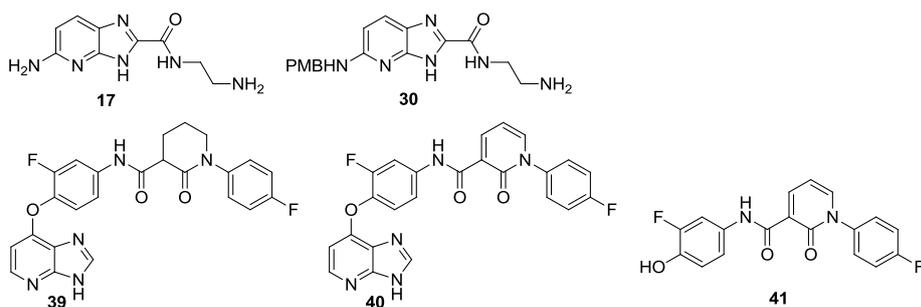
Ce travail d'optimisation doit être réalisé pour chaque nouveau lot d'enzyme, afin de vérifier l'activité de la protéine et trouver les conditions pour avoir un taux de conversion d'ATP similaire entre les différents lots.

c. Mesure de l'activité des inhibiteurs potentiels synthétisés

Les molécules synthétisées comme inhibiteurs potentiels inclus dans le test sont les suivantes (Figure 50) :

- Le composé **17** issu de la modélisation et son analogue partiellement déprotégé **30**
- La molécule **39** analogue de l'inhibiteur **40** précédemment synthétisé au laboratoire, avec la pyridone réduite. Ce composé a été obtenu lors de l'exploration de la voie de synthèse des inhibiteurs photo-clivables (cf. Chapitre II)
- La chaîne pyridone **41**
- La librairie de sulfonamides

Issues de la modélisation



Sulfonamides

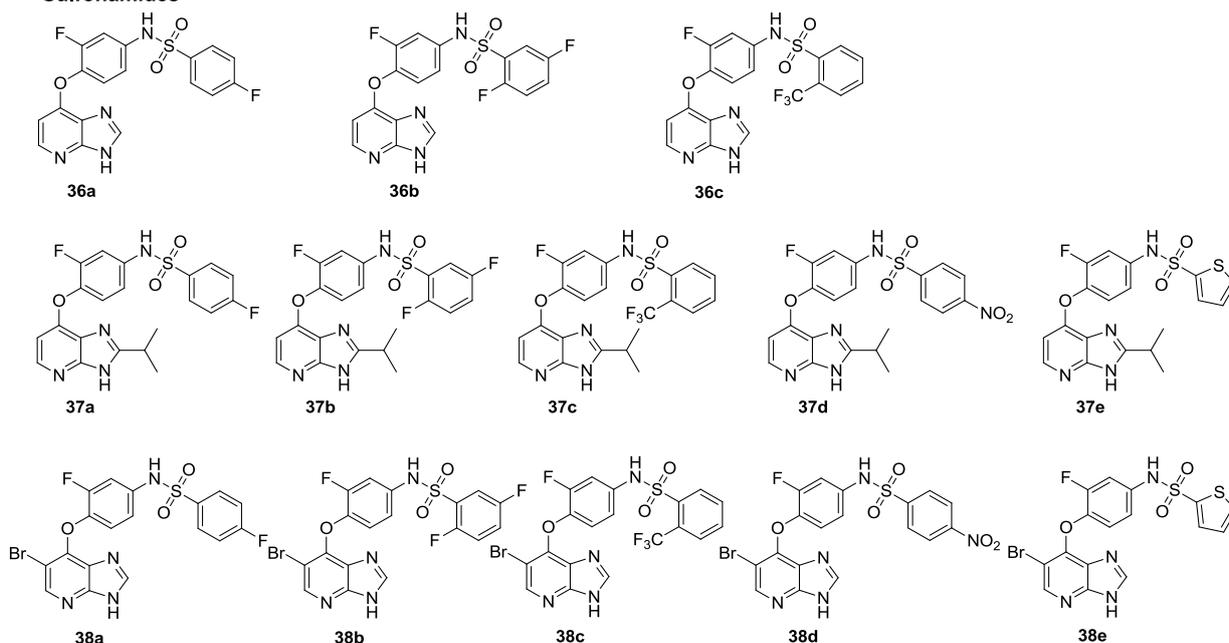


Figure 50 : Molécules testées comme inhibiteurs potentiels de la famille TAM

i. Molécules issues de la modélisation

Les IC₅₀ des molécules issues de la modélisation, ainsi que l'analogue du composé **40** avec la pyridone réduite sont présentées dans le tableau ci-dessous (Tableau 2). La molécule **17** sans la chaîne pyridone ne montre aucune activité quelle que soit la protéine. La molécule **30** n'a été testée que sur Tyro3, pour laquelle son IC₅₀ est de 81 µM. Le composé **39** montre des activités légèrement supérieures à son analogue **40**, montrant que la réduction de la pyridone n'a que peu d'effet sur les interactions entre le composé et le site actif des enzymes. La chaîne latérale à motif pyridone **41** a également été testée sur Tyro3, mais ne montre aucune activité.

Tableau 2 : IC₅₀ des molécules issues de la modélisation

Composé	Tyro3	Axl	Mer
BMS-777607	21 nM	31 nM	329 nM
17	> 100 µM	> 100 µM	> 100 µM
30	81 µM	n.t.	n.t.
39	6,8 µM	10 µM	5,0 µM
40	1,5 µM	2,0 µM	3,1 µM
41	> 100 µM	n.t.	n.t.

n.t. : non testée

Les résultats sur les composés **17** et **41** montrent d'une part que la chaîne à motif pyridone est indispensable à l'activité, mais que sa présence seule n'est pas suffisante, le cœur hétérocyclique devant servir d'ancrage à la molécule pour qu'elle soit active.

ii. Sulfonamides

L'intégralité des sulfonamides a été testée sur Tyro3, mais malheureusement aucun composé n'a montré d'activité inhibitrice. Pour des raisons économiques, seules les molécules **36a**, **37a** et **38a** ont été testées sur Axl et Mer. Là encore, aucune des trois n'a montré d'activité.

La perte d'activité observée peut être liée au raccourcissement de la longueur de la chaîne latérale. En effet, nous avons remplacé l'amide-pyridone en sulfonamide, ce qui réduit la longueur de chaîne de 3 atomes (Figure 51). Le fluorophényle n'est donc peut-être plus en mesure d'établir une interaction avec le site actif de la protéine.

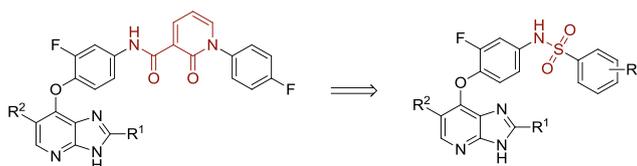


Figure 51 : Remplacement de l'amide-pyridone par un sulfonamide

Conclusions et perspectives

Depuis le début du projet en 2011, plusieurs librairies d'inhibiteurs de la famille TAM ont été synthétisées à partir de la structure du BMS-777607, un inhibiteur de *c*-Met.^{5,50,51} Dans la continuité de ces résultats, j'ai poursuivi les travaux sur le noyau imidazo[4,5-*b*]pyridine en étudiant par modélisation moléculaire les substitutions du noyau hétérocyclique par des groupements donneurs de liaisons hydrogènes (Figure 52).

Le composé **17** sans chaîne latérale ainsi identifié a été synthétisé en 6 étapes à partir de la 2,6-dichloro-3-nitropyridine, avec un rendement global de 5 %. Malheureusement, ce composé n'a montré aucune activité sur les protéines de la famille TAM, nous indiquant le caractère indispensable de la chaîne latérale à motif pyridone pour l'activité.

Une librairie de 13 molécules où la partie aryl-pyridone a été substituée par un aryl-sulfonamide a également été synthétisée. Aucun de ces composés n'a montré d'activité sur la famille TAM. Toutefois, la longueur de la chaîne latérale a été réduite de 3 atomes, ce qui peut expliquer la perte d'activité. Il serait intéressant de synthétiser un composé où la fonction amide est remplacée par un sulfonamide tout en gardant la même longueur de chaîne, à titre de comparaison.

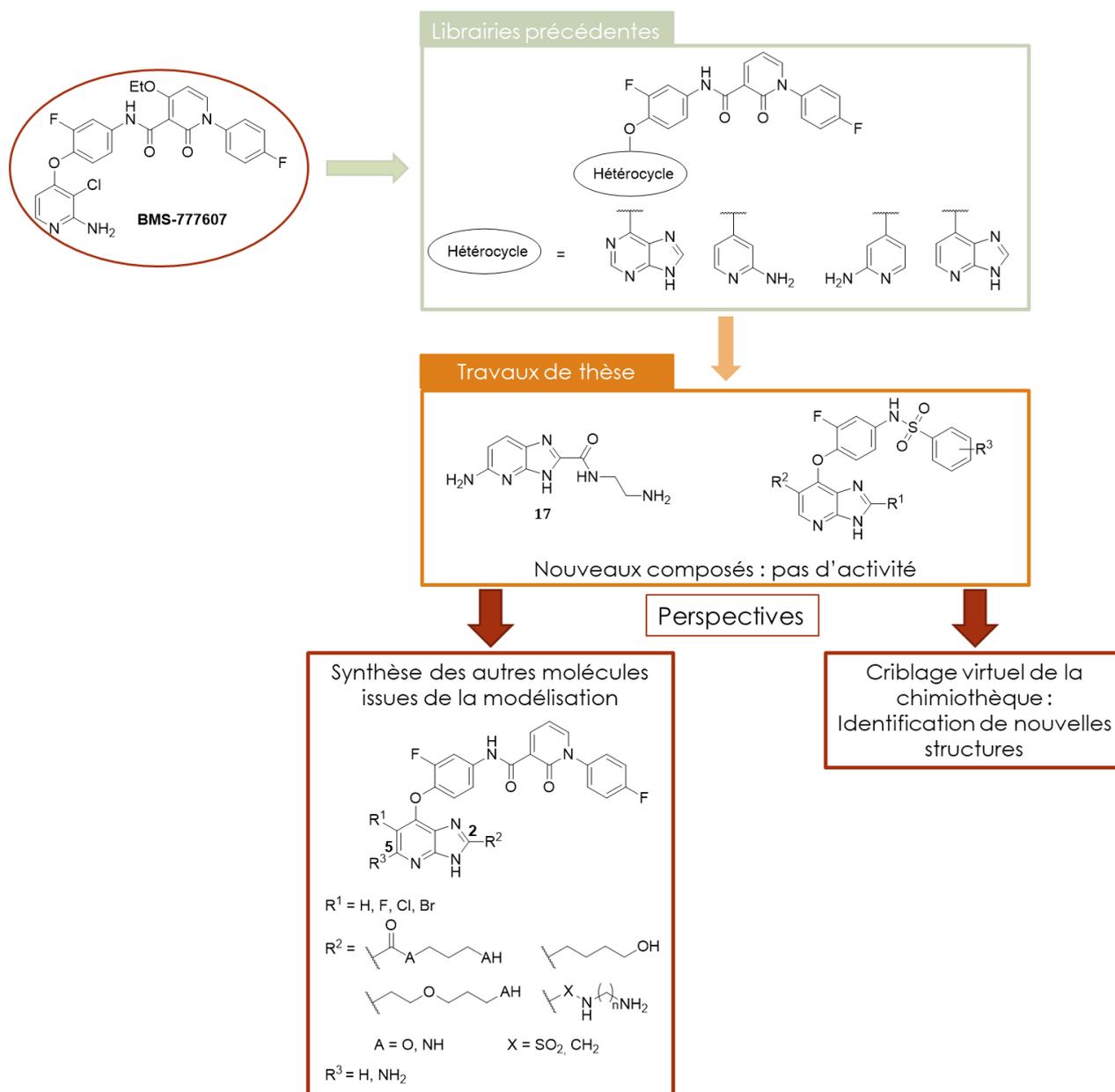


Figure 52 : Résumé et perspectives du projet d'inhibiteurs de la famille TAM

Deux autres séries de composés ont été identifiées par modélisation moléculaire (Figure 52) :

- Des molécules portant en position 5 de l'imidazopyridine une fonction amine primaire, et en position 2 une chaîne avec à son extrémité un groupement donneur de liaison hydrogène.
- Des molécules portant en position 2 une chaîne avec une amine secondaire ou un sulfonamide terminée par une amine primaire, et un hydrogène en position 5.

Pour la suite du projet, il serait intéressant de synthétiser les autres composés issus de la modélisation, afin de voir si l'introduction en position 2 d'une chaîne avec un donneur de liaison hydrogène et en position 5 d'une amine primaire améliore l'activité sur la famille TAM.

Dans le même temps, il serait intéressant de réaliser un criblage virtuel de la chimiothèque de l'Institut Curie et de la chimiothèque nationale afin de découvrir de nouvelles structures originales, et les optimiser pour gagner en efficacité et sélectivité.

Une autre alternative serait de rechercher non pas des inhibiteurs compétitifs de l'ATP, mais de développer des molécules bloquant l'interaction entre les domaines extracellulaires immunoglobulines et le ligand Gas-6. L'inhibition de cette interaction protéine-protéine unique à la famille TAM permettrait d'avoir une très grande sélectivité envers cette famille. Un criblage virtuel de la chimiothèque nationale est actuellement réalisé au laboratoire par le Dr. Liliane Mouawad et Kilolo Bunzeki sur la structure cristalline du complexe Axl/Gas-6.

Chapitre II : Inhibiteurs photo-contrôlables de la famille TAM

I. Introduction

1. Photopharmacologie

La recherche thérapeutique s'attache de plus en plus à limiter les effets secondaires des traitements administrés aux patients. En oncologie particulièrement, l'heure est aux chimiothérapies ciblées, c'est-à-dire l'administration de molécules visant spécifiquement des récepteurs propres aux cellules tumorales. Une autre stratégie permettant de limiter les effets secondaires est de contrôler la libération des agents thérapeutiques uniquement à l'endroit qu'on désire traiter grâce à des stimuli externes. Le principe de la photopharmacologie est ainsi de contrôler l'activité d'une molécule thérapeutique grâce à la lumière.⁵⁵⁻⁵⁸ Deux grandes classes de molécules photo-contrôlables existent : les molécules portant un groupement photo-clivable, et les photo-commutateurs.

a. Molécules photo-clivables

Le principe des molécules photo-clivables est d'accrocher à une molécule bioactive, sur une position essentielle à l'interaction avec le récepteur, un groupement qui peut être clivé par l'action de la lumière (Figure 53).^{55,59} Lorsque le groupement est présent, l'interaction entre la molécule et son récepteur est bloquée et la molécule est inactive. Quand le groupement photo-labile (GPL) est clivé par irradiation lumineuse, l'activité de la molécule est restaurée. Cette activation est irréversible.

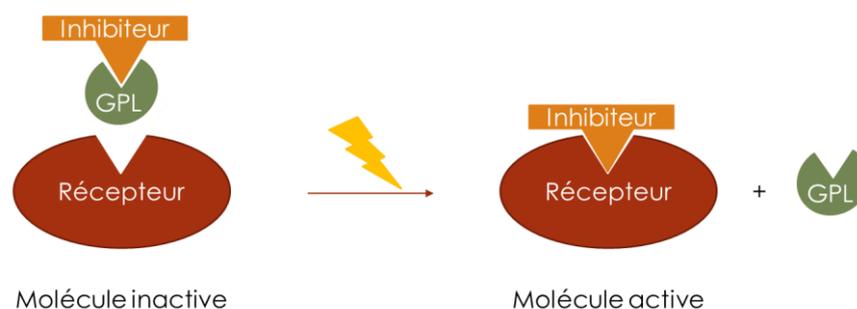


Figure 53 : Principe des molécules photo-clivables

L'utilisation des groupements photo-labiles sur des composés biologiquement actifs a été décrite pour la première fois à la fin des années 1970. En 1977, Engels et Schlaeger décrivent la synthèse d'un phosphate de l'adénosine (cAMP) photo-contrôlable.⁶⁰ L'année suivante, Hoffman synthétise de l'ATP protégé par un groupement photo-labile, et l'utilise pour étudier la pompe à sodium-potassium.⁶¹ Ce dernier utilise le terme « cagé » pour désigner un composé bioactif qui a été inactivé par un groupement photo-labile (appelé aussi « cage »). Ce terme prête toutefois à confusion, faisant penser que le composé est littéralement situé dans une cage qui est ensuite ouverte par la lumière. Dans la suite de ce manuscrit, nous utiliserons plutôt le terme de « molécule photo-clivable ».

La stratégie des groupements photo-clivables a largement été appliquée dans le domaine biologique, avec toutes sortes d'objets portant des groupement photo-labiles : des molécules

thérapeutiques, des acides aminés, des protéines, des nucléosides, des neurotransmetteurs, etc.⁵⁹

Par exemple, l'équipe de Gautier en 2011 a montré qu'il était possible de réguler l'activité de la protéine kinase MEK1 en protégeant un résidu lysine du site actif par un groupement photolabile (Figure 54).⁶² Ces modifications ont pour but d'étudier par la suite les cinétiques et les cascades de régulation contrôlées par MEK1.

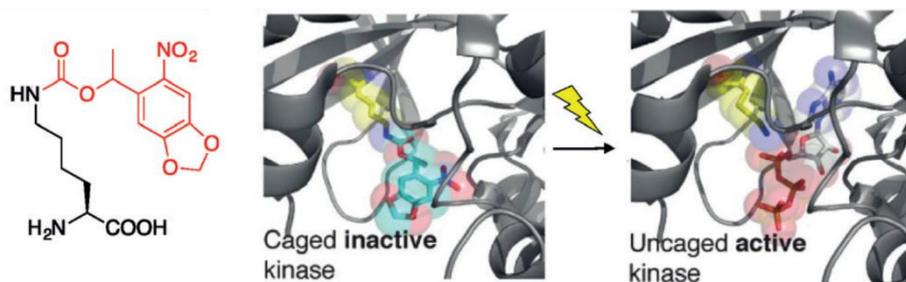


Figure 54 : Régulation de MEK1 par la stratégie des groupements photo-labiles

Les groupements photo-labiles doivent idéalement correspondre au cahier des charges suivant^{55,59} :

- Facile à introduire sur la molécule bioactive
- Grande solubilité et stabilité dans les milieux biologiques
- Coefficient d'extinction molaire ϵ et rendement quantique de clivage Φ élevés pour un photo-clivage efficace
- Réaction de photo-clivage rapide
- Utilisation de lumière à des longueurs d'ondes compatibles avec le milieu biologique
- Sous-produit de clivage non toxique

Le groupement photo-labile qui répond à tous ces critères n'existe pas. Le nombre de groupements photo-clivables est aujourd'hui pléthorique⁶³, et nous allons nous focaliser sur les deux familles les plus représentées : les dérivés d'*o*-nitrobenzyle, et les coumarin-4-méthyles.

Les dérivés d'*o*-nitrobenzyle font partie des premiers groupements photo-labiles décrits dans les années 1970.⁶³ L'addition d'un groupement électroattracteur en position *para* (par rapport au groupement partant) et d'un groupement électrodonneur en position *meta* permet de décaler le maximum d'absorption vers le rouge (Figure 55).⁶⁴

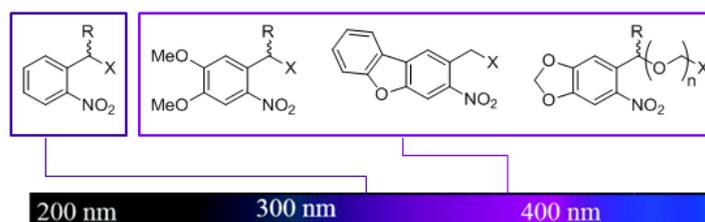


Figure 55 : Exemples de groupements photo-labiles dérivés d'*o*-nitrobenzyle et leur longueur d'onde de clivage

Le mécanisme de clivage est le suivant (Schéma 5) : l'irradiation permet le passage à un intermédiaire de type *aci*-nitro. Celui-ci se cyclise en un 1,3-dihydrobenzen[*c*]isoxazol-1-ol. La réouverture du cycle en nitrosobenzyle puis l'hydrolyse de l'hémiacétal permet la libération du composé bioactif.⁶³

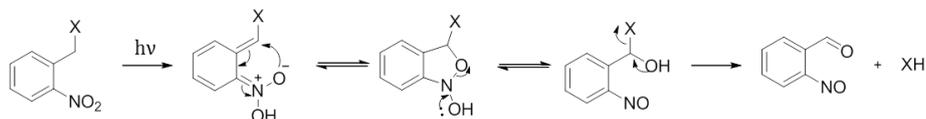


Schéma 5 : Mécanisme de clivage des *o*-nitrobenzyles

Les dérivés de coumarine font également partie des groupements photo-labiles les plus décrits dans la littérature.⁶³ Comme pour les *o*-nitrobenzyles, la substitution du noyau coumarine modifie les propriétés photophysiques du groupement photo-labile.⁶⁴ L'ajout de groupements électrodonneurs en position 7 de la coumarine permet un décalage de l'absorbance vers le rouge (Figure 56). Une conjugaison étendue en position 3 avec des groupements benzothiazoles attachés par un lien vinylique permet également d'augmenter le maximum d'absorbance.⁶⁵ La méthylation du benzothiazole permet d'augmenter la solubilité des composés dans l'eau, qui est souvent un facteur limitant l'utilisation de ce type de groupements photo-labiles.⁶⁶

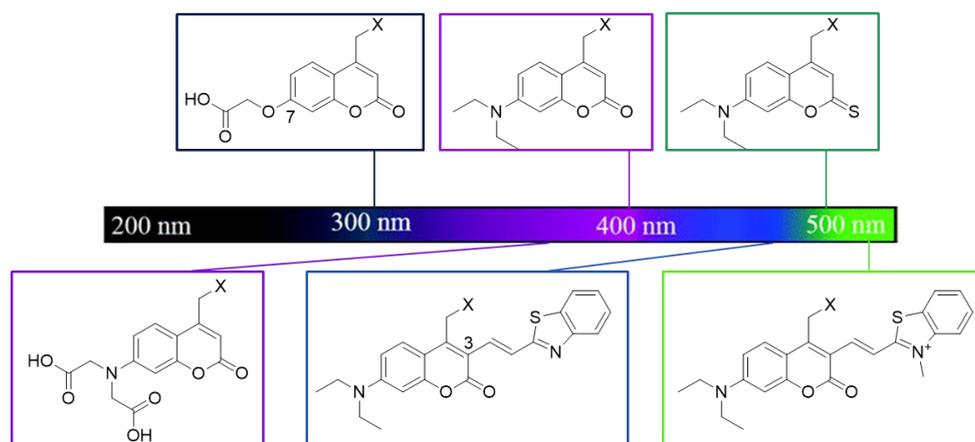


Figure 56 : Exemples de groupements photo-labiles dérivés de coumarine et leur longueur d'onde de clivage

Le mécanisme de clivage proposé consiste en la transition dans un état excité singulet, puis la rupture hétérolytique de la liaison C-X (Schéma 6). Le cation coumarinylméthyle peut ensuite réagir avec un nucléophile ou le solvant pour générer une coumarine stable.⁶³

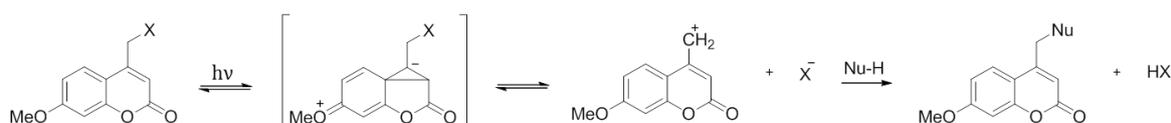


Schéma 6 : Mécanisme de clivage des coumarines

Il faut toutefois noter que la photolyse de la liaison C-X est possible avec des groupements partants de type phosphates, sulfonates et acides carboxyliques, avec des pK_a faibles. Les alcools, amines, phénols et thiols résistent souvent au photoclivage. Dans ce cas, une liaison de type carbonate est souvent utilisée afin d'améliorer les cinétiques de clivage.⁶³ La coupure hétérolytique de la liaison C-O puis la décarboxylation permettent la libération du composé bioactif (Schéma 7).

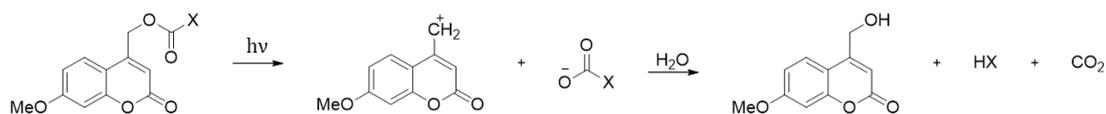


Schéma 7 : Mécanisme de clivage des coumarines carbonates

Afin de contourner les problèmes liés à l'irradiation par une lumière UV, une stratégie de photoclivage à deux photons est également envisageable en utilisant une lumière d'une longueur d'onde environ deux fois supérieure (Figure 57).^{55,67}

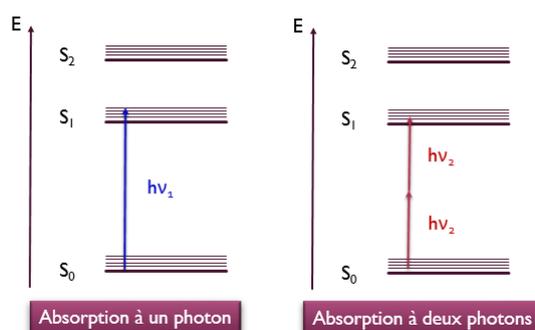


Figure 57 : Absorption à deux photons

L'emploi de rayons infrarouges permet également une meilleure pénétration dans les tissus et une résolution en 3 dimensions. Toutefois, cette stratégie nécessite l'utilisation de lasers puissants. De plus, tous les groupements photo-labiles ne sont pas adaptés à un clivage à deux photons. Pour exprimer l'efficacité d'un photo-clivage à deux photons, on utilise la section efficace associée au clivage à deux photons δ_u , résultant du produit de la section efficace d'absorption à deux photons δ_a par le rendement quantique de la réaction photochimique Φ_u .^{55,67} Certains auteurs considèrent qu'un $\delta_u > 0,1$ GM est nécessaire pour des applications biologiques, toutefois des exemples de clivage à deux photons avec un δ_u inférieur à cette valeur ont été publiés.⁵⁵

$$\delta_u = \delta_a \Phi_u$$

Les dérivés de nitrobenzyle et les coumarines peuvent être utilisés pour des photo-clivages à deux photons. En 2016, Fichte montre qu'un contrôle de l'hybridation de brins d'ADN est possible grâce au photo-clivage à deux photons.⁶⁸ Les brins d'ADN sont modifiés par deux bases portant des groupements photo-labiles différents : le [7-(diéthylamino)coumarin-4-yl]méthyle (DEACM) et le p-dialkylaminonitrobiphényle (ANBP). L'hybridation des brins d'ADN est

impossible en présence des groupements photo-labiles. Sous irradiation à deux photons, un suivi par fluorescence permet de montrer le rapprochement des brins d'ADN dans des cellules neuronales d'hippocampe.

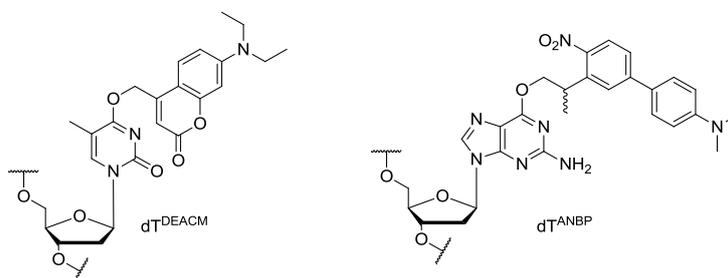


Figure 58 : Bases modifiées pour photo-clivage à deux photons

b. Photo-commutateurs

Les photo-commutateurs, ou photoswitches, sont une classe de composés dont la structure change sous l'effet de la lumière. Les propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques des molécules bioactives dépendant fortement de leur structure, il est donc possible de réguler leur action thérapeutique grâce à la lumière (Figure 59). Contrairement aux molécules photo-clivables, le contrôle des photo-commutateurs est réversible dans la majorité des cas.^{55,56}

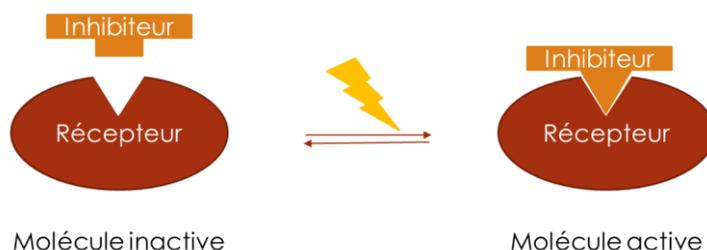
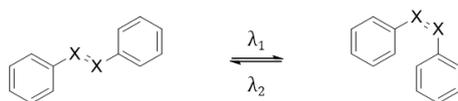


Figure 59 : Principe des photo-commutateurs

Il existe différents systèmes photochromiques utilisables comme photo-commutateurs. Les plus fréquents sont les azobenzènes et les stilbènes (Schéma 8). Dans le cas des azobenzènes, l'isomérisation *trans* vers *cis* est réalisée dans le spectre UV, vers 350 nm. L'isomérisation inverse *cis* vers *trans* se fait dans le visible ou thermiquement. Toutefois, les azobenzènes sont sensibles à la réduction en milieu physiologique (notamment par le glutathion), ce qui peut limiter leur utilisation *in vivo*.^{55,69} Les stilbènes quant à eux sont isomérisés par les rayons UV (environ 300 nm pour la transition *trans* vers *cis* et 280 nm pour la transition *cis* vers *trans*). L'utilisation de lumière à ces longueurs d'onde peut limiter les applications biologiques.⁵⁵ De plus, l'isomérisation n'est pas toujours totale, et la durée de l'état photo-stationnaire variable. Toutefois, la substitution des phényles par des groupements électro-donneurs ou attracteurs permet de moduler ces paramètres.⁵⁵



X = N : azobenzène
X = CH : stilbène

Schéma 8 : Azobenzènes et stilbènes

Les diaryléthènes peuvent également être utilisés comme photo-commutateurs. La réaction d'ouverture ou fermeture de cycle photoinduite permet de modifier la flexibilité du composé (Schéma 9). La photocyclisation est réalisée par irradiation dans l'UV, tandis que l'opération inverse est faite dans le visible. La faible solubilité en milieu aqueux des diaryléthènes limite cependant leurs applications biologiques.^{55,69}

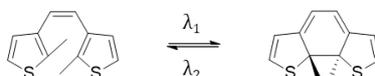


Schéma 9 : Diaryléthènes

Parmi les autres systèmes photochromiques utilisés comme photo-commutateur, on peut citer les spiropyranes, les fulgides/fulgimides et les hémithioindigos (Schéma 10).^{55,69}

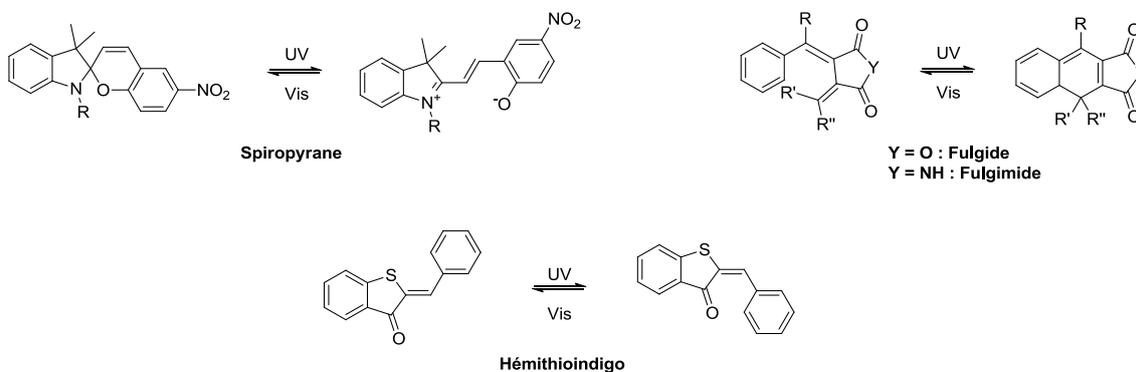


Schéma 10 : Autres classes de photo-commutateurs

Les molécules photo-commutables ont ainsi été utilisées dans de nombreuses applications biologiques.^{57,58} En 2015, Hoppmann présente un composé photo-commutable permettant de contrôler l'activité de la calmoduline CaM, transporteuse d'ions calcium (Figure 60).⁷⁰ L'incorporation d'un azobenzène capable par la suite de réagir avec un résidu cystéine forme un pont entre deux parties de la protéine. L'isomérisation de l'azobenzène permet ensuite de modifier la conformation de la protéine.

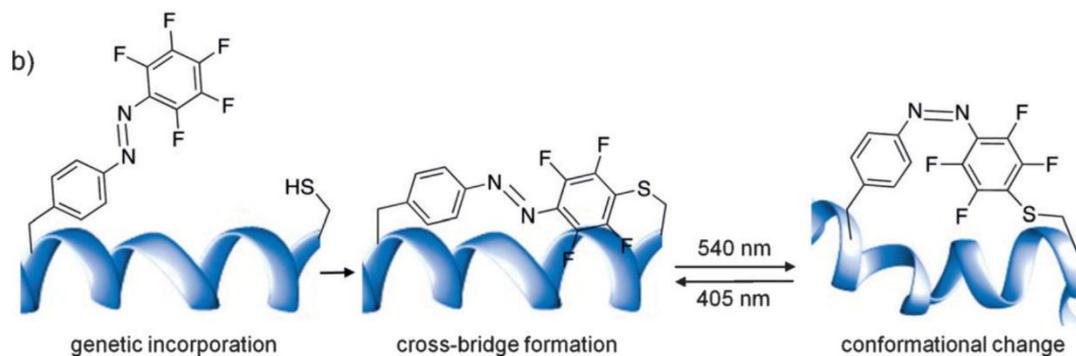


Figure 60 : Contrôle de CaM par la formation d'un pont azo

2. Inhibiteurs de protéines kinases photo-contrôlables

a. Inhibiteurs de kinases photo-clivables

Parmi tous les exemples de molécules bioactives appliquant le principe des groupements photo-labiles, les inhibiteurs de protéine kinase sont encore sous-représentés. Pourtant, comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, le manque de sélectivité des inhibiteurs de kinase constitue l'inconvénient majeur de cette solution thérapeutique. L'utilisation de la photopharmacologie dans le domaine des kinases permettrait de contrôler spatialement et temporellement la distribution de la molécule active et ainsi de limiter les effets secondaires pour le patient.⁷¹

Le premier exemple d'inhibiteur de kinase portant un groupement photo-labile est rapporté par l'équipe de Lawrence en 1998 (Figure 61).⁷² La protéine kinase cAMP-dépendante (PKA) est inhibée par un peptide appelé PKI avec une constante d'inhibition K_i de 420 nM. Lorsque le résidu arginine responsable de l'activité inhibitrice du peptide est protégé par le groupement 6-nitroveratryloxycarbonyl (NVOC), l'activité du peptide est presque 50 fois inférieure, avec un K_i de 20 μ M.

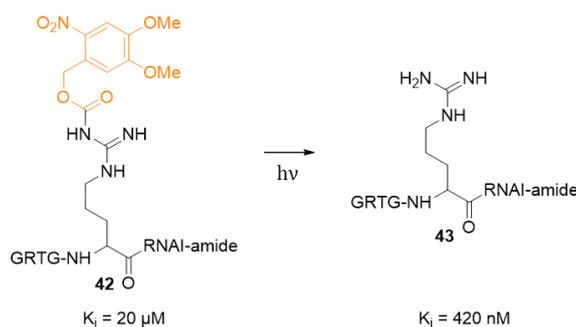


Figure 61 : Premier inhibiteur photo-clivable de PKA

En 2012, Morckel décrit un inhibiteur de la protéine kinase Rho portant le groupement photo-labile 6-nitropiperonyloxyméthyle (NPOM) (Figure 62).⁷³ Bien qu'aucune IC_{50} ou K_i ne soit mesuré, l'activité de la molécule semble dépendre de la lumière. En effet sans irradiation, le composé **44** ne montre aucune inhibition sur Rho, tandis que lorsqu'il est irradié, l'activité catalytique de la kinase est inhibée à 91 %. La régulation de l'activité de Rho par le composé **44**

sous irradiation a ensuite été testée sur des embryons de poisson-zèbre, montrant qu'un contrôle de la morphologie intestinale est possible via irradiation.

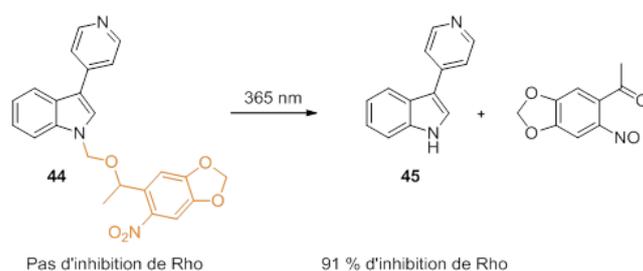


Figure 62 : Inhibiteur photo-clivable de la protéine kinase Rho

En 2015, Bliman développe une version cagée d'un inhibiteur de la protéine kinase RET, responsable du développement du système nerveux (Figure 63).⁷⁴ En protégeant l'amine primaire de l'inhibiteur **47** par le groupement NVOC, l' IC_{50} *in vitro* passe de 72 nM à 6,8 μ M. Lorsque que le composé **46** est irradié, l'activité est partiellement restaurée (IC_{50} = 590 nM). Cette restauration partielle de l'activité est due à la photo-déprotection incomplète du composé **46** au bout de 15 minutes, durée d'irradiation choisie pour limiter l'impact des UV sur le système biologique.

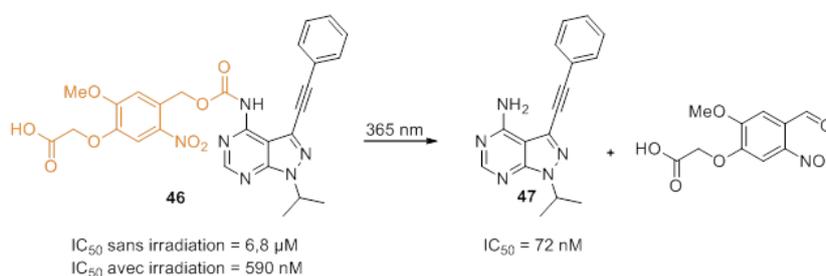


Figure 63 : Inhibiteur photo-clivable de RET

En 2015, l'équipe de Peifer publie les versions cagées de deux inhibiteurs de kinase autorisés par la FDA : l'imatinib⁷⁵ (Gleevec) et le vemurafenib⁷⁶ (Zelboraf). Dans le cas de l'imatinib, sa protection par un groupement 4,5-diméthoxy-2-nitrobenzyle (DMNB) engendre une perte d'activité très importante (IC_{50} = 5,8 μ M contre 59 nM pour l'imatinib) (Figure 64). La photo-déprotection est totale en 12 minutes en solution à 1 mM dans le DMSO et permet une restauration complète de l'activité de l'inhibiteur (IC_{50} après irradiation = 89 nM). En revanche lorsque le (7-méthoxycoumarin-4-yl)méthyle (7-MCM) est utilisé comme groupement photo-labile, la photo-déprotection est très lente (10 % de clivage en 12 minutes).

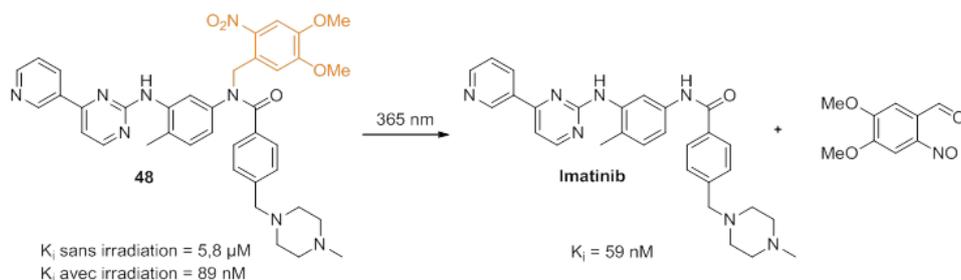


Figure 64 : Imatinib portant le groupement photo-labile DMNB

Dans le cas du vemurafenib, la déprotection du DMNB est presque totale en moins d'une minute (solutions à 10 μ M dans le tampon PBS + 10% de DMSO). L'activité du composé **49** est 44 fois inférieure à celle de l'inhibiteur non protégé (K_d = 440 nM pour **49**, K_d = 10,2 nM pour le vemurafenib) (Figure 65). La restauration de l'activité de l'inhibiteur cagé a également été montrée en milieu cellulaire.

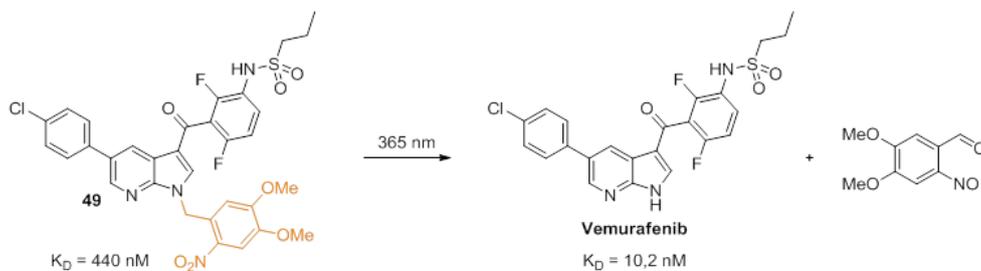


Figure 65 : Vemurafenib photo-clivable

L'année suivante, la même équipe publie un inhibiteur de la kinase VEGFR-2 portant également le groupement photo-labile DMNB (Figure 66).⁷⁷ Des tests de prolifération sur des cellules PC3 VEGFR-2-dépendantes montrent l'inactivation du composé **51** lorsqu'il est protégé par le DMNB, et la restauration de l'activité lorsque **50** est irradié.

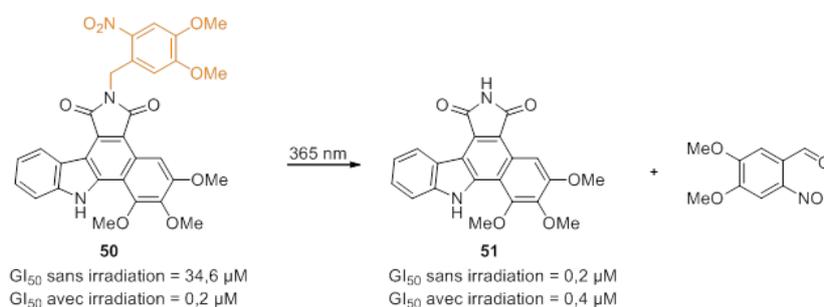


Figure 66 : Inhibiteur de VEGFR-2 photo-clivable

En 2019, l'équipe de Sormus présente un inhibiteur de la kinase cAMP-dépendante PKA portant comme groupement photo-labile le nitrodibenzofurane (NDBF) (Figure 67).⁷⁸ Celui-ci induit une

perte d'activité totale ($K_D > 15 \mu\text{M}$ pour le composé **52**, $K_D = 0,18 \text{ nM}$ pour l'inhibiteur **53**). Lorsqu'il est clivé par irradiation, l'activité est restaurée ($K_D = 0,76 \text{ nM}$).

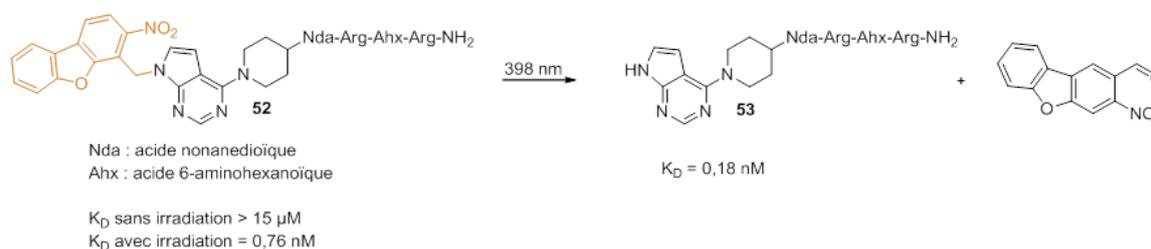


Figure 67 : Inhibiteur de PKA portant le groupement photo-labile nitrodibenzofuranne

c. Inhibiteurs de kinases photo-commutables

Depuis le milieu des années 2010, quelques inhibiteurs de kinases appliquant le principe des photo-commutateurs ont vu le jour. En 2015, Ferreira publie le premier inhibiteur de RET photo-commutable (Figure 68).⁷⁹ Il apparaît que l'isomère *E* est 4 fois plus actif que l'isomère *Z*. La photo-isomérisation $E \rightarrow Z$ est réalisée à 365 nm, tandis que la réaction inverse peut se faire en lumière visible (503 nm) ou thermiquement. Plusieurs cycles de photo-isomérisation ont été réalisés sans voir de signe d'essoufflement.

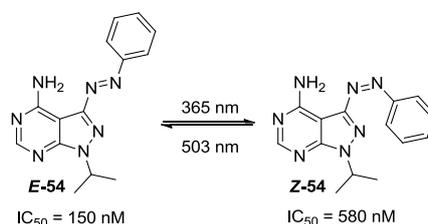


Figure 68 : Inhibiteur de RET photo-commutable

En 2017, Wilson décrit un inhibiteur de la protéine kinase C (PKC) activable par photocyclisation (Figure 69).⁸⁰ L'isomère fermé **C-55** ne montre aucune activité sur la kinase. L'ouverture du cycle est réalisée dans le visible, permettant l'obtention de l'isomère ouvert **O-55**, toujours inactif sur PKC, en moins de 10 secondes. La libre rotation permet d'obtenir le composé **i-55**, qui montre une activité inhibitrice de PKC avec un $IC_{50} = 580 \text{ nM}$. La photocyclisation **O-55** \rightarrow **C-55** n'est en revanche pas possible dans les solvants polaires tels que l'eau ou le DMSO.

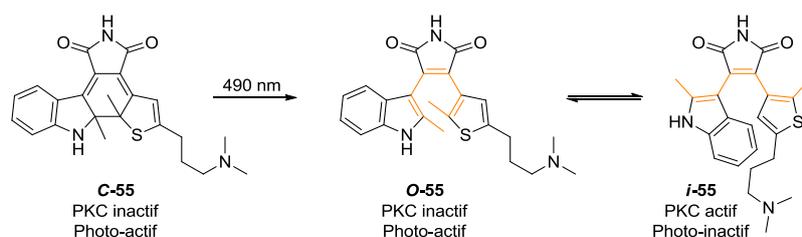


Figure 69 : Inhibiteur de PKC via ouverture de cycle photo-induite

En 2015, Tsai présente une approche où l'inhibiteur de kinase est accroché à la protéine par un lien photo-commutable (Figure 70).⁸¹ L'attache entre l'inhibiteur et la protéine se fait par réaction bio-orthogonale entre un acide aminé modifié (composé 57) et une tétrazine située à l'autre bout du lien photo-commutable. L'activité de la kinase MEK1 est ainsi contrôlée par des cycles d'isomérisation du lien photo-commutable.

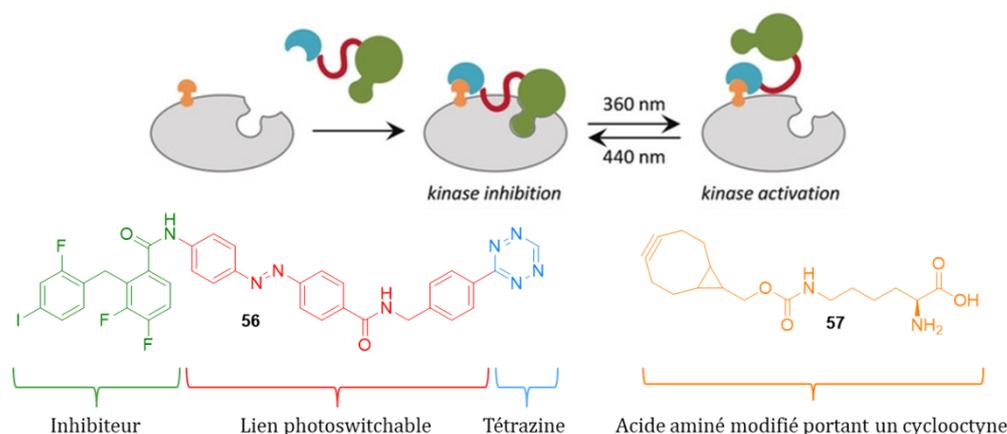


Figure 70 : Inhibiteur de MEK1 avec lien photo-commutable

En 2018, l'équipe de Peifer publie la photo-isomérisation d'un inhibiteur de VEGFR-2 approuvé par la FDA, l'axitinib (Figure 71).⁸² Celui-ci présente une double liaison propice à l'application du principe des photo-commutateurs. L'isomérisation $Z \rightarrow E$ est réalisée par irradiation à 385 nm. En revanche, l'irradiation de l'isomère E à 365 nm ne conduit pas à l'isomérisation inverse mais à la photo-cyclisation [2+2] irréversible du composé. De plus, la manipulation des composés à la lumière rouge est indispensable pour voir une différence d'activité entre les isomères ($IC_{50(E)} = 19\text{ nM}$, $IC_{50(Z)} = 817\text{ nM}$). En effet à la lumière naturelle, l'isomérisation a lieu trop rapidement pour mesurer une différence d'activité entre les isomères.

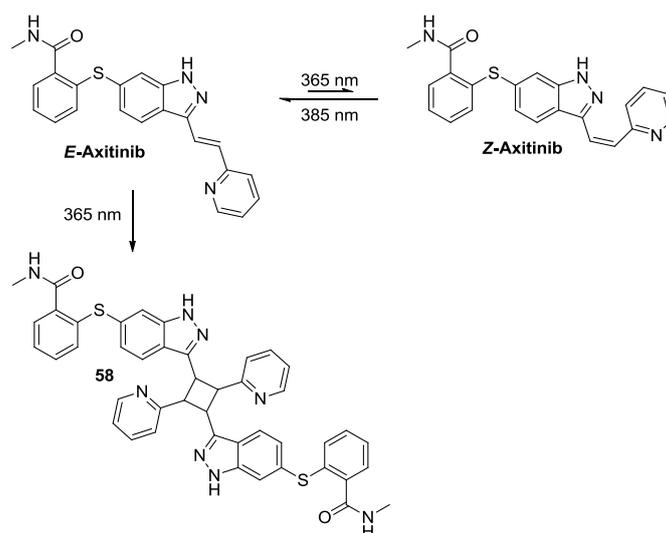


Figure 71 : Photoisomérisation de l'inhibiteur de VEGFR-2 Axitinib

En 2019, Hoorens présente un analogue photo-commutable du vemurafenib, inhibiteur de la kinase BRAF^{V600E} (Figure 72).⁸³ L'isomère *trans* de l'azobenzène est 11 fois moins actif que l'isomère *cis* ($IC_{50(trans)} = 1,68 \mu M$, $IC_{50(cis)} = 156 \text{ nM}$). Plusieurs cycles d'isomérisation et ré-isomérisation ont été réalisés sans observer d'essoufflement.

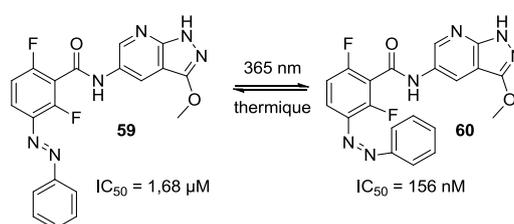


Figure 72 : Inhibiteur photo-commutable de BRAF^{V600E}

3. Objectif du projet de thèse

Comme nous l'avons vu plus haut, l'un des inconvénients majeurs des inhibiteurs de kinase est le manque de sélectivité, menant à des effets secondaires pour le patient. L'utilisation de la photopharmacologie permettrait de limiter ces effets secondaires en contrôlant la libération de la molécule active. La seconde partie de mon projet de thèse consiste à appliquer le concept de la photopharmacologie aux inhibiteurs de la famille TAM synthétisés au laboratoire.⁵ Pour cela, nous souhaitons installer un groupement photo-labile sur l'azote N3 de l'imidazo[4,5-*b*]pyridine, azote donneur de liaison hydrogène souvent impliqué dans les interactions avec la région charnière du site actif de la protéine (cf. chapitre I) (Schéma 11).

