

UNIVERSITÉ D'ORLÉANS

ÉCOLE DOCTORALE Santé, Sciences biologiques et chimie du Vivant
Institut de Chimie Organique et Analytique

THÈSE présentée par :

Jérémy MAGAND

soutenue le : **28 février 2023**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université d'Orléans**

Discipline/ Spécialité : CHIMIE/ CHIMIE ORGANIQUE

Synthèse de dinucléotides cycliques et d'hétérocycles visant la protéine STING et étude sur la réponse immunitaire innée

THÈSE dirigée par :

Mr. A. AGROFOGLIO Luigi
Mr. ROY Vincent

Professeur, Université d'Orléans
Maître de conférence, HDR, Université d'Orléans

RAPPORTEURS :

Mr. LEBRETON Jacques
Mme. LUBIN-GERMAIN Nadège

Professeur, Université de Nantes
Professeure, Université de Cergy-Pontoise

JURY :

Mr. A. AGROFOGLIO Luigi
Mme. BROGGI Julie
Mr. LEBRETON Jacques
Mme. LUBIN-GERMAIN Nadège
Mme. QUESNIAUX Valérie
Mr. ROY Vincent

Professeur, Université d'Orléans
Maître de conférences, Université d'Aix-Marseille
Professeur, Université de Nantes
Professeure, Université de Cergy-Pontoise
D.R. CNRS, Université d'Orléans, Président du jury
Maître de conférences, HDR, Université d'Orléans

REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué à l'Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA UMR CNRS 7311) de l'Université d'Orléans sous la direction du Pr. Luigi A. Agrofoglio et du Dr. HDR Vincent Roy, avec la participation du Dr. Patrick Favetta. Ce projet est financé par le Fond Européen de Développement Régional (FEDER) et la région Centre Val de Loire (programme EX10233 EUROFERI).

Je tiens tout d'abord à remercier le Pr. Luigi Agrofoglio pour son accueil dans son laboratoire et de la confiance dont il a fait part à mon égard. Je vous remercie pour l'autonomie que vous m'avez octroyée sur le sujet, ainsi que votre encadrement et disponibilité au long de cette thèse, notamment sur les derniers mois que l'on sait être les plus difficiles. Merci à vous pour votre soutien dans la recherche de mes affectations futures.

Je tiens également à remercier le Dr. Vincent Roy de la confiance qu'il m'a témoignée, son investissement tout au long de ce projet, ainsi que ses conseils avisés.

Mes remerciements vont au Pr. Nadège Lubin-Germain et au Pr. Jacques Lebreton pour m'avoir fait l'honneur de juger ce travail de thèse, et de l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail.

Je remercie le Dr. Julie Broggi et le Dr. Valérie Quesniaux pour avoir accepté d'examiner mon travail, et de siéger dans ce jury de thèse.

J'exprime d'ailleurs ma reconnaissance au Dr. Valérie Quesniaux et à Stéphanie Rose pour leur contribution sur la partie biologique de ce projet de thèse. Je les remercie de leur disponibilité et leur sympathie au travers des nombreux échanges que nous avons pu avoir sur ces trois années.

Merci au Dr. Rodrigo Gaboraba-Brito pour son travail sur le STING aviaire.

J'adresse mes remerciements au Pr. Evzen Boura et au Dr. Dominika Chalupska pour les mesures d'affinité sur la fameuse protéine STING.

Je remercie grandement le Dr. Dawid Warszycki pour le travail de modélisation de qualité qu'il a effectué, mais également pour sa réactivité, sa bienveillance et ses enseignements.

Je voudrais tout particulièrement remercier Hervé Meudal pour l'aide précieuse qu'il m'a apporté lors de ce projet et sa gentillesse ; cela a été un véritable plaisir d'avoir pu échanger sur nos spécialités respectives.

Je tiens à faire une mention spéciale à notre fournisseur officiel de café, viennoiseries, chocolats et sucreries en tout genre : ce n'est pas le Saint Nicolas, même si son titre de saint, il peut le mériter pour son empathie, son sens de l'humour, sa serviabilité, ainsi que son grand professionnalisme et ses conseils scientifiques pertinents (sans oublier son « sarcasme » légendaire) : un énorme merci à Patrick Favetta !

Je voudrais remercier tout le personnel administratif et technique de l'ICOA qui nous aide quotidiennement dans le déroulé de notre mission de chimiste. Je pense en particulier à Sophie Nicourt et Christophe Dubois pour le côté administratif, ainsi qu'Alain-Michel Croze, Pascal Mazabraud, Véronique Bardin-Ferreira et Stéphane Rétif, pour leur grande sympathie et leur disponibilité lorsque les avaries surviennent.

Je remercie également l'ensemble des personnes de la plateforme analytique, en particulier le Dr. Cyril Colas pour ses conseils techniques et passionnantes conversations.

Je remercie le Dr. Cyril Nicolas pour ses nombreux conseils et discussions, ainsi que d'avoir continué à me « suivre », certes de loin, tout au long de ma thèse.

Je remercie toutes les personnes du labo 6 avec qui j'ai commencé ma thèse de m'avoir mis le pied à l'étrier, pris le temps de m'écouter et soutenu : Nicolas (merci aussi pour tous tes conseils), Vincent, Ji-Seong et Abuduaini. Je remercie également Mazarine, Agnieska et ma « grande sœur » Clémentine de m'avoir réservé un superbe accueil, ainsi que de m'avoir inclus dans leur grande famille du labo 10 ! Merci aussi à Pierre pour sa bonne humeur, son écoute, sa pâtisserie et tous les bons moments que nous avons partagés ensemble au labo 9 et à l'extérieur ! Merci à tous mes autres collègues du labo 6 de m'avoir aidé dans le rangement du laboratoire.

Merci à Kévin pour les bons moments passés sur ces trois ans, ainsi qu'à Simon pour nos pauses café du matin, les sorties running, nos midis natation, les débats politiques, et pour l'ensemble de ce que nous avons partagé !

Je remercie également Rémi et Julien de m'avoir accueilli au labo 7 sur la fin de ma thèse. Merci pour nos divers échanges, l'entraide ainsi que nos nombreuses crises de fou rire.

Je remercie toutes les formidables personnes de l'aile Sud, avec qui j'ai beaucoup partagé et passé des moments inoubliables au laboratoire, et surtout à l'extérieur : merci à « la femme de ma vie » Damla, ma cavalière rockeuse au grand cœur et à l'oreille très attentive ; « la princesse du désert » Liliane, pour son extrême gentillesse et son écoute ; « Herr Choupinou » Thibault, pour la personne extra que tu es ; « le meilleur de tous les kikis » Kilian pour sa générosité ; le jeune de la bande, Mathieu, et notre charmante écoresponsable Audrey La Cabec, pour leur sympathie et dynamisme ; BK, ou « bichette », pour tous les supers bons moments partagés et pour tes corrections ; mon sacré tchatcheur Pierre-Yves ; Mister Universe Jossip, merci pour ton coaching et la bonne énergie que tu communique ; Mélanie pour ta gentillesse et ta bienveillance ; Flore, Julie, Paul et Ludvine pour votre positivité et sympathie. Un grand merci également à Quentin, Jérémy, Sirine et Laurine pour leur jovialité et leur sens de l'humour toujours affûté.

Je remercie également toutes les personnes que j'ai pu côtoyer à l'ICOA, avec qui j'ai pu échanger lors d'un café, en salle de RMN ou dans les couloirs. Merci aussi à mon François, avec qui j'ai passé de fabuleux moments, « valet tournant, tu prends ! ».

Je tiens à remercier énormément Floriane pour la relecture et les corrections de ce manuscrit. Merci aussi à toi car tu trouves à chaque fois les mots pour me remotiver et me dépasser. Je garde en souvenir nos discussions chimiques, les instants cafés, le skateboard, nos différentes sorties, ... Qui devraient reprendre de plus belle, vu que je te rejoins au Canada !

Je voudrais exprimer ma gratitude à mes deux préférés, sans qui la rédaction de ce manuscrit n'aurait pas avancé aussi vite. Je les remercie de leur soutien sans faille, leur générosité, ainsi que d'avoir pu partager le pire et surtout le meilleur : merci à toi Ugo et à toi Marine (<3 UwU <3) ! Je vous dois un fier cookie !

Merci encore à mes acolytes Rémi, Ugo, Jossip et BK de m'avoir accompagné pour soulever de la fonte durant cette thèse afin de garder un corps « saint » : un grand merci pour ces moments d'hilarité qui m'ont permis de décompresser !

Je remercie tous mes amis du « Studio » : Nico, Matt, Poule, Bébey, Marline et Emilie, qui ont toujours été à mon écoute et qui m'ont encouragé tout au long de cette thèse. Cette seconde famille est une source inépuisable de bonne énergie !

Merci à toi Romain d'avoir partagé ces trois années à mes côtés. Je te remercie de la patience et compréhension dont tu as fait preuve, ainsi que du soutien que tu m'as apporté. Je te souhaite tout le meilleur pour la suite puisque c'est à toi maintenant de décrocher ton doctorat !

À mes parents, à qui j'avais dit en sortant du lycée : « je veux faire de la recherche, et trouver des médicaments », voilà que je commence à concrétiser ce souhait : un immense merci de m'avoir soutenu de manière indéfectible tout au long de mes études, ainsi que d'avoir su me reconforter lorsque cela était nécessaire durant ces trois dernières années. À mon petit frère, à qui je dédie un grand merci pour le soutien et la force qu'il m'a donnés sur ces 3 années (et aussi d'avoir relu et corrigé mon manuscrit). Un énorme merci à ma petite sœur pour la tendresse dont elle me fait part constamment, ainsi que de l'aide qu'elle m'a apportée ! Je suis fier de vous.

À mon grand-père ...

SIGLES ET ABREVIATIONS

A

A : Adénine
A.A. : Acide Aminé
Ac. : Acide
ADME : Absorption, distribution, métabolisme et excrétion
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADN CpG : fragment d'acide désoxyribonucléique uniquement constitué de C et G
ADNdb : Acide désoxyribonucléique double brin
ADNsb : Acide désoxyribonucléique simple brin
AMP : Adénine monophosphate
APTS : Acide paratoluènesulfonique
aq. : Aqueux, ou *aqueous*
Arg : Arginine
ARN : Acide ribonucléique
ARNdb : Acide ribonucléique double brin
ARNsb : Acide ribonucléique simple brin
ATP : Adénosine triphosphate

B

Boc : *tert*-Butoxycarbonyl
Boc₂O : Dicarbonate de di-*tert*-butyle
tBuNH₂ : *tert*-Butylamine
BSA : *N,O*-bis(triméthylsilyl)acétamide
BzCl : Chlorure de benzoyle

C

C : Cytosine
CBr₄ : Tétrabromure de carbone
CDN : Dinucléotide Cyclique
CD-NTase : *cGAS/DncV-like nucleotidyltransferase*
CLR : Récepteur de Lectines de type C
CM : Métathèse croisée
CMP : Cytidine Monophosphate
COVID-19 : Maladie à coronavirus 2019
CPG : *Controlled pore glass*
CTP : Cytidine triphosphate
CuAAc : *Copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition*
CXCL-10 : Ligand de chimiokine à motif C-X-C 10 ou IP-10

D

DAMP : *Host-damage-associated molecular Patterns*
DBU : 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène
DCA : Acide dichloroacétique
DCE : 1,2-Dichloroéthane
DDTT : 3-((diméthylaminométhylidène)-amino)-3*H*-1,2,4-dithiazole-5-thione
DENV : Virus de la dengue
DIAD : Diisopropyl azodicarboxylate
DIPEA : Diisopropyl éthylamine
DMAP : 4-Diméthylaminopyridine
DMF : Diméthylformamide
DMOCP : 5,5-diméthyl-2-oxo-2-chloro-1,3,2-dioxaphosphinane
DMTr : 4,4'-Diméthoxytrityle
DOS : *Diversity oriented synthesis*
DPPA : Azoture de diphenylphosphoryle
DPPB : 1,4-Bis(diphenylphosphino)butane
DSF : Fluorimétrie à balayage différentiel

E

EBOV : Virus Ebola
EC₅₀ : Concentration efficace médiane
ENPP1 : Ectonucléotidase pyrophosphate/phosphodiesterase 1
ERIS : Protéine STING

F

FAO : Organisation des nations pour l'alimentation et l'agriculture

G

G : Guanine
cGAMP : Guanosine monophosphate-adénosine monophosphate cyclique
cGAS : Cyclique GMP-AMP synthase
GMP : Guanosine monophosphate
GTP : Guanosine triphosphate

H

HBV : Hépatite B virus
HCV : Hépatite B virus
HMBC : *Heteronuclear multiple bond correlation*
H1N1 : Virus de la grippe A (origine aviaire)
H5N1 : Virus de la grippe A (origine aviaire, porcine)
HRMS : Spectrométrie de masse haute résolution
HSV 1 et 2 : Virus de type I et type II de l'herpès simplex
HPV : Papillomavirus humain