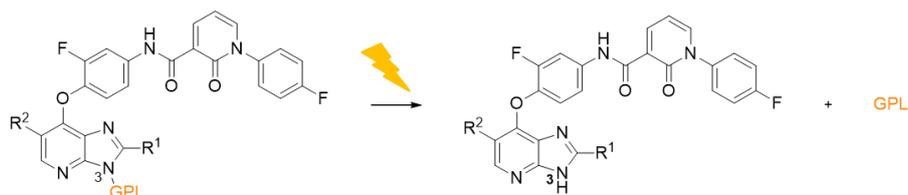


Schéma 11 : Application du concept de molécules photo-clivables aux inhibiteurs de TAM

Nous avons choisi comme groupements labiles le diméthoxynitrobenzyle (DMNB) et le (7-méthoxycoumarin-4-yl)méthyle (7-MCM), qui font partie des groupements les plus décrits dans la littérature.⁶³ Ils seront installés sur les trois inhibiteurs de la famille imidazo[4,5-*b*]pyridine qui ont montré les meilleures activités sur au moins une des protéines de la famille TAM (Figure 73).⁵

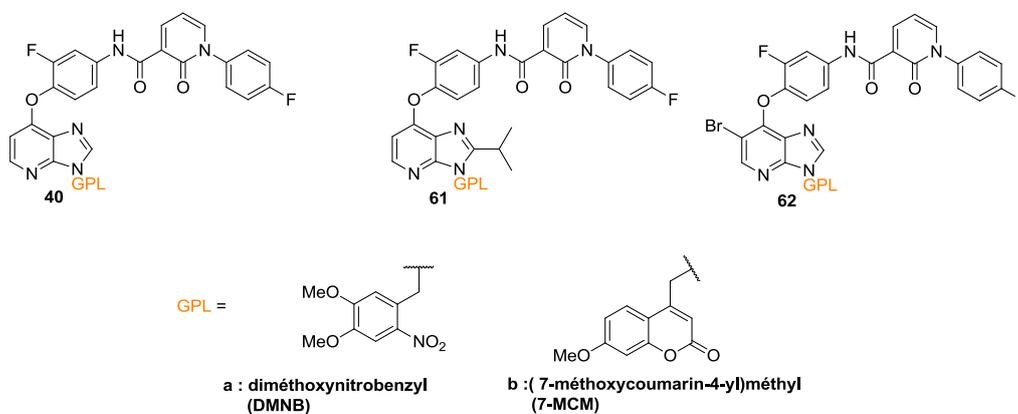


Figure 73 : Inhibiteurs photo-contrôlables cibles

II. Synthèse d'inhibiteurs photo-contrôlables

Nous avons voulu reprendre la voie de synthèse mise au point au laboratoire, en remplaçant le groupement protecteur *p*-méthoxybenzyle par le groupement photo-labile (Schéma 12).

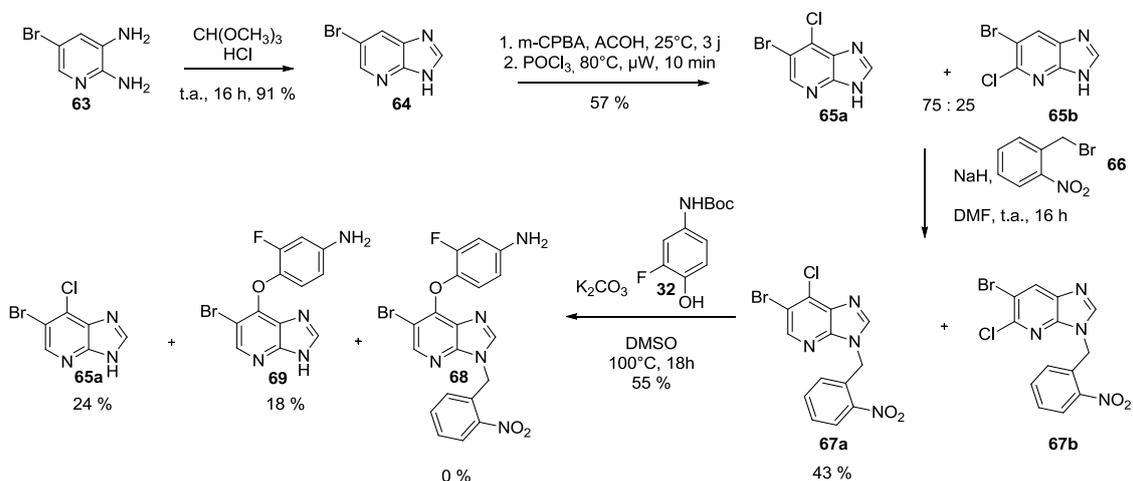


Schéma 12 : Voie de synthèse initiale

Le cycle imidazo[4,5-*b*]pyridine est tout d'abord formé par condensation entre la 2,3-diamino-5-bromopyridine **63** commerciale et l'orthoformiate de méthyle, avec un rendement de 91 %. L'imidazopyridine **64** est ensuite activée sous forme de N-oxyde pour permettre sa chloration. On obtient un mélange de régioisomères **65a** et **65b** inséparables avec un rendement de 57 %. Le groupement nitrobenzyle a ensuite été installé à titre de test sur le mélange de **65a** et **65b** avec un rendement modeste. En effet, les imidazo[4,5-*b*]pyridines existent sous trois formes tautomères. La substitution nucléophile mène ainsi à la formation de trois régioisomères correspondant à la protection des trois azotes. Au total, c'est donc un mélange de six composés que l'on obtient en réalisant la protection sur le mélange de **65a** et **65b**. Le composé **67a** est toutefois majoritaire, et compte tenu de la difficulté de séparation obtenu avec un rendement très satisfaisant de 43 %.

Malheureusement, les conditions utilisées pour la substitution nucléophile aromatique conduisent au clivage du groupement photo-labile. On obtient le produit de départ déprotégé **65a** avec un rendement de 24 %, et le produit de substitution nucléophile déprotégé **69** avec un rendement de 18 %.

Nous avons ensuite essayé de réaliser directement la S_NAr sur l'imidazopyridine non protégée **65a**, sans résultat. Ces résultats nous ont conduits à chercher une nouvelle voie de synthèse.

Nous avons décidé de réaliser la substitution nucléophile aromatique avant de former le cycle imidazopyridine. Pour s'affranchir des problèmes de régioisomères, nous sommes partis de la 2-amino-4-chloro-3-nitropyridine **31** commerciale. La substitution nucléophile aromatique avec la chaîne pyridone **41** préalablement préparée permet l'obtention du composé **72** avec un rendement de 76 % (Schéma 13).

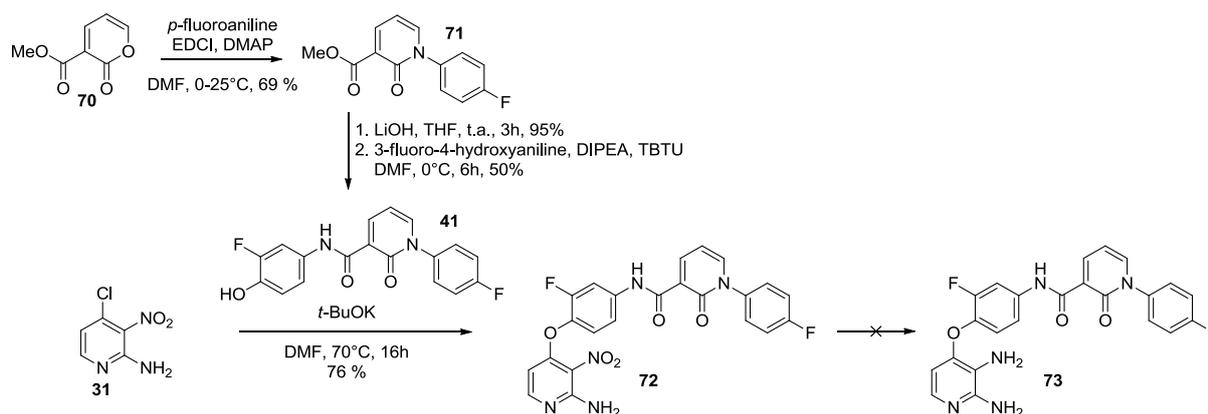
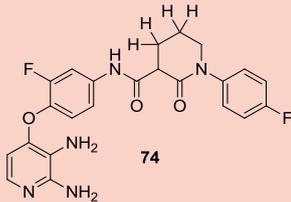


Schéma 13 : Substitution nucléophile aromatique avec la chaîne pyridone

Malheureusement, le produit de réduction de la fonction nitro n'a pas pu être isolé (Tableau 3).

Tableau 3 : Réduction de la nitropyridine 72

Entrée	Conditions	Résultats
1	H ₂ , Pd/C EtOH, t.a., 16h	Réduction de la fonction nitro et de la pyridone 
2	Fe, K ₂ CO ₃ , NH ₄ OAc Toluène/eau, reflux, 36h	Produit de départ et produit désiré 1 : 1 ^a
3	Fe, HCl EtOH, reflux, 16h	Produit désiré majoritaire ^a

^a : observé par LC-MS

L'hydrogénation en présence de palladium sur charbon a conduit à la réduction du groupement nitro mais aussi à la réduction de la pyridone, ce qui avait déjà été observé par l'équipe de Zheng en 2012⁸⁴ (entrée 1). Le suivi par LC-MS de la réduction au fer en milieu basique montre la formation du produit désiré, mais l'avancement n'était pas total (entrée 2). Enfin, la réduction avec le fer en milieu acide a montré la formation du produit désiré (entrée 3). Dans les deux cas, la très faible solubilité de celui-ci n'a pas permis son isolement.

Le composé **74** avec la pyridone réduite a néanmoins été cyclisé avec l'orthoformiate de méthyle pour obtenir un analogue de l'inhibiteur **40** (Schéma 13). L'activité du composé **39** a été évaluée dans le chapitre I.

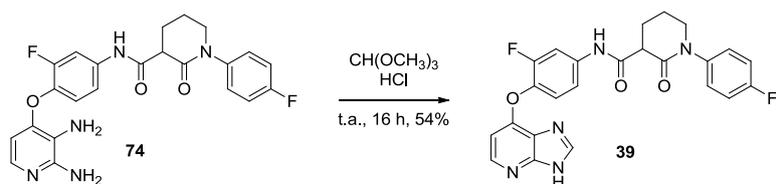


Schéma 14 : Cyclisation du composé **74** avec la pyridone réduite

La substitution nucléophile aromatique sur la 2-amino-4-chloro-3-nitropyridine **31** a donc été réalisée avec le 4-amino-2-fluorophénol protégé **32**, conduisant à la formation du composé **33** avec un rendement de 85% (Schéma 15). Le groupement nitro est réduit par hydrogénation catalysée par le palladium sur charbon de façon quantitative. Le cycle imidazo[4,5-*b*]pyridine est ensuite formé par condensation avec l'orthoformiate de méthyle avec un rendement de 65%.

Nous avons choisi d'installer le groupement photo-labile à ce stade de la synthèse, afin de protéger l'azote N3 de l'imidazopyridine **35** et éviter toute réaction secondaire lors du couplage avec la chaîne pyridone. Les groupements diméthoxynitrobenzyle et (7-méthoxycoumarin-4-yl)méthyle sont installés par substitution nucléophile avec des rendements modestes, dus à l'alkylation des trois azotes de l'imidazo[4,5-*b*]pyridine **35**.

Le *t*-butoxycarbonyl est ensuite clivé en milieu acide pour retrouver l'amine primaire **76**. Celle-ci est engagée avec l'acide **77** pour former le motif amide-pyridone, en utilisant TBTU comme agent de couplage, permettant l'obtention de l'inhibiteur **40** portant les groupements photo-labiles DMNB et 7-MCM avec des rendements de 60 à 80 % sur la dernière étape.

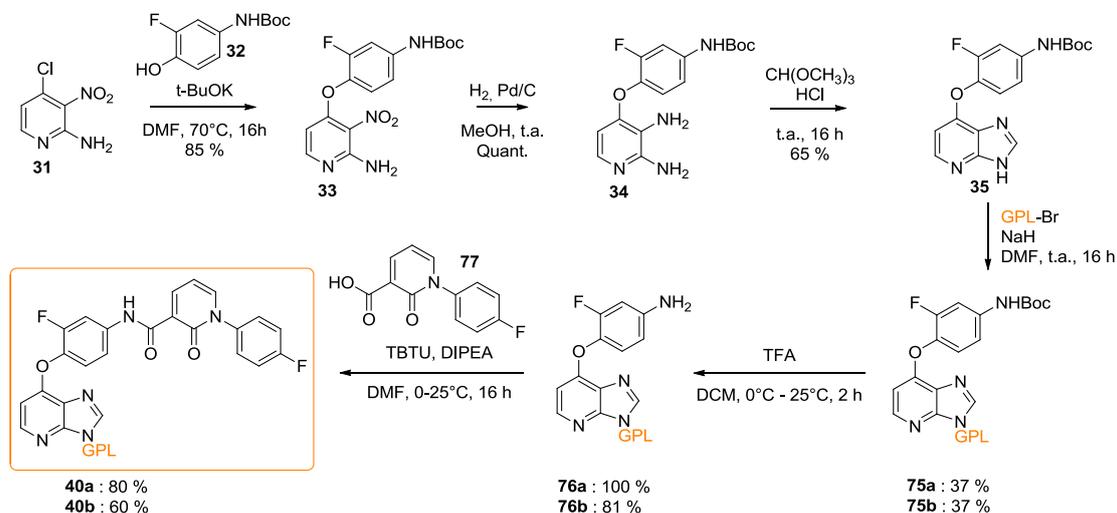
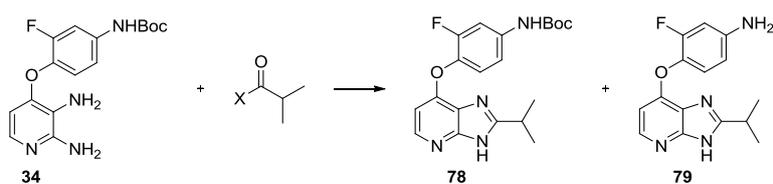


Schéma 15 : Voie de synthèse des composés **40a** et **40b**

Pour les composés **61** comportant un groupement isopropyle en position 2 de l'imidazo[4,5-*b*]pyridine, la synthèse a été reprise à partir du composé **34**. La cyclisation pour obtenir l'imidazopyridine substituée en 2 a dû être optimisée (Tableau 4).

Tableau 4 : Optimisation de la cyclisation du composé **34**



Entrée	X	Conditions	Composé observé
1	-OH	NH ₄ Cl, POCl ₃ 100°C, 1 j	/
2	-OH	NH ₄ Cl, POCl ₃ t.a., 1 j	 80
3	-OH	HCl t.a., 16 h puis 60°C, 16 h	Produit de départ
4	-OH	DBU, T3P μW, 180°C, 10 min	/
5	-OH	NH ₄ Cl, POCl ₃ t.a., 5 h puis DMF, 110°C, 3 j	 81 28 %
6	-Cl	DMF, 60°C, 2 j puis 100°C, 1 j	 80
7	-H	EtOH, reflux, 3 j	 78 55 %
8	-OH	Acide polyphosphorique, 150°C, 4 h	 79 55 %

Nous avons tout d'abord essayé des conditions précédemment mises au point au laboratoire avec POCl₃ et NH₄Cl à 100°C (entrée 1). Toutefois, ces conditions n'ont pas permis d'observer le produit attendu **78**, ni le produit de première addition de l'amine sur l'acide **80**. En reprenant ces conditions à température ambiante, on observe en LC-MS la formation du produit d'addition **80** (entrée 2). Sans surprise, on observe également le clivage du groupement *t*-butoxycarbonyle. De simples conditions acides comme utilisées pour la cyclisation avec l'orthoformiate de méthyle ne conduisent à aucune réaction (entrée 3). Les conditions de Jose⁸⁵ avec le DBU et l'anhydride propylphosphonique (T3P) sous irradiation micro-ondes voient la consommation du réactif de départ, mais pas la formation du produit désiré ou d'un intermédiaire (entrée 4). Nous avons ensuite repris les conditions de l'entrée 2 en chauffant ensuite à 60°C dans le DMF pour

améliorer l'homogénéité du mélange réactionnel afin de favoriser la cyclisation (entrée 5). Celle-ci a bien lieu, mais on assiste également à la substitution nucléophile de la diméthylamine (issue de la dégradation du DMF) en position 6 de l'imidazopyridine. On obtient ainsi le composé **81** avec un rendement de 28 %. Nous avons également tenté la cyclisation avec le chlorure d'acide isobutyrique (entrée 6). Le suivi par LC-MS montre la formation du produit de première addition **80**. De façon satisfaisante, deux jeux de conditions permettent la formation du cycle imidazo[4,5-*b*]pyridine substitué en 2 par l'isopropyle. La réaction avec l'isobutyraldéhyde dans l'éthanol à reflux conduit au produit désiré avec un bon rendement de 55 % (entrée 7). Enfin la cyclisation avec l'acide isobutyrique dans l'acide polyphosphorique⁸⁶ mène à la formation du produit désiré déprotégé avec un rendement similaire à l'entrée précédente (entrée 8).

A partir du composé **79**, la chaîne pyridone est directement introduite en utilisant TBTU comme agent de couplage, avec un rendement de 84%. Les deux groupements photo-labiles sont introduits en dernière étape, avec des rendements modestes de 30 et 20% respectivement (Schéma 16).

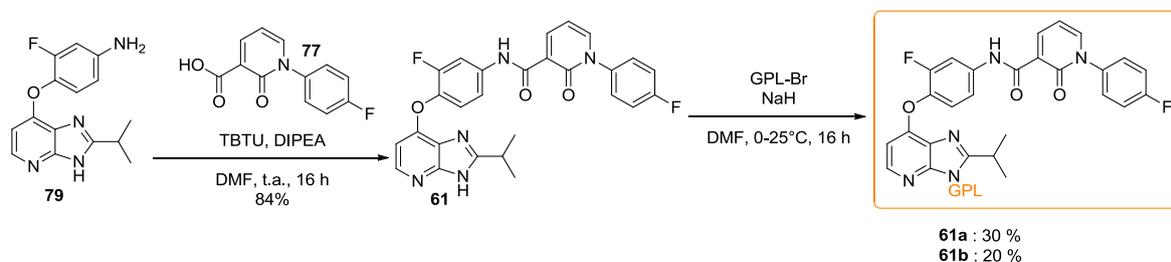


Schéma 16 : Fin de la synthèse du composé **61**

La synthèse des composés **62** comportant un atome de brome en position 6 de l'imidazo[4,5-*b*]pyridine commence par la bromation de la 2-amino-4-chloro-3-nitropyridine par le N-bromosuccinimide (Schéma 17). La substitution nucléophile aromatique avec l'aminophénol protégé donne le composé **83** avec un rendement de 60%.

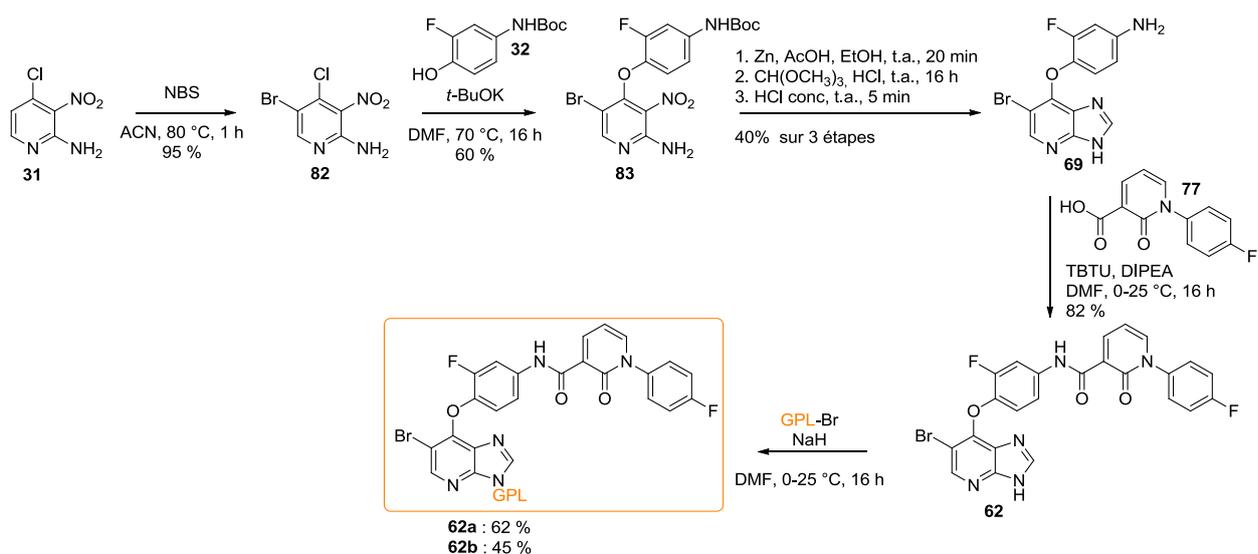
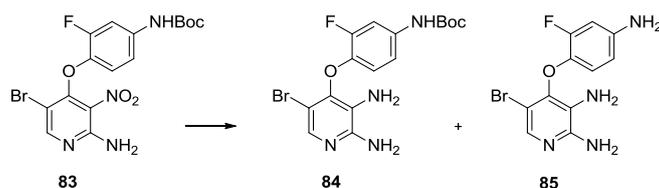


Schéma 17 : Voie de synthèse du composé 62

La réduction du groupement nitro par hydrogénation n'était pas envisageable, du fait de la présence de l'atome de brome. Plusieurs conditions de réduction par des métaux ont été testées (Tableau 5). La réduction par le fer en milieu acide a mené majoritairement au produit réduit et déprotégé **85** (entrée 1), tout comme la réduction avec le chlorure d'étain avec des rendements de 40 à 46 % (entrée 2). La réduction au fer en milieu basique a conduit au produit désiré avec un rendement modeste, mais non reproductible (entrée 3). En reprenant les premières conditions avec le fer et l'acide chlorhydrique, en diminuant la température et le temps de réactions, on obtient finalement majoritairement le produit réduit non déprotégé (entrée 4). Malheureusement, ces résultats restent peu reproductibles. La réduction par le zinc en milieu acide mène exclusivement au produit réduit protégé **84** avec un rendement modeste de 36 %, dû principalement à des difficultés de purification (entrée 5).

Tableau 5 : Optimisation de la réduction du composé **83**



Entrée	Conditions	Rendement en 84	Rendement en 85
1	Fe, HCl EtOH, 90°C, 1 j	21 %	40 %
2	SnCl ₂ , 2 H ₂ O EtOH, 90 °C, 10 h	0 %	46 %
3	Fe, NH ₄ OAc, K ₂ CO ₃ Eau/Toluène, 90°C, 1 j	0-34 %	0 %
4	Fe, HCl EtOH, 50°C, 30 min	14-52 %	0-30 %
5	Zn, AcOH EtOH, t.a.	36 %	0 %

La conservation du groupement protecteur est essentielle pour l'étape suivante de cyclisation avec l'orthoformiate de méthyle. Nous avons donc choisi d'utiliser les conditions de réduction au zinc. Le brut réactionnel est engagé dans la condensation avec l'orthoformiate de méthyle pour éviter les problèmes de purification. A la fin de la cyclisation, de l'acide chlorhydrique concentré est ajouté pour cliver le groupement protecteur *t*-butoxycarbonyle. Le rendement sur ces trois étapes sans purification intermédiaire est ainsi de 40 %.

L'installation de la chaîne pyridone est réalisée avec un très bon rendement de 82 %. Les groupements photo-labiles sont introduits en dernière étape avec des rendements corrects de 62 et 45 %.

La voie de synthèse pour les inhibiteurs photo-contrôlables peut se résumer par le schéma ci-dessous (Schéma 18). Ce nouveau chemin synthétique pour les inhibiteurs est plus court et convergent que la précédente voie mise au point au laboratoire.⁵ Les groupements photo-labiles sont introduits en dernière étape, ce qui permettra d'en tester facilement et rapidement un grand nombre.

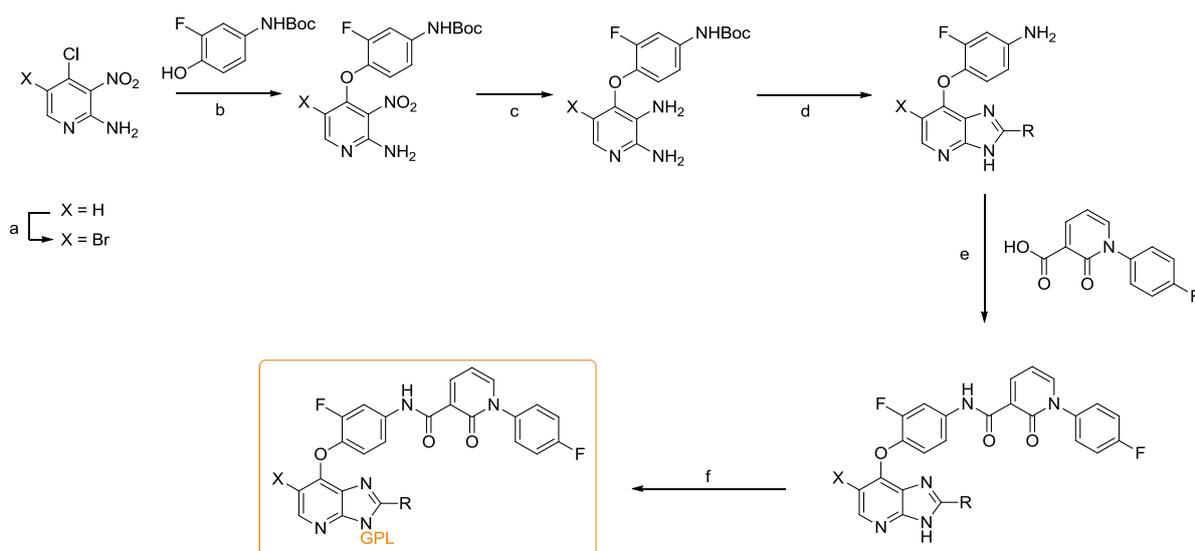


Schéma 18 : Voie de synthèse générale pour les inhibiteurs photo-contrôlables.

a) *N*-bromosuccinimide, acétonitrile, 80°C, 1 h, 95 % ; b) **12**, *t*-BuOK, DMF, 70°C, 16 h, 60-85 % ; c) X = H : H₂, Pd/C, MeOH, rt, 16 h, 100 % ; X = Br : Zn, AcOH, EtOH, 20 min, rt, Ar ; d) R = H : triméthylorthoformiate, HCl, rt, 16 h, 65 % ; R = *i*Pr : isobutyric acid, PPA, 150°C, 4 h, 55 % ; e) **18**, TBTU, DIPEA, DMF, rt, 16 h, 84 % ; f) PPG-Br, NaH, DMF, 0°C to rt, 16 h, 20-40 %.

Au final, deux groupements photo-labiles, le diméthoxynitrobenzyle et le (7-méthoxycoumarin-4-yl)méthyle ont été installés sur trois inhibiteurs de la famille TAM, ce qui porte à six le nombre d'inhibiteurs photo-contrôlables potentiels (Figure 74).

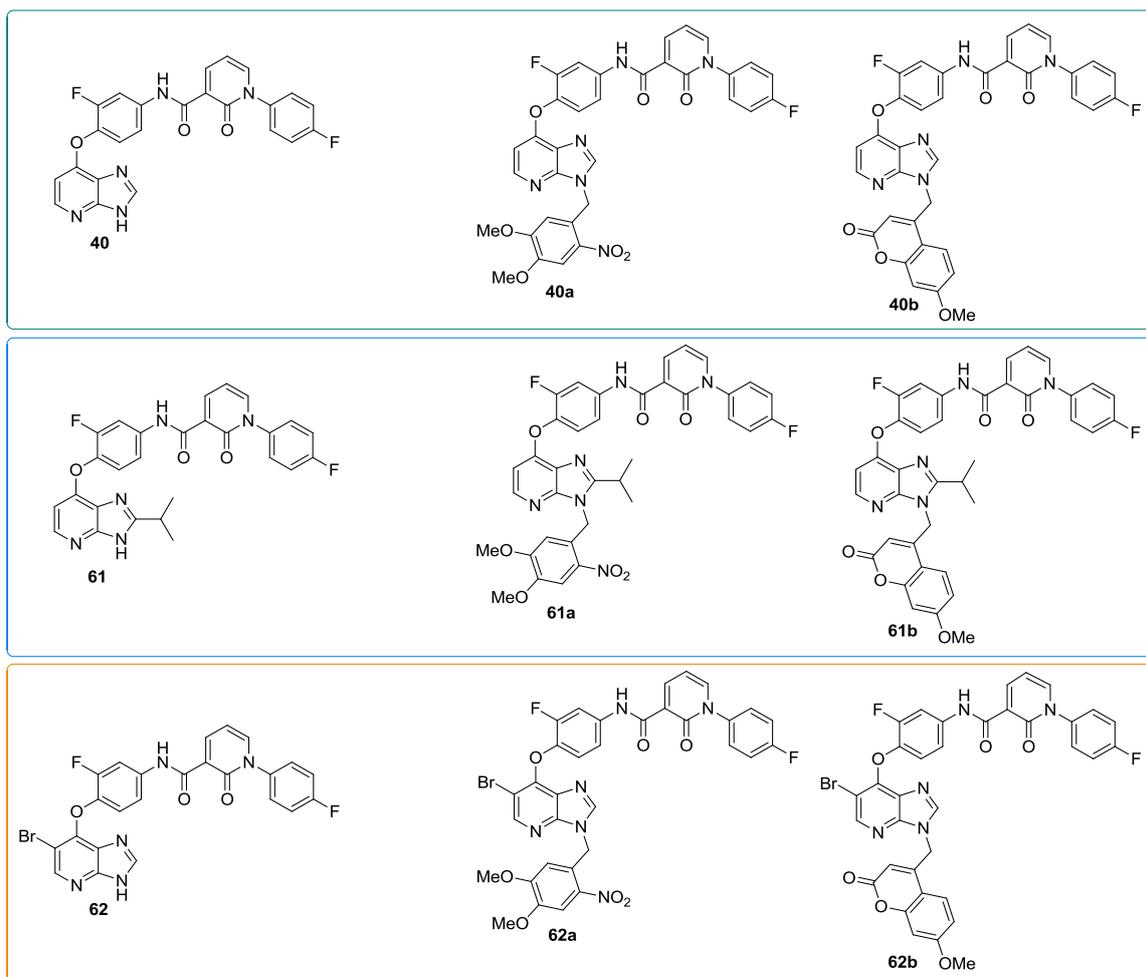


Figure 74 : Inhibiteurs de la famille TAM (à gauche) et leurs pendants photo-contrôlables (au milieu et à droite)

III. Evaluation des propriétés de photo-clivage

1. Cinétique de photoclivage

a. Système Asahi Spectra Max -303

Dans un premier temps, les spectres d'absorbance dans l'acétonitrile de tous les composés ont été réalisés afin de déterminer leur maximum d'absorption et donc la longueur d'onde d'irradiation à utiliser. Il apparaît que toutes les molécules protégées par le diméthoxynitrobenzyle absorbent autour de 340 nm. Les composés protégés par la méthoxycoumarine absorbent quant à eux autour de 325 nm (Figure 75).

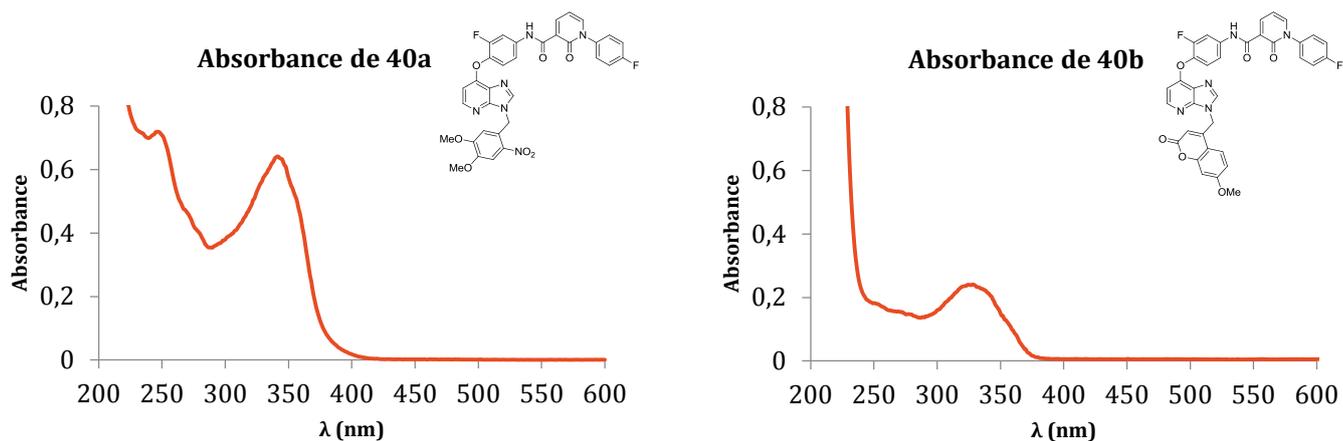


Figure 75 : Absorbance de **40a** (à gauche) et de **40b** (à droite)

Les premiers essais d'irradiations ont été réalisés avec une lampe d'une longueur d'onde de 365 nm située au-dessus du vial contenant la solution du composé à 1 mM dans l'acétonitrile (Figure 76).



Figure 76 : Montage d'irradiation

Des prélèvements sont réalisés à intervalles réguliers et analysés par LC-MS. L'aire des pics des composés cagés et décagés est mesurée. Pour le composé **40a**, on peut voir que le photo-clivage est presque complet au bout de 8 heures d'irradiation (Figure 77).

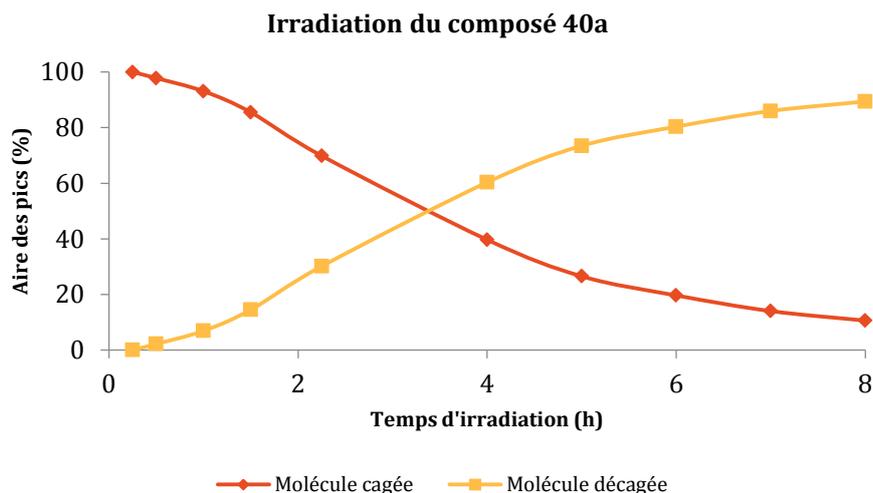


Figure 77 : Cinétique de photo-déprotection de **40a**

D'autres essais ont été réalisés à une longueur d'onde de 312 nm, mais la cinétique de clivage est beaucoup plus lente (30% de produit clivé après 8 h), ce qui semble cohérent puisque la molécule absorbe peu à cette longueur d'onde.

Des essais de clivage ont été réalisés sur la molécule **40b** protégée par la méthoxycoumarine, à 365 nm et 312 nm. Cette fois-ci, aucun produit de clivage n'a été observé par LC-MS. De plus, nous avons fait face à des problèmes de solubilité des composés dans l'acétonitrile. Pour la suite des irradiations, nous avons donc utilisé des solutions dans le DMSO.

b. Système Rayonet RPR-200

Pour améliorer la cinétique de photoclivage, nous avons décidé d'utiliser une lampe plus puissante. Le Dr. Thomas Boddaert, de l'équipe Chimie Peptidomimétique, Photochimie et Procédés Alternatifs de l'ICMMO, nous a permis d'utiliser le système Rayonet RPR-200 qui consiste en un cylindre comportant 16 lampes d'une longueur d'onde de 350 nm. La distance entre l'échantillon et les lampes peut être ajustée en utilisant un carrousel comportant plusieurs positions, ou une tige centrale équipée de pinces (Figure 78).



Figure 78 : Système Rayonet RPR-200

Il apparaît de façon logique que plus l'échantillon est proche des lampes, plus la vitesse de clivage est rapide (Figure 79). On atteint ainsi un clivage complet de la molécule **40a** (en solution dans le DMSO à 1 mM) en un peu moins de 40 minutes d'irradiation dans le système tenu avec les pinces. Il en est de même pour les autres composés protégés par le diméthoxynitrobenzyle.

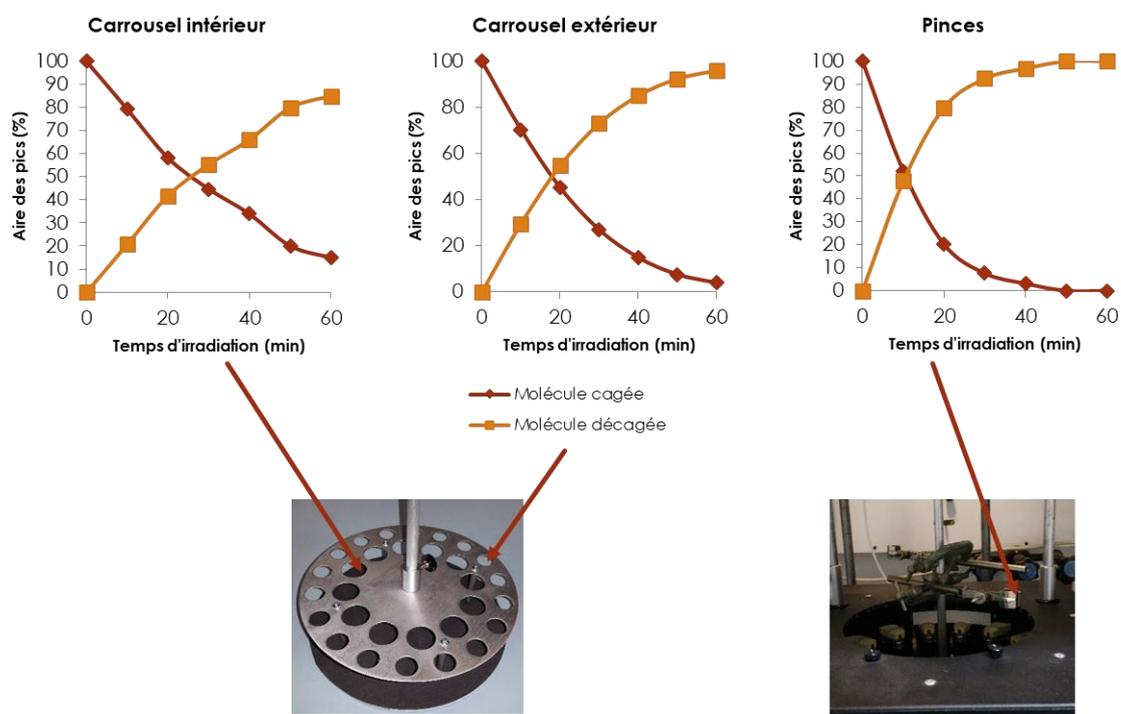


Figure 79 : Vitesses de clivage de **40a** selon la distance aux lampes

En revanche, aucun des composés protégés par la méthoxycoumarine n'a pu être déprotégé dans les mêmes conditions.

Il est apparu par la suite qu'une concentration de 1 mM était trop importante pour obtenir un photoclivage efficace. En effet à forte concentration, l'absorbance du composé est trop élevée et empêche la diffusion homogène de la lumière, ce qui peut ralentir le clivage du groupement photo-labile. Nous avons donc réalisé les expériences de clivage à une concentration où l'absorbance est d'environ 0,4, c'est-à-dire environ 10 μ M à la fois pour les inhibiteurs portant le DMNB et ceux portant le 7-MCM (Figure 80). Le clivage du groupement photo-labile est alors plus beaucoup rapide, avec la restauration complète de l'inhibiteur **40a** en 2 minutes. En revanche dans les mêmes conditions, le composé **40b** portant le 7-MCM n'a pas pu être clivé.

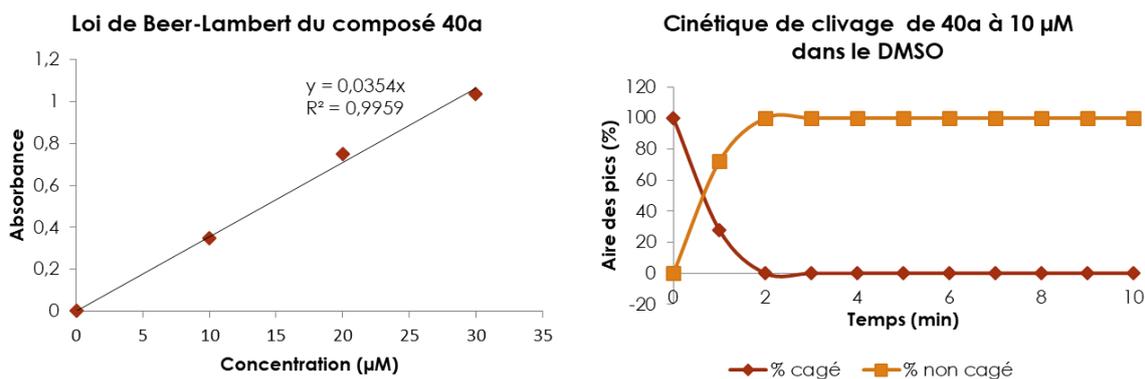


Figure 80 : Cinétique de clivage de 40a à 10 µM dans le DMSO, 350 nm

Les spectres d'absorbance des inhibiteurs non cagés ont également été réalisés, afin de voir si les molécules absorbent à la longueur d'onde utilisées pour le clivage (Figure 81). On constate que le maximum d'absorbance est atteint à 350 nm, c'est-à-dire exactement la longueur d'onde utilisée pour le clivage. Ceci peut diminuer l'efficacité du clivage.

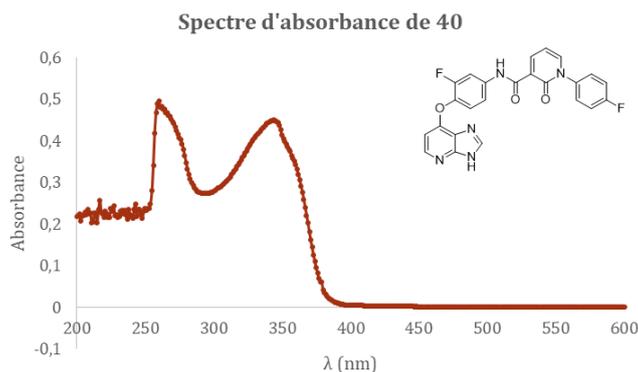


Figure 81 : Spectre d'absorbance de 40

2. Photostabilité des composés

Il était important de vérifier que les molécules actives sont stables et ne se dégradent pas sous l'effet des rayons UV. Pour cela, nous avons irradié nos inhibiteurs dans les mêmes conditions (solutions à 1mM dans le DMSO, 350 nm), et analysé les solutions par LC-MS après une heure. Les chromatogrammes ne montrent aucune formation de produit secondaire (Figure 82).

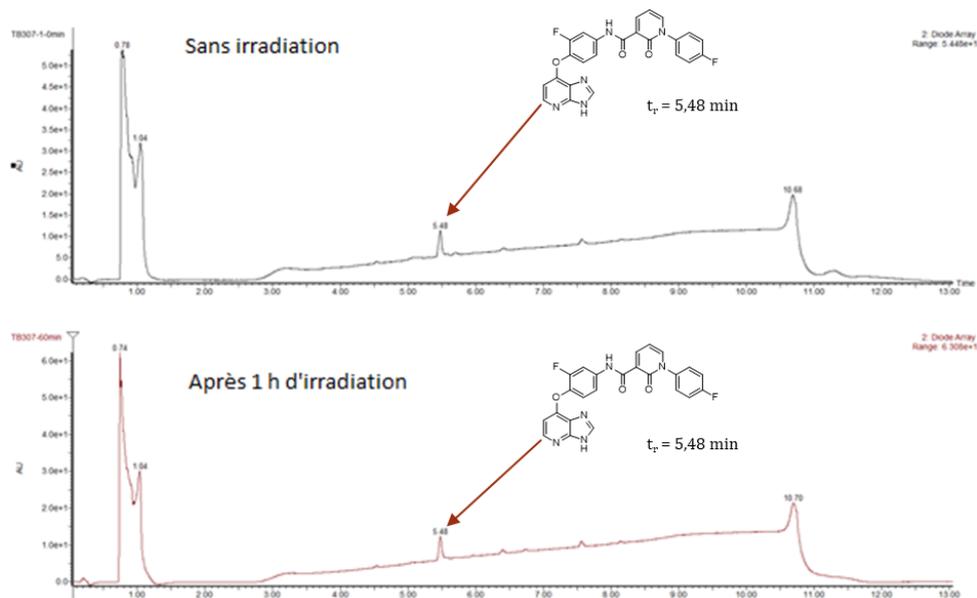


Figure 82 : Photostabilité de **40** (DMSO, 1 mM)

De même, nous avons vérifié que les molécules portant les groupements photo-labiles étaient stables à la lumière ambiante. Le chromatogramme ci-dessous montre que le composé **40a** en solution à 10 μM dans le DMSO ne se clive pas après 2 heures d'exposition à la lumière du jour (Figure 83). Le composé est également stable en solution dans le tampon utilisé pour réaliser les tests enzymatiques.

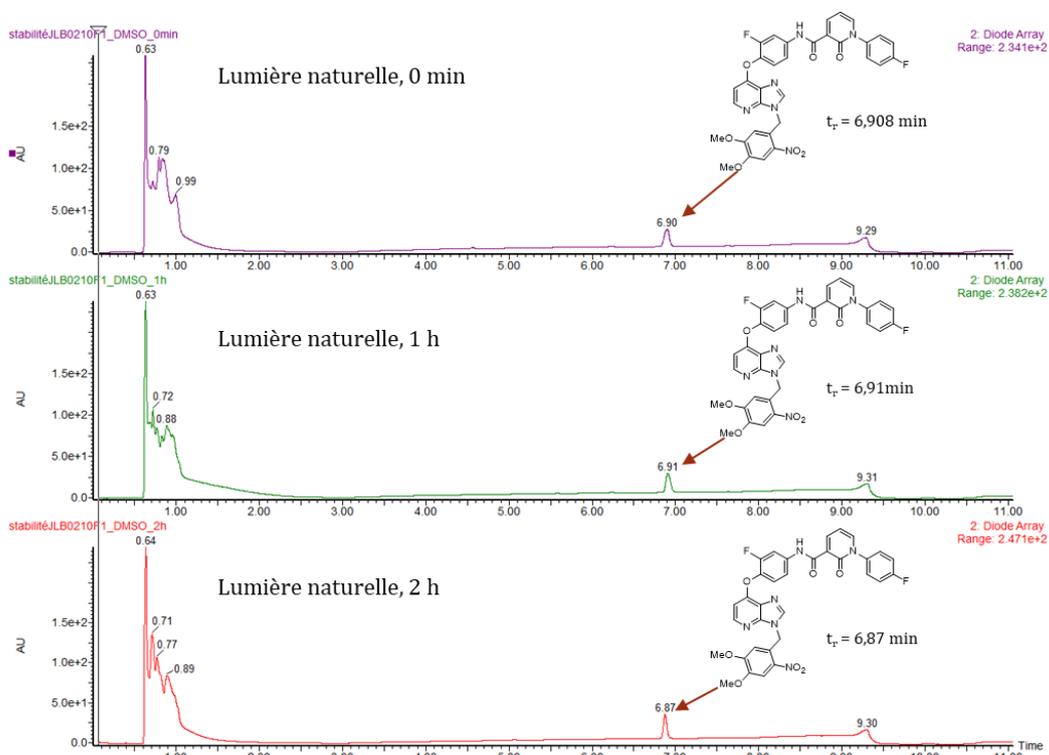


Figure 83 : Stabilité de **40a** à la lumière naturelle (DMSO, 10 μM)

IV. Evaluation biologique des composés photo-activables

1. Activité inhibitrice des composés portant le groupement photo-labile

La première étape était de mesurer l'activité des molécules portant les groupements photo-labiles. Pour cela, nous avons repris le test de dosage de l'ADP par luminescence utilisé au chapitre I. En théorie, la protection de l'azote N3 de l'imidazo[4,5-*b*]pyridine empêche l'interaction entre le composé et le site actif de la protéine, ce qui conduit à une perte d'activité. Pour chaque molécule testée, le pourcentage d'activité a été calculé de la manière suivante :

$$\% \text{ d'activité} = \frac{\text{luminescence}}{\text{luminescence à la plus petite concentration d'inhibiteur}} \times 100$$

Les expériences ont été dupliquées pour Tyro3, mais pas pour Axl et Mer.

On peut d'abord remarquer que les composés non cagés ont une activité inhibitrice bien plus faible que le BMS-777607 (Tableau 6).

Tableau 6 : IC₅₀ des molécules photo-activables

Composé	Tyro3	Axl	Mer
BMS-777607	82 nM	31 nM	329 nM
40	1,5 μM	2,0 μM	3,1 μM
40a	3,6 μM	6 μM	3,0 μM
40b	> 100 μM	18 μM	19 μM
61	17 μM	16 μM	2,9 μM
61a	> 100 μM	19 μM	7,4 μM
61b	> 100 μM	20 μM	> 100 μM
62	> 100 μM	16 μM	> 100 μM
62a	> 100 μM	> 100 μM	> 100 μM
62b	> 100 μM	20 μM	> 100 μM

Pour Tyro3, lorsque le composé **40** est protégé par le DMNB, la perte d'activité est peu significative. En revanche, lorsqu'il porte la coumarine, la perte d'activité est totale. Pour le composé **61**, la protection de l'azote N3 induit une perte d'activité totale, quel que soit le groupement photoactivable utilisé. La molécule bromée **62** est totalement inactive.

Sur Axl, la protection du composé **62** par le DMNB conduit à une perte totale d'activité. Sur les autres composés, la perte d'activité entre inhibiteur cagé et non cagé est peu significative.

Les résultats sur Mer montrent que la protection du composé **61** par la coumarine engendre une perte totale d'activité, tandis que sur les autres composés, la différence d'activité est peu significative. La molécule **62** est totalement inactive.

Il est cependant difficile de comparer l'activité d'un même composé sur les différentes protéines, car les expériences n'ont pas été réalisées dans les mêmes conditions de concentration en protéine et en ATP.

2. Restauration de l'activité inhibitrice sous irradiation

Dans un dernier temps, nous avons voulu évaluer le caractère photo-activable de nos molécules en vérifiant si l'activité des composés portant le groupement photo-labile était restaurée après irradiation. Pour cela, nous avons réalisé le test de dosage de l'ADP par bioluminescence sous irradiation. L'expérience a uniquement été réalisée sur Tyro3, les autres protéines n'étant pas assez actives.

Tout d'abord, nous avons vérifié que la protéine supportait l'exposition prolongée aux rayons UV. L'enzyme est incubée avec l'ATP et le peptide pendant 1 heure sous irradiation à 350 nm. La lampe est ensuite retirée et l'incubation poursuivie pendant 1 heure. L'expérience est également réalisée en présence de l'inhibiteur commercial BMS-777607, afin de voir si l'activité de la molécule est impactée par l'exposition aux rayons UV. Lorsque l'enzyme est incubée avec ses substrats naturels, l'ATP et le peptide, le taux de conversion d'ATP en ADP est de l'ordre de 5 %, ce qui correspond à ce qui était obtenu sans irradiation. Cependant, l'intensité de luminescence est suffisante pour avoir un bon rapport signal sur bruit (S/B = 4). En revanche l'inhibition de BMS-777607 est impactée, l'IC₅₀ passant de 82 nM à 353 nM sous irradiation. L'irradiation prolongée de la protéine en présence d'un inhibiteur semble donc modifier la toxicité de celui-ci.

L'expérience de restauration de l'activité des molécules photo-contrôlables a été réalisées avec les molécules **40a** et **61a**. Leurs inhibiteurs correspondants (**40** et **61** respectivement) ont été inclus à titre de comparaison (Tableau 7).

Tableau 7 : Restauration de l'activité avec 1 heure d'irradiation

Composé	IC ₅₀ sans irradiation	IC ₅₀ avec irradiation
40	1,5 µM	1,3 µM
40a	3,6 µM	1,6 µM
61	17 µM	50 µM
61a	>100 µM	52 µM

On remarque que sous irradiation l'activité du composé **40** et de son homologue portant le DMNB **40a** est sensiblement la même (1,3 µM et 1,6 µM respectivement). Toutefois sans irradiation l'IC₅₀ du composé **40a** est du même ordre de grandeur que celle de **40**.

De la même façon, on peut voir que sous irradiation, l'activité de la molécule **61** et de son homologue cagé **61a** est presque identique (50 µM et 52 µM respectivement). Sans irradiation, ces composés montraient une activité de 17 µM et supérieure à 100 µM respectivement.

L'activité des composés photoactivable a donc bien été restaurée sous l'effet de la lumière. En revanche, l'utilisation prolongée des rayons UV doit certainement endommager la protéine, et diminue l'efficacité de l'inhibiteur commercial BMS-777607 et de la molécule **61**. Toutefois, on peut noter que l'activité du composé **40** n'est pas impactée par l'irradiation. Il nous est difficile d'avancer une explication à ce stade.