I

I : Hypoxanthine
IC₅₀ : Concentration inhibitrice médiane
IFN-I : Interféron de type I
IFN-β : interféron bêta
I₂ : Diode
IKK : *I kappa B Kinase*
IL : Interleukine
IMP : Inosine monophosphate
IP-10 : *Interferon gamma-induced protein 10 (CXCL-10)*
IRF-3 : Facteur de régulation des interférons
ISG15 : Gène 15 stimulé par l'interféron
ITC : Titration Calorimétrique Isotherme
IT : Voie intra-tumorale
IV : Voie intraveineuse

K

K_D : Coefficient d'affinité

L

LNA : *Locked nucleic acid*
LPS : Lipopolysaccharide

M

MAVS : Protéine de signalisation antivirale mitochondriale
MDA5 : Enzyme hélicase d'ARNdb du récepteur de type RIG-I
MITA : Protéine STING
MPYS : Protéine STING
MS : Spectrométrie de masse
MSNT : 1-Mésitylènesulfonyl-3-nitro-1,2,4-triazole
MST : *Microscale Thermophoresis*

N

NF-κB : *Nuclear Factor-kappa B*
NLR : Récepteurs de type NOD
NK : Cellules natural killer
NOD : *Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 1*
NOESY : *Nuclear Overhauser effect spectroscopy*
NPC1 : Niemann Pick C1
NSCLC : Cancer « non à petite cellules »
NTP : Nucléotide triphosphate

O

OIE : Organisation mondiale de la santé animale
OMS : Organisation mondiale de la santé

P

PADS : Bis-(phénylacétyl)-disulfide
PAMP : *Pathogen-associated molecular patterns*
PBO : *syn*-Pyridine-2-aldoxime
PDB : Base de données de protéines
PDE : Phosphodiesterase
pH : Potentiel Hydrogène
PMBC : Cellules mononucléaires périphériques sanguines
Poly I:C : Acide polyinosinique-polycytidylique
PPh₃ : Triphénylphosphine
PRR : *Pattern recognition receptor*
Pyr. : Pyridine

R

RCM : *Ring Closing Metathesis*
RE : Réticulum Endoplasmique
Rf : Rapport frontal
RLR : Récepteur de type *RIG-I*
RIG-I : *Retinoic acid-Inducible gene I*
RMN : Résonance magnétique nucléaire
ROM : Ouverture de cycle par métathèse
ROMP : Métathèse polymérisante
qRT-PCR : technique qui permet de faire une PCR (réaction en chaîne par polymérase) quantitative à partir d'un échantillon d'ARN.

S

sat. : saturée, ou *saturated*

SAR : Relation structure-activité

SARS-CoV-2 : Coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère

SATE : S-pivaloyl-2-thioéthyle

Ser : Sérine

SIDA : Syndrome de l'immunodéficience acquise

STING : *Stimulator of interferon*

cSTING : *Chicken stimulator of interferon genes*

hSTING : *Human stimulator of interferon genes*

mSTING : *Mouse stimulator of interferon genes*

T

T : Thymine

TBAB : Bromure de *tert*-butylammonium

TBAC : Chlorure de *tert*-butylammonium

TBAF : Fluorure de *tert*-butylammonium

TBAI : Iodure de *tert*-butylammonium

TBDMS : *tert*-Butyldiméthylsilane

TBDMSCI : Chlorure de *tert*-butyldiméthylsilane

TBDPS : *tert*-Butyldiphénylsilane

TBK1 : *TANK binding kinase*

TBHP : Hydroperoxyde de *tert*-butyle

TEST : Bis-(triéthoxysilylpropyl)tétrasilane

Tf : Triflate

TFA : Acide trifluoroacétique

THF : Tétrahydrofurane

THP-1 : lignée cellulaire monocyttaire humaine

TIPDS : Triisopropyldisiloxane

TLR : Récepteur de type *Toll*

TMEM173 : protéine STING

TMG : Tétraméthylguanidinium

TNF : Facteur de Nécrose Tumorale

TPSCI : 2,4,6-Triisopropylbenzènesulfonyl

Tyr : Tyrosine

U

U : Uracile

UMP : Uridine monophosphate

UTP : Uridine triphosphate

V

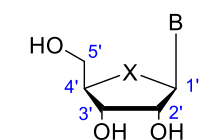
VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

Y

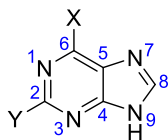
YFV : Virus de la fièvre jaune

CONVENTIONS et NOMENCLATURE

Les conventions et règles internationales utilisées pour la nomenclature et la numérotation des nucléosides, sont résumées dans le schéma suivant :

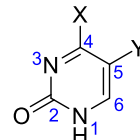


B= base nucléique
X= O, CH₂



Bases puriques naturelles:

Adénine (X = NH₂, Y = H)
Guanine (X = OH, Y = NH₂)
Hypoxanthine (X = OH, Y = H)

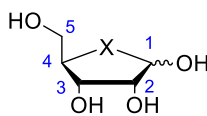


Bases pyrimidiques naturelles:

Cytosine (X = NH₂, Y = H)
Thymine (X = OH, Y = CH₃)
Uracile (X = OH, Y = H)

Un substituant est dit en orientation β s'il se trouve en cis du groupement 4'-hydroxyméthyle, par rapport au plan moyen du sucre ou du cyclopentane. Il est dit en α s'il se trouve en trans de cette fonction.

Par ailleurs, lorsqu'un substrat osidique ne porte pas de nucléobase, la nomenclature et numérotation « classique » des sucres s'appliquent à lui :

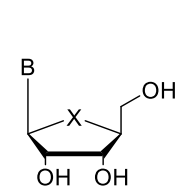


X= O, NH, CH₂

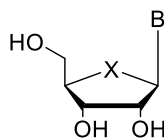
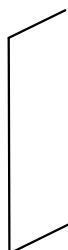
Dans les structures des analogues nucléosidiques, les bases puriques (adénine, guanine, hypoxanthine), ou pyrimidiques (cytosine, thymine, uracile), peuvent être abrégées respectivement par A, G, I, C, U, T, tandis que l'abréviation B ou Base est utilisée pour représenter une base hétérocyclique.

Les bases hétérocycliques sont « classiquement » liées à la partie osidique *via* une liaison *N*-glycosidique, impliquant l'azote N-9 des bases puriques, ou N-1 des bases pyrimidiques.

Enfin, les nucléosides peuvent exister sous deux formes énantiomères, les D-nucléosides, dits de « configuration naturelle », et les L-nucléosides, appelés nucléosides non naturels.



D-nucléosides



L-nucléosides

B= base nucléique
X= O, CH₂

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS.....	3
SIGLES ET ABREVIATIONS.....	6
CONVENTIONS et NOMENCLATURE.....	7
SOMMAIRE	8
INTRODUCTION GÉNÉRALE	11
Chapitre I] Virus et immunité innée (relation hôte pathogène)	13
Introduction	14
I) La voie de signalisation cGAS-STING.....	20
I.1) Mode d'action et biologie des protéines cGAS et STING.....	22
I.2) Structure de la protéine STING	25
I.3) Implication de STING dans le développement de potentielles thérapies innovantes.....	27
II) Les agonistes de STING	30
II.1) Les dinucléotides cycliques, ligands agonistes naturels de STING.....	30
II.2) Le 2',3'-cGAMP : l'analogue dinucléotide cyclique endogène humain.....	31
II.3) Stabilité et décomposition enzymatique du cGAMP	34
III) Les analogues synthétiques du cGAMP	35
III.1) Analogues aux liens phosphates et thiophosphates diesters.....	35
III.2) Analogues de CDNs dépourvus de lien phosphate diester	50
IV) Agonistes de STING de nature hétérocyclique.....	52
IV.1) Les agonistes de type flavonoïde.....	52
IV.2) Les agonistes de type amidobenzimidazole	55
IV.3) Agonistes issus de l'acide benzo[b]thiophène 2-carboxylique.....	56
IV.4) Autres agonistes de nature hétérocyclique.....	58
V) Les agonistes indirects de STING	60
VI) Les antagonistes de STING.....	62

Chapitre II] Objectifs de thèse et plan de travail	65
Chapitre III] Synthèse de nouveaux analogues de dinucléotides cycliques	69
Introduction	70
I) Synthèse de CDN à partir de précurseurs osidiques.....	75
I.1) Rétrosynthèse envisagée	75
I.2) Outils chimiques utilisés	78
I.3) Résultats et discussion	86
II) Synthèse de CDNs à partir d'un précurseur nucléosidique	99
II.1) Rétrosynthèse et stratégie de synthèse envisagées.....	102
II.2) Résultats et discussion	106
III) Evaluation biologique	120
III.1) Tests cellulaires <i>in vitro</i>	120
IV) Conclusion et perspectives	125
Partie expérimentale	127
Chapitre IV] Synthèses de composés hétérocycliques dérivés du benzimidazole et de l'oxazolo[5,4-d]pyrimidine	151
Introduction	152
I) Composés portant un squelette 1 <i>H</i> -benzimidazole	156
I.1) Criblage <i>in vitro</i> d'une chimiothèque de composés dérivés du noyau benzimidazole.....	156
I.2) Stratégie de synthèse.....	158
I.3) Résultats et discussion	160
II) Composés portant un squelette d'oxazolo[5,4- <i>d</i>]pyrimidine.....	173
II.1) Stratégie de synthèse.....	173
II.2) Résultats et discussion	174
III) Modélisation et criblage <i>in silico</i>	188
III.1) Élaboration du modèle.....	188
IV) Molécules criblées et résultats.....	190

V) Evaluation biologique	195
V.1) Tests cellulaires <i>in vitro</i>	195
VI) Conclusion et perspectives	210
Partie expérimentale	213
 CONCLUSION GÉNÉRALE	 261
Articles et communications de l'auteur	266

INTRODUCTION GÉNÉRALE

L'humanité, depuis qu'elle s'est sédentarisée, doit constamment faire face à l'émergence de nouveaux agents infectieux qui apparaissent par l'essor des populations et de leurs échanges, ainsi que par la domestication de nouvelles espèces animales pour son utilisation (élevage ou travail). Cette relation de proximité entre l'homme et l'animal offre aux virus la capacité de contaminer les populations humaines (on parle de zoonose) et de circuler à travers celles-ci, provoquant ainsi des épidémies ou des pandémies. Sur ces 10 dernières années, 60% des de ces virus dit émergents ont pour origine l'animal. À titre d'exemple, nous pouvons citer les diverses gripes (H5N1 en 2005, H1N1 en 2009, H7N9 en 2013) mais aussi Ebola en 2014 et le dernier en date, le SARS-CoV-2 responsable de la pandémie actuelle de COVID-19 ayant débutée en 2019. Il existe deux approches complémentaires afin de lutter contre les virus : l'approche vaccinale et l'approche thérapeutique. Cette dernière, comme nous l'ont démontré les dernières pandémies, est beaucoup plus longue à mettre en place comparée à l'approche vaccinale (à noter que l'approche vaccinale n'est pas adaptée à tous les virus). Il en résulte en revanche une action très ciblée d'une substance contre un agent infectieux précis (grande spécificité de la thérapie). Néanmoins, avec l'apparition de nouvelles souches virales, notre arsenal thérapeutique devient inefficace dans la lutte contre ces pathogènes émergents.

C'est dans ce contexte que l'OMS tire la sonnette d'alarme dans son rapport de 2018 et propose de répondre aux enjeux posés par l'essor des maladies infectieuses à l'échelle internationale. L'une d'elle : la stratégie « One Health » ou « une seule santé », tient à prendre en compte l'interface homme-animal-environnement afin d'agir directement sur la génération des zoonoses en s'appuyant sur de nouvelles approches. Au lieu de combattre directement les agents infectieux par des substances antivirales, ce seraient directement les défenses immunitaires de l'hôte qui seraient renforcées et stimulées par de nouveaux principes actifs. Ainsi ce sera l'organisme de l'hôte lui-même qui combattrait les maladies, les empêchant de davantage se développer. On parle alors d'immunothérapies, ou de thérapies dirigées vers l'hôte (ou « Host-Directed Therapies »), qui reposent sur des voies de signalisation cellulaires de l'immunité innée bien spécifiques. L'une d'elles, récemment identifiée comme une cible attractive pour le développement d'immunothérapies contre le cancer ou les virus, est la protéine STING.

Le premier chapitre de cette thèse est dédié à cette protéine STING et le rôle qu'elle pourrait jouer dans la lutte contre les zoonoses. Seront abordés les différents agonistes naturels de cette protéine, *i.e.* les dinucléotides cycliques (ou CDN), et leurs différents procédés de synthèse, ainsi que les nombreux dérivés synthétiques de nature nucléosidique ou hétérocyclique, modulateurs de cette cible thérapeutique.

Le deuxième chapitre sera consacré aux objectifs et plan de travail de ce projet de thèse.