Afin de limiter l'impact des rayons UV sur la protéine, l'expérience a été réitérée en diminuant le temps d'irradiation à 10 minutes (Tableau 8).

Tableau 8 : Restauration de l'activité avec 10 minutes d'irradiation

Composé	IC ₅₀ sans irradiation	IC ₅₀ avec irradiation
40	0,7 µM	0,6 µM
40a	3,8 µM	0,9 µM
61	1,8 µM	0,8 µM
61a	>100 µM	6 µM

On peut voir que sous l'effet de la lumière, l'activité du composé **40a** passe de 3,8 µM à 0,9 µM, ce qui se rapproche sensiblement de l'activité de l'inhibiteur **40** (0,7 et 0,6 µM sans et avec irradiation respectivement).

Le composé **61a**, qui ne présentait pas d'activité sans irradiation, montre une IC₅₀ de 6 µM sous l'effet de la lumière. Cette valeur se rapproche de l'activité de l'inhibiteur **61**. Cette fois-ci, l'exposition aux UV ne semble pas avoir d'impact sur l'activité de la molécule **61**, dont l'IC₅₀ avec ou sans irradiation est sensiblement la même.

On peut remarquer que les IC₅₀ mesurées sont inférieures à celles présentées précédemment. Les expériences ont été réalisées avec plusieurs mois d'écart, avec des lots de protéines différents, dans des conditions différentes, ce qui peut expliquer ces écarts.

V. Modélisation moléculaire

Nous avons voulu essayer de comprendre pourquoi la présence d'un groupement photo-labile sur l'inhibiteur engendre la perte d'activité biologique dans certains cas mais pas dans d'autres. Pour cela, nous avons réalisé des expériences d'amarrage moléculaire des molécules cagées et non cagées dans les sites actifs des trois protéines de la famille TAM. Nous avons repris les mêmes structures cristallines et les mêmes paramètres utilisés pour le criblage du chapitre I. Le BMS-777607 a également été inclus à titre de référence. Pour chaque composé, jusqu'à 5 poses ont été demandées (Figure 84).

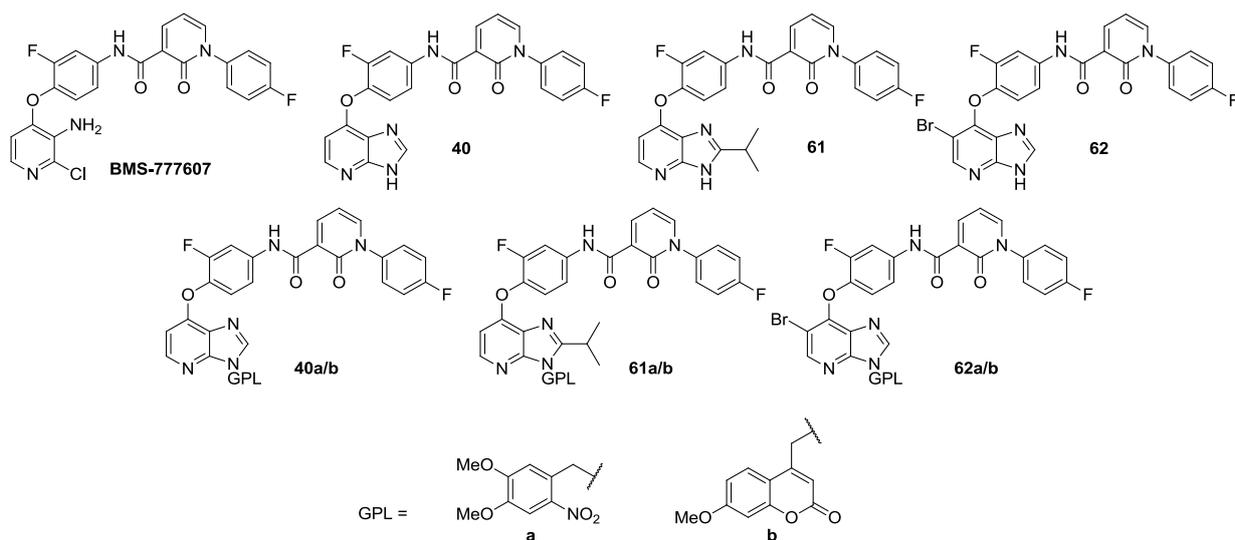


Figure 84 : Molécules incluses dans les expériences d'amarrage moléculaire

Les poses obtenues sont très diverses, mais les images ci-dessous sont représentatives des interprétations que l'on peut en faire. Pour le composé **40a**, les activités obtenues expérimentalement sur Tyro3 et Axl étaient de 3,6 et 6 μM respectivement. L'amarrage dans Tyro3 (Figure 85, A) montre que le groupement DMNB entre profondément dans la cavité, en établissant une liaison hydrogène avec le résidu Met596 de la région charnière. La chaîne latérale établit quant à elle 3 liaisons hydrogène et une interaction cation- π (entre le cycle aromatique terminal et le résidu Lys536). Ces interactions stabilisantes peuvent justifier la bonne IC_{50} observée malgré la suppression de la liaison hydrogène entre l'azote N3 de l'imidazopyridine et la Met596. En revanche, la pose dans Axl semble moins convaincante (Figure 85, B). Le composé se place avec une partie de la chaîne latérale et de l'imidazopyridine dans la cavité, en établissant des liaisons ioniques avec le résidu Lys567. Cette pose qui montre une molécule peu enfoncée dans le site actif, avec un résidu engagé dans trois interactions simultanées, laisse envisager une faible activité. Ce résultat est en contradiction avec la bonne activité mesurée de 6 μM .

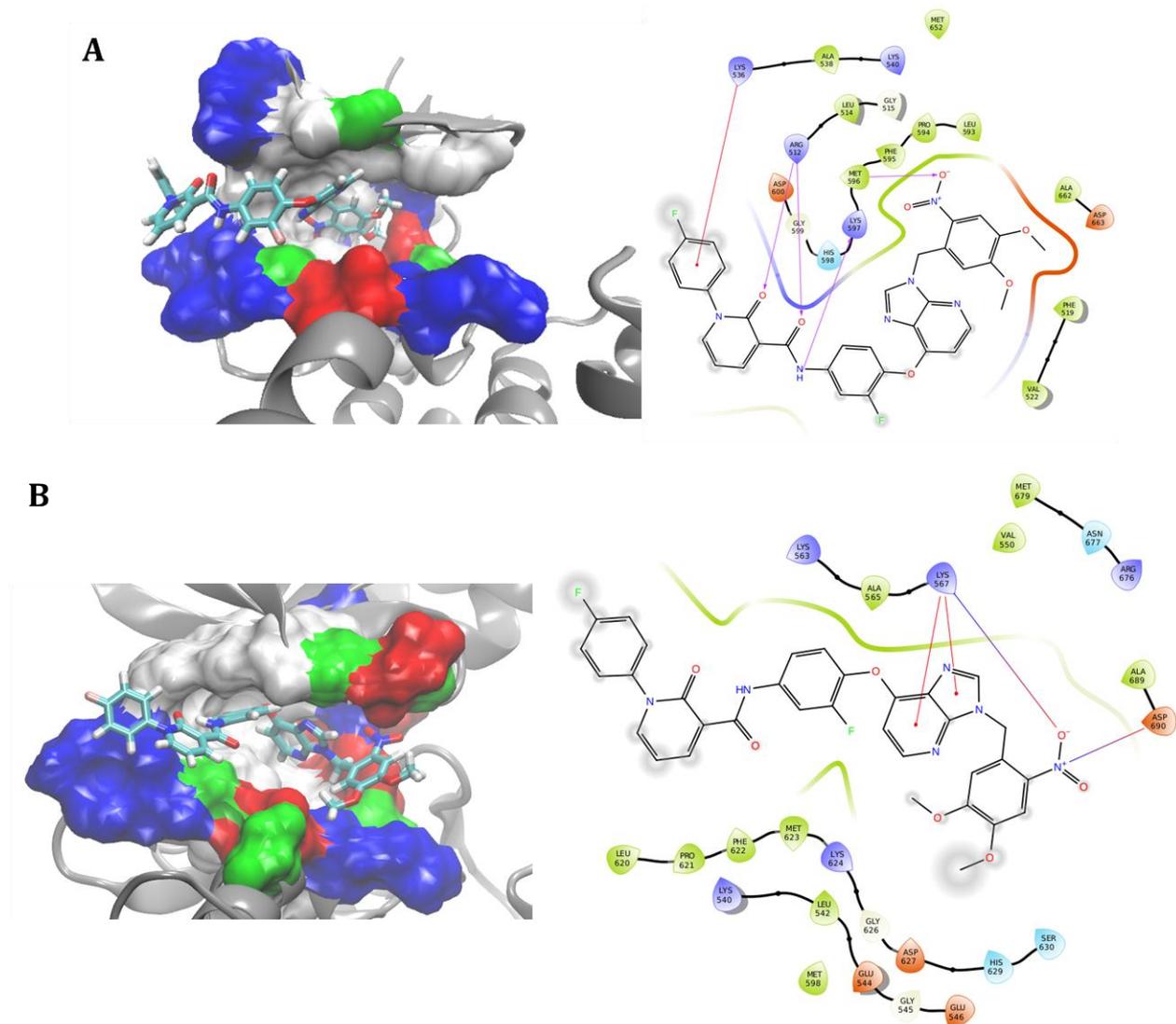


Figure 85 : (A) : Amarrage de **40a** dans Tyro3, vue en 3D (à gauche), vue en 2D (à droite) ; (B) : Amarrage de **40a** dans Axl, vue en 3D (à gauche), vue en 2D (à droite)

On peut également étudier les poses du composé **40b** dans Tyro3 et Axl. La molécule est expérimentalement inactive sur Tyro3, et montre une IC_{50} de 18 μM sur Axl. L'amarrage dans Tyro3 montre que la molécule ne s'installe pas profondément dans la cavité de la protéine (Figure 86, A). Une seule interaction entre la chaîne latérale et le résidu Arg512 stabilise cette pose. Tout ceci peut expliquer la perte totale d'activité de cette molécule. Dans Axl, la coumarine entre dans la cavité en établissant une liaison hydrogène, laissant une grande partie de la molécule à l'extérieur du site actif sans établir d'autres interactions (Figure 86, B). Cette pose suggère que la molécule n'est pas active, ce qui est en contradiction avec l' IC_{50} mesurée de 18 μM .

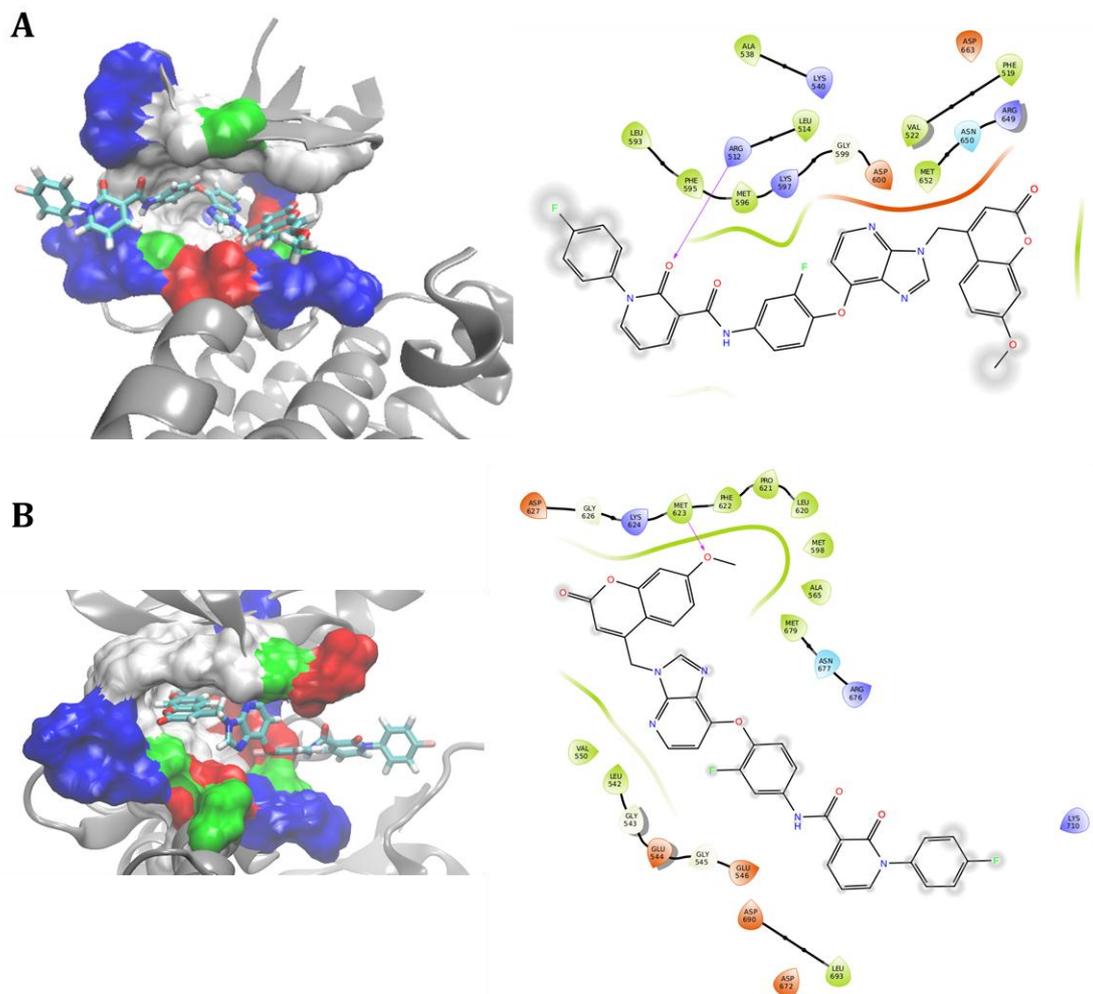


Figure 86 : (A) : Amarrage de **40b** dans Tyro3, vue en 3D (à gauche), vue en 2D (à droite) ; (B) : Amarrage de **40b** dans Axl, vue en 3D (à gauche), vue en 2D (à droite)

La comparaison des poses des composés avec leurs activités mesurées *in vitro* est résumée dans le tableau ci-dessous (Tableau 9). On peut ainsi voir que les résultats de modélisation sur Tyro3 sont en accord avec les résultats biologiques. En revanche pour Axl, les poses observées en modélisation n'expliquent pas les activités obtenues expérimentalement. Enfin pour Mer, les résultats sont plus disparates, certaines poses confirmant les résultats biologiques, d'autres non.

Tableau 9 : Corrélations entre les résultats des tests biologiques et la modélisation

Molécule	Résultats de la modélisation en accord avec les tests enzymatiques ?		
	Tyro3	Axl	Mer
40	✓	✗	✓
40a	✓	✗	✗
40b	✓	✗	✓
61	✓	✗	✓
61a	✓	✗	✗
61b	✓	✗	✓
62	✓	✗	✗
62a	✓	✓	✓
62b	✓	✗	✓

Il faut cependant garder à l'esprit que si la modélisation moléculaire permet de visualiser les interactions entre une molécule et son récepteur, les calculs s'appuient sur des approximations, et certains phénomènes ne sont pas pris en compte.

En effet, les expériences d'amarrage sont réalisées sur une structure cristalline rigide. Les protéines sont des structures dynamiques et peuvent bouger pour accueillir un inhibiteur dans la cavité. Les interactions avec le solvant ne sont pas non plus modélisées, alors qu'elles jouent un rôle important pour une fixation durable de la molécule dans le site actif. Ces interactions sont trop compliquées à modéliser dans le cadre d'un criblage simple tel que nous avons réalisé. Pour avoir des réponses plus complètes à nos interrogations, il faudrait générer plus de poses pour chaque composé et faire des expériences de dynamique moléculaire afin de voir quelle pose est la plus susceptible de rester longtemps dans la cavité.

Enfin, il faut aussi prendre en compte le fait que nous avons travaillé sur les conformations actives des protéines (DFG-in). Il ne faut pas exclure que nos composés soient des inhibiteurs de type II, actifs sur la conformation DFG-out de la protéine. Il s'agit en effet d'analogues du BMS-777607, dont le co-cristal avec la protéine c-Met montre une inhibition de type II (Figure 87). On voit que dans ce cas, la pyridone et le fluorophényle se placent dans la poche allostérique ouverte en conformation inactive.

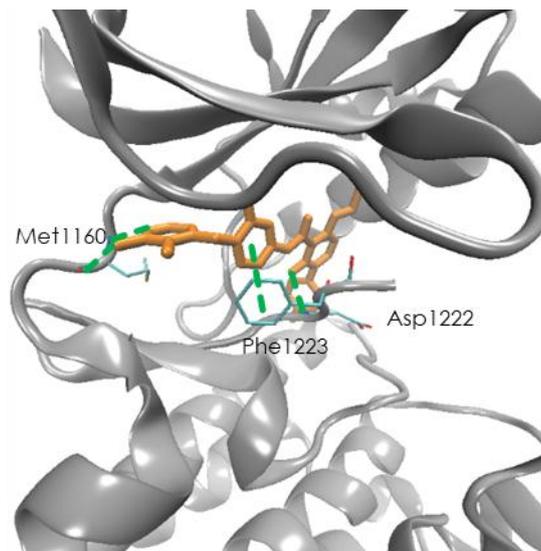


Figure 87 : Structure cristalline de BMS-777607 dans c-Met (code PDB : 3F82)

Lorsque le BMS-777607 est docké dans les protéines de la famille TAM (en conformation DFG-in), celui-ci adopte une pose dans laquelle la molécule n'entre pas profondément dans la cavité et n'établit qu'une seule interaction avec celle-ci (Figure 88). Cette pose peut corroborer le fait que BMS-777607 serait également un inhibiteur de type II sur la famille TAM.

Toutefois, les tests biologiques, réalisés sur des protéines phosphorylées, donc en conformation active DFG-in, indiquent une très bonne IC_{50} de 82 nM. Il nous est donc difficile de conclure si nos inhibiteurs sont de type I ou de type II.

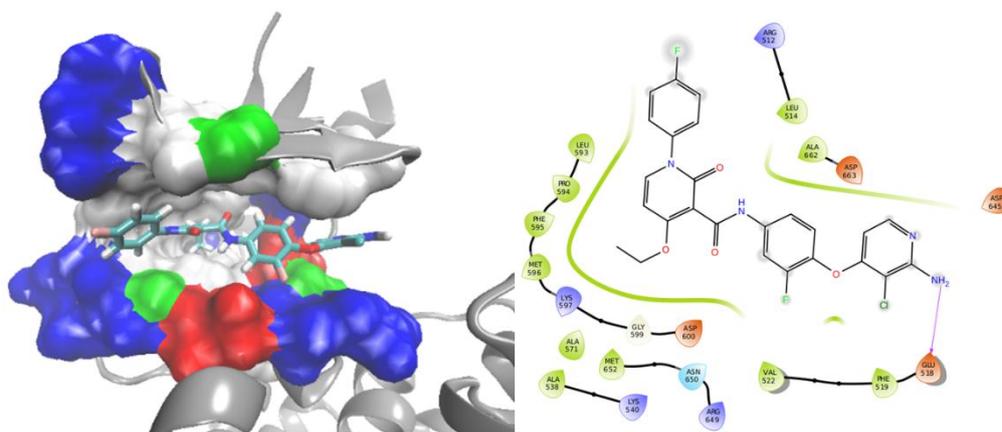


Figure 88 : Pose de BMS-777607 dans Tyro3

Dans tous les cas, cette étude nous aura appris que les deux groupements photo-labiles peuvent se placer dans le site actif et établir des interactions avec celui-ci. L'utilisation de groupements plus imposants, tels que le nitrodibenzofurane (NDBF)⁸⁷ (Figure 89) permettrait peut être d'induire un clash stérique plus important et donc une perte d'activité systématique.

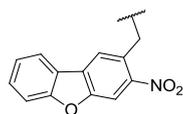


Figure 89 : Groupement photo-labile nitrodibenzofurane

VI. Deuxième génération d'inhibiteurs photo-contrôlables

1. Synthèse des nouveaux inhibiteurs photo-contrôlables

Dans la première série d'inhibiteurs photo-contrôlables, nous avons vu qu'il n'était pas possible de cliver le groupement (7-méthoxycoumarin-4-yl)méthyle. Nous avons donc voulu remplacer le lien benzylique entre la coumarine et l'imidazo[4,5-*b*]pyridine par un lien carbamate afin d'améliorer la cinétique de clivage.

Dans un premier temps, une série de tests sur une imidazo[4,5-*b*]pyridine moins substituée a été réalisée. L'alcool benzylique a été utilisé comme mime de coumarine. L'imidazopyridine **86** est tout d'abord mise à réagir avec le chloroformate de *p*-nitrobenzyle en milieu basique.⁸⁸ L'alcool benzylique est ensuite ajouté pour déplacer le nitrophénol (Schéma 19). Cette stratégie n'a malheureusement pas fonctionné, l'imidazo[4,5-*b*]pyridine de départ étant retrouvée majoritairement.

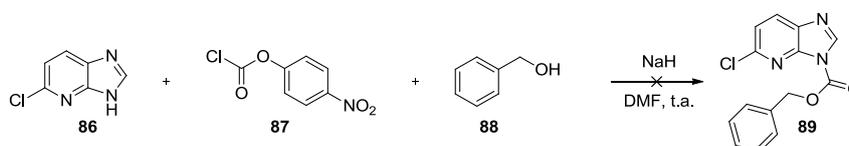


Schéma 19 : Essai de formation de carbamate d'imidazopyridine

Dans un second temps, nous avons donc choisi de synthétiser d'abord le carbonate d'alcool benzylique et de nitrophénol **90**, et de faire ensuite réagir celui-ci avec l'imidazopyridine (Schéma 20). On obtient ainsi le carbamate désiré avec un rendement de 34 % sur 2 étapes.

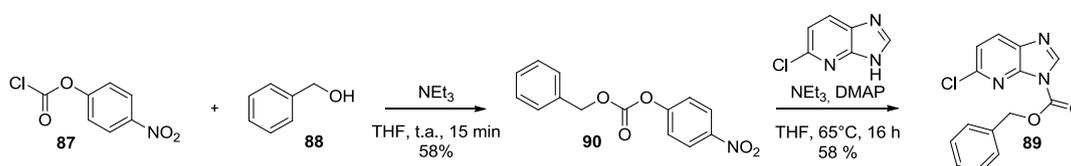


Schéma 20 : Formation du carbamate d'imidazopyridine via la préformation du carbonate

Encouragés par ces résultats, nous avons donc synthétisé le carbonate de coumarine et de nitrophénol. Nous avons repris la synthèse de la 7-diéthylamino-7-hydroxyméthylcoumarine **94** décrite par Klausen⁶⁵, puis fait réagir celle-ci avec le chloroformate de *p*-nitrobenzyle pour obtenir le carbonate **95** avec un rendement de 77%. Ce dernier est ensuite mis à réagir avec les

inhibiteurs imidazo[4,5-*b*]pyridine en milieu basique (Schéma 21). Le composé **40c** est obtenu avec un rendement de 34 %. En série isopropyle, aucune trace du produit désiré n'a été observée, probablement à cause de l'encombrement stérique généré par l'isopropyle. La molécule **62c** est obtenue avec un faible rendement de 7 %. Il est important de noter que ces composés sont très sensibles aux nucléophiles et notamment à l'eau, peu stables à la lumière et se dégradent sur la silice.

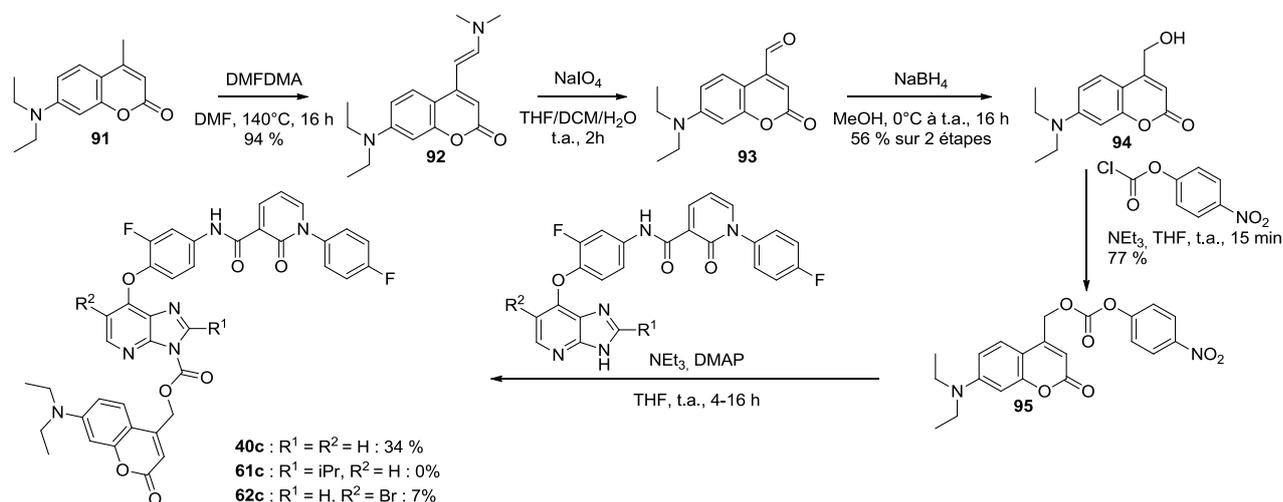


Schéma 21 : Synthèse des inhibiteurs photo-contrôlables carbamates de coumarine

2. Cinétiques de photo-clivage

Dans un premier temps, les spectres d'absorption dans le DMSO ont été réalisés pour les composés **40c** et **62c**. Ces derniers montrent un maximum d'absorption à 360 nm. Les lois de Beer-Lambert ont montré que l'absorbance est de 0,4 pour des concentrations d'environ 10 μM .

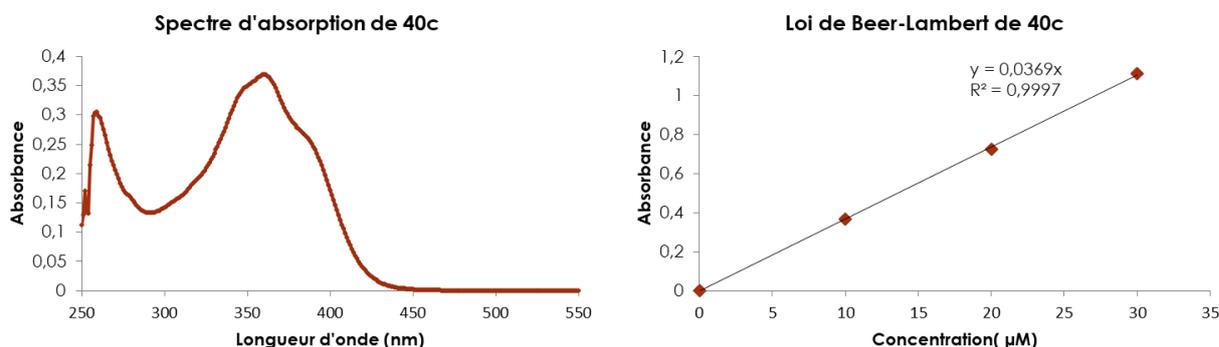


Figure 90 : Spectre d'absorption de **40c** à 10 μM dans le DMSO (à gauche) et loi de Beer-Lambert (à droite)

Les composés, en solution à 10 μM dans le DMSO, ont ensuite été irradiés à 350 nm avec le système Rayonet RPR-200. Les échantillons pris à intervalles réguliers ont ensuite été analysés par LC-MS (Figure 91). On peut voir que le clivage est total au bout de 2 minutes.

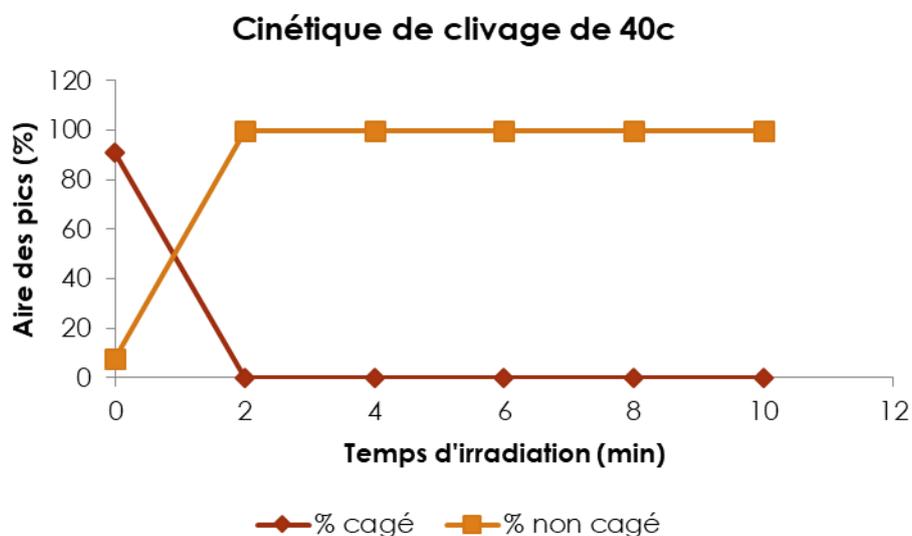


Figure 91 : Cinétique de clivage de **40c**, 10 μ M, DMSO, 350 nm

Toutefois, la faible stabilité du composé à la lumière naturelle rend difficile sa manipulation. En effet, si le composé **40c** en solution à 10 μ M dans le DMSO est laissé à la lumière pendant 2 heures, on constate que 60 % de **40c** s'est clivé pour donner **40** (Figure 92).

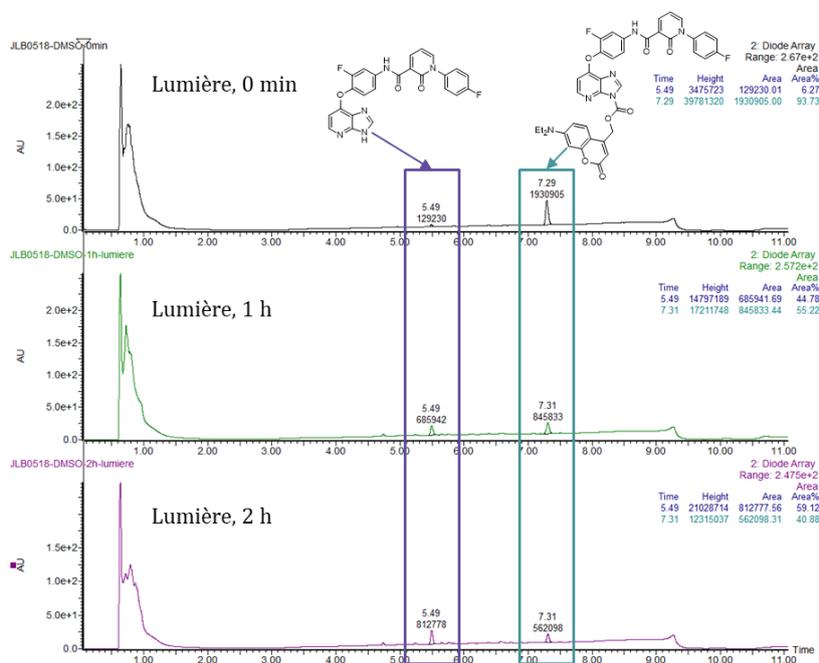


Figure 92 : Stabilité de **40c** dans le DMSO à la lumière naturelle

En revanche, si la solution est laissée dans le noir, il n'y a pas de clivage du groupement photolabile, même au bout de 3 heures (Figure 93).

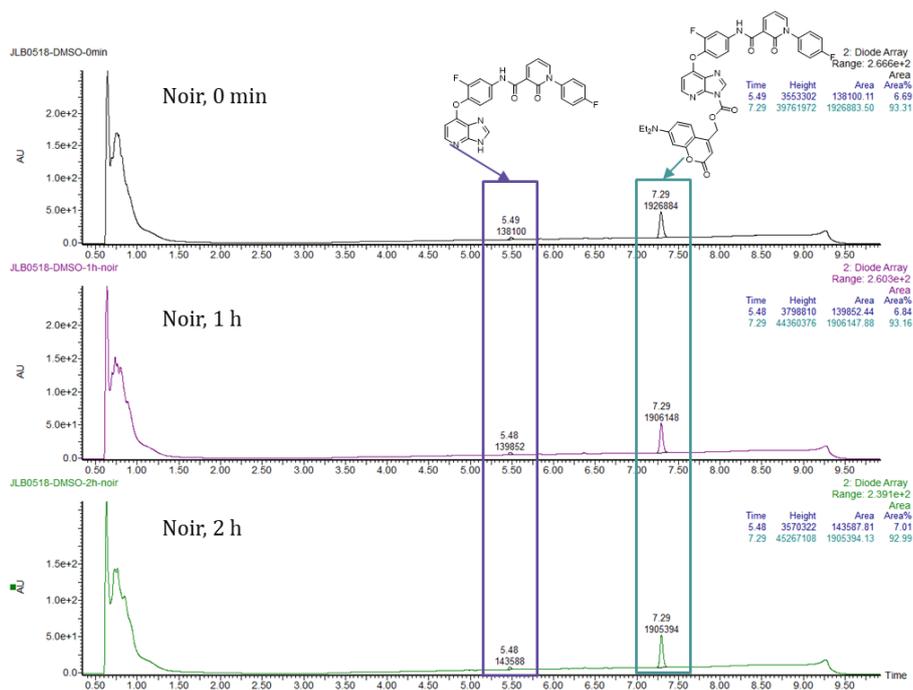


Figure 93 : Stabilité de **40c** dans le DMSO dans le noir

Les mêmes expériences ont été réalisées avec des solutions à 10 μM dans le tampon utilisé pour les tests biochimiques. Lorsque la solution est exposée à la lumière naturelle, environ 50 % du composé **40c** est clivé au bout de 2h30 (Figure 94).

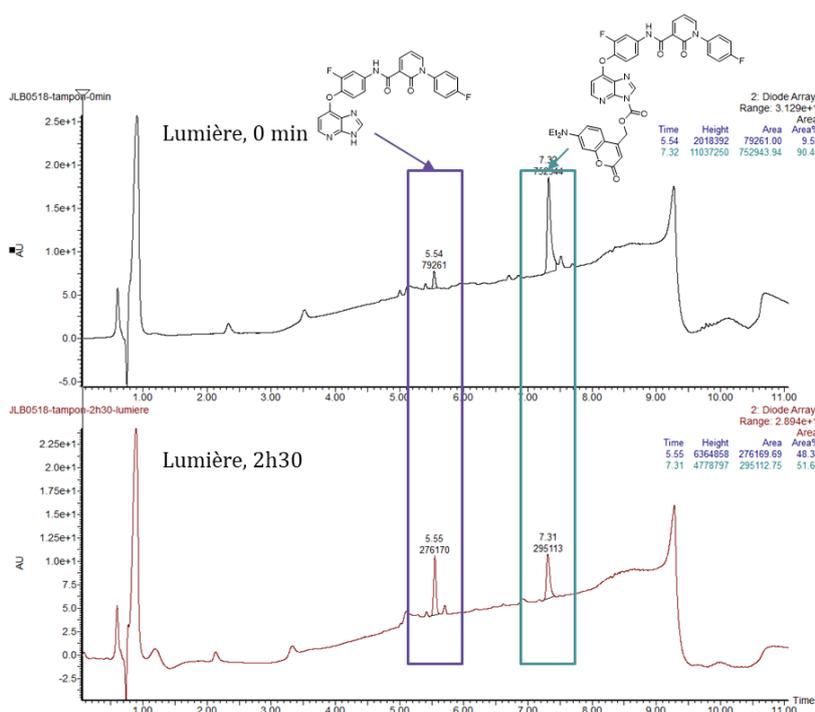


Figure 94 : Stabilité de **40c** dans le tampon à la lumière naturelle

En laissant la solution dans le noir, celle-ci n'évolue quasiment pas (on passe de 9 à 13 % de produit clivé en 2h30) (Figure 95).

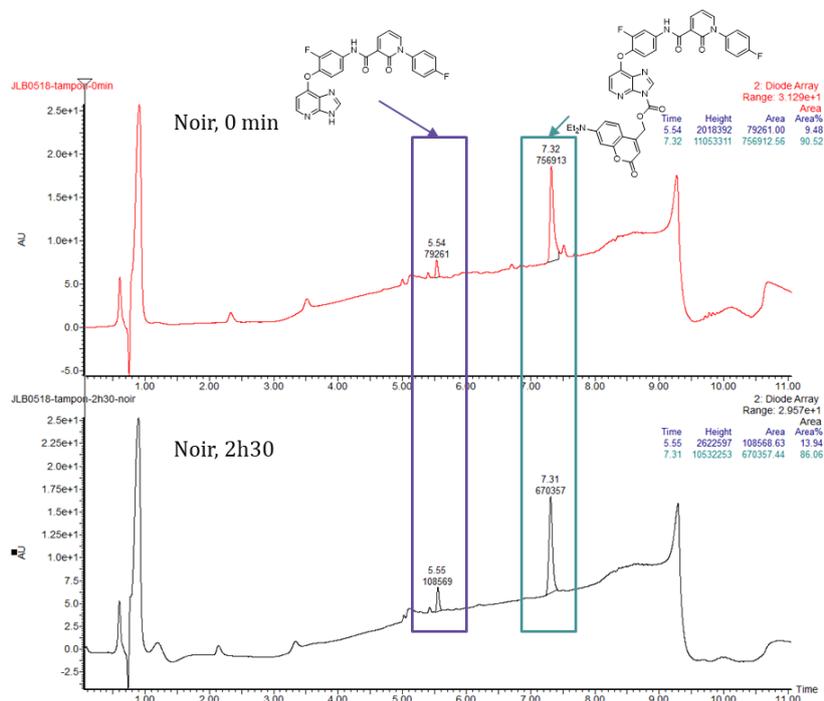


Figure 95 : Stabilité de **40c** dans le tampon dans le noir

Le manque de stabilité à la lumière du composé **40c** (et par extension du composé **62c**) laisse présager des difficultés de manipulation lors de l'évaluation biologique. En effet, lors de la préparation des gammes de concentration des molécules **40c** et **62c**, on peut penser qu'une partie des molécules seront clivées avant même d'avoir commencé les périodes d'incubation avec la protéine. L'activité biologique alors mesurée ne reflètera donc peut-être pas l'activité réelle de l'inhibiteur portant le groupement photo-labile coumarine carbamate.

3. Evaluation biologique

L'activité des inhibiteurs portant les groupements photo-labiles coumarine carbamate a été uniquement évaluée sur Tyro3. En effet pour des considérations de temps, nous avons choisi de ne pas inclure Mer pour laquelle seul l'inhibiteur **61** portant l'isopropyle en position 2 montrait une perte d'activité dans sa version cagée. L'activité sur Axl n'a pas pu être évaluée, les lots d'enzyme commandés étant trop peu actifs.

Les conditions optimisées pour l'évaluation sur Tyro3 sont les suivantes : 25 ng/puits d'enzyme, 10 μ M d'ATP, 250 μ g/mL de peptide et 2 heures d'incubation. La quantité de protéine a été largement augmentée par rapport aux précédents tests, ce lot de Tyro3 étant beaucoup moins actif que le précédent.

Malheureusement comme nous le craignons, les résultats obtenus pour le composé **40c** n'ont pas été reproductibles (Figure 96). Lors du premier test, la courbe dose-réponse est cohérente et donne une IC_{50} de 58 nM. Lorsque l'expérience a été reproduite, on observe que le composé est très toxique, même à de très faibles concentrations. En effet, à la plus petite concentration en composé testée (0,06 nM), l'activité de la protéine est toujours inférieure à 50% (par rapport à l'activité de la protéine sans molécule).

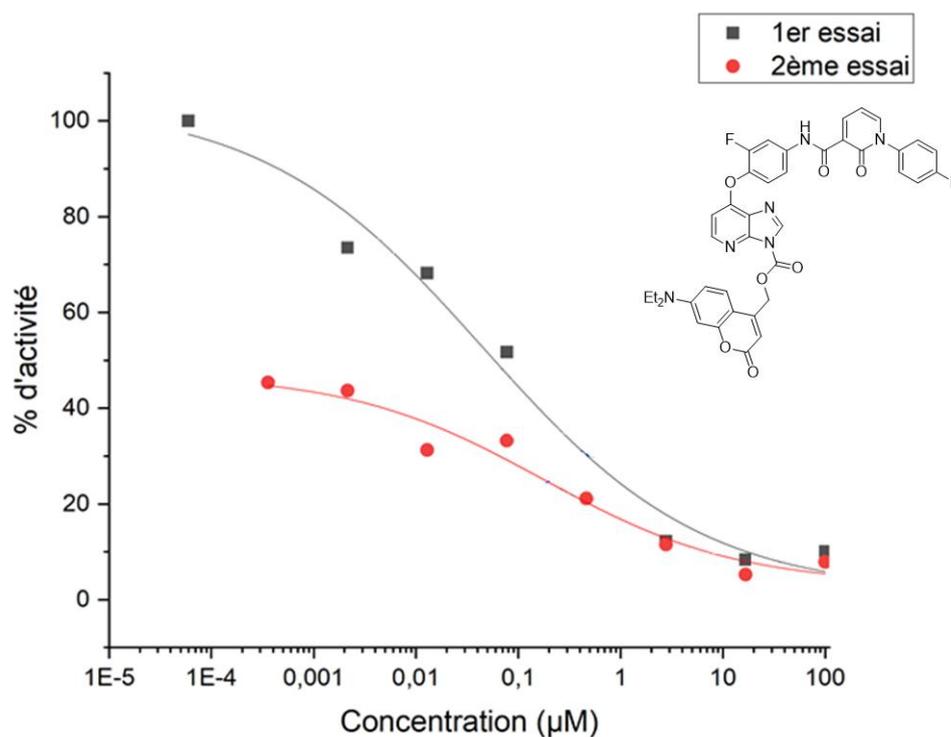


Figure 96 : Mesure de l'activité de **40c**

Nous avons cherché à savoir si la coumarine **94** relâchée lors du photo-clivage était elle-même active sur Tyro3 en l'incluant dans les tests biologiques (Schéma 22), mais nous avons constaté que ce n'est pas le cas.

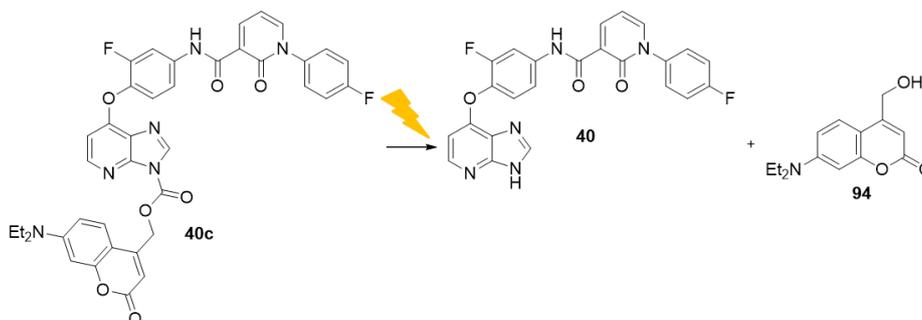


Schéma 22 : Photo-clivage du composé **94**

Enfin, le composé **62** ne montrait pas d'activité sur Tyro3. Son analogue portant la coumarine carbamate n'est lui non plus pas actif sur la protéine.

VII. Conclusions et perspectives

L'objectif de ce second projet était de synthétiser des inhibiteurs de la famille TAM dont l'activité peut être contrôlée par la lumière. Nous avons choisi d'appliquer le concept des molécules photo-clivables, en installant un groupement photo-labile sur une série d'inhibiteurs déjà synthétisés au laboratoire⁵, sur une position indispensable à l'activité des molécules, l'azote N3.

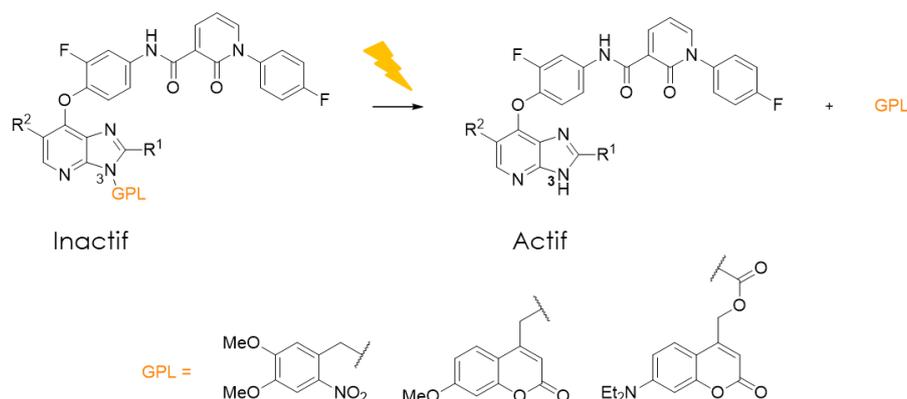
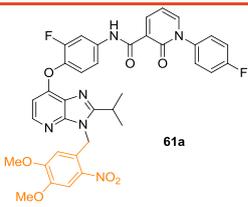
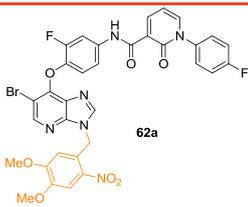
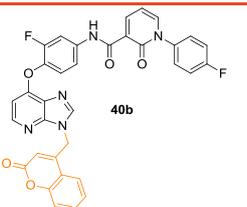
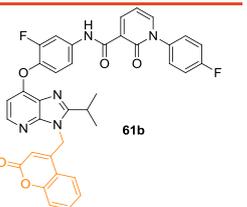


Schéma 23 : Principe des inhibiteurs photo-contrôlables

Dans un premier temps, nous avons installé les groupements DMNB et 7-MCM. Les composés protégés par le DMNB en solution à 10 μM dans le DMSO ont pu être photo-clivés totalement en moins de 10 minutes à 350 nm. En revanche, ceux portant le groupement 7-MCM n'ont pas pu être photo-déprotégés. Nous avons donc modifié la nature du lien entre l'inhibiteur et la coumarine, passant d'un lien benzylique à un lien carbamate. Ces composés ont montré une vitesse de clivage comparable à ceux portant le DMNB. Toutefois, ils se sont avérés instables à la lumière du jour, notamment en milieu aqueux, ce qui rend leur manipulation pour les tests biologiques difficile.

Au final, 4 molécules sur les 8 synthétisées ont montré une perte d'activité sur au moins une des trois protéines de la famille TAM (Tableau 10). Seules les molécules portant le groupement photo-labile DMNB ont pu être photo-déprotégés, les 7-MCM ne se clivant pas dans nos conditions expérimentales. La modification du lien benzylique entre la coumarine et l'inhibiteur par un lien carbamate n'est pas concluante, la molécule devenant trop sensible à la lumière et impossible à manipuler, notamment pour l'évaluation biologique. La restauration de l'activité inhibitrice a pu être réalisée pour le composé **61a**. Pour le composé **62a**, l'expérience n'a pas pu être réalisée, car la protéine Axl était trop peu active.

Tableau 10 : Récapitulatif des inhibiteurs photo-contrôlables synthétisés

Composé				
Perte d'activité	✓	✓	✓	✓
Photo-clivage	✓	✓	✗	✗
Restauration de l'activité sous irradiation	✓	n.t.		

Les expériences de modélisation moléculaire n'ont pas permis de comprendre entièrement pourquoi la présence d'un groupement sur l'azote N3 de l'imidazopyridine induit une perte d'activité dans certains cas mais pas dans d'autre. Nous avons toutefois pu constater que le DMNB ou la 7-MCM étaient capables d'entrer dans le site actif des protéines de la famille TAM et d'établir des interactions avec celui-ci, ce qui peut expliquer la faible différence d'activité entre les inhibiteurs et leurs analogues portant les groupements photo-labiles. L'installation de groupements plus volumineux du type nitrodibenzofurane permettrait peut-être d'induire un clash stérique plus important et donc une perte d'activité systématique.

L'une des limitations de ce projet est la faible activité des inhibiteurs de type imidazopyridine (de l'ordre du μM). De plus, ces molécules ne sont actives qu'*in vitro*, et pas *in cellulo*. La différence d'activité entre l'inhibiteur et son pendant photo-clivable est donc moins importante que pour des inhibiteurs dont l'activité serait de l'ordre du nM. De plus, il serait intéressant de voir si le concept d'inhibiteurs photo-contrôlables de la famille TAM est applicable en milieu cellulaire.

Pour cela, on pourrait installer des groupements photo-labiles sur deux inhibiteurs de TAM plus actifs que nos imidazopyridines : le BMS-777607⁴⁹ et l'UNC2025⁴⁷ (Figure 97). Les structures cristallines nous indiquent que les azotes indiqués en orange sont d'importants donneurs de liaison hydrogène indispensables à l'activité de la molécule. La version N-méthylée d'UNC2025 montre des IC_{50} 280 à 650 fois supérieures sur la famille TAM. L'installation d'un groupement photo-labile sur cet azote est donc susceptible d'induire une perte d'activité très significative de façon systématique. De plus, UNC2025 est également actif *in cellulo* (ce qui n'est en revanche pas le cas de BMS-777607). L'installation de groupements clivables à deux photons est également envisagée, ce qui nous permettrait de travailler à des longueurs d'ondes plus appropriées aux milieux biologiques.

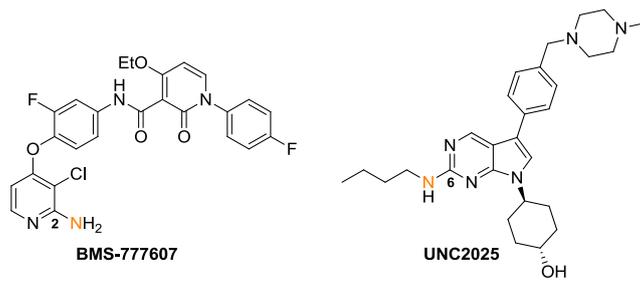


Figure 97 : Inhibiteurs de TAM candidats pour la photo-activation

Chapitre III : Exploitation de la réactivité
inhabituelle du DABCO(SO₂)₂ :
sulfénylation directe d'imidazopyridines

I. Introduction

1. Sulfonylation d'hétérocycles

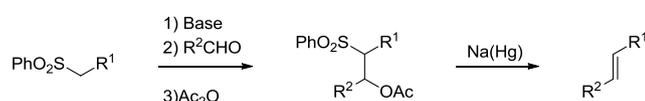
Le lien carbone-soufre est très répandu dans les molécules naturelles et synthétiques et joue un rôle important dans les processus biochimiques des organismes. De ce fait, on le retrouve fréquemment dans les composés à visée pharmaceutique. Plus particulièrement, le motif sulfone est utilisé dans les milieux pharmaceutiques et agro-alimentaires (Figure 98).⁸⁹



Figure 98 : Molécules possédant une fonction sulfone

En synthèse organique, les sulfones sont des intermédiaires polyvalents pouvant par exemple jouer le rôle de groupement partant, de groupement électroattracteur dans des accepteurs de Michael ou stabiliser des carbanions⁹⁰, ce qui leur a valu le surnom de « caméléons chimiques ». ⁹¹ L'oléfination de Julia ou la réaction de van Leusen permettent respectivement la synthèse d'alcènes et d'oxazoles à partir de sulfones (Schéma 24).

Oléfination de Julia



Synthèse d'oxazoles de van Leusen

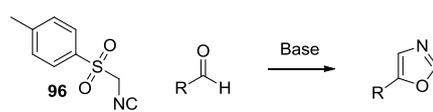


Schéma 24 : Réactions de Julia et de van Leusen

Les méthodes classiques de synthèse de sulfones consistent en l'oxydation de thioéthers, la sulfonylation aromatique de type Friedel-Crafts, l'alkylation ou l'arylation de sulfinates ou l'addition radicalaire entre des halogénures de sulfonyles et des composés insaturés (Schéma 25).⁹⁰ Ces méthodes souffrent de nombreux inconvénients, comme des conditions dures, la faible disponibilité des réactifs soufrés et la génération de déchets toxiques.