Le troisième chapitre expliquera la synthèse de nouveaux analogues de type dinucléotide cyclique aux liens non-ionisables ou « neutres ». Les stratégies de rétrosynthèse et les synthèses seront détaillées ainsi que les réactions clés de ces synthèses multi-étapes.

Le troisième chapitre portera sur l'élaboration de chimiothèques de composés hétérocycliques dérivés du 1*H*-benzimidazole et de l'oxazolo[5,4-*d*]pyrimidine. Les stratégies de rétrosynthèse et les synthèses seront détaillées ainsi que les travaux méthodologiques mis en place sur ces séries.

Les activités biologiques de tous les composés synthétisés ont été évaluées en collaboration avec l'équipe du Docteur Valérie Quesniaux (INEM, CNRS UMR 7355, Univ. Orléans) sur des macrophages exprimant mSTING ou hSTING. Ces données seront présentées tout au long de ce manuscrit. Il en ira de même pour les analyses de fluorimétrie différentielle à balayage (DSF), réalisées par l'équipe du Professeur Evzen Boura (IOCB, Czech Academy of Sciences, Prague), et les résultats de la modélisation *in silico* portant sur la protéine STING, réalisée en collaboration avec le Docteur Dawid Warszycki (Dpt Med. Chem., Maj Institute Pharmacology, Polish Academy of Sciences, Cracovie). Enfin, une partie de nos composés synthétisés a été évaluée par le Docteur Rodrigo Guabiraba-Briteau (ISP, UMR1282, INRAe, Univ. Tours), dans l'intention d'inscrire notre projet dans une approche de type « One Health ».

Chapitre I] Virus et immunité innée (relation hôte pathogène)

Introduction

Les maladies infectieuses et parasitaires sont responsables d'un tiers des décès actuellement dans le monde.¹ Sur les dix dernières années, on remarque que 60% de ces maladies infectieuses sont des zoonoses,² c'est-à-dire une maladie infectieuse d'origine bactérienne, virale, parasitaire ou, de manière non-conventionnelle (*i.e.* les prions), qui est passée de l'animal à l'homme. Ces agents pathogènes se propagent à l'homme par contact direct ou par les aliments, l'eau ou l'environnement. Ils peuvent aussi être transmis par un intermédiaire vecteur (par exemple les moustiques ou les tiques, vecteurs respectifs du virus West Nile ou de la maladie de Lyme). Ces pathogènes représentent un problème majeur de santé publique dans le monde en raison de notre relation étroite avec les animaux d'élevages, domestiques ou sauvages. Outre l'aspect sanitaire, les zoonoses ont également un impact direct sur la production et le commerce de ressources d'origine animale destinées à l'alimentation ou à d'autres usages.³

À l'heure actuelle, plus de 200 types de zoonoses sont recensés (Tableau 1) et ils comprennent :⁴

- Des maladies ayant commencé comme zoonose, qui restent uniquement présentes chez les populations humaines à la suite de nombreuses mutations comme le VIH, certains virus de la grippe ou de coronavirus responsables de rhumes saisonniers (Schéma 1). Lorsque la transmission de ce pathogène reste « d'homme à homme », il perd son caractère zoonotique.
- Des maladies nouvelles qui provoquent des flambées récurrentes comme la maladie liée au virus Ebola, la salmonellose, ou qui provoquent des pandémies mondiales, comme le nouveau coronavirus à l'origine du COVID-19.
- Des agents infectieux reconnus comme cancérogènes, notamment deux parasites : *Opisthorchis viverrini* et *Clonorchis sinensis*, transmis à l'humain par ingestion de poissons parasités crus ou mal cuits. Le VIH-1 est également classé comme cancérogène puisque l'immunodéficience qu'il provoque conduit à un risque accru de développer un cancer.

Les symptômes développés sont très variés : certains touchent le système digestif (salmonellose, campylobactériose, etc.), d'autres le système respiratoire (grippe aviaire et porcine, coronavirus, tuberculose bovine, etc.), le foie (virus de l'hépatite E), le système immunitaire (VIH), ou bien encore, le système nerveux (la rage, West Nile, Creutzfeldt-Jakob). Par ailleurs, certains pathogènes zoonotiques ne provoquent pas de symptômes chez les animaux porteurs, comme les *Campylobacter*. Chez les populations humaines, les individus présentant une plus grande sensibilité envers ces agents zoonotiques sont les personnes au système immunitaire fragile telles que les immunodéprimés, les personnes sous traitement immunosuppresseur, les jeunes enfants, les personnes âgées, ou encore les femmes enceintes.

¹ WHO (2020). *Les 10 principales causes de mortalité*. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> (consulté le 20/03/2021).

² (a) Ministère de l'agriculture et de la souveraineté alimentaire. *Les zoonoses, ces maladies transmissibles entre l'homme et l'animal*. <https://agriculture.gouv.fr/les-zoonoses-ces-maladies-transmissibles-entre-lhomme-et-lanimal> (consulté le 10/09/2022) ; (b) Drouet, E.; Grillot, R.; Morand, S. (2020) *Encyclopédie de l'environnement*. <https://www.encyclopedie-environnement.org/sante/pandemies-virales-ere-moderne/> (consulté le 10/09/2022).

³ Anses.fr. *Les zoonoses, quand les animaux contaminent l'Homme*. <https://www.anses.fr/fr/content/les-zoonoses-quand-les-animaux-contaminent-l%E2%80%99homme> (20/03/2021).

⁴ WHO (2020). *Zoonoses*. Organisation Mondiale de la Santé. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/zoonoses#:~:text=Une%20zoonose%20est%20une%20maladie%20infectieuse%20qui%20est%20pass%C3%A9e%20de,%20eau%20ou%20l'environnement.> (consulté le 20/03/2021).

Zoonoses parasitaires	Toxoplasmose ; Leishmaniose ; Trichinellose ; Téniose (cysticercose) Bothriocéphalose ; Trypanosomiase ; Hydatidose ; Fascioliose
Zoonoses bactériennes	Charbon ; Borréliose (maladie de Lyme) ; Affection streptococcique Tuberculose ; Campylobactériose Salmonellose ; Tétanos ; Entérototoxicose staphylococcique ; Leptospirose ; Listériose ; Brucellose ; Typhus murin ; Botulisme ; Yersiniose ; Fièvre Q ; Peste bubonique
Zoonoses virales	Vaccine ; Grippe ; Ebola ; VIH-1 ; Rage ; Fièvre jaune ; Fièvre de la vallée du Rift ; Fièvre de Lassa ; Fièvre hémorragique de Crimée et du Congo
Zoonose à prions	Encéphalopathie spongiforme bovine (ESB)

Tableau 1. Zoonoses importantes en fonction de leur agent causal^{2,5}

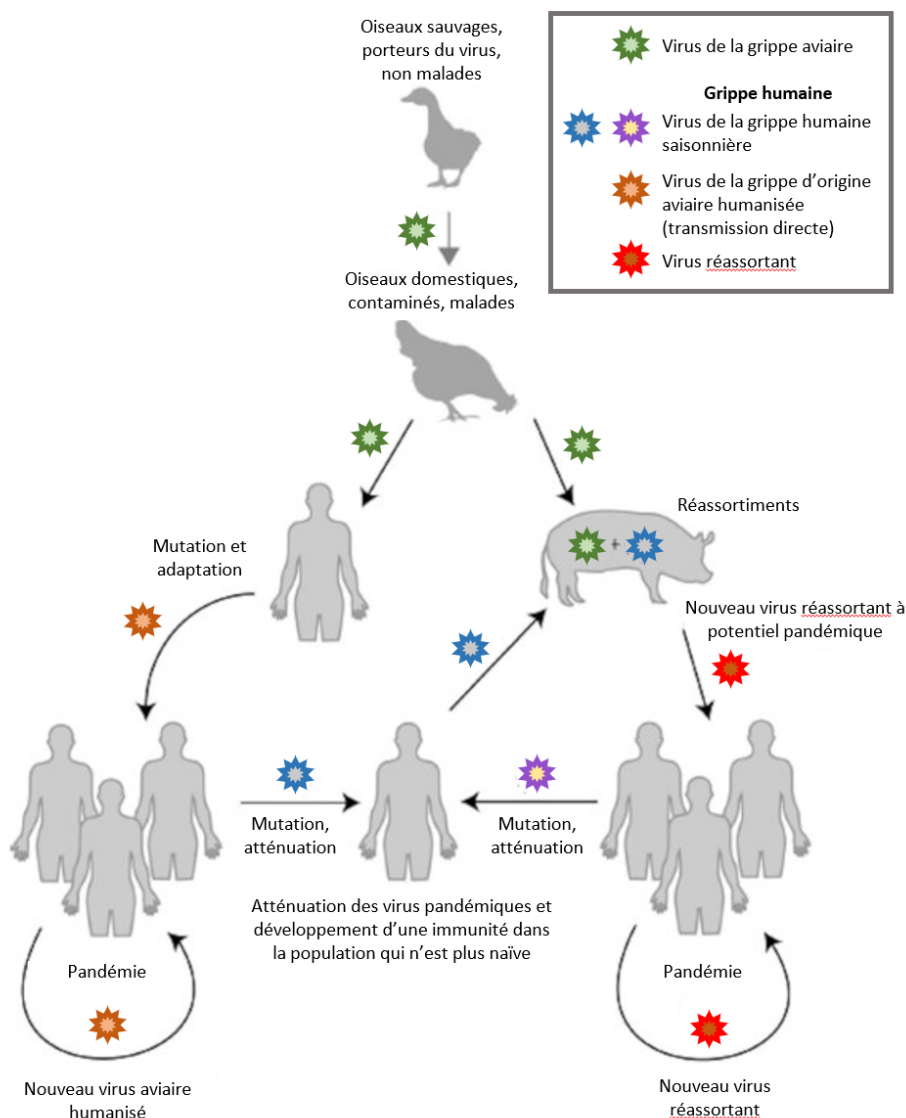


Schéma 1. Mécanisme de la zoonose dans le cas de la grippe aviaire/humaine^{2b}

⁵ Dormont, D. Les agents transmissibles non conventionnels, ou prions : risques de santé publique, *adsp* 2002, 38, 66-68.

Face à ce risque sanitaire de plus en plus important, une stratégie dite « One Health » (ou une seule santé) a été mise en place depuis la fin des années 1990⁶ sur l'initiative de l'Organisation mondiale de la santé (OMS), l'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et l'Organisation mondiale de la santé animale (OIE). Cette stratégie se concentre sur l'interface tripartite homme-animal-environnement (Figure 1) afin de prévenir l'apparition de nouveaux pathogènes et des phénomènes de résistance au sein des différentes espèces. Des programmes de recherche sur les zoonoses sont financés afin de développer des outils de diagnostic permettant la détection et la surveillance de ces pathogènes. Ces travaux font avancer la connaissance que nous avons de ces derniers, leurs interactions avec l'hôte (facteurs de virulence, mécanismes d'action, etc.), ainsi que les facteurs de franchissement de la barrière inter-espèces. La compréhension des zoonoses permettra de proposer à terme des moyens de prévention, de régulation ou de lutte contre celles-ci, par exemple des vaccins ou des traitements médicamenteux.