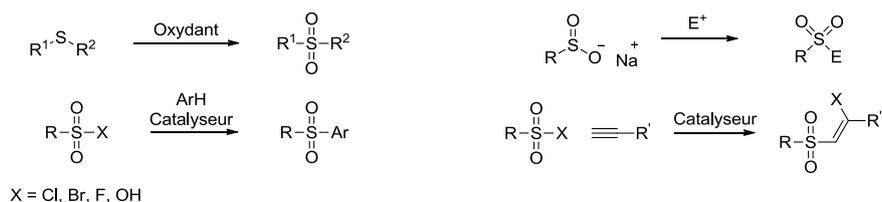


Schéma 25 : Méthodes classiques de synthèse de sulfones

Plus récemment, de nombreuses conditions de couplages métallo-catalysés ont vu le jour. Ces méthodes offrent souvent des conditions plus douces que celles exposées ci-dessus, et permettent donc une plus grande tolérance fonctionnelle. La plupart proposent un couplage entre un sulfinate ou un chlorure de sulfonyle et un partenaire pré-fonctionnalisé (Schéma 26).⁹⁰

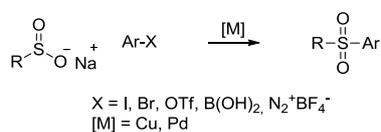


Schéma 26 : Synthèse de sulfones par couplage métallo-catalysé

Dans un souci d'économie d'atomes et d'étapes, la fonctionnalisation directe de liaisons C-H a été explorée mais reste encore limitée. La plupart des exemples de la littérature utilisent comme partenaire soufré des sulfonates ou des dérivés d'acide sulfonique (Schéma 27).^{90,92}

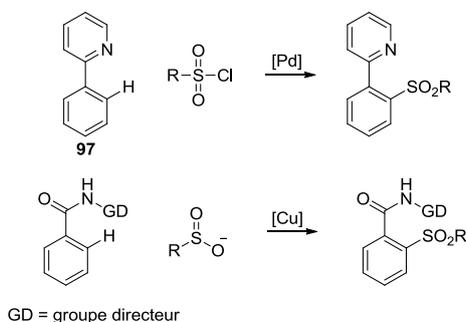


Schéma 27 : Exemples de sulfonylation directe de liaison C-H

Toutefois, l'utilisation de partenaire contenant déjà le groupement SO₂ apparaît comme une limitation importante, ces composés étant peu disponibles commercialement et parfois fastidieux à synthétiser. Des approches de couplage à trois composants ont donc émergé afin d'insérer directement le dioxyde de soufre, mais les exemples de fonctionnalisation C-H avec insertion directe de SO₂ restent encore rares (Schéma 28).^{90,93} Afin d'éviter la manipulation directe du dioxyde de soufre, gaz toxique et corrosif, des précurseurs de SO₂ comme le métabisulfite de sodium ou de potassium, ou encore le DABCO.(SO₂)₂, un adduit de DABCO et de dioxyde de soufre, peuvent être utilisés.⁹⁴

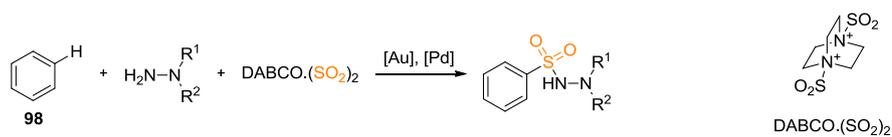


Schéma 28 : Exemple de couplage sulfonlant à trois composantes

Concernant les hétérocycles, peu de méthodologies de sulfonation par fonctionnalisation de liaison C-H sont à ce jour décrites dans la littérature.^{92,93} Des conditions de sulfonation d'indole utilisant des sulfinates ont été proposées par Yang en 2016.⁹⁵ Deux jeux de conditions permettent le couplage sélectivement sur le carbone C-3 ou le carbone C-2 (Schéma 29, a). L'équipe de Liu décrit l'année suivante des conditions de couplage à trois composantes avec insertion de SO₂ dans la liaison C-H entre deux partenaires non soufrés, un 1-(pyridin-2-yl)indole et un sel de diazonium. Le DABCO.(SO₂)₂ joue le rôle de précurseur de dioxyde de soufre.⁹⁶ Le groupement protecteur joue le rôle de groupement directeur pour une sélectivité sur le carbone C-2 (Schéma 29, b).

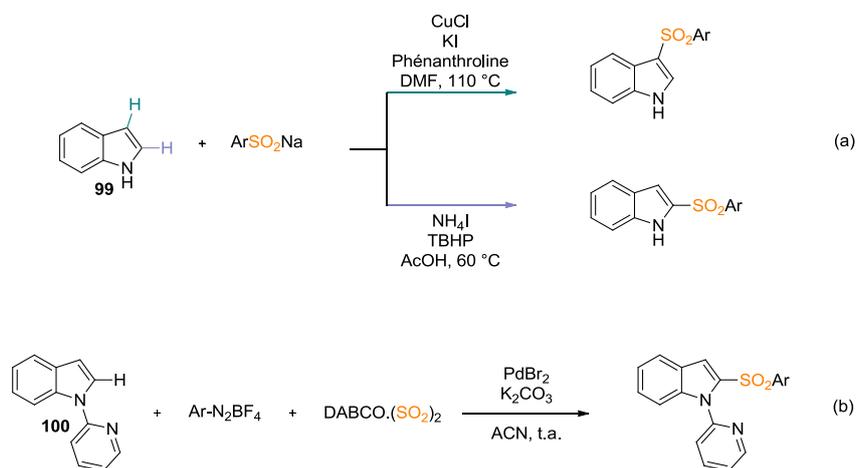


Schéma 29 : Sulfonation d'indoles

En 2018, l'équipe de Guo propose une méthode de sulfonation d'imidazo[1,2-*a*]pyridines à partir d'aryles sulfinates (Schéma 30, a).⁹⁷ La même année, l'équipe de Yang propose des conditions de couplage à trois composantes entre ce même hétérocycle, un dérivé iodé et le DABCO.(SO₂)₂ catalysé par le cuivre (Schéma 30, b).⁹⁸

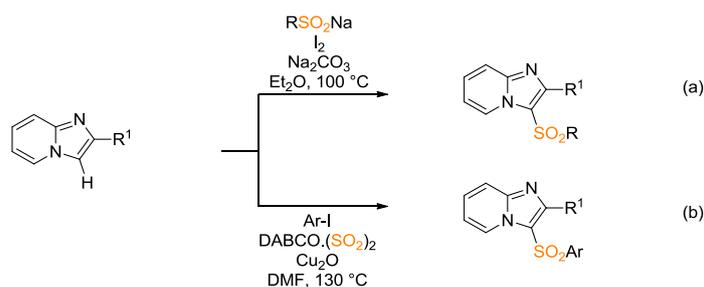


Schéma 30 : Conditions de sulfonation d'imidazo[1,2-*a*]pyridines

Forts de notre expérience concernant la fonctionnalisation C-H d'imidazo[4,5-*b*]pyridines^{6,7}, nous avons voulu développer des conditions de sulfonylation directe de cet hétérocycle (Schéma 31). Pour développer cette réaction, nous voulions réaliser un couplage à trois composantes entre l'hétérocycle, un partenaire de couplage de type iodoaryle ou acide boronique, et un précurseur de SO₂ qui nous permettrait d'éviter la manipulation directe de ce gaz toxique.



Schéma 31 : Sulfonylation d'imidazo[4,5-*b*]pyridines

Nous avons commencé par appliquer les conditions de Yang présentées plus haut (Schéma 30, b) à nos imidazo[4,5-*b*]pyridines, malheureusement sans succès, le produit de départ étant totalement récupéré. De plus, lorsque nous avons tenté de reproduire les expériences de Yang avec les mêmes substrats que celui-ci, aucune trace du produit désiré n'a été observée, le produit de départ étant là aussi récupéré entièrement (Schéma 32).

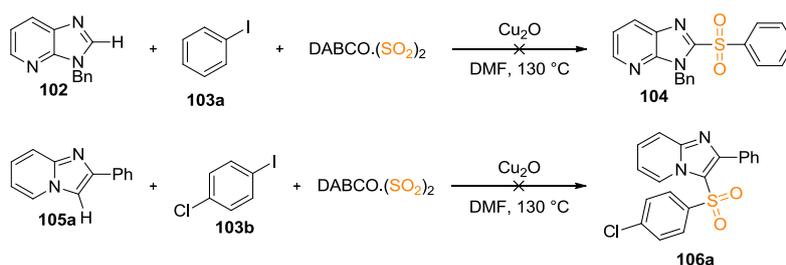


Schéma 32 : Application des conditions de Yang

Intrigués par ces résultats, nous avons repris des conditions d'arylation directe d'imidazo[1,2-*a*]pyridines décrites par Cao, auxquelles nous avons rajouté le DABCO.(SO₂)₂ comme source de SO₂.⁹⁹ A notre grande surprise, nous n'avons pas isolé le produit de sulfonylation **106b**, mais celui de sulfénylation **108a** (Schéma 33).

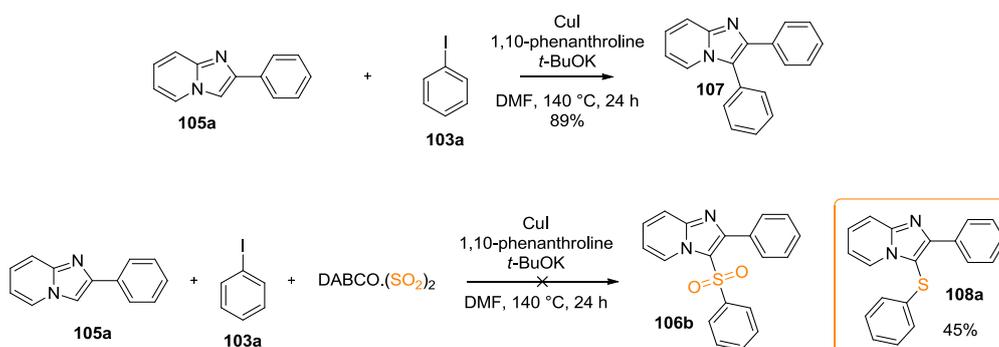
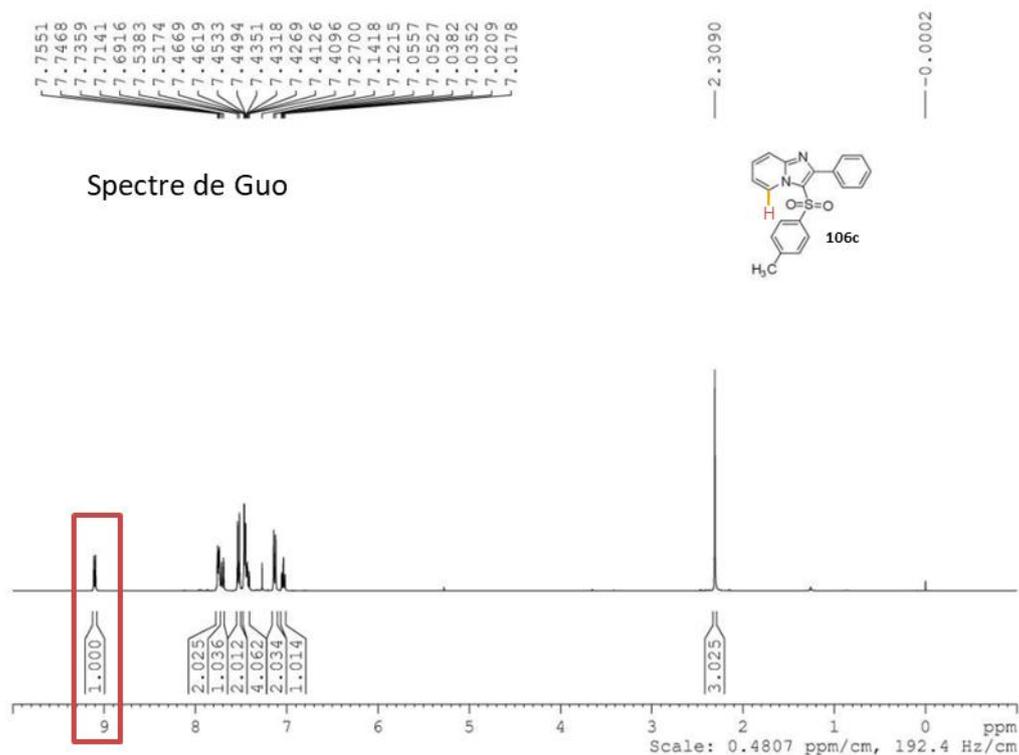


Schéma 33 : Essai de sulfonylation d'imidazo[1,2-*a*]pyridines

Nous avons voulu comparer les spectres RMN des produits de sulfonylation publiés par l'équipe de Guo et celle de Yang. Nous avons ainsi constaté que pour un même composé, les spectres des deux équipes étaient différents. Si l'on compare les spectres de la 2-phényl-3-tosylimidazo[1,2-*a*]pyridine **106c**, on peut voir dans le spectre décrit par Guo un signal caractéristique vers 9 ppm correspondant à l'hydrogène en position 5. Les résultats de Guo sont appuyés par une structure cristalline par diffraction aux rayons X. Ce signal à 9 ppm est absent dans les composés de Yang (Figure 99). Le spectre de Yang correspond en revanche exactement à la 2-phényl-3-(*p*-tolylthio)imidazo[1,2-*a*]pyridine **108b**, le produit de réaction de sulfénylation que nous avons obtenu par la suite (Figure 100). Nous pouvons affirmer sans ambiguïté que nous avons obtenu le produit de sulfénylation, nos spectres RMN concordant avec la littérature de sulfénylation. Nos résultats sont appuyés par des analyses par LC-MS montrant un *m/z* correspondant à la masse du produit de sulfénylation. Une analyse par spectroscopie infra-rouge de notre composé montre l'absence des bandes d'absorption entre 1370-1270 et 1170-1110 cm^{-1} caractéristiques des sulfones. Ces bandes sont bien présentes dans le composé de Guo que nous avons synthétisé à titre de comparaison.

Nous avons donc estimé que l'équipe de Yang a mal interprété les données spectroscopiques de leurs composés, et qu'ils ont obtenu les produits de sulfénylation. Toutefois, nous n'avons jamais retrouvé de trace de ces composés sulfénylés en reproduisant leurs travaux.



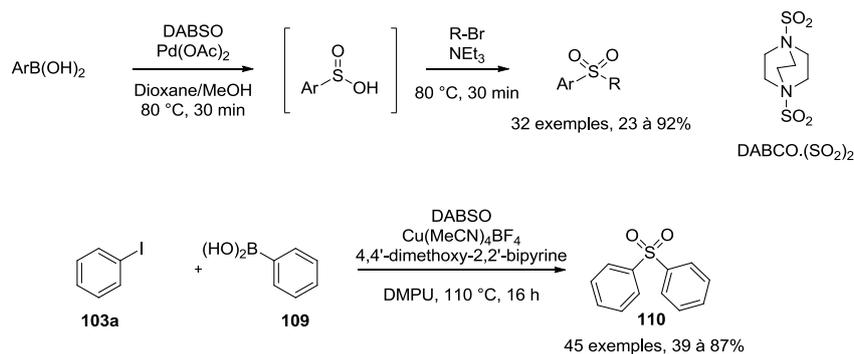


Schéma 34 : Exemples de couplages sulfonylants utilisant DABCO.(SO₂)₂

Ce précurseur de SO₂ n'a en revanche jamais été utilisé comme source de soufre dans des réactions de sulfénylation. Nous avons donc décidé d'exploiter cette réactivité inattendue du DABCO.(SO₂)₂ pour développer une nouvelle méthodologie de sulfénylation d'imidazo[1,2-*a*]pyridines.

2. Sulfénylation d'imidazo[1,2-*a*]pyridine

Les imidazo[1,2-*a*]pyridines sont des isomères d'imidazo[4,5-*b*]pyridines, néanmoins les propriétés physico-chimiques de ces deux hétérocycles sont complètement différentes.¹ Les imidazo[1,2-*a*]pyridines sont l'isomère le plus représenté dans les applications pharmaceutiques. On retrouve ce motif dans de nombreux médicaments sur le marché, comme le Zolpidem ou l'Alpidem, utilisés respectivement pour le traitement de l'insomnie et de l'anxiété (Figure 101).



Figure 101 : Structures du Zolpidem (à gauche) et de l'Alpidem (à droite)

De nombreuses méthodologies de sulfénylation d'imidazo[1,2-*a*]pyridines ont été publiées dans la littérature des dernières années.

a. Sulfénylations d'imidazo[1,2-*a*]pyridines métallo-catalysées

Plusieurs systèmes catalytiques ont été décrits dans la littérature, les partenaires de couplages ainsi que la source de soufre variant. Ravi¹⁰⁴ et Wu¹⁰⁵ publient en 2016 et 2017 respectivement

des conditions de couplage à trois composantes avec des dérivés iodés et du soufre moléculaire catalysé par l'iodure de cuivre (I). La méthodologie de Wu s'étend aux alkyles (Schéma 35).

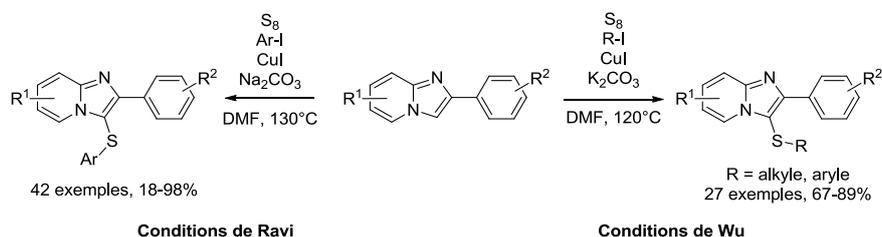


Schéma 35 : Conditions de sulfénylation de Ravi et Wu

L'équipe de Li propose en 2016 une méthode de couplage d'indoles et d'imidazo[1,2-*a*]pyridines avec des acides boroniques et du soufre moléculaire catalysé par le palladium et le cuivre.¹⁰⁶ En 2017, Zhu présente un couplage similaire catalysé par le chlorure de cobalt (II).¹⁰⁷ L'année suivante, un couplage catalysé par l'iodure de cuivre (I) est proposé par Xiao (Schéma 36).¹⁰⁸

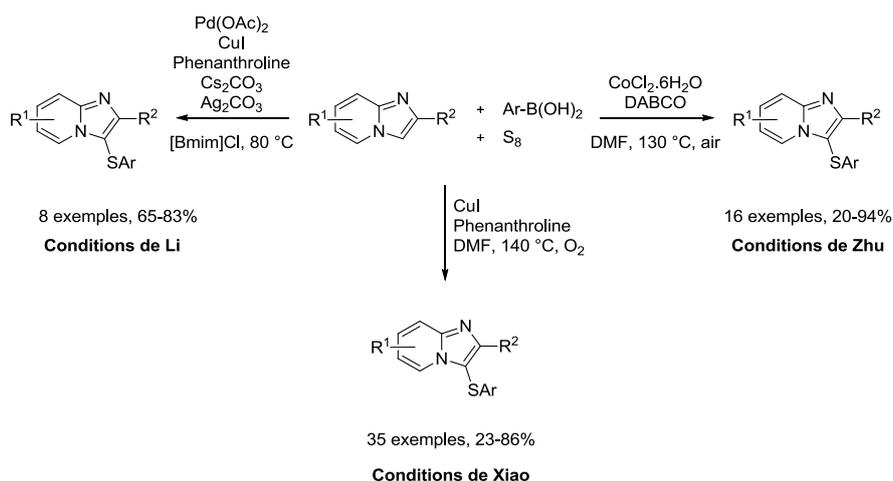


Schéma 36 : Conditions de sulfénylation métallo-catalysée utilisant des acides boroniques et S_8

D'autres sources de soufre ont également été exploitées, comme les thiols par Zheng¹⁰⁹ et Cao¹¹⁰ dans une catalyse au cuivre, des chlorures d'acide sulfonique par Ravi¹¹¹, ou le thiosulfate de sodium par Ding (Schéma 37).¹¹²

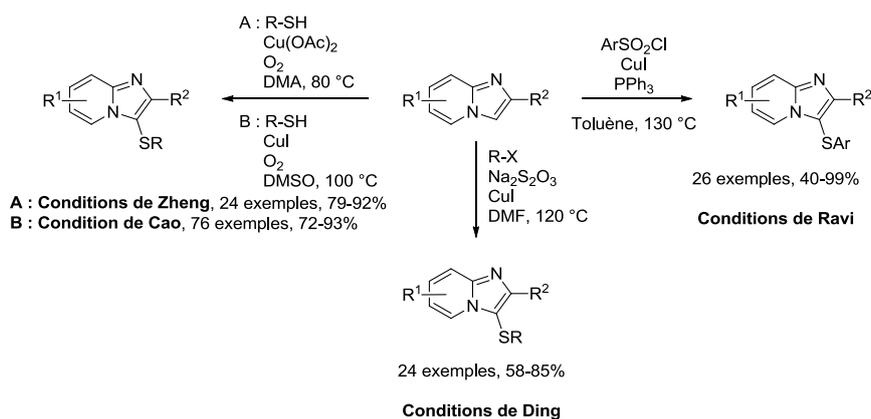


Schéma 37 : Conditions de sulfénylation cupro-catalysée utilisant d'autres sources de soufre

b. Sulfénylations d'imidazo[1,2-*a*]pyridines non catalysées par des métaux

Plusieurs méthodes de sulfénylation n'utilisant pas de métaux de transition ont également été développées ces dernières années, les sources de soufre étant variées.

L'équipe de Braga a développé trois jeux de conditions utilisant des disulfides et le diiode ou une source d'iodures, avec des rendements allant jusqu'à 96% (Schéma 38).¹¹³⁻¹¹⁵ La réaction avec un disélényde permet la sélénylation en position C-3. Ces conditions sont également applicables à d'autres hétérocycles comme l'indole, l'indazole ou l'imidazothiazole.

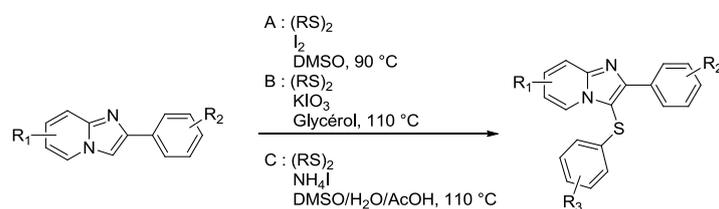


Schéma 38 : Conditions de Braga

Huang¹¹⁶ et Guo⁹⁷ proposent des conditions de sulfénylation à partir d'arylsulfonates, de diiode et de triphénylphosphine. En 2016, le groupe de Ding présente une méthodologie de sulfénylation de divers hétérocycles, notamment de flavones, d'indoles et d'imidazo[1,2-*a*]pyridines utilisant également les arylsulfonates et l'iodure d'ammonium (Schéma 39).

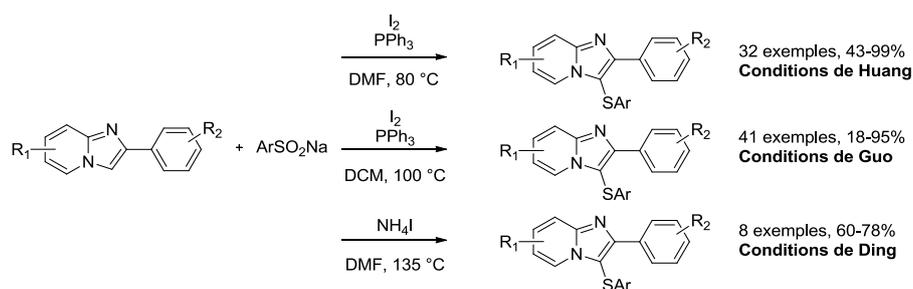


Schéma 39 : Conditions de sulfénylation utilisant des sulfonates

En 2014, le groupe d'Adimurthy publie une méthode de sulfénylation utilisant des thiols catalysée par le N-chlorosuccinimide.¹¹⁷ Plus récemment, Kong utilise également les thiols dans une catalyse par l'iodure de potassium et un oxydant, l'hydroperoxyde de *tert*-butyle (Schéma 40).¹¹⁸

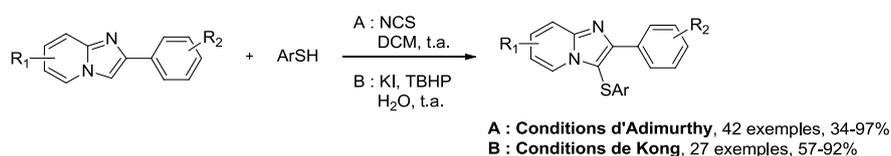


Schéma 40 : Conditions de sulfénylation utilisant des thiols

Il est également possible de réaliser la réaction de sulfénylation sans catalyseur métallique en utilisant le soufre moléculaire. Zhu propose des conditions de réaction faisant intervenir des alcools, le diiode et la triphénylphosphine.¹⁰⁷ L'année suivante, Zhang publie une méthode utilisant des bromures d'alkyles et la N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine (Schéma 41).¹¹⁹

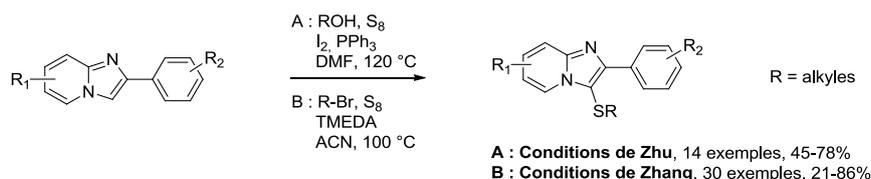


Schéma 41 : Conditions de sulfénylation utilisant le soufre moléculaire

Enfin, l'équipe d'Adimurthy propose des conditions de sulfénylation à partir de sulfonothioates dans l'eau.¹²⁰ L'année suivante, Chowdhury décrit des conditions similaires à partir de sulfonyl hydrazides, connus comme précurseurs de sulfonothioates (Schéma 42).¹²¹ Ces méthodologies sont toutefois limitées par le faible nombre de sulfonothioates ou de sulfonyl hydrazides disponibles commercialement.

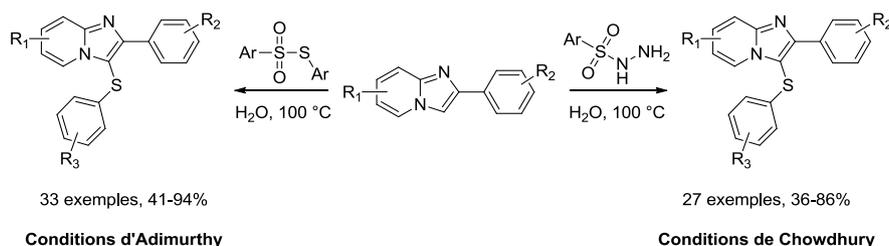


Schéma 42 : Conditions de sulfénylation à partir de sulfonothioates

c. Sulfénylations d'imidazo[1,2-*a*]pyridine par photocatalyse

Deux méthodes de synthèse de 3-sulfénylimidazopyridines par photocatalyse ont été décrites par Sun¹²² en 2017 et par Rahaman¹²³ l'année suivante. Le premier utilise des acides sulfoniques en présence d'un oxydant, le second des thiols (Schéma 43).

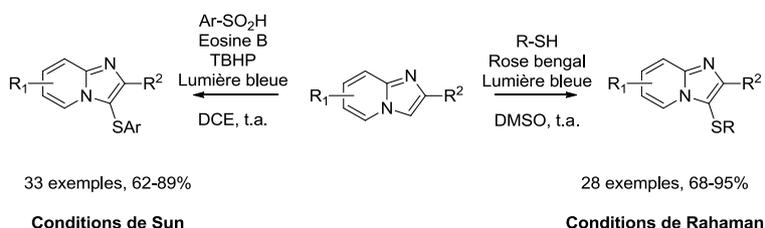


Schéma 43 : Sulfénylation photocatalysée

Les méthodologies de sulfénylation directe d'imidazo[1,2-*a*]pyridines sont donc nombreuses et variées, mais la plupart utilisent des dérivés soufrés peu disponibles commercialement et peu respectueux de l'environnement. Plusieurs exemples de couplage à trois composants utilisant le soufre moléculaire sont décrits, mais le DABCO.(SO₂)₂ n'a jamais été utilisé dans des réactions de sulfénylation. Nous avons donc décidé d'exploiter cette nouvelle réactivité et d'optimiser les résultats obtenus lors de nos premiers essais.

II. Résultats

1. Optimisation des conditions

A partir des premiers résultats obtenus (Schéma 44), les différents paramètres réactionnels (catalyseur, ligand, température, etc) ont été étudiés afin d'améliorer l'efficacité de la réaction. Il est rapidement apparu que la pureté du DABCO.(SO₂)₂ était indispensable à la reproductibilité des résultats. En effet, selon le lot et le fournisseur de DABCO.(SO₂)₂, les rendements peuvent chuter de moitié.

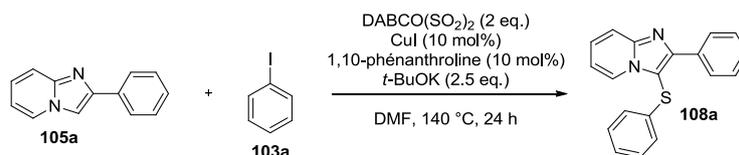


Schéma 44 : Conditions initiales de sulfénylation
2-phénylimidazo[1,2-a]pyridine (0.51 mmol), iodobenzène (2 eq), DABCO.(SO₂)₂ (2 eq), CuI (10 mol%), 1,10-phénanthroline (10 mol%), t-BuOK (2.5 eq), DMF (2 mL)

a. Optimisation du catalyseur

Dans un premier temps, différents sels de cuivre (I) à 10 mol% ont été utilisés (Tableau 11). L'oxyde de cuivre (I) ainsi que le chlorure de cuivre permettent la réaction avec un rendement légèrement inférieur (58 et 54% respectivement, entrées 2 et 3). Le thiophène-2-carboxylate de cuivre, le bromure de cuivre complexé au diméthylsulfite ainsi que (iPr)₂NHCuCl (chlorure de cuivre complexé à un ligand NHC, Figure 102) mènent à des rendements autour de 40% (entrées 4 à 6). Enfin, le bromure de cuivre est le catalyseur le moins performant avec un rendement de 18% (entrée 7). On peut voir que le catalyseur est indispensable à la réaction (entrée 8). Finalement, la diminution de la charge catalytique n'engendre pas de perte de rendement, alors que son augmentation est délétère (entrée 9 et 10). Pour la suite de l'optimisation, nous avons choisi d'utiliser l'iodure de cuivre à 10 mol% qui mène aux meilleurs rendements tout en étant le plus reproductible.

Tableau 11 : Criblage des catalyseurs

Entrée	Catalyseur	Rendement
1	CuI	68%
2	Cu ₂ O	58%
3	CuCl	54%
4	CuTC	41%
5	CuBr.SMe ₂	40%
6	(iPr) ₂ NHCuCl	47%
7	CuBr	18%
8	/	traces
9	CuI 5 mol%	68%
10	CuI 20 mol%	13%

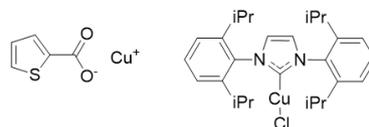
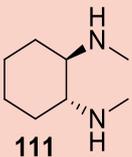


Figure 102 : Structure de CuTC (à gauche) et de (iPr)₂NHCuCl (à droite)

b. Optimisation du ligand

Dans un deuxième temps, différents ligands ont été utilisés (Tableau 12). Il est important de noter que sans ligand, la réaction n'a pas lieu (entrée 2). La triphénylphosphine est également inefficace (entrée 3). En revanche, la bipyridine ainsi que la diméthylcyclohexanediamine permettent la réaction, avec des rendements toutefois inférieurs à celui obtenu avec la 1,10-phénanthroline (entrées 4 et 5). Pour la suite de l'optimisation, nous avons donc choisi la 1,10-phénanthroline.

Tableau 12 : Optimisation du ligand

Entrée	Ligand	Rendement
1	1,10-phénanthroline	68%
2	/	-
3	PPh ₃	-
4	2,2'-bipyridine	58%
5		52%

c. Optimisation de la base

Nous avons ensuite voulu étudier l'influence de la base (Tableau 13). Il est intéressant de noter que sans base, des traces de produit de sulfénylation sont observées (entrée 2). Le carbonate de césium ou de sodium ne permettent pas la réaction (entrées 3 et 4). Lorsque le *tert*-butylate de lithium ou l'acétate de potassium sont utilisés, le rendement chute de façon importante (entrée 5 et 6). Nous avons donc décidé de conserver le *tert*-butylate de potassium pour la suite de l'optimisation.

Tableau 13 : Optimisation de la base

Entrée	Base	Rendement
1	<i>t</i> -BuOK	68%
2	/	Traces
3	Cs ₂ CO ₃	-
4	Na ₂ CO ₃	-
5	<i>t</i> -BuOLi	30%
6	KOAc	21%

d. Optimisation du solvant

Par la suite, nous avons choisi de modifier le solvant de la réaction (Tableau 14). Il apparaît clairement que la réaction n'a lieu dans aucun autre solvant que le DMF (entrées 2 à 7). L'ajout d'eau est délétère, mais n'empêche pas totalement la réaction (entrée 8).

Tableau 14 : Optimisation des solvants

Entrée	Solvant	Rendement
1	DMF	68%
2	Toluène	-
3	Dioxane	-
4	Acétonitrile	-
5	NMP	-
6	Dichloroéthane	-
7	DMSO	-
8	DMF + 50 μ L d'eau	35%

e. Optimisation de la température et de la durée de réaction

Nous avons décidé d'étudier l'influence de la température et du temps de chauffage (Tableau 15). En abaissant la température à 110 °C, la réaction n'a plus lieu, tandis que l'augmenter à 160 °C est néfaste (entrées 2 et 3). En écourtant la durée de réaction à 7 heures, aucun produit de sulfénylation ne s'est formé, alors qu'après 15 heures la réaction semble terminée (entrées 4 et 5).

Tableau 15 : Optimisation de la température et de la durée de réaction

Entrée	Température	Durée	Rendement
1	140 °C	24 h	68%
2	110 °C	60 h	-
3	160 °C	24 h	23%
4	140 °C	7h	-
5	140 °C	15 h	68%

Il faut mentionner que la réaction n'a pas lieu lorsque l'acide phénylboronique est utilisé comme partenaire de couplage à la place de l'iodobenzène. Lorsque le bromobenzène est utilisé, le rendement chute significativement à 13%. Il est notable qu'une montée en échelle avec 1.5 mmol d'imidazopyridine conduit à l'obtention du produit sulfénylé avec 66% de rendement.

De plus, la différence de rendement lorsque la réaction est réalisée sous air ou sous argon n'est pas significative. Toutefois, au cours de l'exemplification, des problèmes de reproductibilité sont apparus, avec des rendements passant de 2% sous air à 60% sous argon. Les réactions ont donc été réalisées sous atmosphère inerte.

En conclusion, nous avons choisi les conditions réactionnelles suivantes : 2-phénylimidazo[1,2-*a*]pyridine (0,51 mmol), iodobenzène (2 eq.), DABCO.(SO₂)₂ (2 eq.), CuI (10 mol%), 1,10-phénanthroline (10 mol%), *t*-BuOK (2,5 eq.), DMF, 140 °C, 24 h.

2. Exemplification

Une fois les conditions réactionnelles optimisées, nous avons voulu étudier l'étendue de la réaction en utilisant des iodobenzènes différemment substitués (Schéma 45).

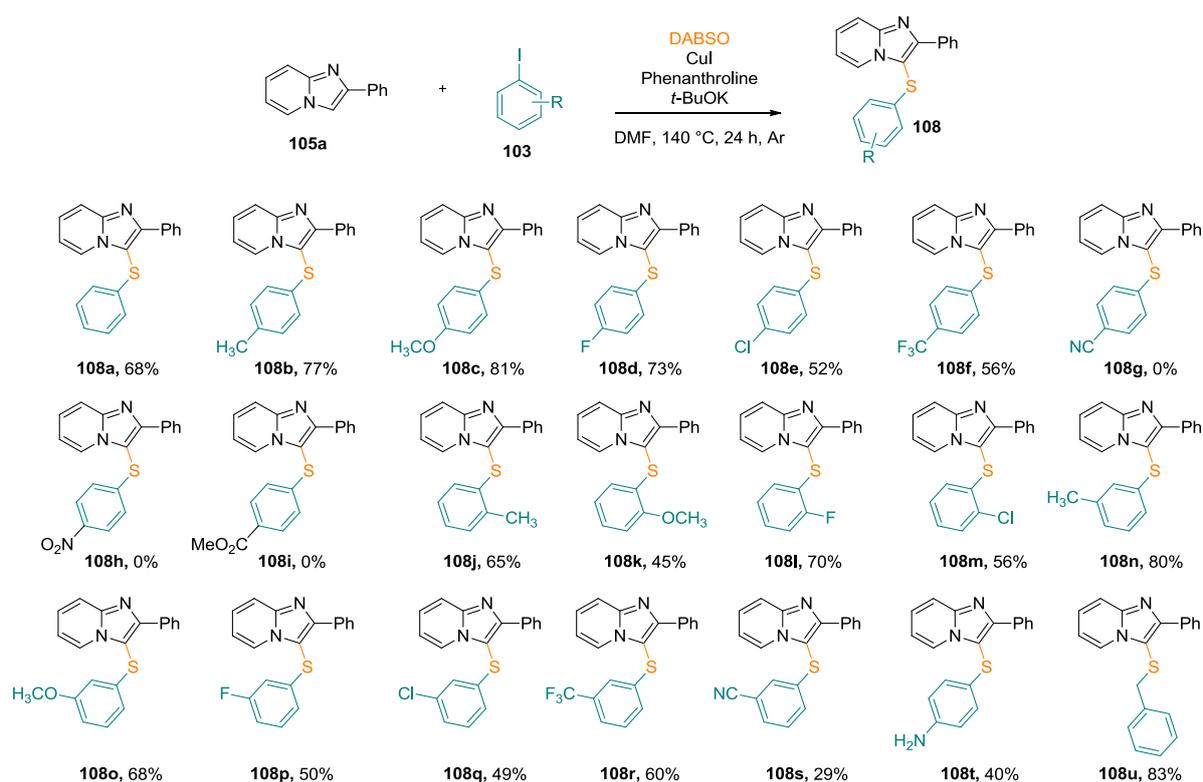


Schéma 45 : Exemplification avec différents dérivés halogénés

On peut observer que la réaction de sulfénylation est favorisée pour des iodobenzènes portant des groupements électrodonneurs (-CH₃, -OCH₃) et halogénés (-F, -Cl), avec des rendements allant de 45 à 81%. La position de ces substituants n'a pas d'influence, puisque même les iodobenzènes ortho-substitués conduisent à des rendements corrects (entre 45 et 70%). Le groupement -CF₃ est également toléré. En revanche, des groupements fortement électroattracteurs comme un nitro, un nitrile ou un ester empêchent la réaction, à l'exception du composé **108s** qui porte un groupement cyano en position méta. De façon surprenante, le composé **108t** portant une amine libre en position para est obtenu avec un rendement correct de 40%. Enfin, la réaction avec le bromure de benzyle conduit à la formation du composé **108u** avec un bon rendement de 83%.

Dans un second temps, nous avons étudié l'influence de la substitution des imidazopyridines. Celles-ci sont pour la plupart synthétisées par condensation entre une 2-aminopyridine et une bromoacétophénone en milieu basique.¹²⁴ La 2-styrylimidazo[1,2-*a*]pyridine est synthétisée selon la méthode décrite par Mohan (Schéma 46).¹²⁵

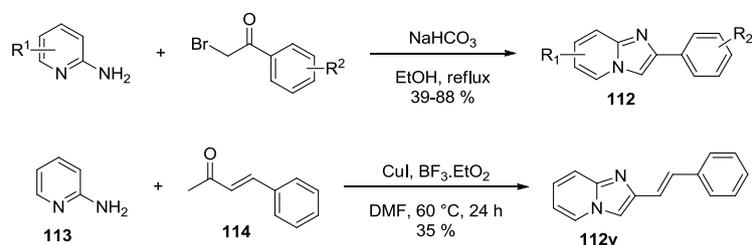


Schéma 46 : Synthèse des imidazopyridines substituées

Une fois les molécules synthétisées, elles ont été engagées dans les conditions de sulfénylation (Schéma 47).

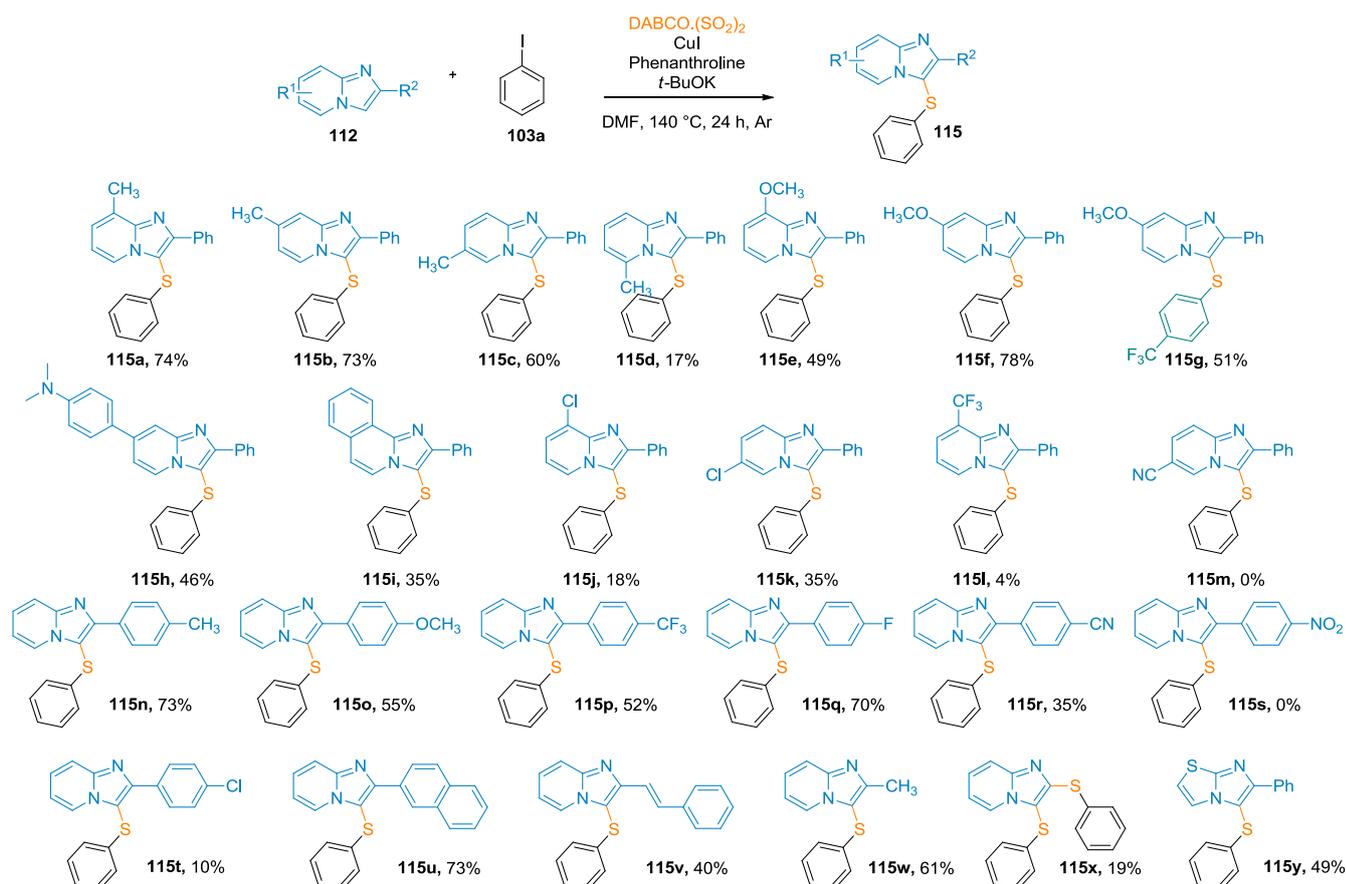


Schéma 47 : Etendue de la réaction avec des imidazopyridines substituées

On peut observer que la réaction de sulfénylation est possible en présence de groupements électrodonneurs en positions 6, 7 et 8. En revanche, la présence d'un méthyle en position 5

conduit à une diminution drastique du rendement à 17% du fait de l'encombrement stérique. Les halogènes et les groupements électroattracteurs sont peu tolérés avec des rendements de 35% maximum, la réaction n'ayant pas du tout lieu avec des substituants de type nitrile ou nitro. L'imidazoquinoline peut également être sulfénylée, avec un rendement toutefois inférieur.

La substitution du phényle en position 2 affecte de manière moins importante la réaction, qui tolère des groupements donneurs (-CH₃, -OCH₃), des halogènes (-F) ou des groupements électroattracteurs (-CF₃, -CN), bien que les rendements chutent avec un chlore ou un groupement nitro.

Enfin, les imidazopyridines portant un groupement naphthyle, styryle ou méthyle en position 2 permettent l'obtention du produit de sulfénylation avec des rendements compris entre 40 et 73%. L'imidazo[1,2-*a*]pyridine non substituée mène quant à elle à la formation du produit disulfénylé en position 2 et 3 **115x** avec un rendement de 19%. Un tel exemple de disulfénylation a été rapporté par Adimurthy¹²⁶ lors du développement de notre méthodologie. La réaction fonctionne également avec le 6-phénylimidazo[2,1-*b*]thiazole avec un rendement correct de 49%.

3. Hypothèses mécanistiques

Par la suite, nous avons cherché à comprendre le mécanisme de cette réaction. Dans un premier temps, nous avons voulu savoir si un mécanisme par voie radicalaire était envisageable. La réaction a donc été conduite en ajoutant le TEMPO comme piège à radicaux. Le rendement diminue fortement à 37% avec 1 équivalent de TEMPO, pour tomber à 0% avec 3 équivalents. Cependant, TEMPO peut également jouer le rôle d'oxydant et ainsi perturber les processus redox qui ont vraisemblablement lieu au cours de la réaction. En utilisant un autre piège à radicaux, le BHT, on peut voir que la baisse de rendement n'est pas significative, ce qui exclut un mécanisme radicalaire (Schéma 48).

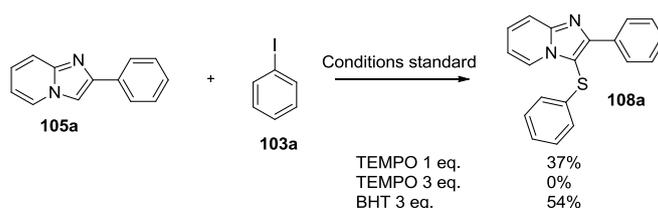


Schéma 48 : Expériences contrôles avec des pièges à radicaux

La réaction a également été conduite dans les conditions standards sans DABCO.(SO₂)₂ avec le diphenyldisulfide, le benzène sulfinate ou le thiophénol sans toutefois observer la formation du produit de sulfénylation, ce qui laisse penser qu'ils ne jouent pas le rôle d'intermédiaires lors de la réaction (Schéma 49).

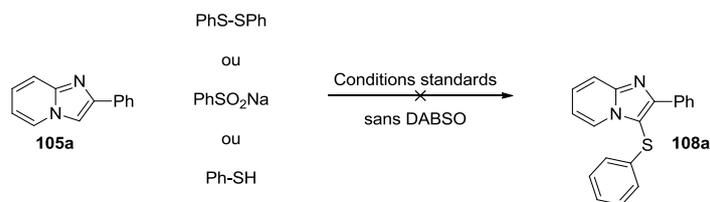


Schéma 49 : Intermédiaires potentiels

Enfin, nous avons envisagé la formation du produit de sulfonylation, qui serait ensuite réduit pour donner le composé **108a**. La sulfone **106b** a été préparée selon la méthode décrite par Guo par couplage entre l'imidazo[1,2-*a*]pyridine et le benzène sulfinate⁹⁷ puis soumise à nos conditions standards. Aucune trace du produit réduit n'a été observée. (Schéma 50).

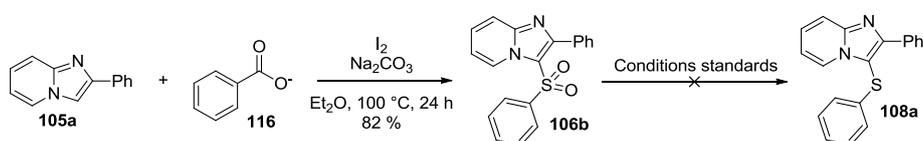
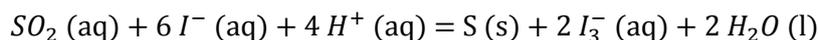


Schéma 50 : Réduction du produit de sulfonylation

Suite à ces observations, on peut se demander comment a lieu la réduction du dioxyde de soufre dans nos conditions. Le DABCO.(SO₂)₂ est un substitut bien connu de SO₂, mais le comportement de celui-ci reste flou. On peut envisager dans nos conditions la dismutation du SO₂ en soufre élémentaire S₈^{127,128}, qui serait alors la source de soufre comme décrit récemment dans d'autres réactions de sulfénylation^{104,105,108} (Équation 1).



Équation 1 : Dismutation du dioxyde de soufre

Les mécanismes décrits dans la littérature sont variés, et au regard de nos précédentes observations, difficiles à appliquer à nos conditions. On peut toutefois proposer le mécanisme suivant, qui suit ce que notre équipe avait déjà proposé pour différentes méthodologies de fonctionnalisation de liaison C-H d'imidazopyridines⁷ (Schéma 51). Le cycle catalytique commence avec un échange de ligand avec le *t*-butylate de potassium pour donner le complexe **II**. Ce complexe permet la déprotonation métallation de l'imidazopyridine pour former le complexe **IV** via l'intermédiaire **III**. L'addition oxydante simultanée du iodobenzène et du soufre élémentaire issu de la dismutation de SO₂ conduit à la formation de l'intermédiaire cuivre (III) tétracoordiné **V**. L'élimination réductrice permet enfin d'obtenir le composé **108a**.

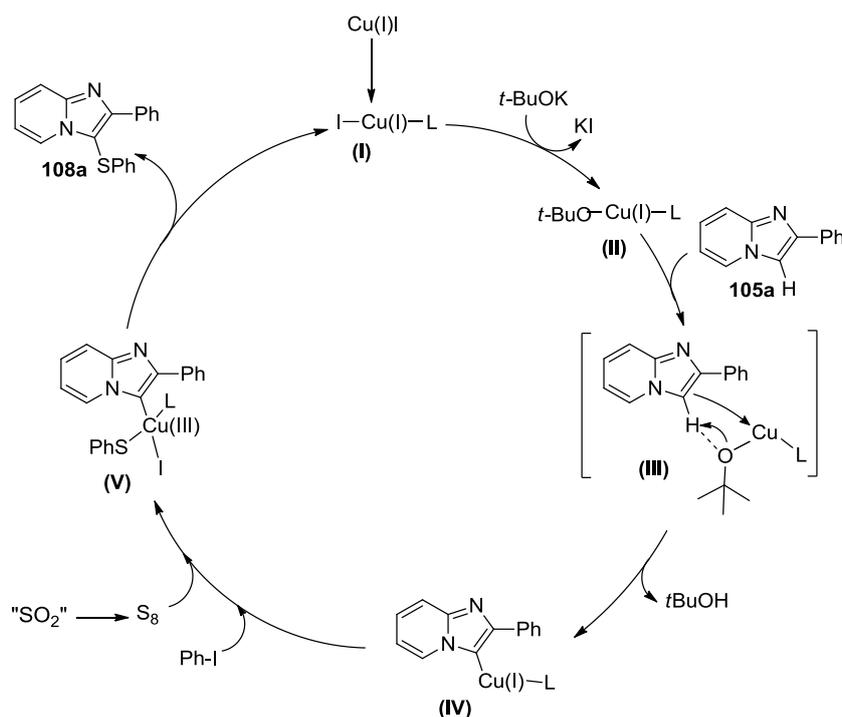


Schéma 51 : Mécanisme postulé

III. Conclusion

Nous avons développé de nouvelles conditions de sulfénylation d'imidazo[1,2-*a*]pyridines en utilisant comme source de soufre le DABCO.(SO₂)₂. Ce travail complète les méthodologies de sulfénylation déjà décrites dans la littérature et a surtout pour vocation de souligner le rôle inhabituel du DABCO.(SO₂)₂ comme source de soufre.

Après optimisation des conditions réactionnelles, 38 exemples utilisant des imidazopyridines et des iodobenzènes substitués ont été réalisés, avec des rendements compris entre 17 et 83% (Schéma 52). Ces travaux ont fait l'objet d'une publication.¹²⁹



Schéma 52 : Nouvelle méthodologie de sulfénylation d'imidazopyridines

Conclusion générale

Le premier projet présenté dans ce manuscrit est un projet multidisciplinaire destiné à la découverte de nouveaux inhibiteurs de la famille de tyrosine kinases TAM. Pour cela, un criblage virtuel d'imidazo[4,5-*b*]pyridine a été réalisé sur les structures cristallines des trois protéines. L'analyse des différents modes de positionnement des molécules dans le site actif des protéines a permis d'identifier les structures ci-dessous comme inhibiteurs potentiels (Figure 103).

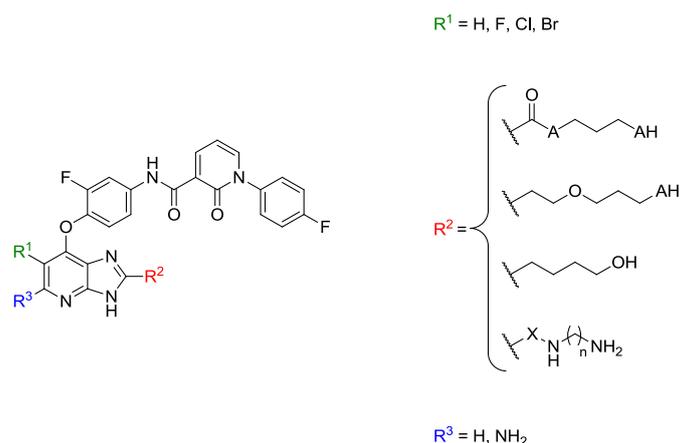


Figure 103 : Molécules issues de la modélisation

Une molécule ne comportant pas la chaîne supérieure à motif pyridone a également été identifiée (Figure 104). Nous avons choisi de réaliser en priorité la synthèse de celle-ci, afin de voir si la chaîne pyridone est indispensable à l'activité.

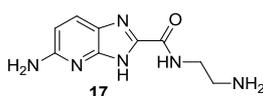


Figure 104 : Inhibiteur de TAM potentiel sans chaîne pyridone

Une librairie de composés pour lesquels le motif amide-pyridone a été remplacé par une fonction sulfonamide a également été synthétisée (Figure 105).

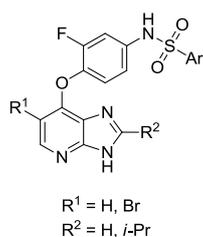


Figure 105 : Librairie de sulfonamides

Un test pour déterminer l'activité des composés via un dosage de l'ADP par luminescence a été développé au laboratoire. Malheureusement, aucune des molécules synthétisée, que ce soient la molécule **17** sans chaîne pyridone ou les sulfonamides, n'a montré d'activité sur les protéines de la famille TAM. Cela nous indique d'une part que la chaîne pyridone est indispensable pour l'activité biologique des composés, et d'autre part que la modification de cette chaîne peut entraîner une perte totale d'activité.

La suite du projet consistera à synthétiser les autres molécules déterminées lors du criblage virtuel, notamment pour voir si l'introduction d'une chaîne donneuse de liaison hydrogène en position 2 de l'imidazopyridine permet d'améliorer l'activité des composés. Un criblage virtuel de la chimiothèque nationale est également envisagé afin de déterminer des nouvelles structures originales.

La deuxième partie de ce manuscrit est dédiée à la conception d'inhibiteurs photo-contrôlables de la famille TAM, afin de contourner les problèmes de sélectivité inhérents aux inhibiteurs de kinases. Pour cela, nous avons installé des groupements photo-labiles sur nos inhibiteurs imidazo[4,5-*b*]pyridines, à une position présumée importante pour l'interaction avec la protéine (Figure 106). La présence du groupement photo-labile bloque temporairement l'activité du composé, et celle-ci est restaurée lors du clivage du groupement par la lumière.

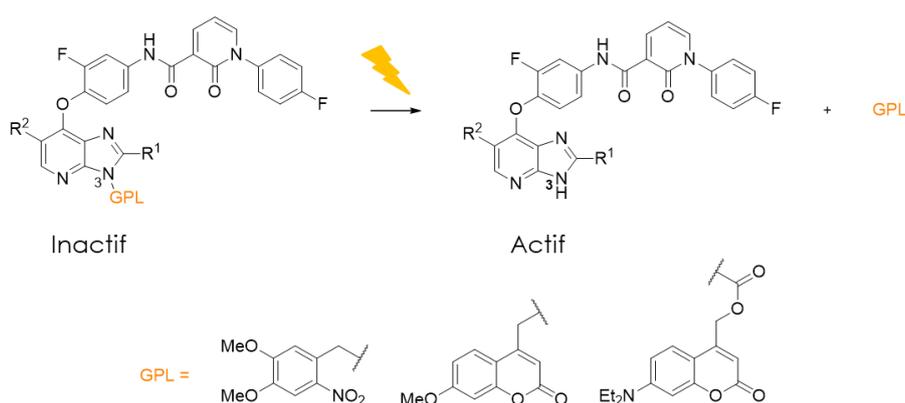


Figure 106 : Inhibiteurs photo-contrôlables de la famille TAM

Huit composés photo-clivables ont ainsi été synthétisés. Les molécules portant le groupement diméthoxynitrobenzyle (DMNB) ont montré une vitesse de clivage de l'ordre de 2 minutes, en solution à 10 μ M dans le DMSO sous irradiation à 350 nm. En revanche, les (7-méthoxycoumarin-4-yl)méthyles (7-MCM) n'ont pas pu être clivés dans les mêmes conditions.

Nous avons donc modifié la nature du lien entre la coumarine et l'inhibiteur par un lien carbamate. Malheureusement, les molécules obtenues ne sont pas assez stables pour permettre leur manipulation.

L'activité biologique des composés photo-clivables a ensuite été évaluée *in vitro*. Il apparaît que la présence du groupement photo-labile n'induit pas systématiquement une perte d'activité biologique. Des expériences de modélisation moléculaire ont été réalisées pour essayer de rationaliser les résultats obtenus. Nous avons pu constater que les résultats sont très hétérogènes, les poses de modélisation étant en accord avec les résultats biologiques sur la moitié des composés environ. On a pu toutefois voir que les groupements photo-labiles pouvaient potentiellement entrer dans le site actif des protéines et établir des interactions stabilisantes avec celui-ci, ce qui peut expliquer la non-perte d'activité. L'installation de groupements photo-labiles plus volumineux comme le nitrodibenzofurane est envisagée.

La restauration de l'activité a été démontrée sur Tyro3 avec le composé **61a** (Schéma 53). Celui-ci présente une IC_{50} supérieure à 100 μM en l'absence de lumière. Il est ainsi au moins 100 fois moins actif que l'inhibiteur **61**. Lorsque le composé **61a** est irradié à 350 nm, l' IC_{50} mesurée est de 6 μM , ce qui se rapproche sensiblement de l'activité du composé **61**.

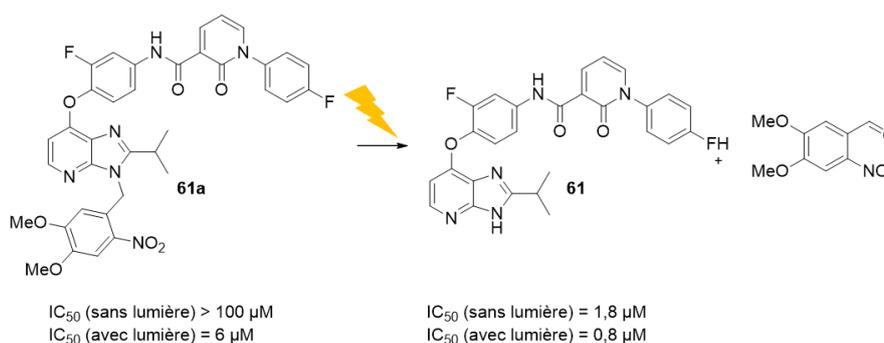


Schéma 53 : Restauration de l'activité sur Tyro3

Ces résultats sont très encourageants pour la suite du projet. Toutefois, les inhibiteurs imidazopyridines ne sont pas actifs *in cellulo*, il n'est donc pas possible d'évaluer la faisabilité du concept de photo-pharmacologie sur des systèmes biologiques plus complexes. L'idée est donc d'installer des groupements photo-labiles sur le composé UNC2025, un inhibiteur de TAM qui présente des activités de l'ordre du nanomolaire en cellule (Figure 107).

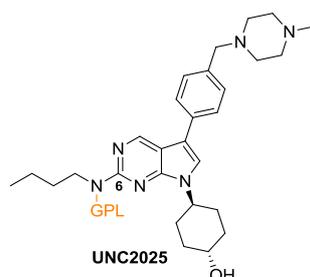


Figure 107 : UNC2025, potentiel inhibiteur photo-contrôlable

Le troisième chapitre de ce manuscrit est consacré à la mise au point d'une méthodologie de sulfénylation directe à trois composantes d'imidazo[1,2-*a*]pyridines. La source de soufre est le DABCO.(SO₂)₂, un composé décrit comme précurseur de dioxyde de soufre. Ces travaux complètent les méthodologies de sulfénylation déjà décrites et a pour but de souligner le rôle inhabituel du DABCO.(SO₂)₂. Après optimisation des conditions réactionnelles, 38 exemples ont été synthétisés en modifiant la substitution des partenaires de couplage, avec des rendements allant de 17 à 83 % (Schéma 54).¹²⁹

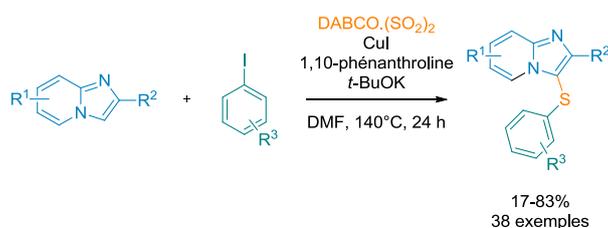


Schéma 54 : Méthodologie de sulfénylation directe d'imidazopyridines

Partie expérimentale

General information.

Commercially available reagents and solvents were used without further purification. Yields refer to isolated and purified products. Reactions were monitored by Thin Layer Chromatography (TLC) carried out on 60F-254 silica gel plates and visualized under UV light at 254 and 365 nm. Column chromatography was performed on a Interchim Puriflash XS420 using pre-packed silica 60 columns. Chemical shifts (δ) of ^1H and ^{13}C NMR are reported in ppm and residual non deuterated solvents were used as references. Multiplicities are designated by the following abbreviations: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quadruplet, sept = septuplet, br s = broad singlet, m = multiplet. Melting points were measured with a Heizbank System Kofler. Preparative HPLC was performed using a Macherey-Nagel VP NUCLEODUR C18 column, 5 μm , 125 x 21 mm coupled to a Waters Sample manager 2767, Waters Binary gradient module 2525, Waters HPLC Pump 515 and a Waters 2996 PDA. Elution gradient : eluent A : H_2O + 0.01% TFA; eluent B : CH_3CN + 0.01% TFA : 0 min (98/2), 2 min (98/2), 15 min (0/100), 17 min (0/100), 18 min (98/2), 20 min (98/2). LC-MS spectra (ESI in the positive ion mode) were recorded on a Waters Micromass ZQ instrument (source voltage 30 kV) coupled to a Waters Alliance Separations Module 2695, equipped with a Phenomenex C18 - 3 μm column (3.0 x 100 mm) and a Waters PDA 2998, using the following gradient: eluent A : H_2O + 0.1% formic acid; eluent B : CH_3CN + 0.1% formic acid : 0 min (98/2), 1 min (98/2), 7 min (0/100), 9 min (0/100), 13 min (98/2). High-resolution mass spectra (HRMS) were measured by a TOF spectrometer, using electrospray ionization (ESI) or atmospheric pressure photoionization (APPI) method.

General procedures.

General procedure A for sulfonamide synthesis : In a round-bottom flask under argon, the 4-((3H-imidazo[4,5-b]pyridin-7-yl)oxy)-3-fluoroaniline (1eq.) was dissolved in dry pyridine (50 eq.). The solution was cooled down to 0°C and the corresponding sulfonyl chloride (1,1 eq.) in solution with pyridine (50 eq.) was added dropwise. The solution was stirred for 20 min at 0°C . The reaction mixture was poured in HCl 1M solution and extracted with EtOAc. The organic layer was dried over anhydrous MgSO_4 , evaporated under reduced pressure and purified by column chromatography using a gradient of DCM to DCM/MeOH 5% to afford the desired product.

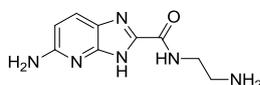
General procedure B for the condensation of (77) on anilines : In a round bottom flask under argon atmosphere, 1-(4-fluorophenyl)-2-oxo-1,2-dihydropyridine-3-carboxylic acid (1 eq.) and TBTU (1,3 eq.) were dissolved in dry DMF. The resulting solution was cooled down to 0°C and stirred for 15 min. DIPEA (3 eq.) was added and the solution was stirred for another 15 min. The corresponding aniline (1 eq.) was added and the reaction mixture was stirred at 0°C for 4 h. Solvent was removed under reduced pressure and the residue was taken in EtOAc and washed with a saturated NaHCO_3 solution. The organic layer was dried over anhydrous MgSO_4 , concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography using a gradient of DCM to DCM/MeOH 8% to give the corresponding product.

General procedure C for imidazo[1,2-a]pyridine synthesis : 2-bromoacetophenone (1 eq.), 2-aminopyridine (1,3 eq.) and NaHCO_3 (1,5 eq.) were refluxed in ethanol for 3 hours. The reaction mixture was allowed to cool to rt, water was added, allowing the desired product to

precipitate. The solid was filtered, washed with water and dried under reduced pressure to give the correspondent imidazo[1,2-*a*]pyridine.

General procedure D for sulfenylation of imidazo[1,2-*a*]pyridine : To a sealed tube under argon atmosphere were added imidazo[1,2-*a*]pyridine **1** (0.51 mmol, 100 mg), DABSO (1.03 mmol, 247 mg), CuI (0.05 mmol, 10 mg), 1,10-phenanthroline (0.05 mmol, 9 mg), *t*-BuOK (1.29 mmol, 144 mg) and iodobenzene (1.03 mmol, 115 μ L) in dry DMF (2 mL). The tube was sealed and the reaction mixture was stirred at 140 °C for 24 h in an oil bath. The mixture was cooled down to room temperature and water (10 mL) was added. The mixture was extracted with DCM (3 x 10 mL), the organic layer was dried with anhydrous MgSO₄ and evaporated under reduced pressure. The crude was purified by chromatography with a gradient of cyclohexane to cyclohexane/EtOAc 10% to afford the sulfenylated product **4a** in 68% yield.

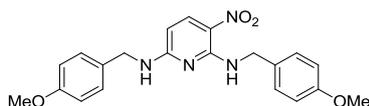
5-amino-N-(2-aminoethyl)-3H-imidazo[4,5-*b*]pyridine-2-carboxamide (**17**)



In a flask under argon tert-butyl (2-(3-(4-methoxybenzyl)-5-((4-methoxybenzyl)amino)-3H-imidazo[4,5-*b*]pyridine-2-carboxamido)ethyl)carbamate (**28**) (0,36 mmol, 200 mg) was dissolved in DCM (2,7 mL). The solution was cooled down to 0°C and TFA (35,7 mmol, 100 eq., 2,65 mL) was added. The solution was stirred at 50 °C overnight. The solvents were evaporated under reduced pressure. The crude was purified by preparative HPLC to obtain the desired product as a TFA salt (yellow solid, 28 mg, 24%).

¹H NMR (300 MHz, D₂O): δ =7.36 (d, J=8.5 Hz, 1H), 6.30 (d, J=8.5 Hz, 1H), 3.65 (t, J=5.4 Hz, 2H), 3.26 (t, J=5.4 Hz, 2H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ =155.2, 153.3, 147.5, 137.2, 134.8, 119.3, 107.3, 38.8, 38.1.

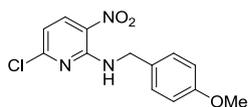
N2,N6-bis(4-methoxybenzyl)-3-nitropyridine-2,6-diamine (**20**)



2,6-dichloro-3-nitropyridine (15,4 mmol, 2,97 g) and Na₂CO₃ (38,8 mmol, 2,5 eq., 4,11 g) were dissolved in ethanol (30 mL). 4-methoxybenzylamine (38,3 mmol, 2,5 eq., 5 mL) was added dropwise and the mixture was stirred at rt for 42 h. The reaction mixture was diluted with 30 mL of water and extracted with DCM (3 x 30 mL). The organic layers were combined, dried over anhydrous MgSO₄ and evaporated under reduced pressure. The crude was purified by column chromatography with a gradient of cyclohexane to cyclohexane/EtOAc 30 % to afford the desired product as a yellow solid (4,3 g, 71 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ =9.16 (s, 1H), 8.10 (d, J=9.2 Hz, 1H), 7.20 (m, 4H), 6.83 (d, J=8.2 Hz, 4H), 5.78 (d, J=9.2 Hz, 1H), 5.61 (s, 1H), 4.69 (d, J=5. Hz, 2H), 4.55 (s, 2H), 3.78 (s, 6H); HRMS (ESI-TOF): *m/z* calcd for C₂₁H₂₃N₄O₄ : 395.4312[M+H]⁺; found: 395.1730.

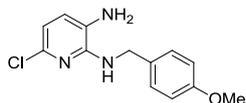
6-chloro-N-(4-methoxybenzyl)-3-nitropyridin-2-amine (**22**)



2,6-dichloro-3-nitropyridine (15,4 mmol, 2,96 g) and Na₂CO₃ (39,3 mmol, 2,6 eq., 4,16 g) were dissolved in ethanol (30 mL). 4-methoxybenzylamine (23 mmol, 1,5 eq., 3 mL) was added dropwise and the mixture was stirred at rt for 6 h. The reaction mixture was diluted with 30 mL of water and extracted with DCM (3 x 30 mL). The organic layers were combined, dried over anhydrous MgSO₄ and evaporated under reduced pressure. The crude was purified by column chromatography with a gradient of cyclohexane to cyclohexane/EtOAc 15 % to afford the desired product as a yellow solid (2,3 g, 51 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ=8.54 (br s, 1H), 8.35 (d, J=8.7 Hz, 1H), 7.31 (d, J=8.7 Hz, 2H), 6.90 (d, J=8.7 Hz, 2H), 6.64 (d, J=8.6 Hz, 1H), 4.74 (d, J=5.5 Hz, 2H), 3.81 (s, 3H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ=159.2, 156.7, 151.7, 137.6, 129.4, 129.3, 126.7, 114.1, 112.0, 55.2, 44.9; HRMS (ESI-TOF): *m/z* calcd for C₁₃H₁₃N₃O₃Cl: 294.0645 [M+H]⁺; found: 294.0650.

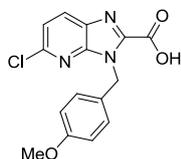
6-chloro-N2-(4-methoxybenzyl)pyridine-2,3-diamine (23)



6-chloro-N-(4-methoxybenzyl)-3-nitropyridin-2-amine (**22**) (1,7 mmol, 500 mg), K₂CO₃ (6,8 mmol, 4 eq., 950 mg), ammonium acetate (16,8 mmol, 10 eq., 1,3 g) and iron powder (13,7 mmol, 8 eq., 762 mg) in suspension in water/toluene 1:1 (13 mL) were refluxed overnight. The reaction mixture was filtered on Celite, washed with water and EtOAc. The filtrate was extracted with EtOAc. The organic layers were combined, dried over anhydrous MgSO₄ and evaporated to afford the desired product without further purification as a brown oil (488 mg, quant.).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ=7.18 (d, J=8.7 Hz, 2H), 6.76 (d, J=8.7 Hz, 2H), 6.66 (d, J=7.7 Hz, 1H), 6.40 (d, J=7.7 Hz, 1H), 4.40 (s, 2H), 3.69 (s, 3H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ=158.9, 150.0, 139.9, 131.4, 129.6, 126.7, 124.6, 114.0, 112.0, 55.3, 45.5; HRMS (ESI-TOF): *m/z* calcd for C₁₃H₁₅N₃OCl: 264.0904 [M+H]⁺; found: 264.0914.

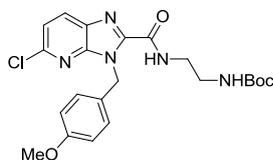
5-chloro-3-(4-methoxybenzyl)-3H-imidazo[4,5-b]pyridine-2-carboxylic acid (25)



6-chloro-N2-(4-methoxybenzyl)pyridine-2,3-diamine (**23**) (5,3 mmol, 1,4 g) is dissolved in dry ether under inert atmosphere. The solution is cooled down to 0°C and trimethylamine (6,9 mmol, 1,3 eq., 0,96 mL) is added. Ethyl oxalyl chloride (6,37 mmol, 1,2 eq., 713 μL) is added dropwise. After complete addition the solution is allowed to warm up to rt overnight. The solvent is removed under reduced pressure, toluene is added (10 mL) and the solution is reflux for 3 h. Toluene is then evaporated. EtOAc was added, the suspension was washed with HCl 1M. The solid was filtrated to afford the desired product as a beige solid (1,69 g, 100 %).

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ =12.25 (s, 1H), 7.54 (d, J =8.2 Hz, 1H), 7.33 (d, J =8.7 Hz, 2H), 7.29 (d, J =8.2 Hz, 1H), 6.87 (d, J =8.7 Hz, 2H), 5.27 (s, 2H), 3.71 (s, 3H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ =158.3, 155.7, 153.3, 140.7, 138.5, 129.6, 128.3, 126.0, 121.7, 119.0, 113.7, 55.1, 43.9; HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_3\text{Cl}$: 318.0645 $[\text{M}+\text{H}]^+$; found: 318.0656.

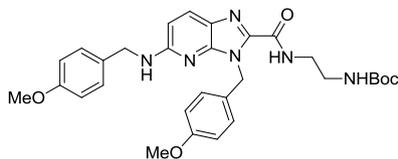
tert-butyl (2-(5-chloro-3-(4-methoxybenzyl)-3H-imidazo[4,5-b]pyridine-2-carboxamido)ethyl)carbamate (27)



5-chloro-3-(4-methoxybenzyl)-3H-imidazo[4,5-b]pyridine-2-carboxylic acid (**25**) (0,93 mmol, 294 mg) was dissolved in dry DMF (6 mL) under argon atmosphere. Diisopropylethylamine (3,24 mmol, 3,5 eq., 535 μL) and HATU (1,02 mmol, 1,1 eq., 387 mg) were added. The reaction mixture was stirred at rt for 1 h, and N-Boc-ethylenediamine (1,02 mmol, 1,1 eq., 161 μL) was added dropwise. The reaction mixture was stirred at rt for 6 h. The solution was then diluted in DCM, washed with 2 x 20 mL of NaOH 1M solution and 1 x 20 mL of saturated NaHCO_3 solution. The organic layer was dried over anhydrous MgSO_4 , evaporated under reduced pressure and purified by column chromatography with a gradient of cyclohexane to cyclohexane/EtOAc 30% to afford the desired product as a yellow solid (314 mg, 74 %).

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ =7.99 (t, J =5.8 Hz, 1H), 7.76 (d, J =8.2 Hz, 1H), 7.32 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.30 (d, J =8.2 Hz, 1H), 6.92 (t, J =5.8 Hz, 1H), 6.86 (d, J =8.7 Hz, 2H), 5.39 (s, 2H), 3.70 (s, 3H), , 3.46 (qd, J =6.0 Hz, 2H), 3.20 (qd, J =6.0 Hz, 2H), 1.35 (s, 9H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ =158.6, 155.8, 151.9, 149.7, 141.1, 139.8, 135.1, 129.6, 128.8, 128.4, 119.8, 113.8, 77.7, 55.0, 43.3, 40,7 38.7, 28.2; HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{N}_5\text{O}_4\text{Cl}$: 460.1752 $[\text{M}+\text{H}]^+$; found: 460.1736.

tert-butyl (2-(3-(4-methoxybenzyl)-5-((4-methoxybenzyl)amino)-3H-imidazo[4,5-b]pyridine-2-carboxamido)ethyl)carbamate (28)

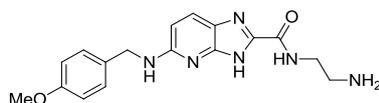


In a sealed tube under argon atmosphere were placed tert-butyl (2-(3-(4-methoxybenzyl)-5-((4-methoxybenzyl)amino)-3H-imidazo[4,5-b]pyridine-2-carboxamido)ethyl)carbamate (**28**) (0,72 mmol, 330 mg), 4-methoxybenzylamine (0,86 mmol, 1,2 eq., 113 μL), Cs_2CO_3 (1,44 mmol, 2 eq., 468 mg), $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (0,07 mmol, 0,1 eq., 66 mg) and Xantphos (0,07 mmol, 0,1 eq., 42 mg) in dry dioxane (4,4 mL). The solution was stirred at 120°C overnight. The reaction mixture was filtered on Celite, washed with DCM. The filtrate was evaporated and purified by column

chromatography with a gradient of cyclohexane to cyclohexane/EtOAc 50% to afford the desired product as a yellow solid (265 mg, 66 %).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ =7.56 (d, J =8.5 Hz, 1H), 7.38 (d, J =8.6 Hz, 2H), 7.25 (d, J =8.6 Hz, 2H), 6.85 (d, J =8.6 Hz, 2H), 6.73 (d, J =8.6 Hz, 2H), 6.35 (d, J =8.5 Hz, 1H), 5.51 (s, 2H), 5.33 (br s, 1H), 4.49 (br s, 1H), 4.55 (s, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.73 (s, 3H), 3.58 (qd, J =5.6 Hz, 2H), 3.38 (qd, J =5.6 Hz, 2H), 1.42 (s, 9H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ =159.0, 156.3, 154.1, 153.0, 147.4, 139.2, 131.5, 130.6, 129.3, 128.9, 121.3, 114.2, 113.7, 105.3, 105.1, 79.4, 55.6, 45.8, 43.7, 41.3, 40.9, 28.6; HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{37}\text{N}_6\text{O}_5$: 561.2825 $[\text{M}+\text{H}]^+$; found: 561.2841.

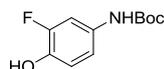
N-(2-aminoethyl)-5-((4-methoxybenzyl)amino)-3H-imidazo[4,5-b]pyridine-2-carboxamide (30)



In a flask under argon tert-butyl (2-(3-(4-methoxybenzyl)-5-((4-methoxybenzyl)amino)-3H-imidazo[4,5-b]pyridine-2-carboxamido)ethyl)carbamate (**28**) (0,36 mmol, 200 mg) was dissolved in DCM (2,7 mL). The solution was cooled down to 0°C and TFA (35,7 mmol, 100 eq., 2,65 mL) was added. The solution was stirred at rt for 1.5 h. The solution was neutralized with NaOH 3M, then extracted with EtOAc. The organic layers were combined, dried over anhydrous MgSO_4 and evaporated under reduced pressure. The crude was purified by column chromatography with a gradient of DCM to DCM/MeOH 10% to obtain the desired product as a yellow solid (80 mg, 66 %).

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD): δ =7.56 (d, J =8.5 Hz, 1H), 7.36 (d, J =8.7 Hz, 2H), 6.73 (d, J =8.7 Hz, 2H), 6.50 (d, J =8.5 Hz, 1H), 5.47 (s, 2H), 3.73 (t, J =3.7 Hz, 2H), 3.67 (s, 3H), 3.22 (t, J =3.7 Hz, 2H); ^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD): δ =160.3, 157.2, 153.8, 148.7, 140.3, 136.3, 131.1, 130.4, 121.8, 114.5, 107.0, 55.6, 44.2, 40.9, 39.7.

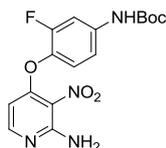
tert-butyl (3-fluoro-4-hydroxyphenyl)carbamate (32)



A solution of 4-amino-2-fluorophenol (29,5 mmol, 3,75 g) and triethylamine (29,5 mmol, 1 eq., 4,1 mL) in dry THF (78 mL) was cooled to 0°C. After addition of di-*t*-butyl-dicarbonate (29,5 mmol, 1 eq., 6,4 g) the ice bath was removed and the reaction was stirred at RT for 16 h. The solution was diluted with AcOEt and washed with a saturated NH_4Cl solution and brine. The organic layer was dried with anhydrous MgSO_4 , evaporated under reduced pressure and purified by flash chromatography using a gradient of cyclohexane to cyclohexane/AcOEt 40% to give the corresponding product as a beige solid (3,3 g, 49 %).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ =7.36 (d, J =12.0 Hz, 1H), 6.92-6.79 (m, 2H), 6.37 (br s, 1H), 5.07 (br s, 1H), 1.50 (s, 9H). Spectroscopic data were in agreement with those reported in the literature.¹³⁰

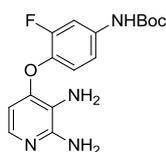
tert-butyl (4-((2-amino-3-nitropyridin-4-yl)oxy)-3-fluorophenyl)carbamate (33)



tert-butyl (3-fluoro-4-(2-amino-4-nitrophenoxy)phenyl)carbamate (**32**) (15,8 mmol, 1,1 eq., 3,6 g) was dissolved in dry DMF (37,5 mL) under argon. *t*-BuOK (16,6 mmol, 1,1 eq., 1,9 g) was added and the solution was stirred at rt for 1 h. 2-amino-4-chloro-3-nitropyridine (14,4 mmol, 2,5 g) was added and the reaction mixture was heated at 70°C overnight. The solvent was evaporated under reduced pressure. The crude was dissolved in EtOAc and washed with saturated Na₂CO₃ solution. The organic layer was dried over anhydrous MgSO₄, evaporated under reduced pressure and purified by column chromatography using DCM as eluent to afford the desired product as a yellow solid (4,46 g, 85 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ=7.97 (d, J=5.7 Hz, 1H), 7.54 (dd, J=12.2, 2.5 Hz, 1H), 7.13 (t, J=8.5 Hz, 1H), 7.03 (ddd, J=8.5, 2.5, 1.2 Hz, 1H), 6.63 (s, 1H), 6.23 (s, 2H), 6.00 (dd, J=5.7, 1.2 Hz, 1H), 1.53 (s, 9H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ=161.0, 155.8, 154.8, 153.6, 152.6, 138.2, 135.2, 123.6, 121.5, 114.6, 108.0, 101.2, 81.5, 28.4; HRMS (ESI-TOF): *m/z* calcd for C₁₆H₁₈N₄O₅F: 365.1261 [M+H]⁺; found: 365.1254.

tert-butyl (4-((2,3-diaminopyridin-4-yl)oxy)-3-fluorophenyl)carbamate (**34**)



In a three-neck round-bottom flask under argon atmosphere tert-butyl (4-((2-amino-3-nitropyridin-4-yl)oxy)-3-fluorophenyl)carbamate (**33**) (6,3 mmol, 2,28 g) was solubilized in MeOH (23 mL). Pd/C 10% (0,13 mmol, 0,02 eq., 133 mg) was added. The flask was purged 3 times with argon, 3 times with H₂ and the solution was stirred under H₂ atmosphere overnight at rt. The reaction mixture was filtered on Celite, washed with MeOH. The filtrate was concentrated under reduced pressure to afford the desired product as a brown solid (2,3 g, quant.).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ=7.53-7.45 (m, 2H), 7.17 (br s, 1H), 7.07-6.98 (m, 2H), 6.07 (d, J=5.7 Hz, 1H), 4.46 (br s, 2H), 3.50 (br s, 2H), 1.52 (s, 9H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ=156.1, 152.8, 152.0, 150.9, 139.0, 136.9, 136.8, 123.1, 118.0, 114.4, 108.1, 103.0, 81.2, 28.4; HRMS (ESI-TOF): *m/z* calcd for C₁₆H₂₀N₄O₄F: 335.1519 [M+H]⁺; found: 335.1508.

4-((3H-imidazo[4,5-b]pyridin-7-yl)oxy)-3-fluoroaniline (**35**)

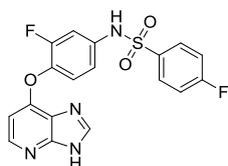


To a solution of tert-butyl (4-((2,3-diaminopyridin-4-yl)oxy)-3-fluorophenyl)carbamate (**34**) (4,7 mmol, 1,56 g) in trimethylorthoformate (140 mmol, 30 eq., 15 mL) were added dropwise HCl 37% (9,3 mmol, 2 eq., 0,93 mL). The solution was stirred at rt overnight. HCl 37% was then added (46.7 mmol, 10 eq., 5 mL) and the reaction mixture was stirred for 20 min. The solution

was cooled down to 0°C and neutralized with NaOH 3M solution. The solution was extracted with EtOAc, washed with brine. The organic layer was dried over anhydrous MgSO₄, evaporated under reduced pressure and purified by column chromatography using a gradient of DCM to DCM/MeOH 6% to afford the desired product as a beige solid (766 mg, 67 %).

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ=8.33 (s, 1H), 8.16 (d, J=5.7Hz, 1H), 6.99 (t, J=8.8 Hz, 1H), 6.59 (dd, J=12.6, 2.5 Hz, 1H), 6.52 (ddd, J=8.8, 2.5, 0.9 Hz, 1H), 6.46 (dd, J=5.7, 0.9 Hz, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD): δ=157.8, 156.8, 154.6, 149.3, 146.9, 143.7, 1323.3, 124.9, 111.9, 104.0, 103.9, 103.8.

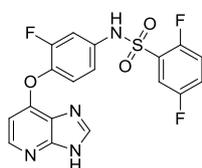
N-(4-((3H-imidazo[4,5-b]pyridin-7-yl)oxy)-3-fluorophenyl)-4-fluorobenzenesulfonamide (36a)



Reaction was performed using general procedure A. Pink solid (30 mg, 18 %).

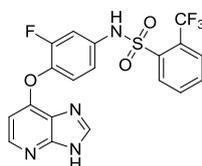
¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ=8.33 (s, 1H), 8.20 (d, J=5.6 Hz, 1H), 7.89 (dd, J=8.7, 5.1 Hz, 2H), 7.34-7.23 (m, 3H), 7.16 (dd, J=11.9, 2.2 Hz, 1H), 6.99 (d, J=8.8 Hz, 1H), 6.45 (d, J=5.6 Hz, 1H).

N-(4-((3H-imidazo[4,5-b]pyridin-7-yl)oxy)-3-fluorophenyl)-2,5-difluorobenzenesulfonamide (36b)



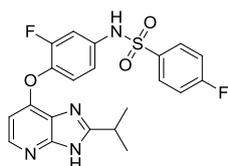
Reaction was performed using general procedure A. Beige solid (32 mg, 14 %).

N-(4-((3H-imidazo[4,5-b]pyridin-7-yl)oxy)-3-fluorophenyl)-2-(trifluoromethyl)benzenesulfonamide (36c)



Reaction was performed using general procedure A. Beige solid (34 mg, 18 %).

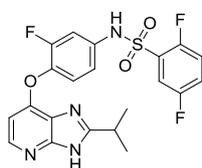
4-fluoro-N-(3-fluoro-4-((2-isopropyl-3H-imidazo[4,5-b]pyridin-7-yl)oxy)phenyl)benzenesulfonamide (37a)



Reaction was performed using general procedure A. Beige solid (86 mg, 55 %).

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ =12.88 (br s, 1H), 10.64 (br s, 1H), 8.05 (d, J =5.5 Hz, 1H), 7.88 (dd, J =9, 5 Hz, 2H), 7.44 (dd, J =9, 9 Hz, 2H), 7.29 (dd, J =9, 9 Hz, 1H), 7.13 (dd, 12, 2.5 Hz, 1H), 6.96 (dd, J =9, 2.5 Hz, 1H), 6.33 (dd, J =5.5 Hz, 1H), 3.11 (sept, J =7 Hz, 1H), 1.32 (d, J =7 Hz, 6H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ =164.5 (d, J =252.1 Hz), 160.2, 153.6 (, J =247.6 Hz), 153.5, 144.3, 137.2, 135.9, 135.4 (d, J =3.0 Hz), 129.8 (d, J =9.7 Hz), 124.0, 117.0, 116.7 (d, J =22.9 Hz), 109.10 (d, J =21.9 Hz), 102.8, 28.6, 21.0; HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_3\text{SF}_2$: 445.1140 $[\text{M}+\text{H}]^+$; found: 445.1139.

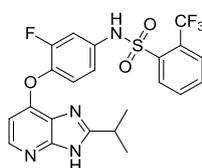
2,5-difluoro-N-(3-fluoro-4-((2-isopropyl-3H-imidazo[4,5-b]pyridin-7-yl)oxy)phenyl)benzenesulfonamide (37b)



Reaction was performed using general procedure A. Beige solid (57 mg, 39 %).

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ =12.88 (br s, 1H), 11.10 (br s, 1H), 8.05 (d, J =5.5 Hz, 1H), 7.64 (m, 3H), 7.31 (dd, J =9, 9 Hz, 1H), 7.16 (dd, J =12, 2.5 Hz, 1H), 7.02 (dd, J =9, 2.5 Hz, 6.33 (dd, J =5.5 Hz, 1H), 3.11 (sept, J =7 Hz, 1H), 1.32 (d, J =7 Hz, 6H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ =158.9, 156.07 (d, J =4.7 Hz), 155.7, 155.2, 152.7 (d, J =4.6 Hz), 151.9, 144.3, 135.2 (d, J =10.6 Hz), 128.1 (d, J =7.3 Hz), 127.9 (d, J =7.1 Hz), 124.0, 123.0 (d, J =9.1 Hz), 122.7 (d, J =8.7 Hz), 119.3 (d, J =8.2 Hz), 117.1, 116.7 (d, J =11.3 Hz), 116.6, 108.7 (d, J =21.9 Hz), 102.8, 28.6, 21.0; HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}_3\text{SF}_3$: 463.1046 $[\text{M}+\text{H}]^+$; found: 463.1045.

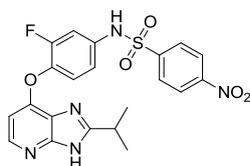
N-(3-fluoro-4-((2-isopropyl-3H-imidazo[4,5-b]pyridin-7-yl)oxy)phenyl)-2-(trifluoromethyl)benzenesulfonamide (37c)



Reaction was performed using general procedure A. White solid (78 mg, 38 %).

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ =12.88 (br s, 1H), 11.02 (br s, 1H), 8.17 (dd, J =7.5, 1.5 Hz, 1H), 8.04 (m, 3H), 7.91 (m, 2H), 7.32 (dd, J =9, 9 Hz, 1H), 7.15 (dd, J =12, 2.5 Hz, 1H), 7.00 (dd, J =9, 2.5 Hz, 1H), 6.33 (dd, J =5.5 Hz, 1H), 3.11 (sept, J =7 Hz, 1H), 1.31 (d, J =7 Hz, 6H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ =15.6 (, J =247.5 Hz), 144.3, 138.0, 137.0, 135.7, 135.6, 133.8, 133.6, 130.7, 128.8 (d, J =6.2 Hz), 126.6, 126.2, 124.1, 122.7 (d, J =274.0 Hz), 117.3, 116.3, 108.5 (d, J =22.1 Hz), 102.8, 28.6, 21.0; HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_3\text{SF}_4$: 495.1109 $[\text{M}+\text{H}]^+$; found: 495.1102.

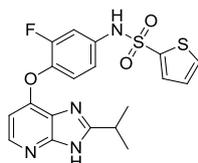
N-(3-fluoro-4-((2-isopropyl-3H-imidazo[4,5-b]pyridin-7-yl)oxy)phenyl)-4-nitrobenzenesulfonamide (37d)



Reaction was performed using general procedure A. Beige solid (54 mg, 33 %).

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ =12.88 (br s, 1H), 10.94 (br s, 1H), 8.43 (d, J =9 Hz, 2H), 8.04 (m, 3H), 7.30 (dd, J =9, 9 Hz, 1H), 7.17 (dd, J =12, 2.5 Hz, 1H), 6.98 (dd, J =2.5 Hz, 1H), 6.36 (dd, J =5.5 Hz, 1H), 3.11 (sept, J =7 Hz, 1H), 1.31 (d, J =7 Hz, 6H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ =160.2, 154.0 (d, J =247.8 Hz), 150.5, 144.9, 144.7, 138.3, 135.9, 128.8, 125.3, 124.5, 117.8 (d, J =3.0 Hz), 109.9 (d, J =21.8 Hz), 103.4, 29.1, 21.5; HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{N}_5\text{O}_5\text{SF}$: 472.1085 $[\text{M}+\text{H}]^+$; found: 472.1079.

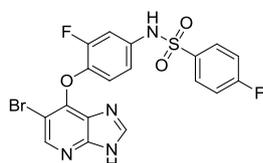
N-(3-fluoro-4-((2-isopropyl-3H-imidazo[4,5-b]pyridin-7-yl)oxy)phenyl)thiophene-2-sulfonamide (37e)



Reaction was performed using general procedure A. Beige solid (36 mg, 24 %).

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ =12.88 (br s, 1H), 10.74 (br s, 1H), 8.06 (d, J =5.5 Hz, 1H), 7.64 (d, J =5 Hz, 1H), 7.33 (d, J =3.5 Hz, 1H), 7.29 (dd, J =9, 9 Hz, 1H), 7.17 (m, 2H), 7.03 (dd, J =9 Hz, 1H), 6.34 (dd, J =5.5 Hz, 1H), 3.13 (sept, J =7 Hz, 1H), 1.34 (d, J =7 Hz, 6H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ =161.3, 154.0 (d, J =247.4 Hz), 144.8, 139.9, 138.0, 136.4 (d, J =9.4 Hz), 134.3, 133.3, 128.3, 124.5, 117.7, 109.6 (d, J =21.8 Hz), 103.1, 29.1, 21.5; HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}_3\text{S}_2\text{F}$: 433.0799 $[\text{M}+\text{H}]^+$; found: 433.0787.

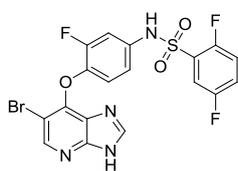
N-(4-((6-bromo-3H-imidazo[4,5-b]pyridin-7-yl)oxy)-3-fluorophenyl)-4-fluorobenzenesulfonamide (38a)



Reaction was performed using general procedure A. Beige solid (71 mg, 48 %).

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ =10.46 (br s, 1H), 8.50 (s, 1H), 8.26 (s, 1H), 7.82 (dd, J =9, 5 Hz, 2H), 7.44 (dd, J =9, 9 Hz, 2H), 7.04 (m, 2H), 6.80 (ddd, J =9, 1.5, 1.5 Hz, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ =164.9 (dd, J =251.8 Hz), 152.9 (d, J =246.0 Hz), 146.8, 144.4, 140.8 (d, J =11.8 Hz), 135.8, 135.1 (d, J =9.7 Hz), 121.5, 117.4 (d, J =3.1 Hz), 117.1 (d, J =22.8 Hz), 109.7 (d, J =21.5 Hz), 103.9.

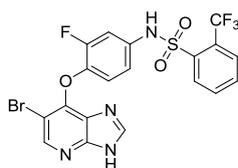
N-(4-((6-bromo-3H-imidazo[4,5-b]pyridin-7-yl)oxy)-3-fluorophenyl)-2,5-difluorobenzenesulfonamide (38b)



Reaction was performed using general procedure A. Orange solid (110 mg, 71 %).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ=13.40 (br s, 1H), 10.94 (br s, 1H), 8.49 (s, 1H), 8.19 (s, 1H), 7.60 (m, 3H), 7.08 (m, 2H), 6.86 (dd, J=9, 1.5 Hz, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ=157.2 (d, J=243.2 Hz), 152.7 (d, J=7.3 Hz), 152.5 (d, J=246.1 Hz), 149.9, 149.5, 146.3, 143.7, 140.4 (d, J=11.9 Hz), 133.9 (d, J=8.6 Hz), 127.8 (d, J=9.6 Hz), 126.1, 123.0 (d, J=8.9 Hz), 121.4, 119.6 (d, J=8.5 Hz), 116.9 (d, J=27.0 Hz), 116.3, 108.7 (d, J=21.7 Hz), 103.2; HRMS (ESI-TOF): *m/z* calcd for C₁₈H₁₀N₄O₃SBrF₃: 498.9682 [M+H]⁺; found: 498.9692.

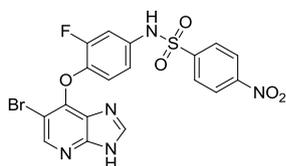
N-(4-((6-bromo-3H-imidazo[4,5-b]pyridin-7-yl)oxy)-3-fluorophenyl)-2-(trifluoromethyl)benzenesulfonamide (38c)



Reaction was performed using general procedure A. White solid (53 mg, 32 %).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ=13.40 (br s, 1H), 10.84 (br s, 1H), 8.48 (s, 1H), 8.22 (s, 1H), 8.11 (dd, J=7.5, 2 Hz, 1H), 8.02 (dd, J=7.5, 2 Hz, 1H), 7.89 (m, 2H), 7.08 (m, 2H), 6.84 (dd, J=9, 1.5 Hz, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ=150.3, 149.9, 146.8, 144.2, 140.7, 140.5, 138.5, 134.9 (d, J=10.0 Hz), 134.1, 134.0, 131.2, 129.2 (, J=6.4 Hz), 127.1, 126.6, 123.2 (d, J=274.0 Hz), 121.9, 116.6, 109.0 (d, J)21.3 Hz), 103.8.

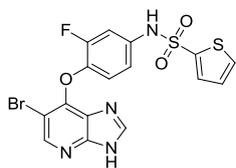
N-(4-((6-bromo-3H-imidazo[4,5-b]pyridin-7-yl)oxy)-3-fluorophenyl)-4-nitrobenzenesulfonamide (38d)



Reaction was performed using general procedure A. Beige solid (93 mg, 59 %).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ=10.79 (br s, 1H), 8.50 (s, 1H), 8.41 (d, J=9 Hz, 2H), 8.26 (s, 1H), 8.01 (d, J=9 Hz, 2H), 7.08 (m, 2H), 6.82 (ddd, J=9, 1.5, 1.5 Hz, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ=152.5 (d, J=246.7 Hz), 150.0, 148.9, 146.4, 144.3, 144.0, 140.8 (d, J=11.7 Hz), 133.9 (d, J=9.1 Hz), 128.4, 124.8, 121.1, 117.3, 109.7 (d, J=21.5 Hz), 103.6.

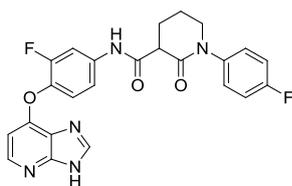
N-(4-((6-bromo-3H-imidazo[4,5-b]pyridin-7-yl)oxy)-3-fluorophenyl)thiophene-2-sulfonamide (38e)



Reaction was performed using general procedure A. Beige solid (62 mg, 42 %).

^1H NMR (300 MHz, DMSO): δ =8.54 (s, 1H), 8.31 (s, 1H), 7.81 (d, J =5.0 Hz, 1H), 7.49 (d, J =3.6 Hz, 1H), 7.13 (t, J =3.6 Hz, 1H), 7.06-6.94 (m, 2H), 6.78 (d, J =8.8 Hz, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO): δ =172.2, 152.6 (d, J =244.1 Hz), 146.2, 143.9, 140.8, 137.8 (d, J =12.6 Hz), 130.9, 130.2, 127.1, 120.4, 116.8, 108.3 (d, J =20.1 Hz), 103.4; HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_3\text{S}_2\text{BrF}$: 468.9434 $[\text{M}+\text{H}]^+$; found: 468.9444.

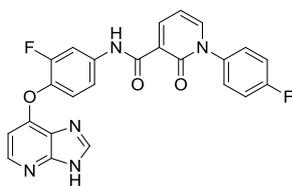
N-(4-((3H-imidazo[4,5-b]pyridin-7-yl)oxy)-3-fluorophenyl)-1-(4-fluorophenyl)-2-oxopiperidine-3-carboxamide (39)



N-(4-((2,3-diaminopyridin-4-yl)oxy)-3-fluorophenyl)-1-(4-fluorophenyl)-2-oxopiperidine-3-carboxamide (0,09 mmol, 40 mg) was dissolved in trimethylorthoformiate (2,67 mmol, 30 eq., 0,3 mL) and HCl 37% (0,18 mmol, 2 eq., 18 μL). The solution was stirred at rt overnight. The reaction mixture was neutralized with NaOH 3M solution and extracted with EtOAc. The organic layer was dried over anhydrous MgSO_4 , evaporated and purified by column chromatography using a gradient of DCM to DCM/EtOH 6% to afford the desired product as a pale yellow solid (22 mg, 54 %).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ =10.18 (s, 1H), 8.25 (d, J =5.5 Hz, 1H), 8.18 (s, 1H), 7.78 (d, J =12.7 Hz, 1H), 7.25-7.08 (m, 6H), 6.53 (d, J =5.5 Hz, 1H), 3.68 (m, 2H), 2.29-1.97 (m, 4H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ =167.7 (d, J =249.1 Hz), 164.2, 163.4, 157.7, 154.4 (d, J =249.4 Hz), 146.0, 145.3, 145.5, 138.5, 136.9, 130.3, 128.2 (d, J =8.6 Hz), 123.6, 116.7 (d, J =22.8 Hz), 116.0 (d, J =3.5 Hz), 109.5, 109.2, 103.7, 52.8, 47.7, 23.0, 21.8.

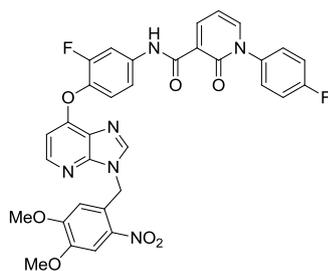
N-(4-((3H-imidazo[4,5-b]pyridin-7-yl)oxy)-3-fluorophenyl)-1-(4-fluorophenyl)-2-oxo-1,2-dihydropyridine-3-carboxamide (40)



Reaction was performed using general procedure B. Beige solid (302 mg, 40%).

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ =13.11 (s, 1H), 12.05 (s, 1H), 8.60 (dd, J =7.3, 2.0 Hz, 1H), 8.36 (s, 1H), 8.19 (d, J =5.4 Hz, 1H), 8.09 (dd, J =6.6, 2.0 Hz, 1H), 7.99 (d, J =12.6 Hz, 1H), 7.60 (dd, J =8.9, 4.9 Hz, 2H), 7.48-7.23 (m, 4H), 6.74 (t, J =6.9 Hz, 1H), 6.56 (s, 1H); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): δ =161.9 (d, J =246 Hz), 161.8, 161.6, 154.7, 153.4 (d, J =246 Hz), 150.4, 145.5, 144.9, 144.0, 142.3, 139.9, 136.6, 136.2 (d, J =2.8 Hz), 129.2 (d, J =8.9 Hz), 124.3 (d, J =2.8 Hz), 123.5, 120.2, 116.5, 116.0 (d, J =23.1 Hz), 108.7 (d, J =22.8 Hz), 107.0, 103.5; HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_3\text{F}_2$: 460.1221 $[\text{M}+\text{H}]^+$; found: 460.1221.

N-(4-((3-(4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin-7-yl)oxy)-3-fluorophenyl)-1-(4-fluorophenyl)-2-oxo-1,2-dihydropyridine-3-carboxamide (40a)

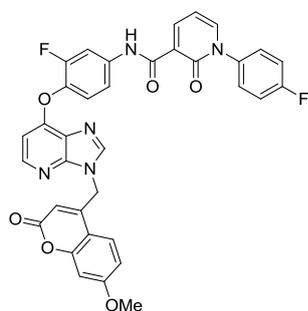


Reaction was performed using general procedure B. Beige solid (214 mg, 80%).

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ =12.09 (s, 1H), 8.58 (dd, J =7.1, 2.1 Hz, 1H), 8.38 (s, 1H), 8.21 (d, J =5.6 Hz, 1H), 8.13 (dd, J =6.6, 2.2 Hz, 1H), 8.01 (dd, J =13.0, 2.2 Hz, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.61 (dd, J =9.0, 4.9 Hz, 2H), 7.52-7.33 (m, 4H), 6.87 (s, 1H), 6.72 (t, J =7.1 Hz, 1H), 6.62 (d, J =5.6 Hz, 1H), 5.78 (s, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.70 (s, 3H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ =161.8, 161.6, 155.1, 153.0, 149.5, 148.1, 145.8, 145.0, 144.2, 140.3, 136.9, 136.8, 136.7, 136.6, 136.2, 129.4, 125.6, 124.6, 123.6, 120.1, 116.5, 116.3, 115.9, 112.7, 108.8, 108.4, 107.0, 104.0, 56.1, 44.2, 38.2; HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $\text{C}_{33}\text{H}_{25}\text{N}_6\text{O}_7\text{F}_2$: 655.1753 $[\text{M}+\text{H}]^+$; found: 655.1754.

Photophysical properties in DMSO : λ_{max} = 345 nm, ϵ = 35400 $\text{mol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{cm}^{-1}$.

N-(3-fluoro-4-((3-((7-methoxy-2-oxo-2H-chromen-4-yl)methyl)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin-7-yl)oxy)phenyl)-1-(4-fluorophenyl)-2-oxo-1,2-dihydropyridine-3-carboxamide (40b)



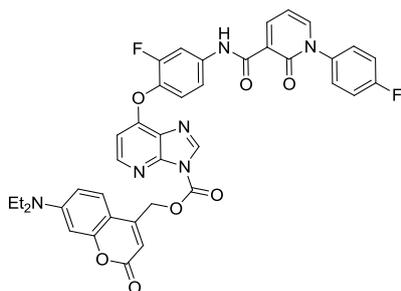
Reaction was performed using general procedure B. Beige solid (61 mg, 60%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ =12.00 (s, 1H), 8.75 (dd, J =7.2, 1.7 Hz, 1H), 8.23 (d, J =5.6 Hz, 1H), 8.04 (s, 1H), 7.96 (d, J =12.3 Hz, 1H), 7.62 (t, J =8.5 Hz, 1H), 7.45-7.35 (m, 3H), 7.27 (m, 1H), 6.92-6.84 (m, 2H), 6.67-6.55 (m, 2H), 5.74 (s, 1H), 5.62 (s, 2H), 3.89 (s, 3H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ =164.6, 163.4, 162.6, 161.7, 160.6, 156.8, 156.1, 155.8, 155.3, 152.8, 149.4, 149.1, 146.8, 145.4,

142.4, 141.9, 137.2, 136.0, 128.5 (d, $J=8.8$ Hz), 124.6, 123.7, 122.2, 117.0 (d, $J=23.2$ Hz), 116.6 (d, $J=3.2$ Hz), 113.0, 110.9, 109.9 (d, $J=22.8$ Hz), 107.5, 104.5, 101.5, 56.0, 43.5; HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $C_{35}H_{24}N_5O_6F_2$: 648.1695 $[M+H]^+$; found: 648.1693.