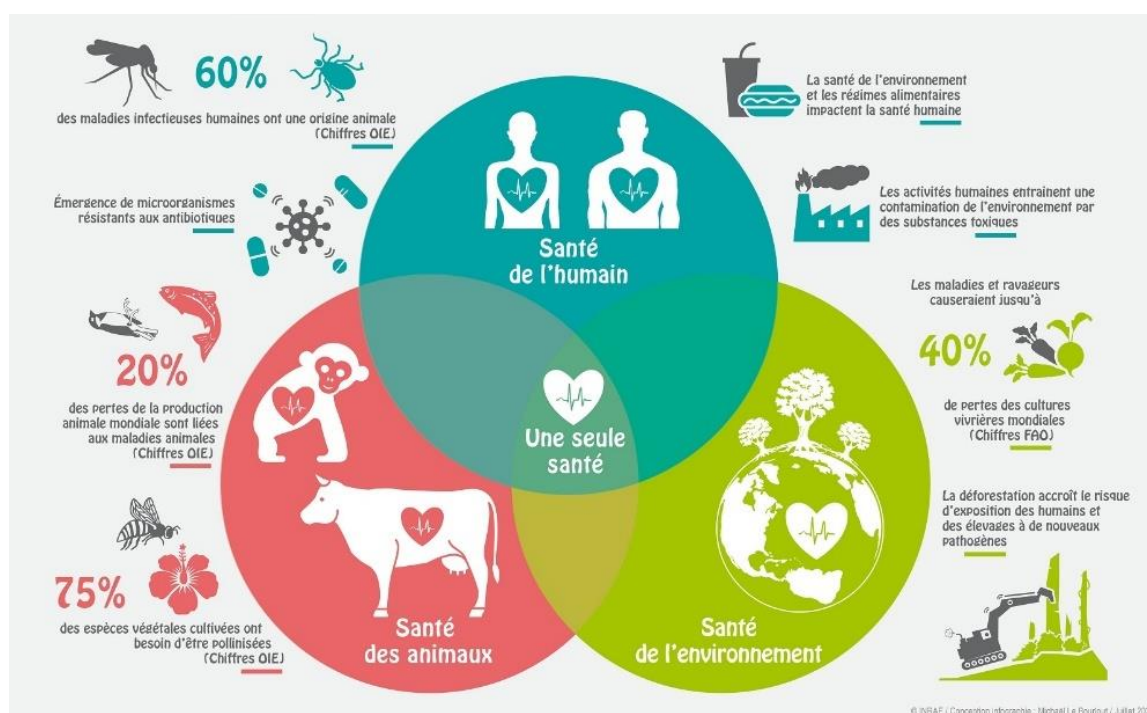


Figure 1. Illustration de la stratégie « une seule santé »⁷

Bien que l'organisme possède plusieurs barrières de défense contre ces agents pathogènes (peau, muqueuses ou tissus conjonctifs) et mécanismes de rejets (expectoration par la toux, miction), il n'est pas rare que ces derniers parviennent à pénétrer l'organisme, soit par piqûres, soit par lésion de la peau, ou tout simplement parce qu'ils ont acquis la capacité à franchir ces barrières. Par exemple, un certain nombre de virus ou bactéries entrent par les muqueuses parce qu'ils adhèrent à des récepteurs présents sur les cellules épithéliales qui en constituent la surface (cas des virus grippaux). Lorsqu'un agent pathogène d'origine exogène arrive à pénétrer dans l'organisme, ce dernier peut, soit être éliminé, soit provoquer une infection plus ou moins importante. Ainsi, l'exposition n'est pas forcément synonyme de contamination, ni de maladie chez l'hôte. Néanmoins, des contacts répétés avec les populations humaines (par exemple) vont stimuler l'adaptation de l'agent à ce « nouvel » environnement. Cette adaptation relève de mécanismes qui font

⁶ Zinsstag, J.; Schelling, E.; Waltner-Toews, D.; A. Whittaker, M.; Tanner, M. *One Health, une seule santé, Théorie et pratique des approches intégrées de la santé*; éditions Quae, 2020.

⁷ INRAE, *One Health, une seule santé*. <https://www.inrae.fr/alimentation-sante-globale/one-health-seule-sante> (consulté le 10/09/2022).

évoluer le génome de l'agent pathogène, comme les mutations, les recombinaisons et les réassortiments qui sont observés en particulier chez les virus grippaux. L'apparition de symptômes chez un hôte dépend à la fois du pouvoir pathogène de l'agent infectieux et de son environnement biotique.

Lors de l'invasion de l'organisme par un corps exogène, une réponse inflammatoire est induite afin de stimuler la seconde défense de l'individu : le système immunitaire (Schéma 2) ; celui-ci élimine l'agent infectieux ainsi que les cellules infectées ou endommagées, puis répare les dégâts causés. Les globules blancs, comme les macrophages, les phagocytes, les mastocytes, les neutrophiles, les cellules dendritiques, etc., ingèrent et détruisent les agents pathogènes invasifs.⁸ Il s'agit de la réponse immunitaire innée puisque celle-ci est immédiate, non-spécifique à un pathogène et est présente de la naissance jusqu'à la mort de l'organisme sans immunisation préalable.⁹ Cependant, certaines infections arrivent à submerger le système immunitaire et provoquent une diminution des globules blancs. Lorsqu'une infection se développe, d'autres mécanismes destinés à attaquer spécifiquement l'agent infectieux sont mis en place : il s'agit de la réponse immunitaire acquise ou adaptative. Cette réponse adapte son attaque à un antigène spécifique qui a déjà été rencontré par les défenses innées de l'hôte. Elle se caractérise par sa capacité d'apprentissage, d'adaptation et de mémorisation. Son activation se traduit par le recrutement de lymphocytes T killer et par la sécrétion d'anticorps spécifiques.^{10,11} Si un germe présente des similitudes antigéniques vis-à-vis d'un autre déjà rencontré par l'immunité adaptative, cette dernière peut également le reconnaître et le combattre : on parle alors d'immunité croisée.

⁸ Marshall, J. S.; Warrington, R.; Watson, W.; Kim, H. L. An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy Asthma Clin. Immunol.* **2018**, 14, 49-63.

⁹ Chatenoud, L. Immunité innée et immunité adaptative : un flirt bénéfique ? *Med. Sci.* **2002**, 18, 1183-1184.

¹⁰ *Les zoonoses : ces maladies qui nous lient aux animaux*; Enjeux sciences; Éditions Quae: Versailles, 2021.

¹¹ Mueller, S. N.; Rouse, B. T. Immune responses to viruses. *Clin. Immunol.* **2008**, 421-431.

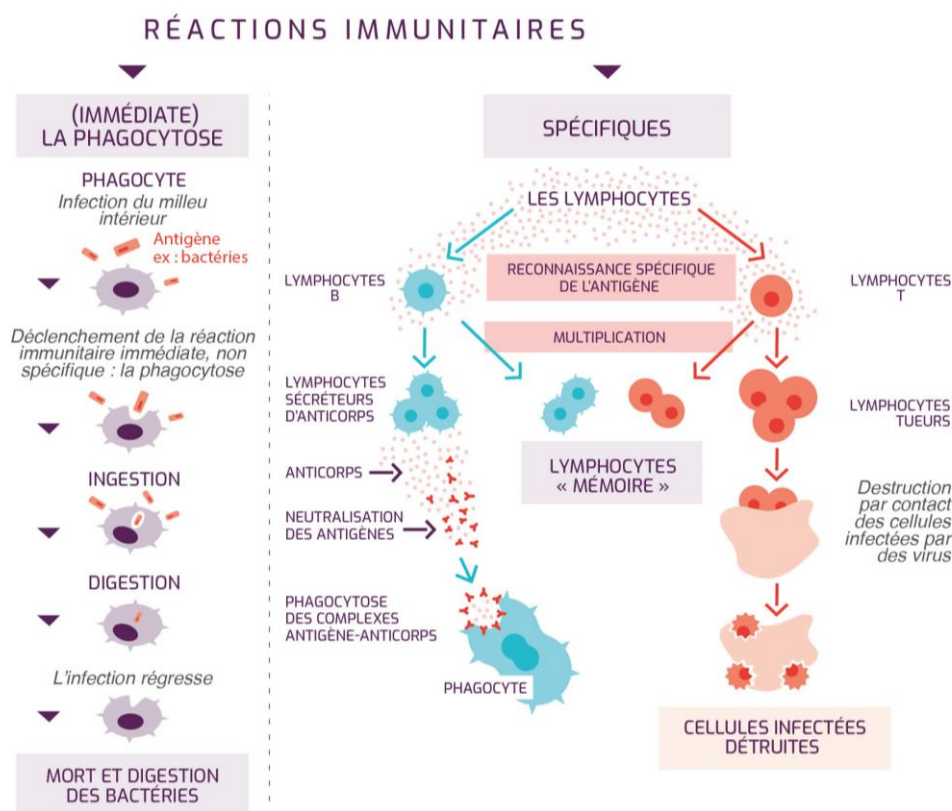


Schéma 2. Fonctionnement du système immunitaire

Dans le cadre de nouvelles zoonoses, les agents pathogènes arrivant à infecter l'homme ne sont pas encore connus de son système immunitaire. Ainsi, seule l'immunité innée va être mise à contribution pour combattre le pathogène. Malheureusement, cette dernière peut être vite submergée avant que l'immunité adaptative ne soit active. Ceci explique notamment pourquoi les virus émergents peuvent provoquer des symptômes sévères et causer de nombreux décès lorsqu'ils atteignent les populations humaines naïves. De plus, ces derniers peuvent se propager d'autant plus rapidement que l'immunité collective, basée sur l'immunité adaptative de chaque individu, n'est pas encore en place. Ce phénomène est à l'origine des pandémies.

Malheureusement, la prophylaxie sanitaire seule ne suffit pas à prévenir la transmission des zoonoses aux humains. Le recours à des stratégies de prophylaxie médicale impliquant l'usage de vaccins ou de médicaments est alors envisagé. Ayant déjà montré son efficacité dans les populations humaines, la vaccination peut être utilisée pour établir une immunité collective au sein de populations animales, sources de contaminations humaines, et ainsi couper la chaîne de transmission jusqu'à l'homme. Les exemples les plus connus sont les cas de la variole et de la rage. Le recours au traitement des populations animales infectées par des agents pathogènes zoonotiques est également un moyen d'agir sur les sources de contamination des populations humaines.

Afin de mieux anticiper les nouvelles crises d'origine zoonotique, la recherche de traitements innovants semble nécessaire. Ces thérapies peuvent alors s'appuyer sur la compréhension des interactions homme-animal à l'origine de ces zoonoses pour être développées. En effet, sur ces dernières années, de nouvelles cibles thérapeutiques ont été identifiées pour traiter des maladies telles que le cancer ou les maladies infectieuses. Ces cibles font partie entre autres des voies de signalisation cellulaire responsables de

l'immunité innée. La voie de signalisation cGAS-STING fait partie de ce groupe. Cette dernière a été clairement identifiée en 2008 par Barber et al.¹² et a suscité depuis beaucoup d'intérêts, notamment par les grands groupes pharmaceutiques pour le développement d'immunothérapies contre le cancer.

Or, il a été montré que cette voie de signalisation est centrale dans la reconnaissance de divers agents pathogènes (virus, bactéries) ainsi que dans l'induction de la réponse immunitaire innée. Cette cascade de signalisation permet, une fois activée lors d'une infection virale, l'installation d'un état antiviral. De plus, les protéines cGAS et STING sont exprimées par l'ensemble des vertébrés de la planète. Ceci rend cette cible d'autant plus attractive pour le développement de traitements devant prévenir ou lutter contre les zoonoses.

Outre une application oncologique, l'immunothérapie est une approche avec un fort intérêt pour combattre les agents infectieux, et notamment les virus. En effet, la plupart des virus provoquent une réponse immunitaire de la part de l'hôte une fois que l'organisme a détecté leur présence. Néanmoins, ces derniers ont évolué de manière à pouvoir contourner, mais aussi éteindre les défenses immunitaires de l'hôte, afin de pouvoir l'infecter et se répliquer en détournant la machinerie cellulaire.¹³ Cette extinction passe par la sécrétion de protéines virales qui inhibent spécifiquement des cascades de signalisation inter- et intracellulaires, impliquées à la fois dans la reconnaissance de ces pathogènes, et l'enclenchement de la réponse immunitaire innée.¹⁴ Bien que complexes, ces voies de signalisation sont actuellement bien identifiées et font l'objet d'études visant leur activation/réactivation par l'utilisation de ligands synthétiques. On parle alors de ligands agonistes puisque ces molécules se complexent aux protéines impliquées dans la voie de signalisation pour restaurer ou provoquer une réponse positive de leur part. Dans le cas présent, il s'agit de stimuler les voies de signalisation responsables de la réponse immunitaire innée pour lutter contre les agents infectieux. Cette stratégie apparaît alors comme un moyen de combattre plusieurs familles virales à la fois par un seul médicament.

¹² Ishikawa, H.; Barber, G. N. STING Is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature* **2008**, 455, 674-678.

¹³ (a) Chatterjee, S.; Basler, C. F.; Amarasinghe, G. K.; Leung, D. W. Molecular mechanisms of innate immune inhibition by non-segmented negative-Sense RNA viruses. *J. Mol. Biol.* **2016**, 428, 3467-3482; (b) Kikkert, M. Innate immune evasion by human respiratory RNA viruses. *J. Innate Immun.* **2020**, 12, 4-20.

¹⁴ (a) Mack, C.; Sickmann, A.; Lembo, D.; Brune, W. Inhibition of proinflammatory and innate immune signaling pathways by a cytomegalovirus RIP1-interacting protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, 105, 3094-3099; (b) Meyer, B.; Ly, H. Inhibition of innate immune responses is key to pathogenesis by arenaviruses. *J. Virol.* **2016**, 90, 3810-3818; (c) Lee, H.-R.; Choi, U. Y.; Hwang, S.-W.; Kim, S.; Jung, J. U. Viral inhibition of PRR-mediated innate immune response: learning from KSHV evasion strategies. *Mol. Cells* **2016**, 39, 777-782.