Photophysical properties in DMSO : λ_{max} = 327 nm, ϵ = 19600 mol⁻¹.L.cm⁻¹.

(7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromen-4-yl)methyl 7-(2-fluoro-4-(1-(4-fluorophenyl)-2-oxo-1,2-dihydropyridine-3-carboxamido)phenoxy)-3H-imidazo[4,5-b]pyridine-3-carboxylate (40c)

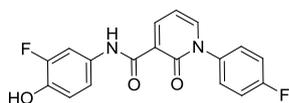


N-(4-((3H-imidazo[4,5-b]pyridin-7-yl)oxy)-3-fluorophenyl)-1-(4-fluorophenyl)-2-oxo-1,2-dihydropyridine-3-carboxamide (**40**) (0,22 mmol, 100 mg) and benzyl (4-nitrophenyl) carbonate (**90**) (0,44 mmol, 2 eq., 180 mg) were dissolved in THF (0,5 mL). Triethylamine (0,26 mmol, 1,2 eq., 36 μ L) and a few crystals of DMAP were added. The solution was stirred at rt for 4h. The solvent was evaporated and the residue was triturated in DCM, filtrated and washed with DCM to afford the desired product as a beige solid (54 mg, 34 %).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ =12.13 (s, 1H), 8.88 (s, 1H), 8.60 (dd, $J=7.2, 2.0$ Hz, 1H), 8.38 (d, $J=5.7$ Hz, 1H), 8.14 (dd, $J=6.6, 2.0$ Hz, 1H), 8.05 (dd, $J=13.0, 2.4$ Hz, 1H), 7.65-7.56 (m, 3H), 7.55-7.48 (m, 1H), 7.47-7.40 (m, 3H), 6.81 (d, $J=5.5$ Hz, 1H), 6.74 (t, $J=7.2$ Hz, 2H), 6.57 (m, 2H), 5.75 (s, 2H), 3.44 (q, $J=7.1$ Hz, 4H), 1.13 (t, $J=7.1$ Hz, 6H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ =162.3, 162.1, 161.2, 160.7, 156.2, 155.9, 150.9, 149.7, 148.2, 148.1, 148.0, 145.5, 144.7, 143.7, 137.7, 136.7, 129.9, 129.7, 126.0, 124.1, 120.5, 116.7, 109.2, 107.5, 105.4, 97.3, 65.3, 44.5, 12.8; HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $C_{39}H_{31}N_6O_7F_2$: 733.2222 $[M+H]^+$; found: 733.2203.

Photophysical properties in DMSO : λ_{max} = 360 nm, ϵ = 36900 mol⁻¹.L.cm⁻¹.

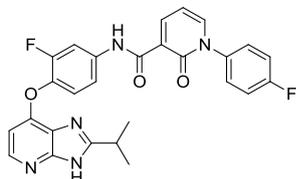
N-(3-fluoro-4-hydroxyphenyl)-1-(4-fluorophenyl)-2-oxo-1,2-dihydropyridine-3-carboxamide (41)



The reaction was performed following procedure B on 4-Amino-2-fluorophenol (3 g, 23.6 mmol) to give the corresponding product as a light brown solid (4 g, 50 %). Mp: 217-219 °C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 11.77 (s, 1H), 9.69 (s, 1H), 8.52 (dd, $J = 7.3, 1.9$ Hz, 1H), 8.07 (dd, $J = 6.4, 1.7$ Hz, 1H), 7.72 (dd, $J = 13.5, 2.4$ Hz, 1H), 7.61 – 7.53 (m, 2H), 7.45 – 7.35 (m, 2H), 7.11 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 6.88 (t, $J = 9.3$ Hz, 1H), 6.68 (t, $J = 7.0$ Hz, 1H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ 161.8 (d, $J = 245.9$ Hz), 161.7, 160.8, 150.3 (d, $J = 239.3$ Hz), 144.4, 143.6, 141.1 (d, $J = 12.2$ Hz), 136.3 (d, $J = 2.9$ Hz), 130.3 (d, $J = 9.3$ Hz), 129.2 (d, $J = 8.9$ Hz), 120.4, 117.7 (d, $J = 3.7$ Hz), 116.0 (d, $J = 18.9$

Hz), 115.9 (d, $J = 3.9$ Hz), 108.3 (d, $J = 23.0$ Hz), 106.9. MS (ES+) m/z (%): 343.1 (100) [M+H]⁺. HRMS (ESI) calculated for C₁₈H₁₃N₂O₃F₂ 343.0894; found 343.0902.

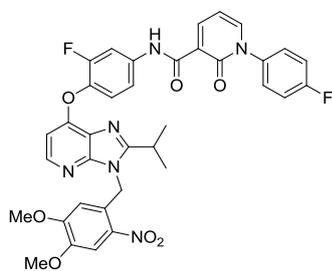
N-(3-fluoro-4-((2-isopropyl-3H-imidazo[4,5-b]pyridin-7-yl)oxy)phenyl)-1-(4-fluorophenyl)-2-oxo-1,2-dihydropyridine-3-carboxamide (61)



Reaction was performed using general procedure B. Beige solid (231 mg, 84 %).

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ =12.89 (s, 1H), 12.10 (s, 1H), 8.60 (dd, $J=7.3, 2.0$ Hz, 1H), 8.14 (dd, $J=6.6, 2.0$ Hz, 1H), 8.09-8.00 (m, 2H), 7.65-7.60 (m, 2H), 7.49 (d, $J=8.2$ Hz, 1H), 7.43 (t, $J=8.8$ Hz, 2H), 7.37 (t, $J=8.7$ Hz, 1H), 6.74 (t, $J=6.9$ Hz, 1H), 6.42 (d, $J=5.5$ Hz, 1H), 3.21-3.10 (sept, $J=6.7$ Hz, 1H), 1.36 (d, $J=6.7$ Hz, 6H); ¹³C NMR (126 MHz, DMOS-d₆): δ =161.9 (d, $J=246$ Hz), 161.8, 161.6, 160.2, 153.8, 153.5 (d, $J=246$ Hz), 151.4, 145.0, 144.8, 144.2 (d, $J=16.5$ Hz), 136.7 (d, $J=9.3$ Hz), 136.2 (d, $J=2.5$ Hz), 129.3, 129.2, 124.2, 123.6, 120.1, 116.5, 116.1 (d, $J=23.1$ Hz), 108.6 (d, $J=22.9$ Hz), 107.0, 102.7, 28.6, 21.0; HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for C₂₇H₂₂N₅O₃F₂: 502.1691 [M+H]⁺; found: 502.1710.

N-(4-((3-(4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl)-2-isopropyl-3H-imidazo[4,5-b]pyridin-7-yl)oxy)-3-fluorophenyl)-1-(4-fluorophenyl)-2-oxo-1,2-dihydropyridine-3-carboxamide (61a)

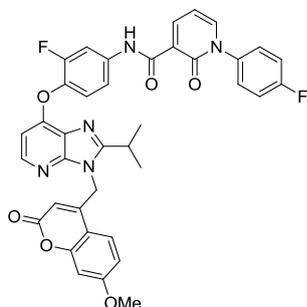


In a round-bottom flask the N-(3-fluoro-4-((2-isopropyl-3H-imidazo[4,5-b]pyridin-7-yl)oxy)phenyl)-1-(4-fluorophenyl)-2-oxo-1,2-dihydropyridine-3-carboxamide (**61**) (0,20 mmol, 100 mg) is dissolved in dry DMF (1,5 mL). The solution was cooled down to 0°C and NaH (0,22 mmol, 1,1 eq., 9 mg). The reaction mixture is stirred at 0°C for 30 min before 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl bromide (0,22 mmol, 1,1 eq., 61 mg) was added. The solution is stirred at rt overnight. The solvent was removed under reduced pressure. The residue was taken in water and extracted with EtOAc. The organic layer was dried over anhydrous MgSO₄, evaporated under reduced pressure and purified by column chromatography using a gradient of DCM to DCM/EtOH 2% to afford the desired product as a brown oil (42 mg, 30 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ =12.00 (s, 1H), 8.75 (dd, $J=7.2, 2.0$ Hz, 1H), 8.10 (d, $J=5.6$ Hz, 1H), 7.95 (dd, $J=12.4, 2.0$ Hz, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.64 (dd, $J=6.6, 2.0$ Hz, 1H), 7.46-7.33 (m, 3H), 7.27 (t, $J=8.4$ Hz, 3H), 6.63 (t, $J=6.6$ Hz, 1H), 6.46 (d, $J=4.9$ Hz, 1H), 5.97 (s, 2H), 5.87 (s, 1H), 3.95 (s, 3H), 3.50 (s, 3H), 3.08 (sept, $J=6.8$ Hz, 1H), 1.42 (d, $J=6.8$ Hz, 6H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ =164.4, 162.5, 161.5, 161.1, 160.3, 156.0, 155.6, 154.1, 152.7, 150.4, 148.1, 145.3, 127.9, 124.5, 123.9, 233.0, 117.0, 116.7, 116.4, 109.8, 108.7, 107.3, 103.7, 56.5, 56.1, 43.5, 27.1, 21.5.

Photophysical properties in DMSO : $\lambda_{\max} = 342 \text{ nm}$, $\epsilon = 36600 \text{ mol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{cm}^{-1}$.

N-(3-fluoro-4-((2-isopropyl-3-((7-methoxy-2-oxo-2H-chromen-4-yl)methyl)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin-7-yl)oxy)phenyl)-1-(4-fluorophenyl)-2-oxo-1,2-dihydropyridine-3-carboxamide (61b)

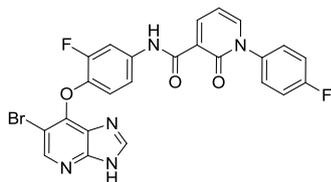


In a round-bottom flask the N-(3-fluoro-4-((2-isopropyl-3H-imidazo[4,5-b]pyridin-7-yl)oxy)phenyl)-1-(4-fluorophenyl)-2-oxo-1,2-dihydropyridine-3-carboxamide (**61**) (0,20 mmol, 100 mg) is dissolved in dry DMF (1,5 mL). The solution was cooled down to 0°C and NaH (0,22 mmol, 1,1 eq., 9 mg). The reaction mixture is stirred at 0°C for 30 min before 4-bromomethyl-7-methoxycoumarine (0,22 mmol, 1,1 eq., 59 mg) was added. The solution is stirred at rt overnight. The solvent was removed under reduced pressure. The residue was taken in water and extracted with EtOAc. The organic layer was dried over anhydrous MgSO₄, evaporated under reduced pressure and purified by column chromatography using a gradient of DCM to DCM/EtOH 3% to afford the desired product as a white solid (18 mg, 13 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ =11.99 (s, 1H), 8.75 (dd, J=7.1, 2.0 Hz, 1H), 8.08 (d, J=5.6 Hz, 1H), 7.96 (dd, J=12.3, 2.0 Hz, 1H), 7.69-7.60 (m, 2H), 7.46-7.34 (m, 3H), 7.32-7.23 (m, 3H), 6.94 (dd, J=8.7, 2.3 Hz, 1H), 6.88 (d, J=2.3 Hz, 1H), 6.62 (t, J=7.1 Hz, 1H), 6.47 (d, J=5.6 Hz, 1H), 5.62 (s, 2H), 5.38 (s, 1H), 3.91 (s, 3H), 3.07 (sept, J=6.7 Hz, 1H), 1.46 (d, J=6.7 Hz, 6H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ =163.3, 162.6, 161.6, 160.6, 159.7, 155.9, 155.7, 150.1, 149.9, 145.4, 141.9, 136.0, 128.6, 124.7, 124.3, 124.1, 122.2, 119.8, 117.1, 116.8, 116.6, 113.0, 110.9, 109.9, 109.6, 109.3, 107.4, 104.4, 56.0, 42.2, 27.3, 21.7.

Photophysical properties in DMSO : $\lambda_{\max} = 327 \text{ nm}$, $\epsilon = 36400 \text{ mol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{cm}^{-1}$.

N-(4-((6-bromo-3H-imidazo[4,5-b]pyridin-7-yl)oxy)-3-fluorophenyl)-1-(4-fluorophenyl)-2-oxo-1,2-dihydropyridine-3-carboxamide (62)

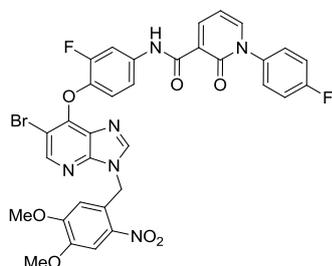


Reaction was performed using general procedure B. Light yellow solid (395 mg, 82 %).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ =13.38 (s, 1H), 11.99 (s, 1H), 8.55 (dd, J=7.3, 2.0 Hz, 1H), 8.48 (s, 1H), 8.22 (s, 1H), 8.09 (dd, J=6.7, 2.0 Hz, 1H), 7.91 (d, J=12.8 Hz, 1H), 7.58 (dd, J=8.7, 4.9 Hz, 2H), 7.39 (t, J=8.7 Hz, 2H), 7.28 (d, J=8.3 Hz, 1H), 7.11 (t, J=8.8 Hz, 1H), 6.70 (t, J=6.7 Hz, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ =161.8 (, J=245.9 Hz), 161.8, 161.4, 152.4 (d, J=244.2 Hz), 149.9, 149.7,

146.3, 144.8, 144.0, 143.8, 139.6 (d, J=11.6 Hz), 136.2 (d, J=2.4 Hz), 135.5 (d, J=8.9 Hz), 129.3 (d, J=8.9 Hz), 126.2, 120.9, 120.2, 116.0 (d, J=23.0 Hz), 115.7, 108.1 (d, J=22.7 Hz), 107.0, 103.4; HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $C_{24}H_{15}N_5O_3BrF_2$: 538.0326 [M+H]⁺; found: 538.0316.

N-(4-((6-bromo-3-(4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin-7-yl)oxy)-3-fluorophenyl)-1-(4-fluorophenyl)-2-oxo-1,2-dihydropyridine-3-carboxamide (62a)

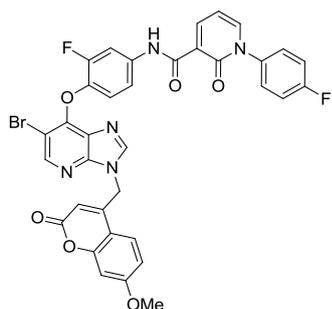


In a round-bottom flask the N-(4-((6-bromo-3H-imidazo[4,5-b]pyridin-7-yl)oxy)-3-fluorophenyl)-1-(4-fluorophenyl)-2-oxo-1,2-dihydropyridine-3-carboxamide (**62**) (0,28 mmol, 150 mg) is dissolved in dry DMF (1,5 mL). The solution was cooled down to 0°C and NaH (0,31 mmol, 1,1 eq., 12 mg). The reaction mixture is stirred at 0°C for 30 min before 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl bromide (0,31 mmol, 1,1 eq., 85 mg) was added. The solution is stirred at rt overnight. The solvent was removed under reduced pressure. The residue was taken in water and extracted with EtOAc. The organic layer was dried over anhydrous $MgSO_4$, evaporated under reduced pressure and purified by column chromatography using a gradient of DCM to DCM/MeOH 2% to afford the desired product as a pale yellow solid (126 mg, 62 %).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ =12.02 (s, 1H), 8.56 (dd, J=7.3, 2.2 Hz, 1H), 8.55 (s, 1H), 8.27 (s, 1H), 8.11 (dd, J=6.6, 2.2 Hz, 1H), 7.93 (dd, J=13.2, 2.4 Hz, 1H), 7.69 (s, 1H), 7.63-7.57 (m, 2H), 7.41 (, J=8.8 Hz, 2H), 7.31 (d, J=8.8 Hz, 1H), 7.18 (t, J=9.0 Hz, 1H), 6.82 (s, 1H), 6.72 (t, J=6.9 Hz, 1H), 5.75 (s, 1H), 5.73 (s, 2H), 3.85 (s, 3H), 3.70 (s, 3H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ =161.8, 161.4, 160.2, 158.7, 154.1, 153.0, 150.2, 148.9, 148.2, 146.6, 145.4, 144.9, 144.1, 140.3, 139.6, 139.4, 136.3, 136.2, 135.8, 135.7, 129.4, 129.2, 126.3, 125.1, 121.1, 120.2, 116.2, 115.9, 115.8, 112.7, 108.4, 107.0, 104.0, 56.1, 54.9, 44.3; HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $C_{33}H_{24}N_6O_7BrF_2$: 733.0858 [M+H]⁺; found: 733.0872.

Photophysical properties in DMSO : λ_{max} = 343 nm, ϵ = 28800 mol⁻¹.L.cm⁻¹.

N-(4-((6-bromo-3-((7-methoxy-2-oxo-2H-chromen-4-yl)methyl)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin-7-yl)oxy)-3-fluorophenyl)-1-(4-fluorophenyl)-2-oxo-1,2-dihydropyridine-3-carboxamide (62b)

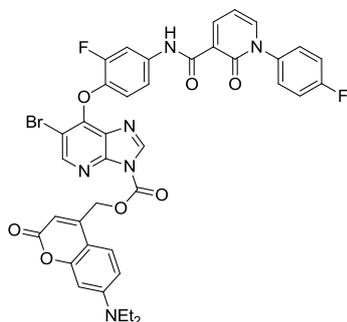


In a round-bottom flask the N-(4-((6-bromo-3H-imidazo[4,5-b]pyridin-7-yl)oxy)-3-fluorophenyl)-1-(4-fluorophenyl)-2-oxo-1,2-dihydropyridine-3-carboxamide (**62**) (0,41 mmol, 222 mg) is dissolved in dry DMF (1,5 mL). The solution was cooled down to 0°C and NaH (0,45 mmol, 1,1 eq., 18 mg). The reaction mixture is stirred at 0°C for 30 min before 4-bromomethyl-7-methoxycoumarin (0,45 mmol, 1,1 eq., 122 mg) was added. The solution is stirred at rt overnight. The solvent was removed under reduced pressure. The residue was taken in water and extracted with EtOAc. The organic layer was dried over anhydrous MgSO₄, evaporated under reduced pressure and purified by column chromatography using a gradient of DCM to DCM/MeOH 2% to afford the desired product as a pale yellow solid (135 mg, 45 %).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ=12.04 (s, 1H), 8.59-8.55 (m, 2H), 8.41 (s, 1H), 8.11 (dd, J=6.6, 2.1 Hz, 1H), 7.95 (dd, J=13.2, 2.3 Hz, 1H), 7.87 (d, J=8.8 Hz, 1H), 7.65-7.55 (m, 2H), 7.41 (t, J=8.8 Hz, 2H), 7.34 (dd, J=9.0, 1.8 Hz, 1H), 7.26 (t, J=9.0 Hz, 1H), 7.05 (d, J=2.4 Hz, 1H), 7.01 (dd, J=8.8, 2.5 Hz, 1H), 6.72 (t, J=7.0 Hz, 1H), 5.76 (s, 2H), 5.53 (s, 1H), 3.87 (s, 3H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ=162.7, 161.8, 161.5, 159.7, 155.0, 150.7, 150.4, 148.7, 146.9, 145.7, 144.9, 144.1, 139.5, 139.3, 136.3, 135.9, 135.8, 129.4, 129.2, 126.2, 125.7, 121.3, 120.2, 116.2, 115.9, 112.5, 110.5, 109.3, 107.0, 104.2, 101.1, 56.0, 43.2; HRMS (ESI-TOF): *m/z* calcd for C₃₅H₂₃N₅O₆BrF₂: 726.0800 [M+H]⁺; found: 726.0811.

Photophysical properties in DMSO : λ_{max} = 326 nm, ε = 34600 mol⁻¹.L.cm⁻¹.

(7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromen-4-yl)methyl 6-bromo-7-(2-fluoro-4-(1-(4-fluorophenyl)-2-oxo-1,2-dihydropyridine-3-carboxamido)phenoxy)-3H-imidazo[4,5-b]pyridine-3-carboxylate (62c)



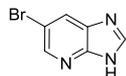
N-(4-((6-bromo-3H-imidazo[4,5-b]pyridin-7-yl)oxy)-3-fluorophenyl)-1-(4-fluorophenyl)-2-oxo-1,2-dihydropyridine-3-carboxamide (**62**) (0,14 mmol, 75 mg) and benzyl (4-nitrophenyl) carbonate (**90**) (0,28 mmol, 2 eq., 115 mg) were dissolved in THF (0,5 mL). Triethylamine (0,17 mmol, 1,2 eq., 23 μL) and a few crystals of DMAP were added. The solution was stirred at rt overnight. The solvent was evaporated and the residue was triturated in DCM, filtrated and washed with DCM to afford the desired product as a yellow solid (8 mg, 7 %).

¹H NMR (360 MHz, CDCl₃): δ=11.96 (s, 1H), 8.74 (dd, J=7.3, 2.2 Hz, 1H), 8.70 (s, 1H), 8.34 (s, 1H), 7.92 (dd, J=12.7, 2.5 Hz, 1H), 7.63 (dd, J=6.6, 2.2 Hz, 1H), 7.43-7.35 (m, 3H), 7.32-7.28 (m, 2H), 7.14 (t, J=8.7 Hz, 1H), 6.64-6.58 (m, 2H), 6.54 (d, J=2.5 Hz, 1H), 6.50 (t, J=1.1 Hz, 1H), 5.63 (d, J=1.1 Hz, 2H), 3.43 (q, J=7.1 Hz, 4H), 1.22 (t, J=7.1 Hz, 6H); ¹³C NMR (91 MHz, CDCl₃): δ=162.6, 161.7, 161.5, 156.5, 152.4, 151.0, 149.6, 147.9, 147.4, 146.9, 145.2, 142.0, 141.8, 136.5, 136.0, 128.6, 128.5, 127.9, 124.5, 122.3, 121.2, 117.2, 116.9, 115.9, 115.8, 109.5, 109.2, 108.9, 107.7,

107.4, 105.6, 98.1, 65.3, 44.9, 12.6; HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $C_{39}H_{30}N_6O_7BrF_2$: 811.1327 $[M+H]^+$; found: 811.1315.

Photophysical properties in DMSO : λ_{max} = 360 nm, ϵ = 30900 mol⁻¹.L.cm⁻¹.

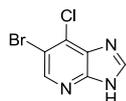
6-bromo-3H-imidazo[4,5-b]pyridine (64)



2,3-diamino-5-bromopyridine (26,6 mmol, 5 g) were dissolved in trimethylorthoformiate (798 mmol, 30 eq., 87 mL). HCl 37% (53,2 mmol, 2 eq., 5,3 mL) were added dropwise. After addition, the solution was stirred overnight at rt. The reaction mixture was neutralized with NaOH 3M solution. The solution was extracted with EtOAc. The organic layer was dried over anhydrous MgSO₄, evaporated under reduced pressure to obtain the desired product without further purification as a brown solid (4,8 g, 91 %).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ =8.47 (s, 1H), 8.41 (d, J=1.6 Hz, 1H), 8.27 (d, J=1.6 Hz, 1H). Spectroscopic data were in agreement with those reported in the literature.⁵

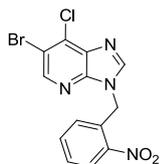
6-bromo-7-chloro-3H-imidazo[4,5-b]pyridine (65a)



To a mixture of 6-bromo-3H-imidazo[4,5-b]pyridine (24,6 mmol, 4,86 g) in AcOH was added *m*-chloroperbenzoic acid (49.1 mmol, 2 eq., 12,11 g). The reaction mixture was stirred at RT for 3 d then filtered through a sintered glass disk to afford a first fraction of 6-bromo-3H-imidazo[4,5-b]pyridine 4-oxide. The filtrate was concentrated under reduced pressure, taken in AcOEt and filtered again to render a second fraction of the *N*-oxide. The combined fractions of 6-bromo-3H-imidazo[4,5-b]pyridine 4-oxide were taken in AcOEt and the resulting suspension was refluxed for 1 h. Subsequent filtration through sintered glass disk afforded 6-bromo-3H-imidazo[4,5-b]pyridine-4-oxide with no trace of benzoic acid. The solid was distributed in microwave tubes in 500 mg portions and POCl₃ (2 mL) was added in each tube. The reaction mixture was heated under microwave irradiation at 80 °C for 10 min. Subsequently, the reaction mixture was poured on ice, neutralized with a 3 M NaOH aqueous solution and the aqueous layer was extracted with AcOEt. The combined organic layers were dried with anhydrous MgSO₄ and concentrated under reduced pressure to give the desired product as an inseparable mixture (ratio 85:15) with the 5-chloro-3H-imidazo[4,5-b]pyridine isomer (beige solid, 3,3 g, 65 %).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ =8.51 (s, 2H), 8.46 (s, 0.33H, 5-Cl isomer); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ =146.6, 145.8, 145.5, 142.3, 133.7, 133.2, 132.3, 130.4, 128.8, 127.8, 113.1, 111.1; HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for C_6H_4NClBr : 231.9277 $[M+H]^+$; found: 231.9287.

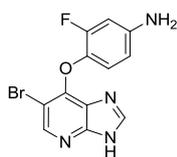
6-bromo-7-chloro-3-(2-nitrobenzyl)-3H-imidazo[4,5-b]pyridine (67a)



In a round-bottom flask the 6-bromo-7-chloro-3H-imidazo[4,5-b]pyridine (**65a**) (1,08 mmol, 250 mg) is dissolved in dry DMF (8 mL). The solution was cooled down to 0°C and NaH (1,18 mmol, 1,1 eq., 47 mg). The reaction mixture is stirred at 0°C for 30 min before 2-nitrobenzyl bromide (1,18 mmol, 1,1 eq., 203 mg) was added. The solution is stirred at rt overnight. The solvent was removed under reduced pressure. The residue was taken in water and extracted with EtOAc. The organic layer was dried over anhydrous MgSO₄, evaporated under reduced pressure and purified by column chromatography using a gradient of cyclohexane to cyclohexane/EtOAc 50% to afford the desired product as a beige solid (172 mg, 43 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ=8.51 (s, 1H), 8.25 (s, 1H), 7.55 (qtd, J=7.6, 1.5 Hz, 2H), 7.17 (dd, J=7.6, 1.5 Hz, 1H), 5.89 (s, 2H).

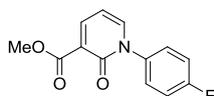
4-((6-bromo-3H-imidazo[4,5-b]pyridin-7-yl)oxy)-3-fluoroaniline (**69**)



tert-butyl 4-((2-amino-5-bromo-3-nitropyridin-4-yl)oxy)-3-fluorophenyl)carbamate (**83**) (2,26 mmol, 1 g) was dissolved in EtOH (10 mL) under Ar atmosphere. Acetic acid (9,0 mmol, 4 eq., 0,5 mL) is added dropwise. After addition, zinc powder (9,0 mmol, 4 eq., 0,59 g) is added portionwise. The reaction mixture is stirred at rt 30 min, then filtered on a celite plug, washed with ethanol. The filtrate is evaporated, dissolved in EtOAc and washed with NH₄OH solution. The organic layer is dried over anhydrous MgSO₄, evaporated under reduced pressure. The crude is dissolved in trimethylorthoformate (67,7 mmol, 30 eq., 7,4 mL) and HCl 37% (4,5 mmol, 2 eq., 0,45 mL) is added dropwise. The solution is stirred at rt overnight. HCl 37% is then added until complete deprotection of the aniline (follow-up by TLC). The solution is neutralized with NaOH 3M solution and extracted with EtOAc. The organic layer is dried over anhydrous MgSO₄, evaporated under reduced pressure and purified by column chromatography using a gradient of DCM to DCM/MeOH 5% to afford the desired product as a beige solid (294 mg, 40 %).

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ=8.47 (s, 1H), 8.13 (s, 1H), 6.80 (t, J=8.9 Hz, 1H), 6.55 (dd, J=12.9, 2.6 Hz, 1H), 6.42 (ddd, J=8.9, 2.6, 1.3 Hz, 1H).

methyl 1-(4-fluorophenyl)-2-oxo-1,2-dihydropyridine-3-carboxylate (**71**)

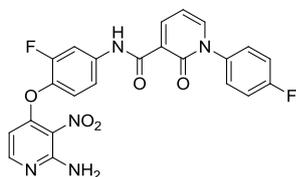


To a solution of commercial methyl-2-oxo-2H-pyran-3-carboxylate **57** (7 g, 45.4 mmol) in DMF (20 mL), was added dropwise under argon atmosphere the commercial *p*-fluoroaniline **58** (4.5 mL, 46.8 mmol). The resulting mixture was stirred at 0 °C for 7 h before EDCI (11.3 g, 59 mmol)

and DMAP (1.39 g, 11.4 mmol) were added. After stirring at RT for 12 h, the reaction mixture was concentrated under reduced pressure and the resulting brown oil was extracted with AcOEt, washed with brine and dried on MgSO₄. Solvent was evaporated and crude product was purified by chromatography using a gradient of cyclohexane to AcOEt to give the corresponding product as a beige solid (7.8 g, 69 %).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ = 8.10 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H), 7.93 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H), 7.49 – 7.32 (m, 4H), 6.39 (m, 1H), 3.73 (s, 3H). MS (ES+) *m/z* (%): 247.9 (100) [M+H]⁺. Spectroscopic data were in agreement with those reported in the literature.⁵⁰

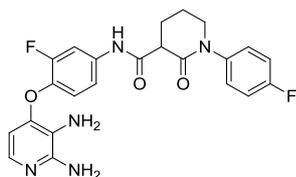
N-(4-((2-amino-3-nitropyridin-4-yl)oxy)-3-fluorophenyl)-1-(4-fluorophenyl)-2-oxo-1,2-dihydropyridine-3-carboxamide (72)



N-(3-fluoro-4-hydroxyphenyl)-1-(4-fluorophenyl)-2-oxo-1,2-dihydropyridine-3-carboxamide (**41**) (1,9 mmol, 1,1 eq., 651 mg) was dissolved in dry DMF (4,5 mL) under argon. *t*-BuOK (2,0 mmol, 1,1 eq., 223 mg) was added and the solution was stirred at rt for 1 h. 2-amino-4-chloro-3-nitropyridine (1,7 mmol, 300 mg) was added and the reaction mixture was heated at 70°C overnight. The solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was triturated in EtOAc and filtered to afford the desired product without further purification as a beige solid (632 mg, 76 %).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ=12.11 (s, 1H), 8.57 (dd, *J*=7.3, 2.2 Hz, 1H), 8.12 (dd, *J*=6.6, 2.2 Hz, 2H), 8.07-7.96 (m, 2H), 7.65-7.55 (m, 4H), 7.24 (s, 2H), 6.72 (t, *J*=7.0 Hz, 1H), 6.00 (dd, *J*=5.7, 1.0 Hz, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ=161.9 (d, *J*=246.2 Hz), 161.7 (d, *J*=9.6 Hz), 158.5, 153.9, 153.5, 153.1 (d, *J*=246.2 Hz), 145.1, 144.3, 137.5 (d, *J*=12.9 Hz), 129.3 (d, *J*=8.9 Hz), 123.7, 121.1, 120.1, 116.6, 116.3, 116.0, 108.8, 108.5, 107.1, 99.3; HRMS (ESI-TOF): *m/z* calcd for C₂₃H₁₆N₅O₅F₂: 480.1120 [M+H]⁺; found: 480.1119.

N-(4-((2,3-diaminopyridin-4-yl)oxy)-3-fluorophenyl)-1-(4-fluorophenyl)-2-oxopiperidine-3-carboxamide (74)

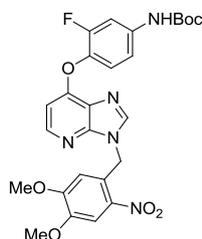


N-(4-((2-amino-3-nitropyridin-4-yl)oxy)-3-fluorophenyl)-1-(4-fluorophenyl)-2-oxo-1,2-dihydropyridine-3-carboxamide (**72**) (0,42 mmol, 200 mg) was solubilized in EtOH (5 mL) under argon atmosphere. Pd/C 10 % (0,08 mmol, 0,2 eq. 89 mg) was added. The solution was purged with H₂ and stirred under H₂ atmosphere at rt overnight. The solution was filtered on a

celite plug, washed with EtOH. The filtrate was evaporated and purified by column chromatography using a gradient of DCM to DCM/MeOH 2% to afford the desired product as a beige solid (40 mg, 20 %).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ =10.18 (s, 1H), 7.72 (dd, J =12.3, 2.4 Hz, 1H), 7.45 (d, J =6.0 Hz, 1H), 7.30-7.08 (m, 6H), 7.01 (t, J =8.7 Hz, 1H), 6.04 (d, J =6.0 Hz, 1H), 3.70-3.64 (m, 2H), 2.24-1.96 (m, 4H).

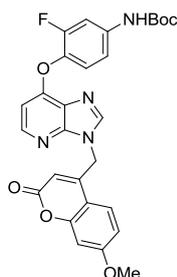
tert-butyl (4-((3-(4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin-7-yl)oxy)-3-fluorophenyl)carbamate (75a)



In a round-bottom flask the 4-((3H-imidazo[4,5-b]pyridin-7-yl)oxy)-3-fluoroaniline (**35**) (1,42 mmol, 490 mg) is dissolved in dry DMF (10,5 mL). The solution was cooled down to 0°C and NaH (1,57 mmol, 1,1 eq., 63 mg). The reaction mixture is stirred at 0°C for 30 min before 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl bromide (1,57 mmol, 1,1 eq., 432 mg) was added. The solution is stirred at rt overnight. The solvent was removed under reduced pressure. The residue was taken in water and extracted with EtOAc. The organic layer was dried over anhydrous MgSO_4 , evaporated under reduced pressure and purified by column chromatography using a gradient of cyclohexane to cyclohexane/EtOAc 60 % to afford the desired product as a beige solid (286 mg, 37 %).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ =8.25-8.16 (m, 1H), 7.72 (s, 1H), 7.54 (dd, J =12.4, 1.9 Hz, 1H), 7.20 (t, J =8.7 Hz, 1H), 7.05 (d, J =8.7 Hz, 1H), 6.82 (s, 1H), 6.75 (s, 1H), 6.51 (d, J =6.5 Hz, 1H), 5.88 (s, 2H), 3.95 (s, 3H), 3.76 (s, 3H), 1.53 (s, 9H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ =156.6, 153.8, 152.6, 149.7, 148.7, 146.2, 143.3, 140.3, 137.4 (d, J =9.9 Hz), 136.3 (d, J =12.6 Hz), 126.4, 125.4, 123.7, 114.5, 112.3, 108.4, 108.1, 107.8, 103.9, 81.3, 56.6, 56.5, 44.9, 28.4; HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{27}\text{N}_5\text{O}_7\text{F}$: 540.1895 $[\text{M}+\text{H}]^+$; found: 540.1891.

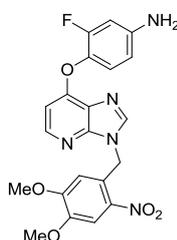
tert-butyl (3-fluoro-4-((3-((7-methoxy-2-oxo-2H-chromen-4-yl)methyl)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin-7-yl)oxy)phenyl)carbamate (75b)



In a round-bottom flask the 4-((3H-imidazo[4,5-b]pyridin-7-yl)oxy)-3-fluoroaniline (**35**) (0,58 mmol, 200 mg) is dissolved in dry DMF (4 mL). The solution was cooled down to 0°C and NaH (0,64 mmol, 1,1 eq., 26 mg). The reaction mixture is stirred at 0°C for 30 min before 4-bromométhyl-7-methoxycoumarine (0,63 mmol, 1,1 eq., 172 mg) was added. The solution is stirred at rt overnight. The solvent was removed under reduced pressure. The residue was taken in water and extracted with EtOAc. The organic layer was dried over anhydrous MgSO₄, evaporated under reduced pressure and purified by column chromatography using a gradient of DCM to DCM/MeOH 2 % to afford the desired product as a beige solid (116 mg, 37 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ=8.23 (d, J=5.5 Hz, 1H), 8.04 (s, 1H), 7.65-7.53 (m, 2H), 7.27-7.18 (m, 1H), 7.06 (d, J=8.9 Hz, 1H), 6.95-6.85 (m, 2H), 6.62 (s, 1H), 6.56 (d, J=5.5 Hz, 1H), 5.73 (s, 1H), 5.63 (s, 2H), 3.90 (s, 3H), 1.54 (s, 9H).

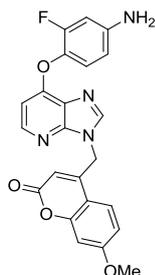
4-((3-(4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin-7-yl)oxy)-3-fluoroaniline (**76a**)



tert-butyl (4-((3-(4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin-7-yl)oxy)-3-fluorophenyl)carbamate (**75a**) (0,44 mmol, 240 mg) was dissolved in DCM (5 mL) at 0°C. TFA (67 mmol, 150 eq., 5 mL) was added dropwise. The solution was stirred at rt for 1h. The solution was diluted with water and neutralized with NaOH 3M solution and extracted with DCM. The organic layer was dried over anhydrous MgSO₄ and evaporated to give the desired product without further purification as a beige solid (196 mg, 100 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ=8.23-8.17 (m, 2H), 7.72 (s, 1H), 7.06 (t, J=8.6 Hz, 1H), 6.80 (s, 1H), 6.57-6.44 (m, 3H), 5.87 (s, 2H), 3.94 (s, 3H), 3.75 (s, 3H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ=157.2, 155.1, (d, J=248.4 Hz), 153.8, 149.5, 148.7, 146.2, 145.8 (d, J=9.5 Hz), 143.1, 140.3, 132.7 (d, J=13.1 Hz), 126.5, 125.4, 124.3, 112.3, 111.0 (d, J=2.9 Hz), 108.4, 103.8, 103.6, 103.5, 56.6, 56.5, 44.8; HRMS (ESI-TOF): *m/z* calcd for C₂₁H₁₉N₅O₅F: 440.1370 [M+H]⁺; found: 440.1366.

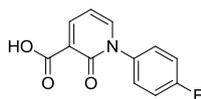
4-((7-(4-amino-2-fluorophenoxy)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin-3-yl)methyl)-7-methoxy-2H-chromen-2-one (**76b**)



tert-butyl (3-fluoro-4-((3-((7-methoxy-2-oxo-2H-chromen-4-yl)methyl)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin-7-yl)oxy)phenyl)carbamate (**75b**) (0,21 mmol, 111 mg) was dissolved in DCM (2,3 mL) at 0°C. TFA (31 mmol, 150 eq., 2,3 mL) was added dropwise. The solution was stirred at rt for 1h. The solution was diluted with water and neutralized with NaOH 3M solution and extracted with DCM. The organic layer was dried over anhydrous MgSO₄ and evaporated to give the desired product without further purification as a beige solid (72 mg, 81 %).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ=8.50 (s, 1H), 8.19 (d, J=5.6 Hz, 1H), 7.94 (d, J=8.8 Hz, 1H), 7.13-7.00 (m, 3H), 6.59-6.41 (m, 3H), 5.82-5.73 (m, 2H), 5.47 (s, 2H), 3.88 (s, 3H).

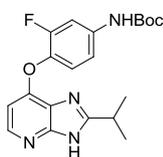
1-(4-fluorophenyl)-2-oxo-1,2-dihydropyridine-3-carboxylic acid (**77**)



A solution of methyl 1-(4-fluorophenyl)-2-oxo-1,2-dihydropyridine-3-carboxylate (**71**) (7.8 g, 31.4 mmol) in THF (39 mL) at RT was treated with a 1 M LiOH aqueous solution (55 mL) for 3 h. The mixture was then concentrated under reduced pressure, extracted with AcOEt and the pH was adjusted to 2 by adding 1 M HCl aqueous solution. The organic layer was dried on MgSO₄ and concentrated under reduced pressure to give the corresponding product as a beige solid (7.0 g, 95 %) without further purification. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8.47 (d, J = 5.7 Hz, 1H), 8.19 (d, J = 4.9 Hz, 1H), 7.65 – 7.52 (m, 2H), 7.47 – 7.33 (m, 2H), 6.77 (t, J = 6.6 Hz, 1H). MS (ES+) *m/z* (%): 256.0 (100) [M+Na]⁺. Spectroscopic data were in agreement with those reported in the literature.⁵⁰

tert-butyl (4-((2,3-diaminopyridin-4-yl)oxy)-3-fluorophenyl)carbamate (**78**)

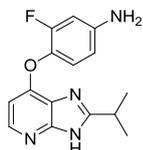
(3-fluoro-4-((2-isopropyl-3H-imidazo[4,5-b]pyridin-7-yl)oxy)phenyl)carbamate (**78**)



tert-butyl (4-((2,3-diaminopyridin-4-yl)oxy)-3-fluorophenyl)carbamate (**34**) (0,30 mmol, 100 mg) was dissolved in ethanol (2 mL). Isobutyraldehyde (0,39 mmol, 1,3 eq., 35 μL) was added and the reaction mixture was refluxed for 60 h. The solution was diluted with water and extracted with EtOAc. The organic layer was dried over anhydrous MgSO₄, evaporated under reduced pressure and purified by column chromatography using a gradient of cyclohexane to cyclohexane/EtOAc 30% to afford the desired product as a brown oil (64 mg, 55 %).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ =13.86 (s, 1H), 8.14 (d, J =5.8 Hz, 1H), 7.54 (d, J =12.5 Hz, 1H), 7.19 (t, J =8.6 Hz, 1H), 7.06 (d, J =8.3 Hz, 1H), 6.93 (s, 1H), 6.43 (dd, J =5.8, 1.6 Hz, 1H), 3.38 (sept, J =7.0 Hz, 1H), 1.55 (d, J =7.0 Hz, 6H), 1.53 (s, 9H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ =; HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_3\text{F}$: 387.1832 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$; found: 387.1824.

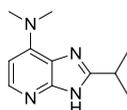
3-fluoro-4-((2-isopropyl-3H-imidazo[4,5-b]pyridin-7-yl)oxy)aniline (79)



tert-butyl (4-((2,3-diaminopyridin-4-yl)oxy)-3-fluorophenyl)carbamate (**34**) (1,6 mmol, 543 mg), isobutyric acid (1,9 mmol, 1,2 eq., 181 μL) and polyphosphoric acid (\sim 5 g) were placed in a sealed tube. The mixture was stirred at 150°C for 4 h. The reaction mixture was diluted with water and extracted with EtOAc. The organic layer was dried over anhydrous MgSO_4 , evaporated under reduced pressure and purified by column chromatography using a gradient of DCM to DCM/MeOH 5% to afford the desired product as a brown solid (255 mg, 55 %).

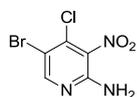
^1H NMR (300 MHz, CD_3OD): δ =8.07 (d, J =5.7 Hz, 1H), 7.01 (t, J =8.8 Hz, 1H), 6.60 (dd, J =12.6, 2.5 Hz, 1H), 6.54 (ddd, J =8.8, 2.5, 0.9 Hz, 1H), 6.42 (dd, J =5.7, 0.9 Hz, 1H), 3.26 (sept, J =7.0 Hz, 1H), 1.44 (d, J =7.0 Hz, 6H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ =156.4 (d, J =245.3 Hz), 149.3 (d, J =9.8 Hz), 145.8, 132.3 (d, J =12.8 Hz), 125.0 (d, J =2.1 Hz), 112.0 (d, J =2.8 Hz), 104.1, 103.8, 103.7, 30.5, 21.6.

2-isopropyl-N,N-dimethyl-3H-imidazo[4,5-b]pyridin-7-amine (81)



^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ =8.00 (d, J =5.9 Hz, 1H), 6.27 (d, J =5.9 Hz, 1H), 3.28 (sept, J =7.0 Hz, 1H), 1.51 (d, J =7.0 Hz, 6H).

5-bromo-4-chloro-3-nitropyridin-2-amine (82)



2-amino-4-chloro-3-nitropyridine (**31**) (28,8 mmol, 5 g) were dissolved in dry acetonitrile (150 mL). N-bromosuccinimide (34,8 mmol, 1,2 eq., 6,2 g) were added portionwise. The reaction mixture was stirred at 80°C for 1 h. The solvent was removed under reduced pressure and the crude was directly purified by column chromatography using DCM as eluent to afford the desired product as a brown solid (6,9 g, 95 %).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ =8.36 (s, 1H), 5.83 (br s, 2H).

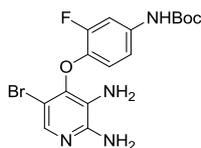
tert-butyl (4-((2-amino-5-bromo-3-nitropyridin-4-yl)oxy)-3-fluorophenyl)carbamate (83)



tert-butyl (3-fluoro-4-hydroxyphenyl)carbamate (**32**) (2,2 mmol, 1,1 eq., 495 mg) was dissolved in dry DMF (11 mL) under argon. *t*-BuOK (2,2 mmol, 1,1 eq., 256 mg) was added and the solution was stirred at rt for 1 h. 5-bromo-4-chloro-3-nitropyridin-2-amine (**82**) (2,0 mmol, 500 mg) was added and the reaction mixture was heated at 70°C overnight. The solvent was evaporated under reduced pressure. The crude was dissolved in EtOAc and washed with saturated Na₂CO₃ solution. The organic layer was dried over anhydrous MgSO₄, evaporated under reduced pressure and purified by column chromatography using DCM as eluent to afford the desired product as a yellow solid (529 mg, 60 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ=8.36 (s, 1H), 7.46 (dd, J=13.3, 2.2 Hz, 1H), 6.91 (d, J=8.6 Hz, 1H), 6.74 (t, J=8.6 Hz, 1H), 6.46 (s, 1H), 6.11 (s, 2H); HRMS (ESI-TOF): *m/z* calcd for C₁₆H₁₇N₄O₅FBr: 443.0366 [M+H]⁺; found: 443.0365.

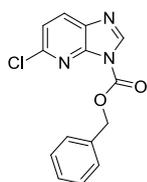
tert-butyl (4-((2,3-diamino-5-bromopyridin-4-yl)oxy)-3-fluorophenyl)carbamate (84)



tert-butyl (4-((2-amino-5-bromo-3-nitropyridin-4-yl)oxy)-3-fluorophenyl)carbamate (**83**) (0,22 mmol, 100 mg) was dissolved in EtOH (1 mL). HCl 37 % (0,74 mmol, 3.3 eq., 75 μL) is added dropwise, then iron powder (0,72 mmol, 3.2 eq., 40 mg) is added. The solution is stirred at 50°C for 30 min. The solution is diluted with water, filtrated on a silica plug and washed with EtOH. The filtrate is evaporated, the crude is solubilized in EtOAc and neutralized with NaOH 3M solution. The organic phase is dried over anhydrous MgSO₄, evaporated under reduced pressure and purified by column chromatography using a gradient of DCM to DCM/EtOH 3% to afford the desired product as a colorless oil (48 mg, 51%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ=7.76 (s, 1H), 7.48 (d, J=12.6 Hz, 1H), 6.81 (d, J=8.8 Hz, 1H), 6.68 (s, 1H), 6.57 (t, J=8.8 Hz, 1H), 4.46 (br s, 2H), 3.53 (br s, 2H), 1.51 (s, 9H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ=152.7, 151.9 (d, J=246.4 Hz), 150.1, 144.7, 139.9, 139.8, 139.1 (d, J=11.4 Hz), 134.4 (d, J=9.3 Hz), 124.2, 116.2, 114.1, 108.3 (d, J=24.0 Hz), 104.5, 81.0, 28.3.

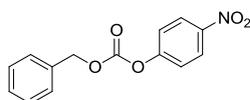
benzyl 5-chloro-3H-imidazo[4,5-b]pyridine-3-carboxylate (89)



5-chloro-3H-imidazo[4,5-b]pyridine (**86**) (0,32 mmol, 50 mg) and benzyl (4-nitrophenyl) carbonate (**90**) (0,36 mmol, 1,1 eq., 98 mg) were dissolved in THF (1 mL). Triethylamine (0,39 mmol, 1,2 eq., 54 μ L) and a few crystals of DMAP were added. The solution was stirred at 65°C for 1,5h. 10 mL of saturated NH₄Cl solution were added and the solution was extracted with EtOAc. The organic layer was dried over anhydrous MgSO₄, evaporated under reduced pressure and purified by column chromatography using a gradient of cyclohexane to cyclohexane/EtOAc 40 % to afford the desired product as a brown solid (54 mg, 58 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ =8.68 (s, 1H), 8.23 (d, J=8.5 Hz, 1H), 7.55-7.40 (m, 5H), 7.35 (d, J=8.5 Hz, 1H), 5.53 (s, 2H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ =155.9, 148.5, 148.0, 144.6, 133.6, 129.6, 129.1, 129.0, 125.0, 123.2, 121.1, 70.7.

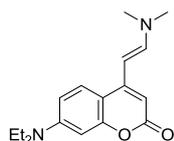
benzyl (4-nitrophenyl) carbonate (**90**)



To a solution of benzyl alcohol (4,8 mmol, 0,5 mL) and trimethylamine (7,2 mmol, 1,5 eq., 1 mL) in dry THF (10 mL) was added a solution of 4-nitrophenylchloroformate (4,8 mmol, 1 eq., 973 mg) in THF (10 mL) dropwise. After stirring at rt for 15 min the solution was filtered. The residue was dissolved in DCM, washed with 0,1 M K₂CO₃ solution. The organic layer was dried over anhydrous MgSO₄, evaporated under reduced pressure and purified by column chromatography using a gradient of cyclohexane to cyclohexane/EtOAc 20% to afford the desired product as a yellow solid (768 mg, 58 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ =8.29 (d, J=9.2 Hz, 2H), 7.54-7.33 (m, 7H), 5.32 (s, 2H). Data were in agreement with those reported in the literature.¹³¹

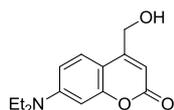
(E)-7-(diethylamino)-4-(2-(dimethylamino)vinyl)-2H-chromen-2-one (**92**)



In a sealed tube under argon atmosphere, 7-(diethylamino)-4-methyl-2H-chromen-2-one (**91**) (4,3 mmol, 1 g) and DMFDMA (4,3 mmol, 1 eq., 0,58 mL) in solution in dry DMF (0,5 mL) were stirred at 140°C overnight. The solvent was removed under reduced pressure. The residue was suspended in cyclohexane, filtered on a sintered glass, washed with Et₂O and dried under vacuum to afford the desired product as a brown solid (1,17 g, 94 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ =7.53 (d, J=9.0, 1H), 7.23 (d, J=13.0 Hz, 1H), 6.56 (d, J=9.0 Hz, 1H), 6.50 (d, J=2.3 Hz, 1H), 5.86 (s, 1H), 5.23 (d, J=13.0 Hz, 1H), 3.41 (q, J=7.0 Hz, 4H), 3.00 (s, 6H), 1.20 (t, J=7.0 Hz, 6H). Data were in agreement with those reported in the literature.¹³²

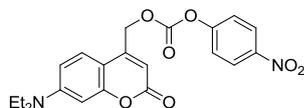
7-(diethylamino)-4-(hydroxymethyl)-2H-chromen-2-one (**94**)



(E)-7-(diethylamino)-4-(2-(dimethylamino)vinyl)-2H-chromen-2-one (**92**) (4,1 mmol, 1,17 g) was dissolved in THF/DCM 5:1 (15 mL). NaIO₄ (12,3 mmol, 3 eq., 2,62 g) in solution in water (12 mL) was added and the solution was stirred at rt for 2 h. The solution was filtered on a celite plug. The filtrate was partially concentrated under reduced pressure, then extracted with DCM. The organic layer was dried over anhydrous MgSO₄ and evaporated under reduced pressure. The crude was dissolved in MeOH (20 mL) at 0°C, and NaBH₄ (4,9 mmol, 1,2 eq., 185 mg) was added portionwise. The resulting mixture was allowed to warm up to rt and stirred overnight. The solution was quenched with an HCl solution (1M) and MeOH was partially evaporated. The pH was adjusted to 6 by addition of aqueous saturated NaHCO₃ solution, then the aqueous layer was extracted with DCM. The combined organic layers were dried over anhydrous MgSO₄, evaporated under reduced pressure and purified by column chromatography using a gradient of cyclohexane to cyclohexane/EtOAc 50 % to afford the desired product as a brown solid (561 mg, 56 % over 2 steps).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ=7.33 (d, J=8.9 Hz, 1H), 6.57 (dd, J=8.9, 2.6 Hz, 1H), 6.52 (d, J=2.6 Hz, 1H), 6.26 (s, 1H), 4.85 (dd, J=6.2, 1.4 Hz, 2H), 3.42 (q, J=7.1 Hz, 4H), 1.91 (t, J=6.2 Hz, 1H), 1.21 (t, J=7.1 Hz, 6H). Data were in agreement with those reported in the literature.⁶⁵

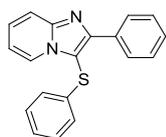
(7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromen-4-yl)methyl (4-nitrophenyl) carbonate (**95**)



To a solution of 7-(diethylamino)-4-(hydroxymethyl)-2H-chromen-2-one (**94**) (3,4 mmol, 845 mg) and trimethylamine (5,1 mmol, 1,5 eq., 0,71 mL) in dry THF (7 mL) was added a solution of 4-nitrophenylchloroformate (5,1 mmol, 1,5 eq., 1,03 g) in THF (7 mL) dropwise. After stirring at rt for 15 min the solution was filtered. The residue was dissolved in DCM, washed with 0,1 M K₂CO₃ solution. The organic layer was dried over anhydrous MgSO₄, evaporated under reduced pressure and purified by column chromatography using a gradient of cyclohexane to cyclohexane/EtOAc 20% to afford the desired product as a yellow solid (1,09 g, 77 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ=8.32 (d, J=9.1 Hz, 2H), 7.43 (d, J=9.1 Hz, 2H), 7.32 (d, J=9.0 Hz, 1H), 6.62 (dd, J=9.0, 2.5 Hz, 1H), 6.52 (d, J=2.5 Hz, 1H), 6.24 (s, 1H), 5.41 (d, J=1.3 Hz, 2H), 3.44 (q, J=7.1 Hz, 4H), 1.23 (t, J=7.1 Hz, 6H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ=161.7, 156.5, 153.3, 151.0, 147.8, 145.8, 125.7, 124.4, 121.9, 108.9, 107.1, 105.7, 98.1, 65.9, 45.0, 12.3.

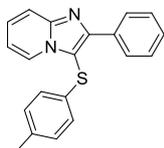
2-phenyl-3-(phenylthio)imidazo[1,2-a]pyridine (**108a**)



Reaction was performed using general procedure D. Yellow solid (106 mg, 68%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 8.27 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 8.24 – 8.19 (m, 2H), 7.74 (d, J =9.0 Hz, 1H), 7.48 – 7.30 (m, 4H), 7.25 – 7.09 (m, 3H), 7.00 (m, 2H), 6.86 (td, J = 7.5, 0.7 Hz, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ =151.5, 147.2, 135.3, 133.4, 129.5, 128.7, 128.5, 128.5, 126.8, 126.1, 125.6, 124.6, 117.7, 113.2, 106.3; MS (ES⁺): m/z (%) = 302.7 (100) [M + H]⁺.

2-phenyl-3-(*p*-tolylthio)imidazo[1,2-*a*]pyridine (108b)



Reaction was performed using general procedure D. Yellow solid (113 mg, 77%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ =8.28 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 8.21 (d, J =7.0 Hz, 2H), 7.72 (d, J =9.0 Hz, 1H), 7.46-7.29 (m, 4H), 7.02 (d, J =8.2 Hz, 2H), 6.91 (d, J =8.2 Hz, 2H), 6.85 (t, J =6.5 Hz, 1H), 2.26 (s, 3H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ =151.2, 147.0, 136.0, 133.5, 131.5, 130.2, 128.6, 128.4, 128.4, 126.6, 125.8, 124.5, 117.6, 113.0, 106.8, 20.9; MS (ES⁺): m/z (%) = 316.8 (100) [M + H]⁺.

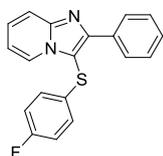
3-((4-methoxyphenyl)thio)-2-phenylimidazo[1,2-*a*]pyridine (108c)



Reaction was performed using general procedure D. Yellow solid (139 mg, 81%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ =8.32 (d, J =6.8 Hz, 1H), 8.24 (d, J =7.1 Hz, 2H), 7.71 (d, J =9.0 Hz, 1H), 7.49 – 7.27 (m, 4H), 6.99 (d, J =8.8 Hz, 2H), 6.87 (t, J =6.6 Hz, 1H), 6.76 (d, J =8.8 Hz, 2H), 3.73 (s, 3H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ =158.6, 150.9, 147.0, 133.6, 128.6, 128.5, 128.5, 128.0, 126.6, 125.5, 124.6, 117.7, 115.2, 113.1, 107.9, 55.4; MS (ES⁺): m/z (%) = 332.8 (100) [M + H]⁺.

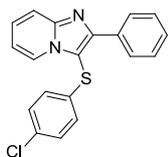
3-((4-fluorobenzyl)thio)-2-phenylimidazo[1,2-*a*]pyridine (108d)



Reaction was performed using general procedure D. Yellow solid (120 mg, 73%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 8.28 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 8.25 – 8.16 (m, 2H), 7.73 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 7.51 – 7.30 (m, 4H), 7.05 – 6.83 (m, 5H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ =161.5 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 246.0 Hz), 151.3, 147.1, 133.3, 130.1 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 3.1 Hz), 128.7, 128.5, 128.3, 127.6 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 7.9 Hz), 126.7, 124.3, 117.7, 116.6 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 22.2 Hz), 113.2, 106.6; MS (ES⁺): m/z (%) = 320.7 (100) [M + H]⁺.

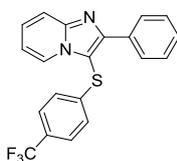
3-((4-chlorophenyl)thio)-2-phenylimidazo[1,2-*a*]pyridine (108e)



Reaction was performed using general procedure D. Yellow solid (90 mg, 52%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ =8.23 (d, J =6.8 Hz, 1H), 8.18 (d, J =7.0 Hz, 2H), 7.73 (d, J =9.0 Hz, 1H), 7.49 – 7.28 (m, 4H), 7.16 (d, J =8.6 Hz, 2H), 6.92-6.84 (m, 3H) ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ =151.7, 147.3, 133.8, 133.2, 132.1, 129.7, 128.8, 128.6, 128.4, 126.9, 126.9, 124.4, 117.9, 113.3, 105.8; MS (ES⁺): m/z (%) = 336.8 (100) [$\text{M} + \text{H}$]⁺.

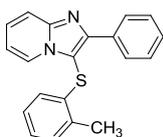
2-phenyl-3-((4-(trifluoromethyl)phenyl)thio)imidazo[1,2-*a*]pyridine (108f)



Reaction was performed using general procedure D. Yellow solid (106 mg, 56%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ =8.23 (d, J =6.8 Hz, 1H), 8.15 (d, J =6.8 Hz, 2H), 7.77 (d, J =9.0 Hz, 1H), 7.47-7.35 (m, 6H), 7.06 (d, J =8.2 Hz, 2H), 6.92 (t, J =6.8 Hz, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ =152.2, 147.5, 140.6, 133.1, 129.0, 128.6, 128.4, 128.1, 127.2, 126.4 (q, $J_{\text{C-F}}$ = 3.7 Hz), 125.3, 124.4, 124.1 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 271.9 Hz), 118.0, 113.6, 104.6; MS (ES⁺): m/z (%) = 370.8 (100) [$\text{M} + \text{H}$]⁺.

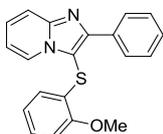
2-phenyl-3-(*o*-tolylthio)imidazo[1,2-*a*]pyridine (108j)



Reaction was performed using general procedure D. Yellow solid (106 mg, 65%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ =8.22 – 8.13 (m, 3H), 7.76 (d, J =9.0 Hz, 1H), 7.46-7.32 (m, 4H), 7.20 (d, J =7.4 Hz, 1H), 7.05 (t, J =7.4 Hz, 1H), 6.89 (dt, J =13.7, 7.2 Hz, 1H), 6.42 (d, J =7.8 Hz, 1H), 2.52 (s, 3H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ =151.7, 147.2, 134.9, 134.1, 133.4, 130.7, 128.6, 128.4, 128.4, 127.0, 126.7, 125.7, 124.5, 124.1, 117.7, 113.1, 105.6, 19.9; MS (ES⁺): m/z (%) = 316.8 (100) [$\text{M} + \text{H}$]⁺.

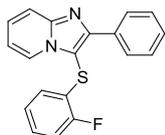
3-((2-methoxyphenyl)thio)-2-phenylimidazo[1,2-*a*]pyridine (108k)



Reaction was performed using general procedure D. Yellow solid (77 mg, 45%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ =8.27 (d, J =6.8 Hz, 1H), 8.19 (d, J =7.0 Hz, 2H), 7.74 (d, J =9.0 Hz, 1H), 7.48 – 7.29 (m, 4H), 7.12 (td, J =7.7 Hz, 1.3 Hz, 1H), 6.91-6.84 (m, 2H), 6.69 (t, J =8.0 Hz, 1H), 6.39 (dd, J =7.7, 1.3 Hz, 1H), 3.94 (s, 3H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ =156.2, 151.9, 147.4, 133.5, 128.6, 128.5, 127.0, 126.7, 125.6, 124.9, 123.4, 121.7, 117.7, 113.0, 110.9, 105.4, 56.0; MS (ES+): m/z (%) = 332.8 (100) $[\text{M} + \text{H}]^+$.

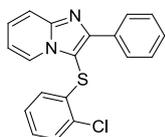
3-((2-fluorophenyl)thio)-2-phenylimidazo[1,2-*a*]pyridine (108l)



Reaction was performed using general procedure D. Pink solid (115 mg, 70%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 8.30 (d, J =6.8 Hz, 1H), 8.20 (d, J =7.0 Hz, 2H), 7.75 (d, J =9.0 Hz, 1H), 7.47-7.33 (m, 4H), 7.18 – 7.02 (m, 2H), 6.94 – 6.82 (m, 2H), 6.61 – 6.49 (td, J =7.7 Hz, 1.0 Hz, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ =159.7 (d, J = 244.9 Hz), 152.1 , 147.4 , 133.2 , 128.8 , 128.5 , 128.4 , 127.8 (d, J = 7.3 Hz), 127.3 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 2.2 Hz), 126.9 , 125.1 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 3.4 Hz), 124.6 , 122.4 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 17.1 Hz), 117.8 , 116.0 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 20.8 Hz), 113.3 , 104.2; MS (ES+): m/z (%) = 320.7 (100) $[\text{M} + \text{H}]^+$.

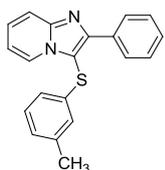
3-((2-chlorophenyl)thio)-2-phenylimidazo[1,2-*a*]pyridine (108m)



Reaction was performed using general procedure D. Yellow solid (97 mg, 56%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ =8.24 (d, J =6.8 Hz, 1H), 8.16 (d, J =7.8 Hz, 2H), 7.79 (d, J =9.0 Hz, 1H), 7.49 – 7.32 (m, 5H), 7.08 (td, J =7.8, 1.5 Hz, 1H), 7.01 – 6.88 (m, 2H), 6.40 (dd, J =7.9, 1.4 Hz, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ =152.3, 147.6, 134.4, 133.2, 131.2, 130.2, 128.9, 128.6, 128.41, 127.7, 127.1, 127.0, 125.6, 124.6, 117.9, 113.4, 104.7; MS (ES+): m/z (%) = 336.9 (100) $[\text{M} + \text{H}]^+$.

2-phenyl-3-(*m*-tolylthio)imidazo[1,2-*a*]pyridine (108n)

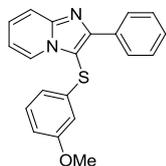


Reaction was performed using general procedure D. Yellow solid (129 mg, 80%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ =8.28 (d, J =6.8 Hz, 1H), 8.24 – 8.19 (m, 2H), 7.74 (d, J =9.0 Hz, 1H), 7.48 – 7.30 (m, 4H), 7.09 (t, J =7.7 Hz, 1H), 6.95 (d, J =7.5 Hz, 1H), 6.90 – 6.83 (m, 2H), 6.77 (d, J =7.8 Hz, 1H), 2.23 (s, 3H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ =151.4, 147.2, 139.5, 135.0, 133.5, 129.4,

128.7, 128.5, 128.4, 127.1, 126.7, 126.1, 124.6, 122.6, 117.7, 113.1, 106.5, 21.5; MS (ES⁺): *m/z* (%) = 316.8 (100) [M + H]⁺.

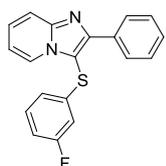
3-((3-methoxyphenyl)thio)-2-phenylimidazo[1,2-*a*]pyridine (108o)



Reaction was performed using general procedure D. Yellow solid (116 mg, 68%).

m.p. 90-92 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ=8.28 (d, *J*=6.8 Hz, 1H), 8.23 – 8.16 (m, 2H), 7.73 (d, *J*=9.0 Hz, 1H), 7.49 – 7.30 (m, 4H), 7.12 (t, *J*=7.9 Hz, 1H), 6.88 (td, *J*=6.8, 0.8 Hz, 1H), 6.71-6.64 (m, 1H), 6.61-6.53 (m, 2H), 3.67 (s, 3H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ=160.4, 151.6, 147.2, 136.7, 133.4, 130.4, 128.7, 128.5, 128.5, 126.8, 124.6, 117.8, 117.7, 113.2, 111.7, 111.3, 106.3, 55.3; MS (ES⁺): *m/z* (%) = 332.8 (100) [M + H]⁺; HRMS (ESI-TOF): *m/z* calcd for C₂₀H₁₇N₂OS: 333.1062 [M+H]⁺; found: 333.1050.

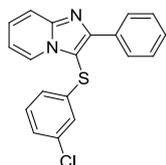
3-((3-fluorophenyl)thio)-2-phenylimidazo[1,2-*a*]pyridine (108p)



Reaction was performed using general procedure D. Yellow solid (82 mg, 50%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ=8.25 (d, *J*=6.8 Hz, 1H), 8.20 – 8.14 (m, 2H), 7.76 (d, *J*=9.0 Hz, 1H), 7.50 – 7.31 (m, 4H), 7.18 (td, *J*=8.0, 6.0 Hz, 1H), 6.93 – 6.87 (t, *J*=6.8 Hz, 1H), 6.86 – 6.75 (m, 2H), 6.71 – 6.66 (m, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ=163.4 (d, *J*_{C-F} = 249.4 Hz), 151.8, 147.3, 137.8 (d, *J*_{C-F} = 7.1 Hz), 133.1, 130.9 (d, *J*_{C-F} = 8.4 Hz), 128.9, 128.6, 128.4, 127.1, 124.4, 121.1 (d, *J*_{C-F} = 3.0 Hz), 117.8, 113.4, 113.2 (d, *J*_{C-F} = 21.5 Hz), 112.5 (d, *J*_{C-F} = 24.3 Hz), 105.4; MS (ES⁺): *m/z* (%) = 320.7 (100) [M + H]⁺.

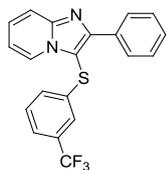
3-((3-chlorophenyl)thio)-2-phenylimidazo[1,2-*a*]pyridine (108q)



Reaction was performed using general procedure D. Yellow solid (84 mg, 49%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ=8.25 (d, *J*=6.8 Hz, 1H), 8.20 – 8.13 (m, 2H), 7.75 (d, *J*=9.0 Hz, 1H), 7.50 – 7.32 (m, 4H), 7.12 (m, 2H), 7.02 (m, 1H), 6.91 (td, *J*=6.8, 0.8 Hz, 1H), 6.85 – 6.79 (m, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ=152.0, 147.5, 137.6, 135.5, 133.2, 130.6, 128.9, 128.6, 128.46, 127.1, 126.5, 125.4, 124.5, 123.6, 118.3, 113.5, 105.3; MS (ES⁺): *m/z* (%) = 336.8 (100) [M + H]⁺.

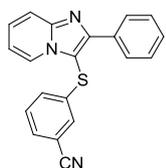
2-phenyl-3-((3-(trifluoromethyl)phenyl)thio)imidazo[1,2-*a*]pyridine (108r)



Reaction was performed using general procedure D. Yellow solid (114 mg, 60%).

mp 112-114 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ= 8.25 (d, J=6.8 Hz, 1H), 8.17 (d, J=6.8 Hz, 2H), 7.76 (d, J=9.0 Hz, 1H), 7.49 – 7.35 (m, 6H), 7.32 – 7.24 (m, 1H), 6.99 (d, J=7.9 Hz, 1H), 6.91 (t, J=6.8 Hz, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ=152.2, 147.5, 137.1, 133.2, 132.2, 131.8, 130.0, 128.9, 128.7, 128.5, 128.4, 127.1, 124.4, 123, 122.5, 118.0, 113.5, 104.9; MS (ES⁺): *m/z* (%) = 370.7 (100) [M + H]⁺; HRMS (ESI-TOF): *m/z* calcd for C₂₀H₁₄F₃N₂S: 371.0830 [M+H]⁺; found: 371.0836.

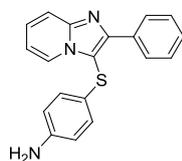
3-((2-phenylimidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)thio)benzonitrile (108s)



Reaction was performed using general procedure D. Yellow solid (48 mg, 29%).

m.p. 113-115 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ=8.23 (d, J=6.8 Hz, 1H), 8.15 (dd, J=8.1, 1.5 Hz, 2H), 7.77 (d, J=9.0 Hz, 1H), 7.49 – 7.35 (m, 5H), 7.30 (t, J=7.8 Hz, 1H), 7.26 (m, 1H), 7.19 – 7.13 (m, 1H), 6.93 (td, J=6.8, 1.0 Hz, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ=152.3, 147.5, 137.9, 132.9, 130.1, 129.6, 129.5, 129, 128.6, 128.4, 128.3, 127.2, 124.1, 118.0, 118.0, 113.7, 113.6, 104.0 ; MS (ES⁺): *m/z* (%) = 327.9 (100) [M + H]⁺; HRMS (ESI-TOF): *m/z* calcd for C₂₀H₁₄N₃S: 328.0908 [M+H]⁺; found: 328.0895.

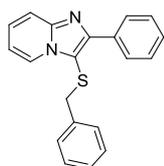
4-((2-phenylimidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)thio)aniline (108t)



Reaction was performed using general procedure D. White crystals (65 mg, 40%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ=8.34 (d, J=6.9 Hz, 1H), 8.29 – 8.23 (m, 2H), 7.70 (d, J=9.0 Hz, 1H), 7.45 (t, J=7.2 Hz, 2H), 7.41 – 7.36 (m, 1H), 7.30 (ddd, J=9.0, 6.9, 1.3 Hz, 1H), 6.94 – 6.82 (m, 3H), 6.53 (d, J=8.5 Hz, 2H), 3.62 (s, 2H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ=150.5, 146.8, 145.6, 133.6, 128.7, 128.5, 128.5, 126.5, 124.6, 122.3, 117.6, 116.2, 113.0, 108.7; MS (ES⁺): *m/z* (%) = 317.8 (100) [M + H]⁺.

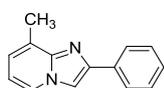
3-(benzylthio)-2-phenylimidazo[1,2-*a*]pyridine (108u)



Reaction was performed using general procedure D. Brown solid (136 mg, 84%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ =8.28 – 8.20 (m, 2H), 8.07 (d, J =6.9 Hz, 1H), 7.58 (d, J =9.0 Hz, 1H), 7.45 (t, J =7.3 Hz, 2H), 7.41 – 7.36 (m, 1H), 7.23 – 7.15 (m, 1H), 7.09 – 7.03 (m, 3H), 6.95-6.89 (m, 2H), 6.67 (td, J =6.8, 0.9 Hz, 1H), 3.81 (s, 2H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ =150.0, 146.3, 137.0, 133.8, 128.6, 128.4, 128.3, 128.2, 127.3, 125.9, 124.1, 117.2, 112.2, 109.3, 40.5; MS (ES⁺): m/z (%) = 316.8 (100) [$\text{M} + \text{H}$]⁺.

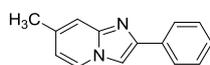
8-methyl-2-phenylimidazo[1,2-a]pyridine (112a)



Reaction was performed following general procedure C. Light yellow solid (918 mg, 88%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ =7.99 (dd, J =7.2, 1.7 Hz, 3H), 7.85 (s, 1H), 7.44 (t, J =7.6 Hz, 2H), 7.34 (t, J =7.6 Hz, 1H), 6.96 (dt, J =6.8, 1.3 Hz, 1H), 6.68 (t, J =6.8 Hz, 1H), 2.68 (s, 3H). Data were in agreement with those reported in the literature.¹³³

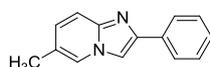
7-methyl-2-phenylimidazo[1,2-a]pyridine (112b)



Reaction was performed following general procedure C. Beige solid (1,81 g, 85%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ =7.99 (d, J =6.9 Hz, 1H), 7.97-7.92 (m, 2H), 7.78 (s, 1H), 7.48-7.37 (m, 3H), 7.36-7.328 (m, 1H), 6.61 (dd, J =6.9, 1.6 Hz, 1H), 2.40 (s, 3H). Data were in agreement with those reported in the literature.¹³⁴

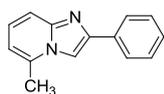
6-methyl-2-phenylimidazo[1,2-a]pyridine (112c)



Reaction was performed following general procedure C. Yellow solid (1,86 g, 89%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ =7.99-7.89 (m, 3H), 7.80 (s, 1H), 7.54 (d, J =9.2 Hz, 2H), 7.44 (dd, J =8.3, 6.8 Hz, 2H), 7.36-7.29 (m, 1H), 7.03 (dd, J =9.2, 1.7 Hz, 1H), 2.33 (s, 3H). Data were in agreement with those reported in the literature.¹³³

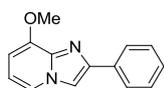
5-methyl-2-phenylimidazo[1,2-a]pyridine (112d)



Reaction was performed following general procedure C. Greenish solid (289 mg, 14%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ=; ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ=8.01 (d, J=7.2 Hz, 2H), 7.77 (s, 1H), 7.57 (d, J=9.0 Hz, 1H), 7.46 (t, J=7.2 Hz, 2H), 7.34 (t, J=7.2 Hz, 1H), 7.17 (dd, J=9.0, 6.9 Hz, 1H), 6.64 (d, J=6.9 Hz, 1H), 2.65 (s, 3H). Data were in agreement with those reported in the literature.¹³⁵

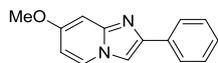
8-methoxy-2-phenylimidazo[1,2-a]pyridine (112f)



Reaction was performed following general procedure C. Beige solid (662 mg, 59%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ=8.05-7.95 (m, 2H), 7.83 (s, 1H), 7.74 (dd, J=6.7, 1.0 Hz, 1H), 7.45-7.38 (m, 2H), 7.35-7.28 (m, 1H), 6.67 (dd, J=7.6, 6.7 Hz, 1H), 6.44 (dd, J=7.6, 1.0 Hz, 1H), 4.03 (s, 3H). Data were in agreement with those reported in the literature.¹³⁶

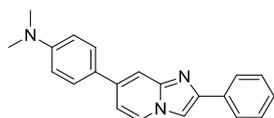
7-methoxy-2-phenylimidazo[1,2-a]pyridine (112g)



Reaction was performed following general procedure C. Beige solid (441 mg, 39%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ=7.93 (d, J=7.2 Hz, 3H), 7.71 (s, 1H), 7.43 (t, J=7.5 Hz, 2H), 7.32 (t, J=7.2 Hz, 1H), 6.93 (d, J=2.5 Hz, 1H), 6.52 (dd, J=7.5, 2.5 Hz, 1H), 3.88 (s, 3H). Data were in agreement with those reported in the literature.¹³⁷

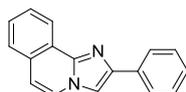
N,N-dimethyl-4-(2-phenylimidazo[1,2-*a*]pyridin-7-yl)aniline (112h)



In a microwave tube under argon, 7-chloro-2-phenylimidazo[1,2-*a*]pyridine (1.31 mmol, 300 mg, 1 eq), 4-(dimethylamino)phenylboronic acid (1.57 mmol, 260 mg, 1.2 eq), sodium carbonate (5.25 mmol, 556 mg, 4 eq), tri-*tert*-butylphosphine tetrafluoroborate (0.079 mmol, 23 mg, 0.06 eq), Tris(dibenzylideneacetone)dipalladium (0.026 mmol, 24 mg, 0.02 eq) were solubilized in 8:1 DMF:H₂O (5 mL). The reaction was heated by microwave irradiation at 110 °C for 1 h. After, the reaction mixture was diluted with ethyl acetate (50 mL) and washed with saturated sodium carbonate solution (3x50 mL) and distilled water (3x50 mL). The organic layer was dried over anhydrous sodium sulfate and the solvent was removed under reduced pressure. The crude was dissolved in a minimum of DCM and pentane was added until the formation of a precipitate. The resulting solid was filtered, washed with pentane and dried under vacuum to give the

corresponding product as a yellow solid (167 mg, 41%); m.p. 77-79 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ=8.09 (d, J=7.0 Hz, 1H), 7.97 (d, J=7.4 Hz, 2H), 7.82 (s, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.58 (d, J=8.2 Hz, 2H), 7.44 (t, J=7.1 Hz, 2H), 7.37-7.28 (m, 1H), 7.07 (d, J=7.2 Hz, 1H), 6.82 (d, J=8.4 Hz, 2H), 3.02 (s, 6H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ=150.5, 146.7, 146.1, 137.9, 133.9, 128.7, 127.9, 127.4, 126.1, 126, 125.2, 112.7, 112.1, 112.0, 107.5, 40.4; HRMS (ESI-TOF): *m/z* calcd for C₂₁H₂₀N₃: 314.1657 [M+H]⁺; found: 314.1657.

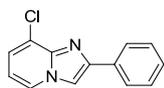
2-phenylimidazo[2,1-a]isoquinoline (112i)



Reaction was performed following general procedure C. Light yellow solid (916 mg, 75%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ=8.75 (dd, J=7.9, 1.3 Hz, 1H), 8.03 (d, J=7.2 Hz, 2H), 7.91 (d, J=7.2 Hz, 1H), 7.83 (s, 1H), 7.74-7.54 (m, 3H), 7.47 (t, J=7.5 Hz, 2H), 7.34 (t, J=7.5 Hz, 1H), 7.04 (d, J=7.2 Hz, 1H). Data were in agreement with those reported in the literature.¹³⁶

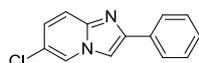
8-chloro-2-phenylimidazo[1,2-a]pyridine (112j)



Reaction was performed following general procedure C. White solid (1,54 g, 64%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ=8.007 (dd, J=6.7, 1.1 Hz, 1H), 8.03-7.98 (m, 2H), 7.92 (s, 1H), 7.45 (t, J=7.4 Hz, 2H), 7.41-7.29 (m, 1H), 7.25 (dd, J=7.4, 1.1 Hz, 1H), 6.72 (t, J=7.1 Hz, 1H). Data were in agreement with those reported in the literature.¹³³

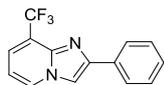
6-chloro-2-phenylimidazo[1,2-a]pyridine (112k)



Reaction was performed following general procedure C. Yellow solid (1,75 g, 73%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ=8.19 (dd, J=1.9, 0.9 Hz, 1H), 7.99-7.92 (m, 2H), 7.85 (s, 1H), 7.59 (d, J=9.6 Hz, 1H), 7.46 (t, J=7.4 Hz, 2H), 7.40-7.33 (m, 1H), 7.15 (dd, J=9.6, 1.9 Hz, 1H). Data were in agreement with those reported in the literature.¹³³

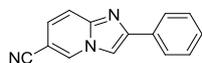
2-phenyl-8-(trifluoromethyl)imidazo[1,2-a]pyridine (112l)



Reaction was performed following general procedure C. Yellow solid (644 mg, 24%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ =8.29 (d, J =6.8 Hz, 1H), 8.01 (d, J =7.0 Hz, 2H), 7.95 (s, 1H), 7.52 (d, J =7.2 Hz, 1H), 7.45 (t, J =7.4 Hz, 2H), 7.39-7.32 (m, 1H), 6.85 (t, J =7.0 Hz, 1H). Data were in agreement with those reported in the literature.¹³³

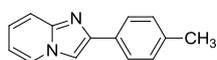
2-phenylimidazo[1,2-a]pyridine-6-carbonitrile (112m)



Reaction was performed following general procedure C. Brown solid (1,37 g, 62%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 8.20 (dd, J = 7.0, 1.0 Hz, 1H), 8.08–7.90 (m, 4H), 7.46 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 7.40 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 6.94 (dd, J = 7.0, 1.6 Hz, 1H). Data were in agreement with those reported in the literature.¹³⁴

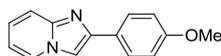
2-(p-tolyl)imidazo[1,2-a]pyridine (112n)



Reaction was performed following general procedure C. Light yellow solid (813 mg, 83%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ =8.11 (d, J =6.8 Hz, 1H), 7.90-7.81 (m, 3H), 7.63 (d, J =9.4 Hz, 1H), 7.26 (d, J =7.6 Hz, 2H), 7.16 (ddd, J =9.4, 6.8, 1.0 Hz, 1H), 6.77 (dt, J =6.8, 1.0 Hz, 1H), 2.40 (s, 3H). Data were in agreement with those reported in the literature.¹³³

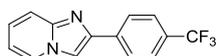
2-(4-methoxyphenyl)imidazo[1,2-a]pyridine (112o)



Reaction was performed following general procedure C. Beige solid (1,55 g, 79%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ =8.10 (d, J =6.8 Hz, 1H), 7.90 (d, J =8.8 Hz, 2H), 7.78 (s, 1H), 7.61 (d, J =9.1 Hz, 1H), 7.15 (ddd, J =9.1, 6.8, 1.1 Hz, 1H), 6.98 (d, J =8.8 Hz, 2H), 6.76 (td, J =6.8, 1.1 Hz, 1H), 3.86 (s, 3H). Data were in agreement with those reported in the literature.¹³⁴

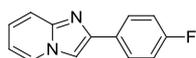
2-(4-(trifluoromethyl)phenyl)imidazo[1,2-a]pyridine (112p)



Reaction was performed following general procedure C. Beige solid (803 mg, 82%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ =8.14 (d, J =6.8 Hz, 1H), 8.07 (d, J =8.1 Hz, 2H), 7.93 (s, 1H), 7.74-7.60 (m, 3H), 7.21 (ddd, J =9.0, 7.5, 1.1 Hz, 1H), 6.82 (td, J =6.8, 0.6 Hz, 1H). Data were in agreement with those reported in the literature.¹³³

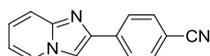
2-(4-fluorophenyl)imidazo[1,2-a]pyridine (112q)



Reaction was performed following general procedure C. Beige solid (741 mg, 76%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ =8.11 (d, J =6.8 Hz, 1H), 7.92 (dd, J =8.8, 5.4 Hz, 2H), 7.81 (s, 1H), 7.62 (d, J =8.8 Hz, 1H), 7.22-7.08 (m, 3H) 6.78 (td, J =6.8, 1.2 Hz, 1H). Data were in agreement with those reported in the literature.¹³³

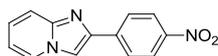
4-(imidazo[1,2-a]pyridin-2-yl)benzotrile (112r)



Reaction was performed following general procedure C. Beige solid (532 mg, 54%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ =8.12 (d, J =6.8 Hz, 1H), 8.03 (d, J =8.5 Hz, 2H), 7.93 (s, 1H), 7.69 (d, J =8.5 Hz, 2H), 7.62 (d, J =9.2 Hz, 1H), 7.21 (ddd, J =9.2, 6.8, 1.1 Hz, 1H), 6.82 (td, J =6.8, 1.1 Hz, 1H). Data were in agreement with those reported in the literature.¹³³

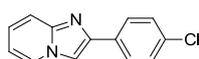
2-(4-nitrophenyl)imidazo[1,2-a]pyridine (112s)



Reaction was performed following general procedure C. Beige solid (381 mg, 39%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ =8.31 (d, J =8.8 Hz, 2H), 8.19-8.09 (m, 3H), 8.00 (s, 1H), 7.66 (d, J =9.5 Hz, 1H), 7.27-7.20 (m, 1H), 6.85 (t, J =7.1 Hz, 1H). Data were in agreement with those reported in the literature.¹³⁸

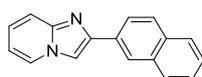
2-(4-chlorophenyl)imidazo[1,2-a]pyridine (112t)



Reaction was performed following general procedure C. Beige solid (774 mg, 76%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ =8.11 (d, J =6.8 Hz, 1H), 7.89 (d, J =8.6 Hz, 2H), 7.84 (s, 1H), 7.62 (d, J =9.1 Hz, 1H), 7.40 (d, J =8.6 Hz, 1H), 7.18 (ddd, J =9.1, 6.8, 1.1 Hz, 1H), 6.79 (td, J =6.8, 1.1 Hz, 1H). Data were in agreement with those reported in the literature.¹³³

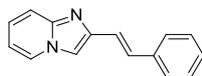
2-(naphthalen-2-yl)imidazo[1,2-a]pyridine (112u)



Reaction was performed following general procedure C. Beige solid (744 mg, 75%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ =8.52 (s, 1H), 8.13 (d, J =6.8 Hz, 1H), 8.04-7.81 (m, 5H), 7.67 (d, J =9.1 Hz, 1H), 7.53-7.42 (m, 2H), 7.22-7.14 (m, 1H), 6.78 (t, J =6.8 Hz, 1H). Data were in agreement with those reported in the literature.¹³⁷

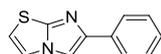
(E)-2-styrylimidazo[1,2-a]pyridine (112v)



2-aminopyridine (5 mmol, 470 mg), (E)-4-phenyl-3-buten-2-one (10 mmol, 1461 mg), CuI (0,25 mmol, 48 mg) and BF₃·OEt₂ (0,5 mmol, 62 μL) were dissolved in DMF (2 mL). The flask was purged with O₂ and the reaction mixture was stirred at 60°C for 24 h. The reaction mixture was allowed to cool to rt and poured into 20 mL of sodium carbonate solution. The product was extracted with DCM and dried over anhydrous MgSO₄. The crude was evaporated and then purified by column chromatography on silica gel using a gradient from cyclohexane to cyclohexane/AcOEt 30 % to afford the desired product as a beige solid (388 mg, 35%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ=8.07 (d, J=6.8 Hz, 1H), 7.63-7.51 (m, 5H), 7.36 (t, J=7.4 Hz, 2H), 7.27 (t, J=7.4 Hz, 1H), 7.20-7.11 (m, 2H), 6.75 (t, J=6.8 Hz, 1H). Data were in agreement with those reported in the literature.¹²⁵

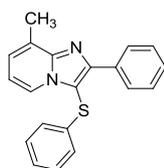
6-phenylimidazo[2,1-b]thiazole (112y)



Reaction was performed following general procedure C. Beige solid (834 mg, 83%).

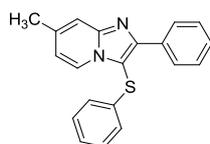
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ=7.83 (d, J=7.3 Hz, 2H), 7.74 (s, 1H), 7.45-7.36 (m, 3H), 7.32-7.24 (m, 1H), 6.81 (d, J=4.5 Hz, 1H). Data were in agreement with those reported in the literature.¹³³

8-methyl-2-phenyl-3-(phenylthio)imidazo[1,2-a]pyridine (115a)



Yellow solid (120 mg, 74%); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ=8.22 – 8.16 (m, 2H), 8.14 (d, J=6.8 Hz, 1H), 7.48-7.32 (m, 3H), 7.24-7.16 (m, 2H), 7.16 – 7.09 (m, 2H), 7.03 – 6.96 (m, 2H), 6.78 (t, J=6.8 Hz, 1H), 2.72 (s, 3H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ=151.2, 147.5, 135.6, 133.8, 129.5, 128.6, 128.5, 127.8, 126.0, 125.6, 125.5, 122.4, 113.1, 106.5, 16.9; MS (ES⁺): *m/z* (%) = 316.8 (100) [M + H]⁺.

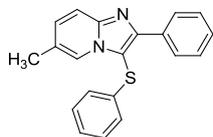
7-methyl-2-phenyl-3-(phenylthio)imidazo[1,2-a]pyridine (115b)



Yellow solid (119 mg, 73%); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ=8.19 (d, J=7.4 Hz, 2H), 8.13 (d, J=6.6 Hz, 1H), 7.49 (s, 1H), 7.46-7.33 (m, 3H), 7.24-7.08 (m, 3H), 6.99 (d, J=7.6 Hz, 2H), 6.68 (d, J=6.1 Hz, 1H), 2.43 (s, 3H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ=151.4, 147.6, 138.0, 135.6, 133.6, 129.5, 128.6,

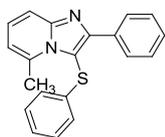
128.5, 128.4, 126.0, 125.6, 123.8, 116.3, 115.8, 105.5, 21.5; MS (ES+): m/z (%) = 316.8 (100) [M + H]⁺.

6-methyl-2-phenyl-3-(phenylthio)imidazo[1,2-*a*]pyridine (115c)



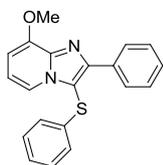
Yellow solid (98 mg, 60%); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ=8.22 – 8.15 (m, 2H), 8.07 (s, 1H), 7.64 (d, J=9.1 Hz, 1H), 7.46-7.34 (m, 3H), 7.25 – 7.12 (m, 4H), 7.04 – 6.97 (m, 2H), 2.31 (s, 3H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ=151.3, 146.2, 135.6, 133.5, 129.8, 129.4, 128.5, 128.4, 128.3, 125.9, 125.4, 122.9, 122.2, 117.0, 105.6, 18.4; MS (ES+): m/z (%) = 316.8 (100) [M + H]⁺.

5-methyl-2-phenyl-3-(phenylthio)imidazo[1,2-*a*]pyridine (115d)



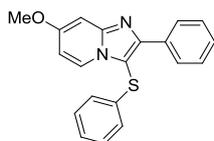
Yellow solid (27 mg, 17%); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ=8.01 – 7.95 (m, 2H), 7.63 (d, J=8.9 Hz, 1H), 7.41 – 7.33 (m, 3H), 7.28 – 7.18 (m, 3H), 7.12 (t, J=7.4 Hz, 1H), 6.97 (d, J=8.3 Hz, 2H), 6.56 (d, J=6.9 Hz, 1H), 2.97 (s, 3H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ=154.1, 149.1, 140.6, 138.9, 133.7, 129.6, 129.1, 128.6, 128.3, 127.0, 125.6, 124.9, 116.3, 115.1, 107.1, 20.6; MS (ES+): m/z (%) = 316.9 (100) [M + H]⁺.

8-methoxy-2-phenyl-3-(phenylthio)imidazo[1,2-*a*]pyridine (115e)



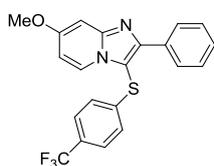
Brown solid (84 mg, 49%); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ=8.29 – 8.19 (m, 2H), 7.92 (d, J=6.7 Hz, 1H), 7.45-7.32 (m, 3H), 7.23 – 7.09 (m, 3H), 7.03 – 6.96 (m, 2H), 6.76 (t, J=7.2 Hz, 1H), 6.61 (d, J=7.5 Hz, 1H), 4.07 (s, 3H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ=150.7, 149.1, 141.4, 135.4, 133.3, 129.5, 128.6, 128.5, 128.3, 126.1, 125.7, 117.3, 113.0, 107.4, 103.0, 56.1; MS (ES+): m/z (%) = 332.8 (100) [M + H]⁺.

7-methoxy-2-phenyl-3-(phenylthio)imidazo[1,2-*a*]pyridine (115f)



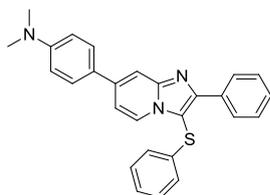
Pink solid (134 mg, 78%); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ=8.31-8.16 (m, 2H), 8.07 (d, J=7.5 Hz, 1H), 7.46-7.34 (m, 3H), 7.24-7.18 (m, 2H), 7.16-7.10 (m, 1H), 7.04 – 6.99 (m, 3H), 6.57 (dd, J=7.5, 2.5 Hz, 1H), 3.89 (s, 3H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ=159.6, 151.2, 148.6, 135.6, 133.4, 129.5, 128.5, 128.4, 128.2, 126.0, 125.5, 124.9, 107.9, 104.8, 95.2, 55.8; MS (ES⁺): *m/z* (%) = 332.8 (100) [M + H]⁺.

7-methoxy-2-phenyl-3-((4-(trifluoromethyl)phenyl)thio)imidazo[1,2-*a*]pyridine (115g)



Yellow solid (45 mg, 51%); m.p. 109-111 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ=8.16 – 8.10 (m, 2H), 8.02 (d, J=7.5 Hz, 1H), 7.48 – 7.36 (m, 5H), 7.10 – 7.02 (m, 3H), 6.60 (dd, J=7.5, 2.4 Hz, 1H), 3.90 (s, 3H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ=159.9, 152.0, 149.1, 141.1, 133.3, 128.8, 128.6, 128.2, 126.4, 125.9, 125.2, 124.7, 122.3, 108.3, 103.1, 95.5, 55.9; MS (ES⁺): *m/z* (%) = 400.9 (100) [M + H]⁺; HRMS (ESI-TOF): *m/z* calcd for C₂₁H₁₆N₂OF₃S: 401.0935 [M+H]⁺; found: 401.0932.

N,N-dimethyl-4-(2-phenyl-3-(phenylthio)imidazo[1,2-*a*]pyridin-7-yl)aniline (115h)



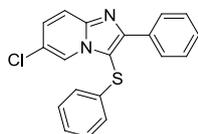
Yellow solid (62 mg, 46%); m.p. 251-253 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ=8.25-8.20 (m, 3H), 7.87 (s, 1H), 7.59 (d, J=8.7 Hz, 2H), 7.48-7.34 (m, 3H), 7.26-7.19 (m, 2H), 7.17-7.11 (m, 2H), 7.04 (d, J=7.5 Hz, 2H), 6.81 (d, J=8.8 Hz, 2H), 3.03 (s, 6H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ=150.7, 147.9, 140.0, 135.6, 133.5, 129.5, 128.5, 128.4, 128.3, 127.6, 126.0, 125.6, 124.1, 112.6, 112.0, 105.4, 40.4; MS (ES⁺): *m/z* (%) = 422.2 (100) [M + H]⁺; HRMS (ESI-TOF): *m/z* calcd for C₂₇H₂₄N₃S: 422.1691 [M+H]⁺; found: 422.1683.

2-phenyl-3-(phenylthio)imidazo[2,1-*a*]isoquinoline (115i)

Yellow solid (63 mg, 35%); m.p. 160-163 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ=8.82 (d, J=7.8 Hz, 1H), 8.30 – 8.23 (m, 2H), 8.11 (d, J=7.3 Hz, 1H), 7.77 – 7.73 (m, 1H), 7.73 – 7.67 (m, 1H), 7.66 – 7.60 (m, 1H), 7.50 – 7.42 (m, 2H), 7.41 – 7.34 (m, 1H), 7.25-7.17 (m, 2H), 7.16-7.09 (m, 2H), 7.07 – 7.01 (m, 2H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ=149.9, 145.1, 137.1, 135.8, 133.6, 130.4, 129.5, 129.0,

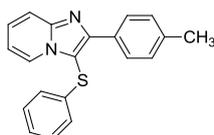
128.5, 128.4, 128.3, 127.1, 126.1, 125.7, 123.8, 123.7, 121.3, 113.7, 108.5; MS (ES+): m/z (%) = 352.9 (100) [M + H]⁺; HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for C₂₃H₁₇N₂S: 353.1112 [M+H]⁺; found: 353.1109.

6-chloro-2-phenyl-3-(phenylthio)imidazo[1,2-*a*]pyridine (115k)



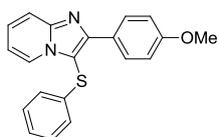
Yellow solid (60 mg, 35%); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ=8.34 – 8.30 (m, 1H), 8.23 – 8.17 (m, 2H), 7.67 (d, J=9.4 Hz, 1H), 7.49 – 7.35 (m, 3H), 7.29 (dd, J=9.5, 2.0 Hz, 1H), 7.25 – 7.20 (m, 2H), 7.19 – 7.14 (m, 1H), 7.04 – 6.98 (m, 2H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ=152.3, 145.5, 134.7, 133.0, 129.7, 129.0, 128.6, 128.4, 128.2, 126.4, 125.8, 122.6, 121.7, 118.2, 107.3; MS (ES+): m/z (%) = 336.9 (100) [M + H]⁺.

3-(phenylthio)-2-(*p*-tolyl)imidazo[1,2-*a*]pyridine (115n)



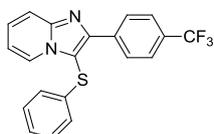
Yellow solid (120 mg, 73%); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ=8.26 (d, J=6.8 Hz, 1H), 8.11 (d, J=8.1 Hz, 2H), 7.72 (d, J=9.0 Hz, 1H), 7.36 – 7.28 (m, 1H), 7.24 – 7.12 (m, 4H), 7.03 – 6.97 (m, 2H), 6.85 (td, J=6.8, 0.7 Hz, 1H), 2.38 (s, 3H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ=151.5, 147.1, 138.5, 135.3, 130.5, 129.4, 129.2, 128.2, 126.6, 126.0, 125.5, 124.4, 117.5, 113.0, 105.9, 21.4; MS (ES+): m/z (%) = 316.8 (100) [M + H]⁺.

2-(4-methoxyphenyl)-3-(phenylthio)imidazo[1,2-*a*]pyridine (115o)



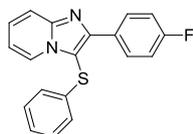
Yellow solid (94 mg, 55%); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ=8.26 (d, J=6.8 Hz, 1H), 8.20-8.13 (m, 2H), 7.71 (d, J=9.0 Hz, 1H), 7.36 – 7.28 (m, 1H), 7.24 – 7.09 (m, 3H), 7.03 – 6.93 (m, 4H), 6.89 – 6.81 (m, 1H), 3.83 (s, 3H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ=160.0, 151.3, 147.1, 135.3, 129.7, 129.5, 126.6, 126.0, 126.0, 125.5, 124.4, 117.4, 113.9, 112.9, 105.3, 55.3; MS (ES+): m/z (%) = 332.8 (100) [M + H]⁺.

3-(phenylthio)-2-(4-(trifluoromethyl)phenyl)imidazo[1,2-*a*]pyridine (115p)



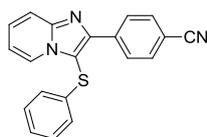
Yellow solid (99 mg, 52%); ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ =8.35 (d, J =8.2 Hz, 2H), 8.31 (d, J =6.9 Hz, 1H), 7.75 (d, J =9.0 Hz, 1H), 7.69 (d, J =8.3 Hz, 2H), 7.42 – 7.32 (m, 1H), 7.25-7.12 (m, 3H), 7.02 – 6.96 (m, 2H), 6.91 (td, J =6.8, 0.5 Hz, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 149.8, 147.3, 137.0, 134.7, 130.5, 130.1, 129.7, 129.6, 128.6, 128.5, 127.3, 127.1, 126.4, 126.4, 126.1, 125.7, 125.6, 125.3, 124.7, 124.6, 122.5, 118.0, 117.9, 113.6, 107.4; MS (ES⁺): m/z (%) = 370.7 (100) [M + H]⁺.

2-(4-fluorophenyl)-3-(phenylthio)imidazo[1,2-*a*]pyridine (115q)



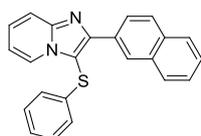
Beige solid (115 mg, 70%); ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ =8.27 (d, J =6.8 Hz, 1H), 8.23-8.16 (m, 2H), 7.72 (d, J =9.0 Hz, 1H), 7.34 (t, J =7.8 Hz, 1H), 7.25-7.18 (m, 2H), 7.17 – 7.08 (m, 3H), 6.99 (d, J =7.2 Hz, 2H), 6.88 (t, J =6.5 Hz, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 164.8, 161.5, 150.6, 147.6, 135.1, 130.2 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 8.2 Hz), 129.6, 126.9, 126.2, 125.6, 124.6, 117.7, 115.5 (d, $J_{\text{C-H}}$ = 21.5 Hz), 113.2, 106.1; MS (ES⁺): m/z (%) = 320.7 (100) [M + H]⁺.

4-(3-(phenylthio)imidazo[1,2-*a*]pyridin-2-yl)benzonitrile (115r)



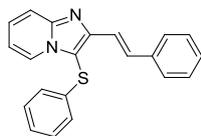
Yellow solid (58 mg, 35%); ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ =8.41-8.27 (m, 2H), 8.30 (d, J =6.9 Hz, 1H), 7.77-7.67 (m, 3H), 7.42 – 7.34 (m, 1H), 7.27-7.15 (m, 3H), 7.01 – 6.95 (m, 2H), 6.92 (td, J =6.9, 0.7 Hz, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ =149.0, 147.3, 137.9, 134.4, 132.3, 129.7, 128.7, 127.4, 126.5, 125.7, 124.7, 119.1, 118.0, 113.8, 111.9, 107.9; MS (ES⁺): m/z (%) = 327.8 (100) [M + H]⁺.

2-(naphthalen-2-yl)-3-(phenylthio)imidazo[1,2-*a*]pyridine (115u)



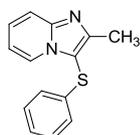
Beige solid (132 mg, 73%); ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ =8.72 (s, 1H), 8.39 (dd, J =8.6, 1.4 Hz, 1H), 8.33 (d, J =6.8 Hz, 1H), 7.94-7.88 (m, 2H), 7.87 – 7.82 (m, 1H), 7.78 (d, J =9.0 Hz, 1H), 7.51 – 7.44 (m, 2H), 7.37 (ddd, J =8.7, 6.9, 1.3 Hz, 1H), 7.24 – 7.19 (m, 2H), 7.18 – 7.13 (m, 1H), 7.08-7.03 (m, 2H), 6.90 (t, J =6.1 Hz, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ =151.4, 147.3, 135.3, 133.5, 130.9, 128.8, 128.1, 128.0, 127.7, 126.9, 126.5, 126.3, 126.2, 126.0, 125.9, 124.6, 117.8, 113.3, 106.9; MS (ES⁺): m/z (%) = 352.9 (100) [M + H]⁺.

(E)-3-(phenylthio)-2-styrylimidazo[1,2-a]pyridine (115v)



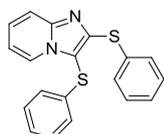
Orange oil (67 mg, 40%); ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ =8.19 (d, J =6.9 Hz, 1H), 7.82 (d, J =16.1 Hz, 1H), 7.67 (d, J =9.1 Hz, 1H), 7.61 (d, J =7.7 Hz, 2H), 7.47 (d, J =16.1 Hz, 1H), 7.40 – 7.10 (m, 7H), 7.03 (d, J =8.0 Hz, 2H), 6.82 (t, J =6.8 Hz, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ =150.4, 147.8, 137.1, 135.2, 133.0, 129.5, 128.8, 128.3, 127.2, 127.2, 126.4, 126.3, 124.5, 118.3, 117.4, 112.9; MS (ES⁺): m/z (%) = 328.9(100) [M + H]⁺.

2-methyl-3-(phenylthio)imidazo[1,2-a]pyridine (115w)



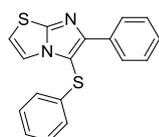
White crystals (76 mg, 61%); ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ =8.15 (d, J =6.8 Hz, 1H), 7.60 (d, J =9.0 Hz, 1H), 7.31-7.22 (m, 1H), 7.22-7.15 (m, 2H), 7.15-7.07 (m, 1H), 6.93 (d, J =7.6 Hz, 2H), 6.81 (t, J =6.9 Hz, 1H), 2.58 (s, 3H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ =151.8, 147.1, 135.7, 129.4, 126.1, 126.0, 125.7, 124.4, 117.1, 112.7, 14.1; MS (ES⁺): m/z (%) = 240.8 (100) [M + H]⁺.

2,3-bis(phenylthio)imidazo[1,2-a]pyridine (115x)



Brown solid (32 mg, 19%); ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ =8.20 (d, J =6.8 Hz, 1H), 7.65 (d, J =9.0 Hz, 1H), 7.49-7.44 (m, 2H), 7.34 – 7.27 (m, 1H), 7.27 – 7.21 (m, 2H), 7.20 – 7.16 (m, 3H), 7.16 – 7.12 (m, 1H), 7.03-6.98 (m, 2H), 6.87 (t, J =6.8 Hz, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ =148.1, 147.6, 134.6, 134.3, 131.0, 129.4, 129.1, 127.2, 126.8, 126.8, 126.6, 124.6, 117.8, 113.5; MS (ES⁺): m/z (%) = 334.8 (100) [M + H]⁺; HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{S}_2$: 335.0677 [M+H]⁺; found: 335.0668.

6-phenyl-5-(phenylthio)imidazo[2,1-b]thiazole (115y)



Orange oil (76 mg, 49%); ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ =8.10 (d, J =7.1 Hz, 2H), 7.43 – 7.31 (m, 4H), 7.23 (d, J =7.6 Hz, 2H), 7.16 (d, J =7.2 Hz, 1H), 7.07 (d, J =7.2 Hz, 2H), 6.85 (d, J =4.5 Hz, 1H); ^{13}C

NMR (75 MHz, CDCl₃): δ =152.7, 151.5, 135.9, 133.6, 129.5, 128.5, 128.3, 127.6, 126.2, 125.9, 118.1, 113.1, 107.8; MS (ES⁺): m/z (%) = 308.8(100) [M + H]⁺.