I) La voie de signalisation cGAS-STING

Afin de défendre l'hôte contre l'invasion d'un agent pathogène, le système immunitaire inné doit d'abord reconnaître les corps exogènes d'un corps endogène (Figure 2). Cette reconnaissance s'effectue grâce aux récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires, ou PRR (« pattern recognition receptor ») présents sur l'ensemble des leucocytes ou cellules blanches. Ces PRRs se lient spécifiquement à des motifs moléculaires des agents pathogènes, ou PAMP (« pathogen-associated molecular patterns »).^{15,16,17}

Ces motifs, ou PAMPs, sont par exemple : le lipopolysaccharide, ou LPS (chez les bactéries Gram négative), la flagelline (chez les bactéries flagellées), les mananes (chez les champignons, levures), les ARNdb (chez les virus à ARN), les résidus mannose (chez les bactéries), etc. Cette ligation active les PRRs qui déclenchent alors des cascades de signalisation intracellulaire, menant à la transcription et l'expression de cytokines pro-inflammatoires, d'interférons de type I (IFN-I) et d'autres protéines antivirales (constituants principaux de la réponse immunitaire innée), pour procéder à l'élimination des agents pathogènes et des cellules infectées.

En plus des PAMPs, certains PRRs détectent les motifs moléculaires associés aux dégâts, ou DAMPs (« host-damage-associated molecular patterns ») issus de lésions cellulaires de nature non infectieuse. Ces molécules sont notamment des protéines nucléaires ou cytosoliques dénaturées, libérées lors du stress ou de la mort cellulaire. L'ADN est aussi un DAMP lorsque celui-ci est libéré à la suite d'une nécrose cellulaire (tumeur, stress, vieillissement ou mort cellulaire).

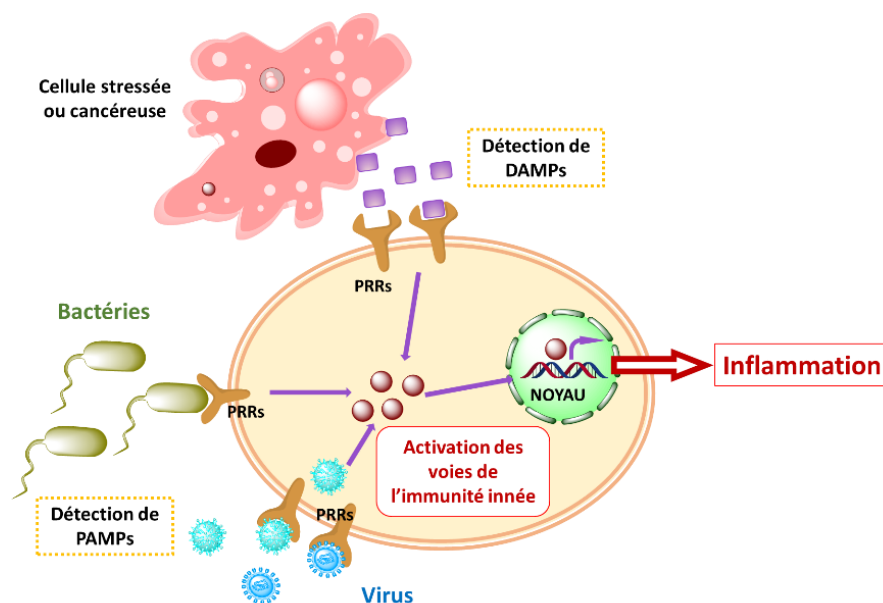


Figure 2. Mécanismes de reconnaissance de l'immunité innée

¹⁵ Takeuchi, O.; Akira, S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* **2010**, 140, 805-820.

¹⁶ (a) Akira, S.; Uematsu, S.; Takeuchi, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **2006**, 124, 783-801; (b) Pichlmair, A.; Reis e Sousa, C. Innate Recognition of viruses. *Immunity* **2007**, 27, 370-383; (c) Brubaker, S.-W.; Bonham, K.-S.; Zanoni, I.; Kagan, J.-C. Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective. *Annu. Rev. Immunol.* **2015**, 33, 257-290.

¹⁷ (a) Fukata, M.; Abreu, M.-T. Pathogen recognition receptors, cancer and inflammation in the gut. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2009**, 9, 680-687; (b) Taguchi, T.; Mukai, K. Innate immunity signalling and membrane trafficking. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2019**, 59, 1-7.

Les principaux PRRs de la reconnaissance antivirale sont (Figure 3):

- **Les récepteurs de type Toll (TLR)**,^{16,18,19} présents sur la membrane plasmique et les endosomes. Ils reconnaissent les virus et les bactéries. Le TLR3 est spécifique de l'ARNdb viral, les TLR7 et 8 sont spécifiques de l'ARNsb viral, le TLR9 de l'ADN CpG viral, bactérien et protozoaire. Tous induisent la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-6, etc.) et d'IFN-I.
- **Les récepteurs de type RIG-I (RLR)**,^{16,19} présents dans le cytosole, reconnaissent particulièrement les virus à ARN. Le RIG-I reconnaît l'ARNdb riche en adénine et uridine, alors que MDA5 reconnaît des chaînes d'ARNdb de longueur supérieure à 300 bp comme le Poly I:C. Ils induisent l'activité de MAVS qui est située sur les mitochondries et qui provoque, par la suite, la sécrétion d'IFN-I.
- **Les récepteurs NLRs** (« NOD-like receptors »),^{16,19} présents dans le cytosol, sont des senseurs assez généraux d'ARN et d'ADN (détection des DAMPs). Les deux principaux récepteurs, NOD-1 et NOD-2 vont tous deux induire la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Cependant, NOD-2 induit l'activité de la NF- κ B (« nuclear factor-kappa B ») qui aboutit à la sécrétion de l'IFN-I, alors que NOD-1 va plutôt induire la sécrétion d'interleukine IL-1 β par la caspase 1.
- **Les lectines de type C (CLR)**,^{16,19} présentes sur la membrane plasmique, reconnaissent des motifs de type sucre, des protéines, des lipides et des molécules inorganiques. Elles peuvent faire la différence entre un ligand endogène ou exogène. Elles induisent la sécrétion de l'ensemble des cytokines pro-inflammatoires, ainsi que les cytokines impliquées dans le recrutement de l'immunité adaptative comme l'IL-17.
- **La GMP-AMP cyclique synthase** (ou cGAS)^{16,19} accompagnée du **stimulateur des gènes de l'interféron** (STING), sont deux protéines intracellulaires. Le cGAS est un senseur d'ADNdb issus de microorganismes ou de cellules endommagées (DAMPs). Il induit une sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et d'IFN-I en passant par l'activation de STING.

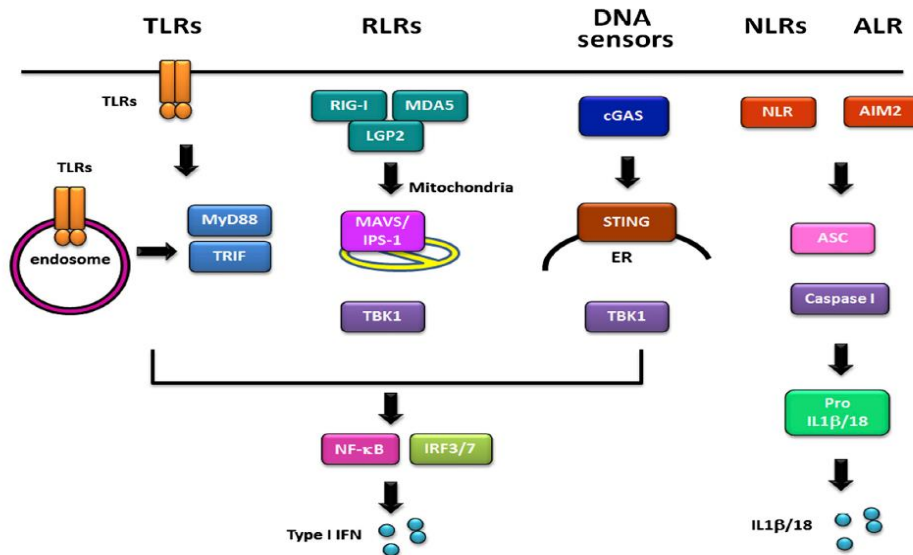


Figure 3. Différents PRRs impliqués dans l'immunité innée²⁰

¹⁸ (a) Fitzgerald, K. A.; Kagan, J. C. Toll-like receptors and the control of immunity. *Cell* **2020**, 180, 1044-1066; (b) Negishi, H.; Osawa, T.; Ogami, K.; Ouyang, X.; Sakaguchi, S.; Koshiba, R.; Yanai, H.; Seko, Y.; Shitara, H.; Bishop, K.; Yonekawa, H.; Tamura, T.; Kaisho, T.; Taya, C.; Taniguchi, T.; Honda, K. A critical link between Toll-like receptor 3 and type II interferon signaling pathways in antiviral innate immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, 105, 20446-20451.

¹⁹ Wang, L.; Ning, S.; "Toll-free" pathways for production of type I interferons. *AIMS Allergy and Immunol.* **2017**, 1, 143-163.

²⁰ Ma, Z.; Damania, B. The cGAS-STING defense pathway and its counteraction by viruses. *Cell Host Microbe* **2016**, 19, 150-158.

Ces PRRs reconnaissent pour la plupart les acides nucléiques (ADN ou ARN) viraux et bactériens et activent la cascade de signalisation menant à la transcription de NF- κ B et de facteurs de régulation de l'interféron (IRFs). Ces cascades induisent finalement la production d'IFN-I qui entraîne la résistance antivirale des cellules.¹⁶⁻¹⁹ Les IFN-I sont également impliqués dans de multiples fonctions de stimulation immunitaire comme la maturation, la migration et l'activation de plusieurs cellules immunitaires, telles que les cellules dendritiques, les lymphocytes T et les cellules NK.

Parmi toutes ces voies de signalisation cellulaire, la voie cGAS-STING s'avère être l'une des voies les plus polyvalentes de reconnaissance de PAMPs et DAMPs. Par ailleurs, d'autres voies de signalisation convergent vers cette voie au niveau de la protéine STING, comme la voie RIG-I. Contrairement aux TLRs, cGAS-STING est exprimée dans l'ensemble des cellules de l'immunité innée et est présente chez tous les vertébrés. Depuis sa découverte en 2008, elle est une cible thérapeutique d'intérêt.^{21,22,23,24}

I.1) Mode d'action et biologie des protéines cGAS et STING

Comme expliqué précédemment, la protéine cGAS est impliquée dans la reconnaissance de brins d'ADN bicaténaires (ou double brin) dans le cytosol, ADNdb d'origine virale, bactérienne ou endogène (Figure 4).²⁵ Après ligation de cet ADNdb, cGAS va catalyser la production d'un second messager à partir d'ATP et GTP, qui est le cyclique guanosine monophosphate (GMP)-adénosine monophosphate (AMP), qu'on appelle plus communément le cGAMP. Ce dernier va se lier directement et spécifiquement à la protéine adaptatrice STING, présente sur la membrane du réticulum endoplasmique (RE), et va provoquer la migration de cette protéine dimérique vers l'appareil de Golgi. Lors de cette translocation, une partie de STING est également détournée pour la formation d'autophagosomes qui facilitent la clairance d'ADN viral au sein du cytosol.²⁶ STING va s'oligomériser sur l'appareil de Golgi et recruter la protéine TBK1 (« TANK binding kinase 1 »).²⁷ Par ce recrutement, la protéine TBK1 est phosphorylée et va à son tour phosphoryler le résidu Ser366 de STING, étape permettant le recrutement et l'activation (par phosphorylation) de l'IRF3. La kinase IKK (« I kappa B kinase ») est également recrutée et phosphorylée par STING pour la transcription du NF- κ B. Enfin, l'IRF3 phosphorylé se dimérise et, accompagné du NF- κ B, se transloque dans le noyau pour induire la sécrétion

²¹ Barber, G. N. STING: infection, inflammation and cancer. *Nat. Rev. Immunol.* **2015**, 15, 760-770.

²² Feng, X.; Liu, D.; Li, Z.; Bian, J. Bioactive modulators targeting STING adaptor in cGAS-STING pathway. *Drug Discov. Today* **2020**, 25, 230-237.

²³ (a) Liu, Y.; Lu, X.; Qin, N.; Qiao, Y.; Xing, S.; Liu, W.; Feng, F.; Liu, Z.; Sun, H. STING, a promising target for small molecular immune modulator: a review. *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, 211, 113113-113144; (b) Zhang, H.; You, Q.-D.; Xu, X.-L. Targeting stimulator of interferon genes (STING): a medicinal chemistry perspective. *J. Med. Chem.* **2020**, 63, 3785-3816; (c) Le Naour, J.; Zitvogel, L.; Galluzzi, L.; Vacchelli, E.; Kroemer, G. Trial watch: STING agonists in cancer therapy. *Oncolimmunology* **2020**, 9, 1-12.

²⁴ (a) Cui, X.; Zhang, R.; Cen, S.; Zhou, J. STING modulators: predictive significance in drug discovery. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, 182, 111591-111606; (b) Guerini, D. STING agonists/antagonists: their potential as therapeutics and future developments. *Cells* **2022**, 11, 1159-1169.

²⁵ (a) Sun L., Wu J., Du F., Chen X., Chen Z.-J. Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. *Science* **2013**, 339, 786-791; (b) Chen, Q.; Sun, L.; Chen, Z. Regulation and function of the cGAS-STING pathway of cytosolic DNA sensing. *Nat. Immunol.* **2016**, 17, 1142-1149.

²⁶ Li, Z.; Cai, S.; Sun, Y.; Li, L.; Ding, S.; Wang, X. When STING meets viruses: sensing, trafficking and response. *Front. Immunol.* **2020**, 11, 2064-2078.

²⁷ Ergun, S. L.; Fernandez, D.; Weiss, T. M.; Li, L. STING polymer structure reveals mechanisms for activation, hyperactivation, and inhibition. *Cell* **2019**, 178, 290-301.

d'IFN-I et d'autres cytokines, comme le $TNF\alpha$, le CXCL-10 ou l'IL-6.²⁸ Une fois ce processus de stimulation terminé, l'ensemble cGAMP-STING est encapsulé dans un lysosome et envoyé vers d'autres compartiments périnucléaires où il est dégradé.^{17,29}

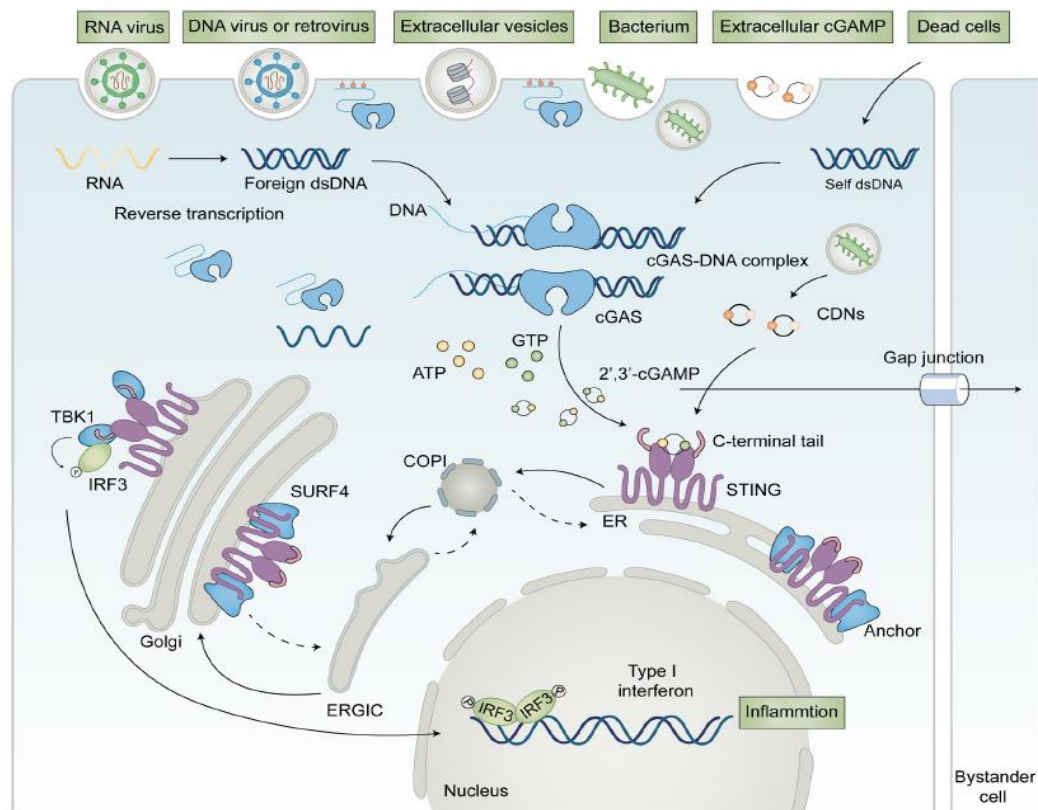


Figure 4. Fonctionnement de la voie de signalisation cGAS-STING³⁴

Bien que la protéine cGAS soit un senseur d'ADN permettant la détection spécifique de virus à ADN (HSV1, KSHV, virus de la vaccine, adénovirus, etc.), la voie cGAS-STING reste une voie de signalisation universelle pour la détection virale et l'activation de l'immunité innée. En effet, STING occupe un rôle central vis-à-vis d'autres voies de signalisation, lui permettant d'être à l'intersection de la détection des virus à ADN, ARN et rétrovirus.³⁰ Les virus à ARN vont déclencher indirectement la réponse immunitaire antivirale par l'axe cGAS-STING, *via* le relargage d'ADNs de la part des mitochondries infectées, ou alternativement, *via* l'activation des récepteurs d'ARN cytosolique, tels le RIG-I et MAVS (signalisation antivirale mitochondriale).³¹ La réplication du virus à ARN est alors supprimée par une activation de la réponse immunitaire, dépendante de la protéine STING, même si cette inhibition ne passe pas par la production d'interférons.³² Concernant les rétrovirus, la génération d'ADN complémentaire rétroviral par la transcription inverse de l'ARN viral permet

²⁸ Ishikawa, H.; Ma, Z.; Barber, G.-N. STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature* **2009**, 461, 788-792.

²⁹ Gonugunta V.-K.; Sakai T.; Pokatayev V.; Yang K.; Wu J.; Dobbs N.; Yan N. Trafficking-mediated STING degradation requires sorting to acidified endolysosomes and can be targeted to enhance anti-tumor response. *Cell Rep.* **2017**, 21, 3234-3242.

³⁰ Schoggins, J. W.; MacDuff, D. A.; Imanaka, N.; Gainey, M. D.; Shrestha, B.; Eitson, J. L.; Mar, K. B.; Richardson, R. B.; Ratushny, A. V.; Litvak, V.; Dabelic, R.; Manicassamy, B.; Aitchison, J. D.; Aderem, A.; Elliott, R. M.; García-Sastre, A.; Racaniello, V.; Snijder, E. J.; Yokoyama, W. M.; Diamond, M. S.; Virgin, H. W.; Rice, C. M. Pan-Viral Specificity of IFN-Induced Genes Reveals New Roles for CGAS in Innate Immunity. *Nature* **2014**, 505, 691-695.

³¹ Horner, S.-M.; Liu, H.-M.; Park, H.-S.; Briley, J.; Gale, M. Jr. Mitochondrial-associated endoplasmic reticulum membranes (MAM) form innate immune synapses and are targeted by hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2011**, 108, 14590-14595.

³² Ni, G.; Ma, Z.; Damania, B. CGAS and STING: At the Intersection of DNA and RNA Virus-Sensing Networks. *PLoS Pathog.* **2018**, 14, 1007148-1007154.

l'activation de cGAS et aboutit ainsi à l'activation de la réponse immunitaire. D'autre part, il a été montré que la protéine cGAS est capable de se lier à des brins hybrides ARN-ADN, provoquant également l'activation de cette cascade de signalisation de l'immunité innée lors d'une infection causée par un rétrovirus (VIH-1, VIH-2).³³

Il est important de mentionner qu'une dérégulation de la voie cGAS-STING est également possible. Celle-ci se traduit en général par une surexpression de la réponse immunitaire innée, provoquant un état inflammatoire continu et incontrôlé. Plusieurs maladies inflammatoires et auto-immunes, comme le lupus, le syndrome d'Aicardi-Goutières et même certains cancers, sont liées à cette surexpression incontrôlée et continue de STING.^{34,35} Ainsi, la voie cGAS-STING présente un aspect ambivalent, puisqu'elle est aussi bien capable d'induire des effets bénéfiques telle la protection contre les pathogènes ou l'immunité tumorale, que des effets néfastes, telles les pathologies inflammatoires. Elle présente donc un double intérêt thérapeutique par son activation ou son inhibition. Toutefois, la modulation de son activité biologique par des substances médicamenteuse est assez délicate.

³³ (a) Gao, D.; Wu, J.; Wu, Y.-T.; Du, F.; Aroh, C.; Yan, N.; Sun, L.; Chen, Z.-J. Cyclic GMP-AMP synthase is an innate immune sensor of HIV and other retroviruses. *Science* **2013**, 341, 903-906; (b) Mankan, A. K.; Schmidt, T.; Chauhan, D.; Goldeck, M.; Höning, K.; Gaidt, M.; Kubarenko, A. V.; Andreeva, L.; Hopfner, K.; Hornung, V. Cytosolic RNA:DNA hybrids activate the cGAS–STING axis. *EMBO J.* **2014**, 33, 2937-2946.

³⁴ (a) Hu, Y.; Chen, B.; Yang, F.; Su, Y.; Yang, D.; Yao, Y.; Wang, S.; Wu, Y.; Tao, L.; Xu, T. Emerging role of the cGAS-STING signaling pathway in autoimmune diseases: biologic function, mechanisms and clinical prospection. *Autoimm. Rev.* **2022**, 21, 103155-103166; (b) Ma, R.; Ortiz Serrano, T.-P.; Davis, J.; Prigge, A.-D.; Ridge, K.-M. The cGAS-STING pathway: the role of self-DNA sensing in inflammatory lung disease. *FASEB J.* **2020**, 34, 13156-13170.

³⁵ Decout, A.; Katz, J. D.; Venkatraman, S.; Ablasser, A. The cGAS–STING Pathway as a therapeutic target in inflammatory diseases. *Nat. Rev. Immunol.* **2021**, 21, 548–569.

I.2) Structure de la protéine STING

La protéine STING est une protéine transmembranaire codée par le gène TMEM173. Elle est également connue sous le nom de protéine transmembranaire 173 (TMEM173) et bien d'autres dénominations (*i.e.* MITA, MPYS, ERIS et TMEM173). Elle est fortement exprimée dans les cellules et tissus de l'immunorégulation tels que la moelle osseuse, le thymus, le foie, la rate et les leucocytes.²³ Au niveau cellulaire, STING se présente sous la forme d'un dimère de deux unités ancrées par leurs parties N-terminales au niveau du réticulum endoplasmique et orientant vers le cytosol leurs parties C-terminales (Figure 5).

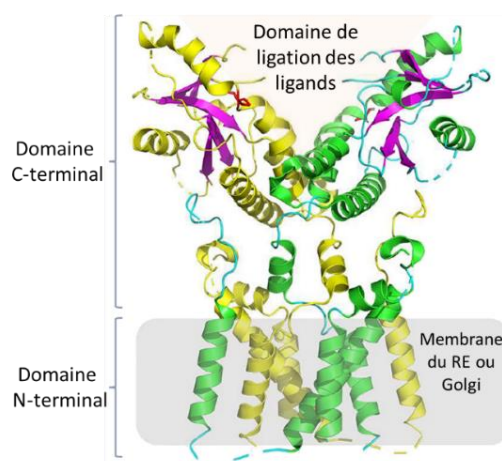


Figure 5. Structure de la protéine STING

D'autres études ont montré que STING est en partie située sur la membrane des mitochondries et également en petite quantité sur la membrane plasmique.²³ La structure *apo*- du STING humain (hSTING) a été analysée entièrement par cryo-microscopie électronique (cryo-EM) par Zhang *et al.* en 2019.³⁶ La protéine humaine est alors composée de 379 acides aminés, alors que celle de la souris est constituée de 378 acides aminés avec une homologie de séquence de 70% par rapport à hSTING.³⁷ La partie transmembranaire s'étend du N-terminal au résidu 156 alors que le domaine C-terminal cytosolique va du résidu 152 au C-terminal. Le large domaine de complexation des ligands (55 Å) est alors dû à cette structure dimérique particulière en forme de « V », symétrique, qui peut s'adapter lors de l'appariement d'une molécule en son sein ; les résidus 157-335 du domaine C-terminal sont impliqués lors de la complexation avec la protéine. Un repliement de la protéine est observé lorsque celle-ci est complexée avec le cGAMP, passant d'une forme ouverte (*apo*-) à une forme fermée (35 Å),³⁸ avant d'être transloquée vers l'appareil de Golgi (Schéma 3).

³⁶ Shang, G.; Zhang, C.; Chen, Z.-J.; Bai, X.-C.; Zhang, X. Cryo-EM structures of STING reveal its mechanism of activation by cyclic GMP-AMP. *Nature* **2019**, 567, 389-393.

³⁷ Gao, P.; Ascano, M.; Zillinger, T.; Wang, W.; Dai, P.; Serganov, A. A.; Gaffney, B. L.; Shuman, S.; Jones, R. A.; Deng, L.; Hartmann, G.; Barchet, W.; Tuschl, T.; Patel, D. J. Structure-function analysis of STING activation by c[G(2',5')PA(3',5')p] and targeting by antiviral DMXAA. *Cell* **2013**, 154, 748-762.

³⁸ Cai, X.; Chiu, Y.-H.; Chen, Z. J. The cGAS-cGAMP-STING pathway of cytosolic DNA sensing and signaling. *Mol. Cell* **2014**, 54, 289-296.