Evaluation biologique

Fluorometric assay (Abcam ADP Assay Kit (Colorimetric/Fluorometric))

In a 96-well plate, a set of standard wells containing 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 and 1.0 nmol of ADP was first prepared by diluting a commercial concentrated solution of ADP in water (supplied in Abcam kit). In test wells, 10 μL of a 150 ng/mL solution of TAM protein (ThermoFisher) in reaction buffer (supplied in Abcam kit) was dispensed. A control well containing only DMSO at the same concentration was prepared alongside. Potential inhibitors were then added to the enzyme at various concentrations (5X) as 10 μL of a 5% DMSO/water solution and incubated 5 min. Each well was then completed to 50 μL with 30 μL of buffer containing ATP (5.2 μM) and the poly (Glu-Ala-Tyr) peptide (7 $\mu\text{g}/\text{mL}$) as substrate and incubated for 5 min (Tyro3) or 10 min (Axl and Mer). "Reaction Mix" was subsequently prepared (supplied in Abcam kit) and 50 μL and was added to each well, including standard wells. After 30 min of incubation, fluorescence was read at 590 nm upon excitation at 540 nm and compared to that of standard wells to recover the ADP concentration in the corresponding well. Control well therefore gives the maximum concentration of ADP that can be produced by the protein, in the same conditions with no inhibitor. The IC_{50} values were determined by plotting ADP concentration as a function of small molecule concentration.

Bioluminescence assay

In a 96-well plate, a set of standard wells containing a range of solutions of ADP+ATP between 0 and 10 μM in ADP was first prepared by diluting a commercial concentrated solution of ADP and ATP in buffer (40 mM Tris (pH=7.5), 20 mM MgCl_2 , 0.1 mg/mL BSA, 2 mM DTT). In test wells, 10 μL of potential inhibitors at various concentrations (2.5X in buffer) were dispensed. 5 μL of 2.5X ATP/poly Glu-Ala-Tyr 1 :1 :1 (25 μM , 625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in buffer) solution were added. 10 μL of a 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ solution of TAM protein (ThermoFisher or Promega) in reaction buffer were then dispensed. The plate was incubated 2 hours at rt.

25 μL of « ADP-Glo Reagent » (supplied in Promega kit) were added in each well, including standard wells, and the plate was incubated for 40 min at rt. 50 μL of « Kinase Detection Reagent » (supplied in Promega kit) were added in each well, including standard wells. After 30 minutes of incubation at rt, luminescence was read.

The IC_{50} values were determined by plotting ADP concentration as a function of small molecule concentration.

Modélisation moléculaire

Molecular modelling was performed with Schrödinger Maestro, version 11.3, 2017, Schrödinger, LLC, New York, NY, USA. The RCSB protein data bank (pdb) crystal structures 3QUP, 5U6B and 3BRB were used for Tyro3, Axl and Mer modelling studies respectively. The protein structure was initially prepared with the Protein Preparation Wizard 2015-4 (Epik version 2.4, Schrödinger, LLC, 2015; Impact version 5.9, Schrödinger, LLC, 2015; Prime version 3.2, Schrödinger LLC, 2015). Ionization states and tautomers were generated with LigPrep, version 3.6, Schrödinger, LLC, 2015. Ligand docking and receptor grid generation was performed with Glide, version 6.9, Schrödinger, LLC, 2015. Interactions between the docked molecules and the protein were visualized using VMD software and Maestro Ligand Interaction Diagrams.

Photoclivages

Irradiations were performed using Rayonet RPR-200 system, 16 lamps, 350 nm. The solutions (10 μ M in DMSO) were irradiated in glass tubes held by pliers (distance lamp-tube \approx 2 cm). Samples were taken every minutes and directly injected in LC-MS. LC-MS spectra (ESI in the positive ion mode) were recorded on a Waters Micromass ZQ instrument (source voltage 30 kV) coupled to a Waters Alliance Separations Module 2695, equipped with a Phenomenex C18 - 3 μ m column (3.0 x 100 mm) and a Waters PDA 2998, using the following gradient: eluent A : H₂O + 0.1% formic acid; eluent B : CH₃CN + 0.1% formic acid : 0 min (98/2), 1 min (98/2), 7 min (0/100), 9 min (0/100), 13 min (98/2).

Absorption spectra were recorded with an Hitachi U-2900 spectrophotometer in quartz cells (path length 1 cm), using slit widths of 2 nm and a scan rate of 150 nm.min⁻¹.

Références bibliographiques

- (1) Vanda, D.; Zajdel, P.; Soural, M. Imidazopyridine-Based Selective and Multifunctional Ligands of Biological Targets Associated with Psychiatric and Neurodegenerative Diseases. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2019, p 111569. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111569>.
- (2) Krause, M.; Foks, H.; Gobis, K. Pharmacological Potential and Synthetic Approaches of Imidazo[4,5-b]Pyridine and Imidazo[4,5-c]Pyridine Derivatives. *Molecules* **2017**, *22* (3). <https://doi.org/10.3390/molecules22030399>.
- (3) IRMSCHER, KLAUS, DR, ; SAIKO, OTTO, DR, ; MINCK, KLAUS-OTTO, DR, ; WOLF, HANS-PETER, P. D. IMIDAZO (4,5-C) PYRIDINES, PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS CONTAINING THEM AND PROCESS FOR THEIR PREPARATION. EP0082369, 1986.
- (4) Galmiche, J. P.; Bruley Des Varannes, S.; Ducrotté, P.; Sacher-Huvelin, S.; Vavasseur, F.; Taccoen, A.; Fiorentini, P.; Homerin, M. Tenatoprazole, a Novel Proton Pump Inhibitor with a Prolonged Plasma Half-Life: Effects on Intra-gastric PH and Comparison with Esomeprazole in Healthy Volunteers. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2004**, *19* (6), 655–662. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2004.01893.x>.
- (5) Baladi, T.; Aziz, J.; Dufour, F.; Abet, V.; Stoven, V.; Radvanyi, F.; Poyer, F.; Wu, T. Di; Guerquin-Kern, J. L.; Bernard-Pierrot, I.; et al. Design, Synthesis, Biological Evaluation and Cellular Imaging of Imidazo[4,5-b]Pyridine Derivatives as Potent and Selective TAM Inhibitors. *Bioorganic Med. Chem.* **2018**, *26* (20), 5510–5530. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.09.031>.
- (6) Baladi, T.; Granzhan, A.; Piguel, S. Microwave-Assisted C-2 Direct Alkenylation of Imidazo[4,5-b]Pyridines: Access to Fluorescent Purine Isosteres with Remarkably Large Stokes Shifts. *European J. Org. Chem.* **2016**, *2016* (14), 2421–2434. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201600166>.
- (7) Aziz, J.; Baladi, T.; Piguel, S. Direct Alkynylation of 3H-Imidazo[4,5-b]Pyridines Using Gem-Dibromoalkenes as Alkynes Source. *J. Org. Chem.* **2016**, *81* (10), 4122–4133. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.6b00406>.
- (8) Fabbro, D.; Cowan-Jacob, S. W.; Moebitz, H. Ten Things You Should Know about Protein Kinases: IUPHAR Review 14. *Br. J. Pharmacol.* **2015**, *172* (11), 2675–2700. <https://doi.org/10.1111/bph.13096>.
- (9) Adams, J. A. Kinetic and Catalytic Mechanisms of Protein Kinases. *Chem. Rev.* **2001**, *101* (8), 2271–2290. <https://doi.org/10.1021/cr000230w>.
- (10) Wu, P.; Nielsen, T. E.; Clausen, M. H. FDA-Approved Small-Molecule Kinase Inhibitors. *Trends Pharmacol. Sci.* **2015**, *36* (7), 422–439. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2015.04.005>.
- (11) Manning, G.; Whyte, D. B.; Martinez, R.; Hunter, T.; Sudarsanam, S. The Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Science (80-.)*. **2002**, *298* (5600), 1912–1934. <https://doi.org/10.1126/science.1075762>.
- (12) Chico, L. K.; Van Eldik, L. J.; Watterson, D. M. Targeting Protein Kinases in Central Nervous System Disorders. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, *8* (11), 892–909. <https://doi.org/10.1038/nrd2999>.
- (13) Vijayan, R. S. K.; He, P.; Modi, V.; Duong-Ly, K. C.; Ma, H.; Peterson, J. R.; Dunbrack, R. L.;

- Levy, R. M. Conformational Analysis of the DFG-out Kinase Motif and Biochemical Profiling of Structurally Validated Type II Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (1), 466–479. <https://doi.org/10.1021/jm501603h>.
- (14) Schwarz, D.; Merget, B.; Deane, C.; Fulle, S. Modeling Conformational Flexibility of Kinases in Inactive States. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2019**, *87* (11), 943–951. <https://doi.org/10.1002/prot.25756>.
- (15) Carles, F.; Bourg, S.; Meyer, C.; Bonnet, P. PKIDB: A Curated, Annotated and Updated Database of Protein Kinase Inhibitors in Clinical Trials. *Molecules* **2018**, *23* (4), 1–18. <https://doi.org/10.3390/molecules23040908>.
- (16) Liu, Q.; Sabnis, Y.; Zhao, Z.; Zhang, T.; Buhrlage, S. J.; Jones, L. H.; Gray, N. S. Developing Irreversible Inhibitors of the Protein Kinase Cysteine. *Chem. Biol.* **2013**, *20* (2), 146–159. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2012.12.006>.
- (17) Knight, Z. A.; Shokat, K. M. Features of Selective Kinase Inhibitors. *Chem. Biol.* **2005**, *12* (6), 621–637. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2005.04.011>.
- (18) Bernard-Pierrot, I.; Radvanyi, F.; Allory, Y.; Stransky, N. Tyrosine Kinase Receptor TYRO3 as a Therapeutic Target in the Treatment of Cancer. WO2010031828, 2010.
- (19) Dufour, F.; Silina, L.; Neyret-Kahn, H.; Moreno-Vega, A.; Krucker, C.; Karboul, N.; Dorland-Galliot, M.; Maillé, P.; Chapeaublanc, E.; Allory, Y.; et al. TYRO3 as a Molecular Target for Growth Inhibition and Apoptosis Induction in Bladder Cancer. *Br. J. Cancer* **2019**, *120* (5), 555–564. <https://doi.org/10.1038/s41416-019-0397-6>.
- (20) Linger, R. M. A.; Keating, A. K.; Earp, H. S.; Graham, D. K. TAM Receptor Tyrosine Kinases: Biologic Functions, Signaling, and Potential Therapeutic Targeting in Human Cancer. *Adv. Cancer Res.* **2008**, *100* (08), 35–83. [https://doi.org/10.1016/S0065-230X\(08\)00002-X](https://doi.org/10.1016/S0065-230X(08)00002-X).
- (21) Graham, D. K.; Deryckere, D.; Davies, K. D.; Earp, H. S. The TAM Family: Phosphatidylserine-Sensing Receptor Tyrosine Kinases Gone Awry in Cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2014**, *14* (12), 769–785. <https://doi.org/10.1038/nrc3847>.
- (22) Smart, S. K.; Vasileiadi, E.; Wang, X.; DeRyckere, D.; Graham, D. K. The Emerging Role of TYRO3 as a Therapeutic Target in Cancer. *Cancers (Basel)*. **2018**, *10* (12), 474. <https://doi.org/10.3390/cancers10120474>.
- (23) Huang, X.; Finerty, P.; Walker, J. R.; Butler-Cole, C.; Vedadi, M.; Schapira, M.; Parker, S. A.; Turk, B. E.; Thompson, D. A.; Dhe-Paganon, S. Structural Insights into the Inhibited States of the Mer Receptor Tyrosine Kinase. *J. Struct. Biol.* **2009**, *165* (2), 88–96. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2008.10.003>.
- (24) Zhang, W.; McIver, A. L.; Stashko, M. A.; Deryckere, D.; Branchford, B. R.; Hunter, D.; Kireev, D.; Miley, M. J.; Norris-Drouin, J.; Stewart, W. M.; et al. Discovery of Mer Specific Tyrosine Kinase Inhibitors for the Treatment and Prevention of Thrombosis. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (23), 9693–9700. <https://doi.org/10.1021/jm4013888>.
- (25) Wang, X.; Liu, J.; Zhang, W.; Stashko, M. A.; Nichols, J.; Miley, M. J.; Norris-Drouin, J.; Chen, Z.; Machius, M.; DeRyckere, D.; et al. Design and Synthesis of Novel Macrocyclic Mer Tyrosine Kinase Inhibitors. *ACS Med. Chem. Lett.* **2016**, *7* (12), 1044–1049. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.6b00221>.
- (26) Keung, W.; Bolor, A.; Brown, J.; Kiryanov, A.; Gangloff, A.; Lawson, J. D.; Skene, R.; Hoffman, I.; Atienza, J.; Kahana, J.; et al. Structure-Based Optimization of 1H-Imidazole-2-Carboxamides as Axl Kinase Inhibitors Utilizing a Mer Mutant Surrogate. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2017**, *27* (4), 1099–1104. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.12.024>.

- (27) McIver, A. L.; Zhang, W.; Liu, Q.; Jiang, X.; Stashko, M. A.; Nichols, J.; Miley, M. J.; Norris-Drouin, J.; Machius, M.; DeRyckere, D.; et al. Discovery of Macrocyclic Pyrimidines as MerTK-Specific Inhibitors. *ChemMedChem* **2017**, *12* (3), 207–213. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201600589>.
- (28) Da, C.; Zhang, D.; Stashko, M.; Vasileiadi, E.; Parker, R. E.; Minson, K. A.; Huey, M. G.; Huelse, J. M.; Hunter, D.; Gilbert, T. S. K.; et al. Data-Driven Construction of Antitumor Agents with Controlled Polypharmacology. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141* (39), 15700–15709. <https://doi.org/10.1021/jacs.9b08660>.
- (29) Gajiwala, K. S.; Grodsky, N.; Bolaños, B.; Feng, J.; Ferre, R. A.; Timofeevski, S.; Xu, M.; Murray, B. W.; Johnson, T. W.; Stewart, A. The Axl Kinase Domain in Complex with a Macrocyclic Inhibitor Offers First Structural Insights into an Active TAM Receptor Kinase. *J. Biol. Chem.* **2017**, *292* (38), 15705–15716. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.771485>.
- (30) Liu, J.; Yang, C.; Simpson, C.; Deryckere, D.; Van Deusen, A.; Miley, M. J.; Kireev, D.; Norris-Drouin, J.; Sather, S.; Hunter, D.; et al. Discovery of Small Molecule Mer Kinase Inhibitors for the Treatment of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, *3* (2), 129–134. <https://doi.org/10.1021/ml200239k>.
- (31) Powell, N. A.; Kohrt, J. T.; Filipinski, K. J.; Kaufman, M.; Sheehan, D.; Edmunds, J. E.; Delaney, A.; Wang, Y.; Bourbonais, F.; Lee, D. Y.; et al. Novel and Selective Spiroindoline-Based Inhibitors of Sky Kinase. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2012**, *22* (1), 190–193. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.11.036>.
- (32) Powell, N. A.; Hoffman, J. K.; Ciske, F. L.; Kaufman, M. D.; Kohrt, J. T.; Quin, J.; Sheehan, D. J.; Delaney, A.; Baxi, S. M.; Catana, C.; et al. Highly Selective 2,4-Diaminopyrimidine-5-Carboxamide Inhibitors of Sky Kinase. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2013**, *23* (4), 1046–1050. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.12.013>.
- (33) Scott, R. S.; McMahon, E. J.; Pop, S. M.; Reap, E. A.; Caricchio, R.; Cohen, P. L.; Shelton Earp, H.; Matsushima, G. K. Phagocytosis and Clearance of Apoptotic Cells Is Mediated by MER. *Nature* **2001**, *411* (6834), 207–211. <https://doi.org/10.1038/35075603>.
- (34) Burstyn-cohen, T.; Maimon, A. TAM Receptors, Phosphatidylserine, Inflammation, and Cancer. *Cell Commun. Signal.* **2019**, *17* (156), 1–9.
- (35) Wium, M.; Paccetz, J.; Zerbini, L. The Dual Role of TAM Receptors in Autoimmune Diseases and Cancer: An Overview. *Cells* **2018**, *7* (10), 166. <https://doi.org/10.3390/cells7100166>.
- (36) Lemke, G. Biology of the TAM Receptors. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2013**, *5* (11), 1–17. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009076>.
- (37) Nowakowski, T. J.; Pollen, A. A.; Di Lullo, E.; Sandoval-Espinosa, C.; Bershteyn, M.; Kriegstein, A. R. Expression Analysis Highlights AXL as a Candidate Zika Virus Entry Receptor in Neural Stem Cells. *Cell Stem Cell* **2016**, *18* (5), 591–596. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.03.012>.
- (38) Persaud, M.; Martinez-Lopez, A.; Buffone, C.; Porcelli, S. A.; Diaz-Griffero, F. Infection by Zika Viruses Requires the Transmembrane Protein AXL, Endocytosis and Low PH. *Virology* **2018**, *518* (March), 301–312. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.03.009>.
- (39) Baladi, T.; Abet, V.; Piguel, S. State-of-the-Art of Small Molecule Inhibitors of the TAM Family: The Point of View of the Chemist. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *105*, 220–237. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.10.003>.
- (40) Kim, D.; Lee, K. W.; Jung, H.; Kim, M.; Lee, J. Y.; Lee, Y.; Hwang, J. Y.; Min, Y.; Lee, C. H.; Cho, S. Y. Design and Synthesis of Novel 2,4-Diamino-5-Pyrazol-4-Yl Pyrimidine Derivatives as Selective Tyro3 Kinase Inhibitors. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2018**, *39* (9), 1101–1104.

<https://doi.org/10.1002/bkcs.11541>.

- (41) Dhillon, S. Gilteritinib: First Global Approval. *Drugs* **2019**, *79* (3), 331–339. <https://doi.org/10.1007/s40265-019-1062-3>.
- (42) Myers, S. H.; Brunton, V. G.; Unciti-Broceta, A. AXL Inhibitors in Cancer: A Medicinal Chemistry Perspective. *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (8), 3593–3608. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01273>.
- (43) Mahadevan, D.; Cooke, L.; Riley, C.; Swart, R.; Simons, B.; Della Croce, K.; Wisner, L.; Iorio, M.; Shakalya, K.; Garewal, H.; et al. A Novel Tyrosine Kinase Switch Is a Mechanism of Imatinib Resistance in Gastrointestinal Stromal Tumors. *Oncogene* **2007**, *26* (27), 3909–3919. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210173>.
- (44) Mollard, A.; Warner, S. L.; Call, L. T.; Wade, M. L.; Bearss, J. J.; Verma, A.; Sharma, S.; Vankayalapati, H.; Bearss, D. J. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of a Series of Novel AXL Kinase Inhibitors. *ACS Med. Chem. Lett.* **2011**, *2* (12), 907–912. <https://doi.org/10.1021/ml200198x>.
- (45) Szabadkai, I.; Torka, R.; Garamvölgyi, R.; Baska, F.; Gyulavári, P.; Boros, S.; Illyés, E.; Choidas, A.; Ullrich, A.; Órfi, L. Discovery of N-[4-(Quinolin-4-Yloxy)Phenyl]Benzenesulfonamides as Novel AXL Kinase Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2018**, *61* (14), 6277–6292. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00672>.
- (46) Liu, J.; Zhang, W.; Stashko, M. A.; DeRyckere, D.; Cummings, C. T.; Hunter, D.; Yang, C.; Jayakody, C. N.; Cheng, N.; Simpson, C.; et al. UNC1062, a New and Potent Mer Inhibitor. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *65*, 83–93. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.03.035>.
- (47) Zhang, W.; Deryckere, D.; Hunter, D.; Liu, J.; Stashko, M. A.; Minson, K. A.; Cummings, C. T.; Lee, M.; Glaros, T. G.; Newton, D. L.; et al. UNC2025, a Potent and Orally Bioavailable MER/FLT3 Dual Inhibitor. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (16), 7031–7041. <https://doi.org/10.1021/jm500749d>.
- (48) Zhang, W.; Zhang, D.; Stashko, M. A.; DeRyckere, D.; Hunter, D.; Kireev, D.; Miley, M. J.; Cummings, C.; Lee, M.; Norris-Drouin, J.; et al. Pseudo-Cyclization through Intramolecular Hydrogen Bond Enables Discovery of Pyridine Substituted Pyrimidines as New Mer Kinase Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (23), 9683–9692. <https://doi.org/10.1021/jm401387j>.
- (49) Schroeder, G. M.; An, Y.; Cai, Z. W.; Chen, X. T.; Clark, C.; Cornelius, L. A. M.; Dai, J.; Gullo-Brown, J.; Gupta, A.; Henley, B.; et al. Discovery of N-(4-(2-Amino-3-Chloropyridin-4-Yloxy)-3-Fluorophenyl)-4-Ethoxy-1-(4-Fluorophenyl)-2-Oxo-1,2-Dihydropyridine-3-Carboxamide (BMS-777607), a Selective and Orally Efficacious Inhibitor of the Met Kinase Superfamily. *J. Med. Chem.* **2009**, *52* (5), 1251–1254. <https://doi.org/10.1021/jm801586s>.
- (50) Suárez, R. M.; Chevot, F.; Cavagnino, A.; Saettel, N.; Radvanyi, F.; Piguel, S.; Bernard-Pierrot, I.; Stoven, V.; Legraverend, M. Inhibitors of the TAM Subfamily of Tyrosine Kinases: Synthesis and Biological Evaluation. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *61*, 2–25. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.06.005>.
- (51) Traoré, T.; Cavagnino, A.; Saettel, N.; Radvanyi, F.; Piguel, S.; Bernard-Pierrot, I.; Stoven, V.; Legraverend, M. New Aminopyrimidine Derivatives as Inhibitors of the TAM Family. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *70*, 789–801. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.10.037>.
- (52) Nolen, B.; Taylor, S.; Ghosh, G. Regulation of Protein Kinases: Controlling Activity through Activation Segment Conformation. *Mol. Cell* **2004**, *15* (5), 661–675. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.08.024>.

- (53) Johnson, L. N.; Noble, M. E. M.; Owen, D. J. Active and Inactive Protein Kinases: Structural Basis for Regulation. *Cell* **1996**, *85* (2), 149–158. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81092-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81092-2).
- (54) Yu, Z.; Ma, Y. C.; Ai, J.; Chen, D. Q.; Zhao, D. M.; Wang, X.; Chen, Y. L.; Geng, M. Y.; Xiong, B.; Cheng, M. S.; et al. Energetic Factors Determining the Binding of Type I Inhibitors to C-Met Kinase: Experimental Studies and Quantum Mechanical Calculations. *Acta Pharmacol. Sin.* **2013**, *34* (11), 1475–1483. <https://doi.org/10.1038/aps.2013.85>.
- (55) Brieke, C.; Rohrbach, F.; Gottschalk, A.; Mayer, G.; Heckel, A. Light-Controlled Tools. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2012**, *51* (34), 8446–8476. <https://doi.org/10.1002/anie.201202134>.
- (56) Lerch, M. M.; Hansen, M. J.; van Dam, G. M.; Szymanski, W.; Feringa, B. L. Emerging Targets in Photopharmacology. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2016**, *55* (37), 10978–10999. <https://doi.org/10.1002/anie.201601931>.
- (57) Hüll, K.; Morstein, J.; Trauner, D. In Vivo Photopharmacology. *Chem. Rev.* **2018**, *118* (21), 10710–10747. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00037>.
- (58) Ankenbruck, N.; Courtney, T.; Naro, Y.; Deiters, A. Optochemical Control of Biological Processes in Cells and Animals. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2018**, *57* (11), 2768–2798. <https://doi.org/10.1002/anie.201700171>.
- (59) Silva, J. M.; Silva, E.; Reis, R. L. Light-Triggered Release of Photocaged Therapeutics - Where Are We Now? *J. Control. Release* **2019**, *298* (October 2018), 154–176. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.02.006>.
- (60) Engels, J.; Schlaeger, E. J. Synthesis, Structure, and Reactivity of Adenosine Cyclic 3',5'-Phosphate-Benzyl Triesters. *J. Med. Chem.* **1977**, *20* (7), 907–911. <https://doi.org/10.1021/jm00217a008>.
- (61) Kaplan, J. H.; Forbush, B.; Hoffman, J. F. Rapid Photolytic Release of Adenosine 5'-Triphosphate from a Protected Analogue: Utilization by the Na:K Pump of Human Red Blood Cell Ghosts. *Biochemistry* **1978**, *17* (10), 1929–1935. <https://doi.org/10.1021/bi00603a020>.
- (62) Gautier, A.; Deiters, A.; Chin, J. W. Light-Activated Kinases Enable Temporal Dissection of Signaling Networks in Living Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (7), 2124–2127. <https://doi.org/10.1021/ja1109979>.
- (63) Klán, P.; Šolomek, T.; Bochet, C. G.; Blanc, A.; Givens, R.; Rubina, M.; Popik, V.; Kostikov, A.; Wirz, J. Photoremovable Protecting Groups in Chemistry and Biology: Reaction Mechanisms and Efficacy. *Chem. Rev.* **2013**, *113* (1), 119–191. <https://doi.org/10.1021/cr300177k>.
- (64) Hansen, M. J.; Velema, W. A.; Lerch, M. M.; Szymanski, W.; Feringa, B. L. Wavelength-Selective Cleavage of Photoprotecting Groups: Strategies and Applications in Dynamic Systems. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44* (11), 3358–3377. <https://doi.org/10.1039/c5cs00118h>.
- (65) Klausen, M.; Dubois, V.; Clermont, G.; Tonnelé, C.; Castet, F.; Blanchard-Desce, M. Dual-Wavelength Efficient Two-Photon Photorelease of Glycine by π -Extended Dipolar Coumarins. *Chem. Sci.* **2019**, *10* (15), 4209–4219. <https://doi.org/10.1039/c9sc00148d>.
- (66) Bojtár, M.; Kormos, A.; Kis-Petik, K.; Kellermayer, M.; Kele, P. Green-Light Activatable, Water-Soluble Red-Shifted Coumarin Photocages. *Org. Lett.* **2019**, *21* (23), 9410–9414. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.9b03624>.

- (67) Piant, S.; Bolze, F.; Specht, A. Two-Photon Uncaging, from Neuroscience to Materials. *Opt. Mater. Express* **2016**, *6* (5), 1679. <https://doi.org/10.1364/ome.6.001679>.
- (68) Fichte, M. A. H.; Weyel, X. M. M.; Junek, S.; Schäfer, F.; Herbivo, C.; Goeldner, M.; Specht, A.; Wachtveitl, J.; Heckel, A. Three-Dimensional Control of DNA Hybridization by Orthogonal Two-Color Two-Photon Uncaging. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2016**, *55* (31), 8948–8952. <https://doi.org/10.1002/anie.201603281>.
- (69) Szymański, W.; Beierle, J. M.; Kistemaker, H. A. V.; Velema, W. A.; Feringa, B. L. Reversible Photocontrol of Biological Systems by the Incorporation of Molecular Photoswitches. *Chem. Rev.* **2013**, *113* (8), 6114–6178. <https://doi.org/10.1021/cr300179f>.
- (70) Hoppmann, C.; Maslennikov, I.; Choe, S.; Wang, L. In Situ Formation of an Azo Bridge on Proteins Controllable by Visible Light. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (35), 11218–11221. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b06234>.
- (71) Fleming, C. L.; Grøtli, M.; Andréasson, J. On-Command Regulation of Kinase Activity Using Photonic Stimuli. *ChemPhotoChem* **2019**, *3* (6), 318–326. <https://doi.org/10.1002/cptc.201800253>.
- (72) Wood, J. S.; Koszelak, M.; Liu, J.; Lawrence, D. S. A Caged Protein Kinase Inhibitor. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120* (28), 7145–7146. <https://doi.org/10.1021/ja980960+>.
- (73) Morckel, A. R.; Lusic, H.; Farzana, L.; Yoder, J. A.; Deiters, A.; Nascone-Yoder, N. M. A Photoactivatable Small-Molecule Inhibitor for Lightcontrolled Spatiotemporal Regulation of Rho Kinase in Live Embryos. *Development* **2012**, *139* (2), 437–442. <https://doi.org/10.1242/dev.072165>.
- (74) Bliman, D.; Nilsson, J. R.; Kettunen, P.; Andréasson, J.; Grøtli, M. A Caged Ret Kinase Inhibitor and Its Effect on Motoneuron Development in Zebrafish Embryos. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep13109>.
- (75) Zindler, M.; Pinchuk, B.; Renn, C.; Horbert, R.; Döbber, A.; Peifer, C. Design, Synthesis, and Characterization of a Photoactivatable Caged Prodrug of Imatinib. *ChemMedChem* **2015**, *10* (8), 1335–1338. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201500163>.
- (76) Horbert, R.; Pinchuk, B.; Davies, P.; Alessi, D.; Peifer, C. Photoactivatable Prodrugs of Antimelanoma Agent Vemurafenib. *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10* (9), 2099–2107. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.5b00174>.
- (77) Pinchuk, B.; Horbert, R.; Döbber, A.; Kuhl, L.; Peifer, C. Photoactivatable Caged Prodrugs of VEGFR-2 Kinase Inhibitors. *Molecules* **2016**, *21* (5), 1–19. <https://doi.org/10.3390/molecules21050570>.
- (78) Sörmus, T.; Lavogina, D.; Enkvist, E.; Uri, A.; Viht, K. Efficient Photocaging of a Tight-Binding Bisubstrate Inhibitor of CAMP-Dependent Protein Kinase. *Chem. Commun.* **2019**, *55* (74), 11147–11150. <https://doi.org/10.1039/c9cc04978a>.
- (79) Ferreira, R.; Nilsson, J. R.; Solano, C.; Andréasson, J.; Grøtli, M. Design, Synthesis and Inhibitory Activity of Photoswitchable RET Kinase Inhibitors. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep09769>.
- (80) Wilson, D.; Li, J. W.; Branda, N. R. Visible-Light-Triggered Activation of a Protein Kinase Inhibitor. *ChemMedChem* **2017**, *12* (4), 284–287. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201600632>.
- (81) Tsai, Y. H.; Essig, S.; James, J. R.; Lang, K.; Chin, J. W. Selective, Rapid and Optically Switchable Regulation of Protein Function in Live Mammalian Cells. *Nat. Chem.* **2015**, *7* (7), 554–561. <https://doi.org/10.1038/nchem.2253>.

- (82) Schmidt, D.; Rodat, T.; Heintze, L.; Weber, J.; Horbert, R.; Girreser, U.; Raeker, T.; Bußmann, L.; Kriegs, M.; Hartke, B.; et al. Axitinib: A Photoswitchable Approved Tyrosine Kinase Inhibitor. *ChemMedChem* **2018**, *13* (22), 2415–2426. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201800531>.
- (83) Hoorens, M. W. H.; Ourailidou, M. E.; Rodat, T.; van der Wouden, P. E.; Kobauri, P.; Kriegs, M.; Peifer, C.; Feringa, B. L.; Dekker, F. J.; Szymanski, W. Light-Controlled Inhibition of BRAFV600E Kinase. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *179*, 133–146. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.06.042>.
- (84) Ghizzoni, M.; Wu, J.; Gao, T.; Haisma, H. J.; Dekker, F. J.; George Zheng, Y. 6-Alkylsalicylates Are Selective Tip60 Inhibitors and Target the Acetyl-CoA Binding Site. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *47* (1), 337–344. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.11.001>.
- (85) Jose, G.; Suresha Kumara, T. H.; Nagendrappa, G.; Sowmya, H. B. V.; Jasinski, J. P.; Millikan, S. P.; Chandrika, N.; More, S. S.; Harish, B. G. New Polyfunctional Imidazo[4,5-C]Pyridine Motifs: Synthesis, Crystal Studies, Docking Studies and Antimicrobial Evaluation. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *77*, 288–297. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.03.019>.
- (86) Chen, D.; Wang, Y.; Ma, Y.; Xiong, B.; Ai, J.; Chen, Y.; Geng, M.; Shen, J. Discovery of 3H-Imidazo[4,5-b]Pyridines as Potent c-Met Kinase Inhibitors: Design, Synthesis, and Biological Evaluation. *ChemMedChem* **2012**, *7* (6), 1057–1070. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201200120>.
- (87) Momotake, A.; Lindegger, N.; Niggli, E.; Barsotti, R. J.; Ellis-Davies, G. C. R. The Nitrodibenzofuran Chromophore: A New Caging Group for Ultra-Efficient Photolysis in Living Cells. *Nat. Methods* **2006**, *3* (1), 35–40. <https://doi.org/10.1038/nmeth821>.
- (88) Skwarczynski, M.; Noguchi, M.; Hirota, S.; Sohma, Y.; Kimura, T.; Hayashi, Y.; Kiso, Y. Development of First Photoresponsive Prodrug of Paclitaxel. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2006**, *16* (17), 4492–4496. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2006.06.030>.
- (89) Scott, K. A.; Njardarson, J. T. Analysis of US FDA-Approved Drugs Containing Sulfur Atoms. *Top. Curr. Chem.* **2018**, *376* (1), 1–34. <https://doi.org/10.1007/s41061-018-0184-5>.
- (90) Liu, N. W.; Liang, S.; Manolikakes, G. Recent Advances in the Synthesis of Sulfones. *Synth.* **2016**, *48* (13), 1939–1973. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1560444>.
- (91) Trost, B. M.; Kalnmals, C. A. Sulfones as Chemical Chameleons: Versatile Synthetic Equivalents of Small-Molecule Synthons. *Chem. - A Eur. J.* **2019**, *25* (48), 11193–11213. <https://doi.org/10.1002/chem.201902019>.
- (92) Shaaban, S.; Liang, S.; Liu, N. W.; Manolikakes, G. Synthesis of Sulfones via Selective C-H-Functionalization. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15* (9), 1947–1955. <https://doi.org/10.1039/C6OB02424F>.
- (93) Qiu, G.; Zhou, K.; Wu, J. Recent Advances in the Sulfonylation of C-H Bonds with the Insertion of Sulfur Dioxide. *Chem. Commun.* **2018**, *54* (89), 12561–12569. <https://doi.org/10.1039/C8CC07434H>.
- (94) Bissret, P.; Blanchard, N. Taming Sulfur Dioxide: A Breakthrough for Its Wide Utilization in Chemistry and Biology. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11* (33), 5393–5398. <https://doi.org/10.1039/c3ob40997j>.
- (95) Yang, Y.; Li, W.; Xia, C.; Ying, B.; Shen, C.; Zhang, P. Catalyst-Controlled Selectivity in C-S Bond Formation: Highly Efficient Synthesis of C2- and C3-Sulfonylindoles. *ChemCatChem* **2016**, *8* (2), 304–307. <https://doi.org/10.1002/cctc.201500917>.
- (96) Liu, T.; Zhou, W.; Wu, J. Palladium-Catalyzed Direct C-H Functionalization of Indoles with

- the Insertion of Sulfur Dioxide: Synthesis of 2-Sulfonated Indoles. *Org. Lett.* **2017**, *19* (24), 6638–6641. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.7b03365>.
- (97) Guo, Y. J.; Lu, S.; Tian, L. L.; Huang, E. L.; Hao, X. Q.; Zhu, X.; Shao, T.; Song, M. P. Iodine-Mediated Difunctionalization of Imidazopyridines with Sodium Sulfinates: Synthesis of Sulfones and Sulfides. *J. Org. Chem.* **2018**, *83* (1), 338–349. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.7b02734>.
- (98) Yang, D.; Sun, P.; Wei, W.; Liu, F.; Zhang, H.; Wang, H. Copper-Catalyzed Regioselective Cleavage of C–X and C–H Bonds: A Strategy for Sulfur Dioxide Fixation. *Chem. - A Eur. J.* **2018**, *24* (17), 4423–4427. <https://doi.org/10.1002/chem.201705866>.
- (99) Cao, H.; Zhan, H.; Lin, Y.; Lin, X.; Du, Z.; Jiang, H. Direct Arylation of Imidazo[1,2-a]Pyridine at C-3 with Aryl Iodides, Bromides, and Triflates via Copper(I)-Catalyzed C–H Bond Functionalization. *Org. Lett.* **2012**, *14* (7), 1688–1691. <https://doi.org/10.1021/ol300232a>.
- (100) Deeming, A. S.; Russell, C. J.; Willis, M. C. Palladium(II)-Catalyzed Synthesis of Sulfinates from Boronic Acids and DABSO: A Redox-Neutral, Phosphine-Free Transformation. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2016**, *55* (2), 747–750. <https://doi.org/10.1002/anie.201508370>.
- (101) Emmett, E. J.; Hayter, B. R.; Willis, M. C. Palladium-Catalyzed Synthesis of Ammonium Sulfinates from Aryl Halides and a Sulfur Dioxide Surrogate: A Gas- and Reductant-Free Process. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2014**, *53* (38), 10204–10208. <https://doi.org/10.1002/anie.201404527>.
- (102) Vedovato, V.; Talbot, E. P. A.; Willis, M. C. Copper-Catalyzed Synthesis of Activated Sulfonate Esters from Boronic Acids, DABSO, and Pentafluorophenol. *Org. Lett.* **2018**, *20* (17), 5493–5496. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.8b02445>.
- (103) Chen, Y.; Willis, M. C. Copper(I)-Catalyzed Sulfonylative Suzuki–Miyaura Cross-Coupling. *Chem. Sci.* **2017**, *8* (4), 3249–3253. <https://doi.org/10.1039/C6SC05483H>.
- (104) Ravi, C.; Reddy, N. N. K.; Pappula, V.; Samanta, S.; Adimurthy, S. Copper-Catalyzed Three-Component System for Arylsulfenylation of Imidazopyridines with Elemental Sulfur. *J. Org. Chem.* **2016**, *81* (20), 9964–9972. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.6b01715>.
- (105) Wu, W.; Ding, Y.; Xie, P.; Tang, Q.; Pittman, C. U.; Zhou, A. Synthesis of Imidazol[1,2- α]Pyridine Thioethers via Using Sulfur Powder and Halides as Reactants. *Tetrahedron* **2017**, *73* (15), 2151–2158. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2017.02.065>.
- (106) Li, J.; Li, C.; Yang, S.; An, Y.; Wu, W.; Jiang, H. Palladium-Catalyzed Oxidative Sulfenylation of Indoles and Related Electron-Rich Heteroarenes with Aryl Boronic Acids and Elemental Sulfur. *J. Org. Chem.* **2016**, *81* (17), 7771–7783. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.6b01428>.
- (107) Zhu, W.; Ding, Y.; Bian, Z.; Xie, P.; Xu, B.; Tang, Q.; Wu, W.; Zhou, A. One-Pot Three-Component Synthesis of Alkylthio-/Arylthio-Substituted Imidazo[1,2-a]Pyridine Derivatives via C(sp²)-H Functionalization. *Adv. Synth. Catal.* **2017**, *359* (13), 2215–2221. <https://doi.org/10.1002/adsc.201601431>.
- (108) Xiao, G.; Min, H.; Zheng, Z.; Deng, G.; Liang, Y. Copper-Catalyzed Three-Component Reaction of Imidazo[1,2-a]Pyridine with Elemental Sulfur and Arylboronic Acid to Produce Sulfenylimidazo[1,2-a]Pyridines. *Chinese Chem. Lett.* **2018**, *29* (9), 1363–1366. <https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2017.12.013>.
- (109) Zheng, Z.; Qi, D.; Shi, L. Copper-Catalyzed Thiolation of Imidazo[1,2-a]Pyridines with (Hetero)Aryl Thiols Using Molecular Oxygen. *Catal. Commun.* **2015**, *66*, 83–86. <https://doi.org/10.1016/j.catcom.2015.03.023>.

- (110) Cao, H.; Chen, L.; Liu, J.; Cai, H.; Deng, H.; Chen, G.; Yan, C.; Chen, Y. Regioselective Copper-Catalyzed Thiolation of Imidazo[1,2-a]Pyridines: An Efficient C-H Functionalization Strategy for C-S Bond Formation. *RSC Adv.* **2015**, *5* (29), 22356–22360. <https://doi.org/10.1039/c5ra01342a>.
- (111) Ravi, C.; Chandra Mohan, D.; Adimurthy, S. Dual Role of P-Tosylchloride: Copper-Catalyzed Sulfenylation and Metal Free Methylthiolation of Imidazo[1,2-a]Pyridines. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14* (7), 2282–2290. <https://doi.org/10.1039/c5ob02475g>.
- (112) Ding, Y.; Xie, P.; Zhu, W.; Xu, B.; Zhao, W.; Zhou, A. Cu-Catalyzed Sulfenylation of Imidazol[1,2-: A] Pyridine via C-H Functionalization Using a Combination of Na₂S₂O₃ and Halides. *RSC Adv.* **2016**, *6* (85), 81932–81935. <https://doi.org/10.1039/c6ra18136h>.
- (113) Rafique, J.; Saba, S.; Franco, M. S.; Bettanin, L.; Schneider, A. R.; Silva, L. T.; Braga, A. L. Direct, Metal-Free C(Sp²)-H Chalcogenation of Indoles and Imidazopyridines with Dichalcogenides Catalysed by KIO₃. *Chem. - A Eur. J.* **2018**, *24* (16), 4173–4180. <https://doi.org/10.1002/chem.201705404>.
- (114) Rafique, J.; Saba, S.; Rosário, A. R.; Braga, A. L. Regioselective, Solvent- and Metal-Free Chalcogenation of Imidazo[1,2-a]Pyridines by Employing I₂/DMSO as the Catalytic Oxidation System. *Chem. - A Eur. J.* **2016**, *22* (33), 11854–11862. <https://doi.org/10.1002/chem.201600800>.
- (115) Bettanin, L.; Saba, S.; Doerner, C. V.; Franco, M. S.; Godoi, M.; Rafique, J.; Braga, A. L. NH₄I-Catalyzed Chalcogen(S/Se)-Functionalization of 5-Membered N-Heteroaryls under Metal-Free Conditions. *Tetrahedron* **2018**, *74* (29), 3971–3980. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2018.05.084>.
- (116) Huang, X.; Wang, S.; Li, B.; Wang, X.; Ge, Z.; Li, R. Iodine-Triphenylphosphine Mediated Sulfenylation of Imidazoheterocycles with Sodium Sulfinates. *RSC Adv.* **2015**, *5* (29), 22654–22657. <https://doi.org/10.1039/c4ra17237j>.
- (117) Ravi, C.; Chandra Mohan, D.; Adimurthy, S. N-Chlorosuccinimide-Promoted Regioselective Sulfenylation of Imidazoheterocycles at Room Temperature. *Org. Lett.* **2014**, *16* (11), 2978–2981. <https://doi.org/10.1021/ol501117z>.
- (118) Kong, D.; Wang, Q.; Huang, T.; Liang, M.; Lin, Q.; Wu, M. Metal-Free Direct Regioselective Thiolation of Imidazoheterocycles in Water at Room Temperature. *Tetrahedron* **2019**, *75* (10), 1457–1463. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2019.01.059>.
- (119) Zhang, J. R.; Zhan, L. Z.; Wei, L.; Ning, Y. Y.; Zhong, X. L.; Lai, J. X.; Xu, L.; Tang, R. Y. Metal-Free Thiolation of Imidazopyridines with Functionalized Haloalkanes Using Elemental Sulfur. *Adv. Synth. Catal.* **2018**, *360* (3), 533–543. <https://doi.org/10.1002/adsc.201701190>.
- (120) Ravi, C.; Joshi, A.; Adimurthy, S. C₃ Sulfenylation of N-Heteroarenes in Water under Catalyst-Free Conditions. *European J. Org. Chem.* **2017**, *2017* (25), 3646–3651. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201700487>.
- (121) Chowdhury, S. R.; Fadikar, P.; Ul Hoque, I.; Maity, S. Catalyst-Free Regioselective Sulfenylation of Imidazoheterocycles with Sulfonyl Hydrazides in Water. *Asian J. Org. Chem.* **2018**, *7* (2), 332–336. <https://doi.org/10.1002/ajoc.201700670>.
- (122) Sun, P.; Yang, D.; Wei, W.; Jiang, M.; Wang, Z.; Zhang, L.; Zhang, H.; Zhang, Z.; Wang, Y.; Wang, H. Visible Light-Induced C-H Sulfenylation Using Sulfinic Acids. *Green Chem.* **2017**, *19* (20), 4785–4791. <https://doi.org/10.1039/c7gc01891f>.
- (123) Rahaman, R.; Das, S.; Barman, P. Visible-Light-Induced Regioselective Sulfenylation of Imidazopyridines with Thiols under Transition Metal-Free Conditions. *Green Chem.* **2018**,

- 20 (1), 141–147. <https://doi.org/10.1039/c7gc02906c>.
- (124) Smakula Hand, E.; Paudler, W. W. Mechanism of the Reaction of 2-Haloketones with 2-Aminopyridine. *Tetrahedron* **1982**, *38* (1), 49–55. [https://doi.org/10.1016/0040-4020\(82\)85044-8](https://doi.org/10.1016/0040-4020(82)85044-8).
- (125) Mohan, D. C.; Donthiri, R. R.; Rao, S. N.; Adimurthy, S. Copper(I) Iodide-Catalysed Aerobic Oxidative Synthesis of Imidazo [1,2- α]Pyridines from 2-Aminopyridines and Methyl Ketones. *Adv. Synth. Catal.* **2013**, *355* (11–12), 2217–2221. <https://doi.org/10.1002/adsc.201300456>.
- (126) Semwal, R.; Ravi, C.; Saxena, S.; Adimurthy, S. Copper-Catalysed Multi-Component Reactions (MCR's) for Disulfenylation of Imidazo[1,2-a]Pyridines Using Elemental Sulfur and Arylhalides and Intramolecular Cyclisation of Haloimidazo[1,2-a]Pyridines. *J. Org. Chem.* **2019**, No. entry 7, 2–11. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.9b01632>.
- (127) Kubas, G. J. Chemical Transformations and Disproportionation of Sulfur Dioxide on Transition Metal Complexes. *Acc. Chem. Res.* **1994**, *27* (7). <https://doi.org/10.1021/ar00043a001>.
- (128) Wong, B.; Brown, L.; Buckingham, R.; Sweet, W.; Russ, B.; Gorenek, M. Sulfur Dioxide Disproportionation for Sulfur Based Thermochemical Energy Storage. *Sol. Energy* **2015**, *118*, 134–144. <https://doi.org/10.1016/j.solener.2015.04.037>.
- (129) Le Bescont, J.; Breton-Patient, C.; Piguel, S. Unconventional Reactivity with DABCO-Bis(Sulfur Dioxide): C–H Bond Sulfenylation of Imidazopyridines. *European J. Org. Chem.* **2020**, 2101–2109. <https://doi.org/10.1002/ejoc.202000112>.
- (130) Hwang, D. J.; Yang, J.; Xu, H.; Rakov, I. M.; Mohler, M. L.; Dalton, J. T.; Miller, D. D. Arylthiocyanato Selective Androgen Receptor Modulators (SARMs) for Prostate Cancer. *Bioorganic Med. Chem.* **2006**, *14* (19), 6525–6538. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.06.019>.
- (131) RUBIO-RUIZ BELEN; BRAY THOMAS L; PEREZ-LOPEZ ANA M; ADAM CATHERINE; UNCITI-BROCETA ASIER. Bioorthogonal Compounds Comprising a Propargyl Group for Treating Cancer. WO2017199028, 2017.
- (132) Weinrich, T.; Gränz, M.; Grünwald, C.; Prisner, T. F.; Göbel, M. W. Synthesis of a Cytidine Phosphoramidite with Protected Nitroxide Spin Label for EPR Experiments with RNA. *European J. Org. Chem.* **2017**, *2017* (3), 491–496. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201601174>.
- (133) Cao, G.; Chen, Z.; Song, J.; Xu, J.; Miao, M.; Ren, H. Oxidant-Mediated Nitrogenation and Recyclization of Imidazo[1,2-a]Pyridines with Sodium Azide: Synthesis of 4H-Pyrido[1,2-a][1,3,5]Triazin-4-Ones. *Adv. Synth. Catal.* **2018**, *360* (5), 881–886. <https://doi.org/10.1002/adsc.201701480>.
- (134) Chen, L.; Zhu, H.; Wang, J.; Liu, H. One-Pot NBS-Promoted Synthesis of Imidazoles and Thiazoles from Ethylarenes in Water. *Molecules* **2019**, *24* (5), 1–13. <https://doi.org/10.3390/molecules24050893>.
- (135) Jin, S.; Yao, H.; Lin, S.; You, X.; Yang, Y.; Yan, Z. Peroxide-Mediated Site-Specific C-H Methylation of Imidazo[1,2-a] Pyridines and Quinoxalin-2(1 H)-Ones under Metal-Free Conditions. *Org. Biomol. Chem.* **2020**, *18* (2), 205–210. <https://doi.org/10.1039/c9ob02328c>.
- (136) Donthiri, R. R.; Pappula, V.; Reddy, N. N. K.; Bairagi, D.; Adimurthy, S. Copper-Catalyzed c-h Functionalization of Pyridines and Isoquinolines with Vinyl Azides: Synthesis of Imidazo Heterocycles. *J. Org. Chem.* **2014**, *79* (22), 11277–11284.

<https://doi.org/10.1021/jo5021618>.

- (137) Samanta, S.; Hajra, A. Mn(II)-Catalyzed C-H Alkylation of Imidazopyridines and N-Heteroarenes via Decarbonylative and Cross-Dehydrogenative Coupling. *J. Org. Chem.* **2019**, *84* (7), 4363–4371. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.9b00366>.
- (138) Rodríguez, J. C.; Maldonado, R. A.; Ramírez-García, G.; Díaz Cervantes, E.; de la Cruz, F. N. Microwave-Assisted Synthesis and Luminescent Activity of Imidazo[1,2-a]Pyridine Derivatives. *J. Heterocycl. Chem.* **2020**, *57* (5), 2279–2287. <https://doi.org/10.1002/jhet.3950>.

Titre : Inhibiteurs photo-contrôlables de la famille TAM – Méthodologie de sulfénylation directe d'imidazopyridines

Mots clés : Protéines kinases – Chimie médicinale – Sulfénylation – Chimie hétérocyclique

Résumé : La famille TAM regroupe trois tyrosines kinases transmembranaires : Tyro3, Axl et Mer. Ces trois protéines sont impliquées dans de nombreux mécanismes de signalisation et de régulation cellulaire, notamment de croissance et d'apoptose. La famille TAM a été identifiée comme nouvelle cible thérapeutique prometteuse dans le traitement de certains cancers, de maladies auto-immunes et d'infections virales. Toutefois, il n'existe que peu de molécules ayant été spécialement conçues comme inhibiteurs de TAM, la plupart s'intéressant à Axl ou Mer.

La première partie de ce manuscrit est consacrée à l'optimisation d'inhibiteurs de TAM basés sur le noyau imidazo[4,5-*b*]pyridine. La conception par modélisation moléculaire, la synthèse et l'évaluation biologique seront discutées.

Pour contourner les problèmes de sélectivité inhérents aux protéines kinases, nous avons choisi d'appliquer le concept de la photopharmacologie.

Cette stratégie permet de contrôler spatialement et temporellement la distribution de la drogue uniquement dans la zone à traiter par l'utilisation de la lumière, et donc d'éviter les effets secondaires. L'approche utilisant les groupements photo-labiles (GPL) consiste à masquer une fonction chimique importante pour l'activité thérapeutique, ce qui rend la molécule temporairement inactive. L'irradiation du composé induit le clivage du groupement et ainsi la restauration de l'activité inhibitrice.

Nous avons introduit différents groupements photo-labiles (GPL) sur l'azote N3 de nos inhibiteurs. Le choix du groupement, la synthèse, l'étude du photo-clivage et l'évaluation biologique des composés seront présentés dans le deuxième chapitre.

Enfin, nous avons développé une méthodologie de sulfénylation directe d'imidazopyridines utilisant le DABCO.(SO₂)₂, un précurseur de dioxyde de soufre comme source de soufre.

Title : Light-triggered inhibitors of the TAM family – Direct sulfenylation of imidazopyridines

Keywords : Protein kinases – Medicinal chemistry – Sulfenylation – Heterocyclic chemistry

Abstract : The TAM family consists in 3 tyrosine kinases : Tyro3, Axl and Mer. These proteins are involved in many cellular processes and pathways. The TAM family has been identified as a new promising target for cancer therapy, autoimmune diseases and viral infections. However, only a few inhibitors have been developed for this family.

The first chapter of this manuscript is dedicated to the conception, synthesis and biological evaluation of new inhibitors for the TAM family.

To bypass the main drawback of protein kinase inhibitors, selectivity, we chose to apply the concept of photopharmacology.

This strategy enable spatial and temporal control of the drug delivery upon irradiation. By blocking a key position of the inhibitor with a photoremovable group, we can inactivate the molecule, and restore the activity upon irradiation.

We introduced different photoremovable protecting groups on our inhibitors. The choice of the groups, the synthesis, the photo-cleavage and the biological evaluation will be discussed in chapter 2.

Finally, we also developed a methodology for direct sulfenylation of imidazopyridines using DABCO.(SO₂)₂ as sulfur source.