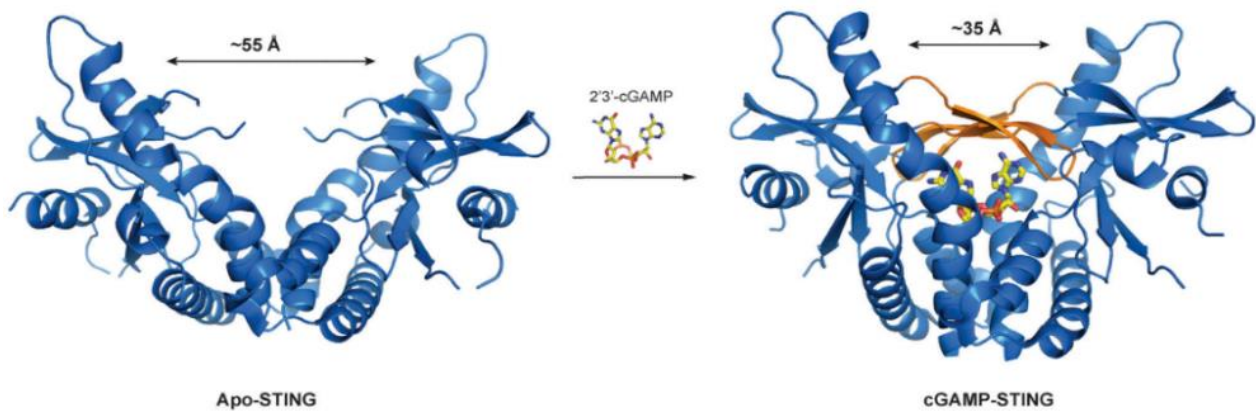


Schéma 3. Repliement de la protéine STING provoqué par la complexation du 2',3'-cGAMP³⁸

Le repliement de la protéine STING semblait nécessaire à son activation, notamment lors de l'étape d'oligomérisation sur l'appareil de Golgi et l'interaction avec la protéine TBK1, jusqu'à la découverte de ligands synthétiques (*i.e.* le diABZY) qui induisent l'activité de STING, bien que celle-ci conserve une conformation ouverte (Figure 6).³⁹ Par ailleurs, il a été démontré que le blocage de la translocation de STING vers l'appareil de Golgi entraîne une inhibition de son activité biologique.

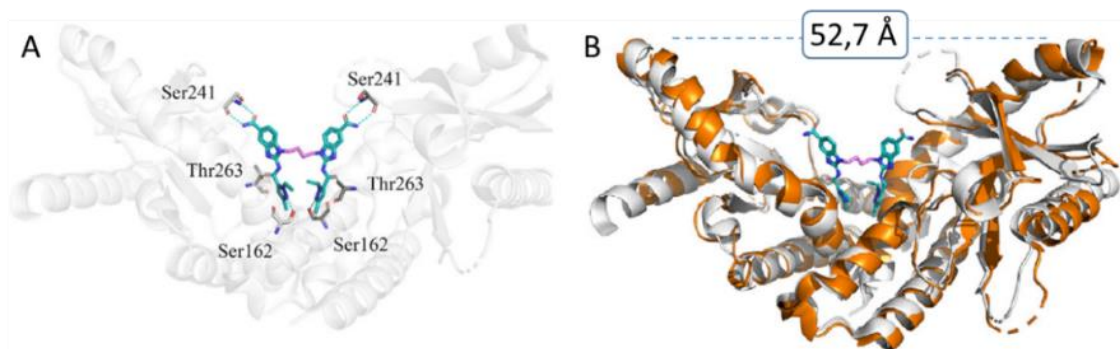


Figure 6. (A) Interactions du complexe **154**-hSTING (PDB : 6DXL) ; (B) Superposition des structures cristallographiques de l'apo-hSTING (PDB : 6NT5 ; en orange) et du complexe **154**-hSTING (en blanc)²³

³⁹ Ramanjulu, J. M.; Pesiridis, G. S.; Yang, J.; Concha, N.; Singhaus, R.; Zhang, S.-Y.; Tran, J.-L.; Moore, P.; Lehmann, S.; Eberl, H. C.; Muelbaier, M.; Schneck, J. L.; Clemens, J.; Adam, M.; Mehlmann, J.; Romano, J.; Morales, A.; Kang, J.; Leister, L.; Graybill, T. L.; Charnley, A. K.; Ye, G.; Nevins, N.; Behnia, K.; Wolf, A. I.; Kasparcova, V.; Nurse, K.; Wang, L.; Puhl, A. C.; Li, Y.; Klein, M.; Hopson, C. B.; Guss, J.; Bantscheff, M.; Bergamini, G.; Reilly, M. A.; Lian, Y.; Duffy, K. J.; Adams, J.; Foley, K. P.; Gough, P. J.; Marquis, R. W.; Smothers, J.; Hoos, A.; Bertin, J. Design of amidobenzimidazole STING receptor agonists with systemic activity. *Nature* **2018**, 564, 439-443.

I.3) Implication de STING dans le développement de potentielles thérapies innovantes

Par son rôle central dans la détection d'ADN viral, bactérien et du soi, qui aboutit à l'activation de la réponse immunitaire innée, la voie cGAS-STING est actuellement une cible thérapeutique très prisée pour le développement de nouvelles thérapies basées sur l'immunité (ou immunothérapies).^{21-24,40}

I.3-1) Application antivirale

Malgré une compréhension de plus en plus précise du rôle de la protéine STING lors des infections virales (mise en place d'un état antiviral), son potentiel est malheureusement sous exploité dans la recherche de nouvelles thérapies antivirales. Or, il est avéré que les virus à ADN (HSV : herpès, HBV : hépatite B, HPV : papillomavirus humain), aussi bien que les virus à ARN (YFV : fièvre jaune, DENV : dengue, HCV : hépatite C), agissent de manière antagoniste sur la protéine STING afin d'éteindre cette voie de signalisation, primordiale pour l'immunité antivirale de l'individu (Figure 7).²⁰

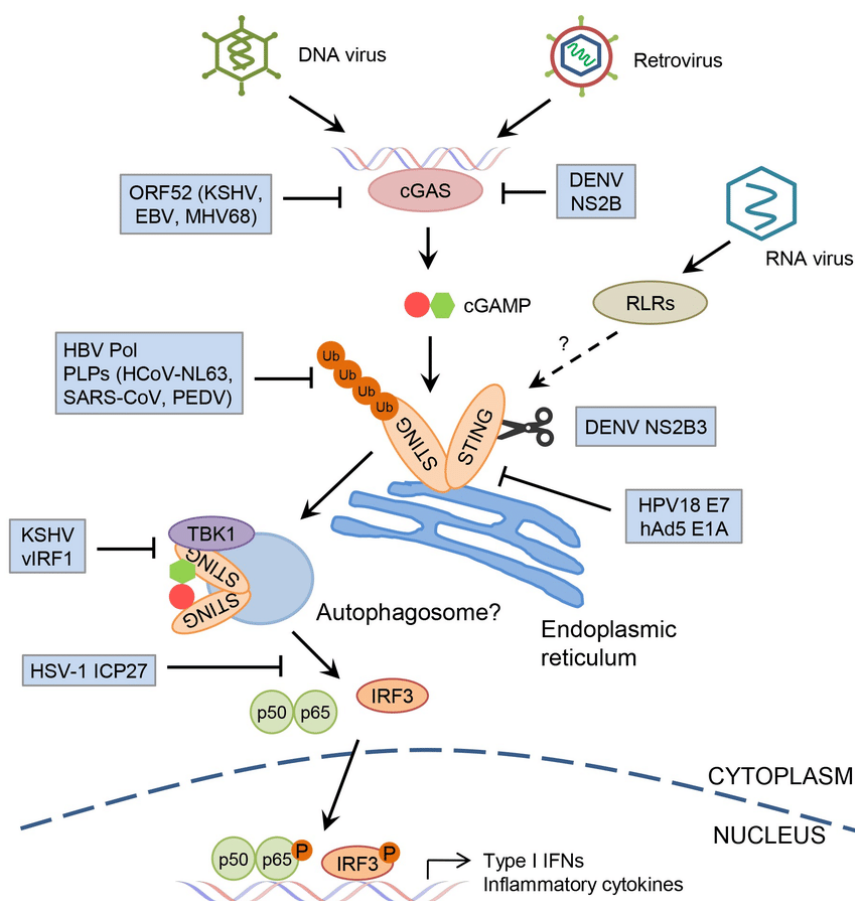


Figure 7. Inhibition de la voie cGAS-STING par différentes protéines virales³²

⁴⁰ Du, H.; Xu, T.; Cui, M. cGAS-STING signaling in cancer immunity and immunotherapy. *Biomed. Pharmacother.* **2021**, 133, 110972-110982.

STING joue donc un rôle capital lors d'infections provoquées par diverses espèces virales. Il est alors permis d'imaginer de nouvelles thérapies antivirales, basées sur la stimulation de STING (ou de la voie cGAS-STING), par des molécules agonistes, pour prévenir ou combattre ces divers pathogènes. Trois études réalisées lors de la pandémie de COVID-19, ont montré que l'administration d'un agoniste synthétique de STING (le diABZI), *in vitro*⁴¹ et *in vivo*,⁴² a permis de limiter l'infection du Sars-CoV-2 chez des cellules épithéliales humaines ou murines, ceci de manière dose-dépendante. Ces résultats sont donc encourageants pour le développement de nouvelles thérapies antivirales s'appuyant sur la protéine STING. De plus, les agonistes de cette protéine peuvent servir d'adjuvant dans la formulation de vaccins.⁴³ En effet, il a été montré que les vaccins contenant une dose de 2',3'-cGAMP ont un caractère immunogène⁴⁴ renforcé lors de leur administration, ce qui induit une meilleure stimulation des lymphocytes T CD4 et CD8 (cellules de l'immunité adaptative), contrairement aux vaccins sans agoniste. Si la stimulation des cellules de l'immunité adaptative est augmentée, la protection de l'individu par la couverture vaccinale est accrue. Il est alors possible d'améliorer considérablement l'outil vaccinal par utilisation de ces molécules dans leur composition.

Enfin, comme le virus d'immunodéficience humaine (VIH) est détecté par la voie cGAS-STING, de nouveaux traitements contre ce pathogène peuvent alors être envisagés : Yan *et al.*⁴⁵ ont développé des nanoparticules intégrant du 2',3'-cGAMP, qui induisent une réponse antirétrovirale sur de longues durées contre le VIH-1 chez des cellules mononucléaires (i.e. cellules T, B, NK)

⁴¹ (a) Zhu, Q.; Zhang, Y.; Wang, L.; Yao, X.; Wu, D.; Cheng, J.; Pan, X.; Liu, H.; Yan, Z.; Gao, L. Inhibition of coronavirus infection by a synthetic STING agonist in primary human airway system. *Antivir. Res.* **2021**, 187, 105015-105025; (b) Liu, W.; Reyes, H. M.; Yang, J. F.; Li, Y.; Stewart, K. M.; Basil, M. C.; Lin, S. M.; Katzen, J.; Morrissey, E. E.; Weiss, S. R.; You, J. Activation of STING signaling pathway effectively blocks human coronavirus infection. *J. Virol.* **2021**, 95, e00490-21.

⁴² Li, M.; Ferretti, M.; Ying, B.; Descamps, H.; Lee, E.; Dittmar, M.; Lee, J. S.; Whig, K.; Kamalia, B.; Dohnalová, L.; Uhr, G.; Zarkoob, H.; Chen, Y.-C.; Ramage, H.; Ferrer, M.; Lynch, K.; Schultz, D. C.; Thaïss, C. A.; Diamond, M. S.; Cherry, S. Pharmacological activation of STING blocks SARS-CoV-2 infection. *Sci. Immunol.* **2021**, 6, 9007-9021.

⁴³ Ritchie, C.; Li, L. cGAMP as an adjuvant in antiviral vaccines and cancer immunotherapy. *Biochem.* **2020**, 59, 1713-1715.

⁴⁴ Chauveau, L.; Bridgeman, A.; Tan, T.-K.; Beveridge, R.; Frost, J.-N.; Rijal, P.; Pedroza-Pacheco, I.; Partridge, T.; Gilbert-Jaramillo, J.; Knight, M.-L.; Liu, X.; Russell, R.-A.; Borrow, P.; Drakesmith, H.; Townsend, A.-R.; Rehwinkel, J. Inclusion of cGAMP within virus-like particle vaccines enhances their immunogenicity. *EMBO Rep.* **2021**, 22, 52447-52468.

⁴⁵ Aroh, C.; Wang, Z.; Dobbs, N.; Luo, M.; Chen, Z.; Gao, J.; Yan, N. Innate immune activation by cGMP-AMP nanoparticles leads to potent and long-acting antiretroviral response against HIV-1. *J. Immunol.* **2017**, 199, 3840-3848.

1.3-2) Autres applications

Les thérapies basées sur les agonistes de STING sont essentiellement orientées dans la lutte contre le cancer.^{46,47} Bien que les résultats des essais cliniques de certaines molécules soient très prometteurs concernant l'effet antitumoral (ou immunité tumorale) induit par ces ligands, ces derniers doivent être administrés en bithérapie et non en monothérapie afin d'être efficace. Toutefois, les faibles paramètres ADME (absorption, distribution, métabolisme et excrétion) mesurés chez l'homme de ces substances, ont stoppé leur avancement lors des essais cliniques de phase II.

STING joue également un rôle important dans la détection et lutte des infections bactériennes.⁴⁸ Cependant, le développement de thérapies antibactériennes utilisant cette protéine est bien plus complexe, puisque les CDNs (ligands naturels de STING) sont impliqués dans la virulence et dans d'autres fonctions vitales bactériennes.

Enfin, la voie cGAS-STING est très vulnérable aux perturbations inhérentes à la régulation, la séquestration et la clairance de l'ADN du soit au niveau cellulaire et de l'organisme.⁴⁹ Ces perturbations entraînent généralement une dérégulation de l'activité de STING qui est à l'origine d'un état inflammatoire anormal. Cela a pour conséquence l'apparition de symptômes (hyper-)aiguës chroniques liés à des pathologies auto-immune ou inflammatoires spécifiques. L'utilisation de molécules dites antagonistes de STING (qui inhibent l'activité biologique de la protéine), représente alors un potentiel thérapeutique très prometteur dans le traitement de telles maladies.³⁴ Encore peu exploré aujourd'hui, ce domaine tend à gagner en intérêt étant donné le nombre de maladies directement liées à sa dérégulation (Figure 8).⁵⁰

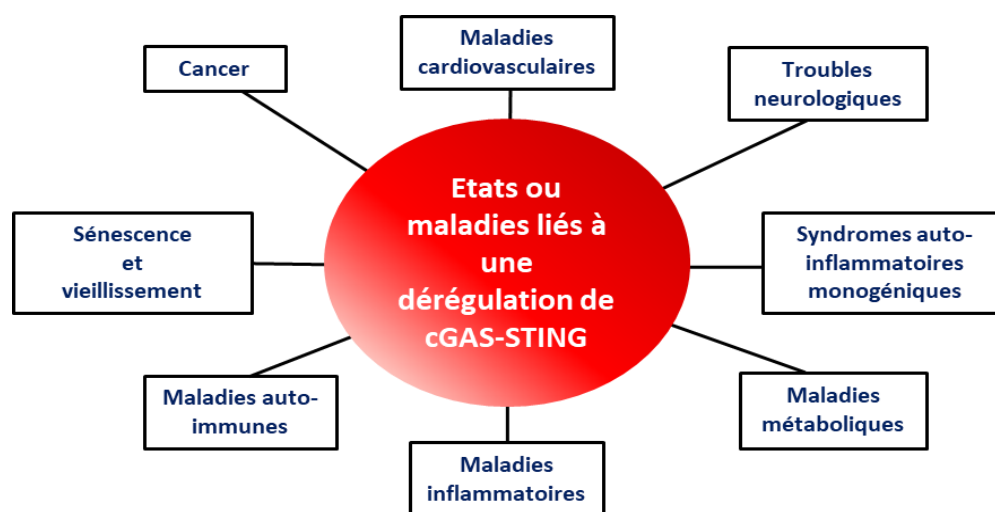


Figure 8.

⁴⁶ Garland, K.; Sheehy, T.; Wilson J.-T. Chemical and biomolecular strategies for STING pathway activation in cancer immunotherapy. *Chem. Rev.* **2022**, 122, 5977-6039

⁴⁷ Kong, X.; Zuo, H.; Huang, H.-D.; Zhang, Q.; Chen, J.; He, C.; Hu, Y. STING as an emerging therapeutic target for drug discovery: perspectives from the global patent landscape. *J. Adv. Res.* **2022**, 22, 118-133.

⁴⁸ Marinho, F.V.; Benmerzoug, S.; Oliveira, S.C.; Ryffel, B.; Quesniaux, V.F.J. The emerging roles of STING in bacterial infections. *Trends Microbiol.* **2017**, 25, 906-918.

⁴⁹ Zhou, R.; Xie, X.; Li, X.; Qin, Z.; Wei, C.; Liu, J.; Luo, Y. The triggers of the cGAS-STING pathway and the connection with inflammatory and autoimmune diseases. *Infect. Genet. Evol.* **2020**, 77, 104094-104104.

⁵⁰ Opoku-Temeng, C.; Zhou, J.; Zheng, Y.; Su, J.; Sintim, H. O. Cyclic dinucleotide (c-Di-GMP, c-Di-AMP, and CGAMP) signalling have come of age to be inhibited by small molecules. *Chem. Commun.* **2016**, 52, 9327-9342.

II) Les agonistes de STING

Ce travail de thèse a porté prioritairement sur la synthèse de ligands ciblant la protéine STING dans le cadre de nouvelles thérapies antivirales, basées sur l'immunité innée. Les molécules synthétisées doivent alors être de nature agoniste. Dans la littérature, deux grandes familles de composés agonistes sont mentionnées : les analogues de type dinucléotide cyclique et les dérivés de type hétérocyclique ou non-nucléotidique. Ces familles sont décrites dans la suite de ce chapitre.

II.1) Les dinucléotides cycliques, ligands agonistes naturels de STING

Les dinucléotides cycliques sont les ligands naturels de la protéine STING. Ils sont constitués de deux nucléosides reliés par deux liens phosphates diesters, formant une structure macrocyclique. Le premier CDN à avoir été découvert, d'origine bactérienne, est le 3',3'-c-diGMP (**1**).⁵¹ D'autres structures analogues ont été identifiées par la suite chez ces micro-organismes : tous les CDNs observés portent des liens 3',3' de type phosphate diester (Figure 9), c'est-à-dire que le premier nucléoside est relié en position C-3' à la position C-5' du second nucléotide, et inversement, par ce type de lien. Ces structures moléculaires sont très caractéristiques des populations bactériennes et archées, où elles assurent des rôles prépondérants dans les processus vitaux comme la régulation de la physiologie bactérienne, la différenciation cellulaire, la communication intercellulaire, etc.⁵² Chez les bactéries, les CDNs sont synthétisées par des enzymes homologues au cGAS : les CD-NTases, qui catalysent la synthèse de CDNs à partir de l'ensemble des substrats nucléotidiques de type purique et pyrimidique (ATP, GTP, UTP et CTP).⁵³ Parmi ces CDNs, le 3',3'-c-diGMP (**1**) et le 3',3'-c-diAMP (**2**) déclenchent une réponse immunitaire (sécrétion d'IFN I) chez des cellules de mammifères.⁵⁴

⁵¹ Ross, P.; Weinhouse, H.; Aloni, Y.; Michaeli, D.; Weinberger-Ohana, P.; Mayer, R.; Braun, S.; de Vroom, E.; van der Marel, G. A.; van Boom, J. H.; Benziman, M. Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature* **1987**, 325, 279-281.

⁵² Krasteva, P. V.; Sondermann, H. Versatile modes of cellular regulation via cyclic dinucleotides. *Nat. Chem. Biol.* **2017**, 13, 350-359.

⁵³ Whiteley, A. T.; Eaglesham, J. B.; de Oliveira Mann, C. C.; Morehouse, B. R.; Lowey, B.; Nieminen, E. A.; Danilchanka, O.; King, D. S.; Lee, A. S. Y.; Mekalanos, J. J.; Kranzusch, P. J. Bacterial cGAS-like enzymes synthesize diverse nucleotide signals. *Nature* **2019**, 567, 194-199.

⁵⁴ (a) Karaolis, D. K.; Means, T. K.; Yang, D.; Takahashi, M.; Yoshimura, T.; Muraille, E.; Philpott, D.; Schroeder, J. T.; Hyodo, M.; Hayakawa, Y.; Talbot, B. G.; Brouillette, E.; Malouin, F. Bacterial c-di-GMP is an immunostimulatory molecule. *J. Immunol.* **2007**, 178, 2171-2181; (b) Woodward, J. J.; Iavarone, A. T.; Portnoy, D. A. c-di-AMP secreted by intracellular *Listeria monocytogenes* activates a host type I interferon response. *Science* **2010**, 328, 1703-1705.

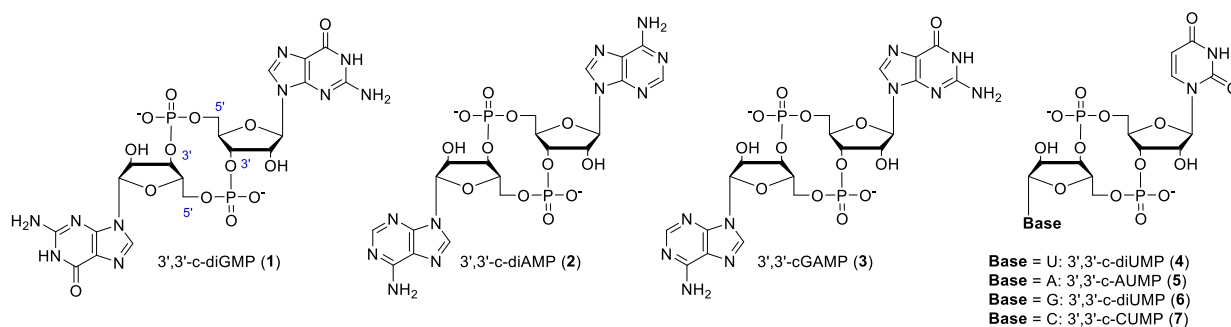


Figure 9. CDNs synthétisées par les bactéries

II.2) Le 2',3'-cGAMP : l'analogue dinucléotide cyclique endogène humain

Chez les vertébrés, et notamment chez l'humain, la synthèse de CDN est régie par la protéine cGAS qui limite la variété de structures. Cette enzyme catalyse spécifiquement la synthèse du 2',3'-cGAMP à partir de GTP et d'ATP, qui sont les seuls substrats assimilables par cGAS. De plus, ce CDN endogène est très caractéristique, puisqu'il possède, contrairement aux autres CDNs, un lien inter-nucléotidique 2',5' phosphate diester. Plus précisément, la guanosine est reliée de sa position C-2' à la position C-5' de l'adénosine, et par sa position C-5' à la position C-3' de l'adénosine (Figure 10).⁵⁵ Cette particularité explique notamment une meilleure affinité de complexation du 2',3'-cGAMP avec la protéine STING humaine (hSTING) par rapport aux autres 3',3'-CDNs exogènes, mais également son meilleur potentiel d'activation de cette protéine.

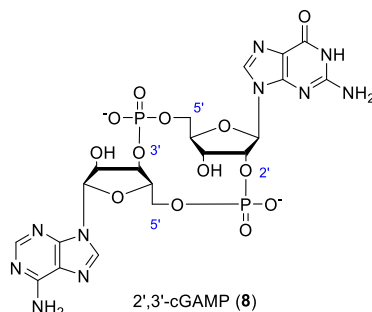


Figure 10. Structure du cGAMP

D'après les structures cristallographiques,^{37,55} le 2',3'-cGAMP induit un repliement vers l'intérieur de la protéine hSTING. Ce réarrangement structural résulte en un complexe 2',3'-cGAMP-hSTING très compact (bien plus qu'avec les autres CDNs) qui est ensuite fermé par un « couvercle » d'acides aminés. À l'intérieur de cet ensemble scellé, le 2',3'-cGAMP adopte une conformation de type « U » (Figure 11). Chaque base purique interagit avec les résidus Tyr167 et Arg238 de chaque unité monomérique de la protéine STING. Plus précisément, le résidu d'arginine (R238) interagit, *via* le groupe guanidinium, avec le N-7 d'une purine par liaison hydrogène dans le même plan. Cela permet au résidu R238 d'avoir une interaction supplémentaire avec la seconde base purique qui peut être de nature π -cation et ainsi renforcer la stabilité du complexe. Le résidu de tyrosine Tyr167 favorise, quant à lui, des interactions de type π -stacking avec chaque nucléobase.

⁵⁵ Zhang, X.; Shi, H.; Wu, J.; Zhang, X.; Sun, L.; Chen, C.; Chen, Z. J. Cyclic GMP-AMP containing mixed phosphodiester linkages is an endogenous high-affinity ligand for STING. *Mol. Cell* **2013**, 51, 226-235.

D'autres interactions sont remarquables dans le complexe 2',3'-cGAMP-hSTING et permettent de rationaliser l'efficacité de ce ligand endogène : les groupements amines exocycliques, comme le N-2 de la guanine ou le N-6 de l'adénosine, interagissent *via* des liaisons hydrogène médiées par des molécules d'eau, avec respectivement les résidus E260, Y261, Y163 et les résidus R238, V239, S241 (ces derniers sont également communs dans l'interaction avec le O-6 de la guanine). Enfin, le lien 2'-5' phosphate diester forme aussi des liaisons hydrogène additionnelles médiées par des molécules d'eau avec les résidus R232, T263 et T267 : ces interactions supplémentaires par rapport aux autres 3',3'-CDNs stabilisent la conformation active du 2',3'-cGAMP.

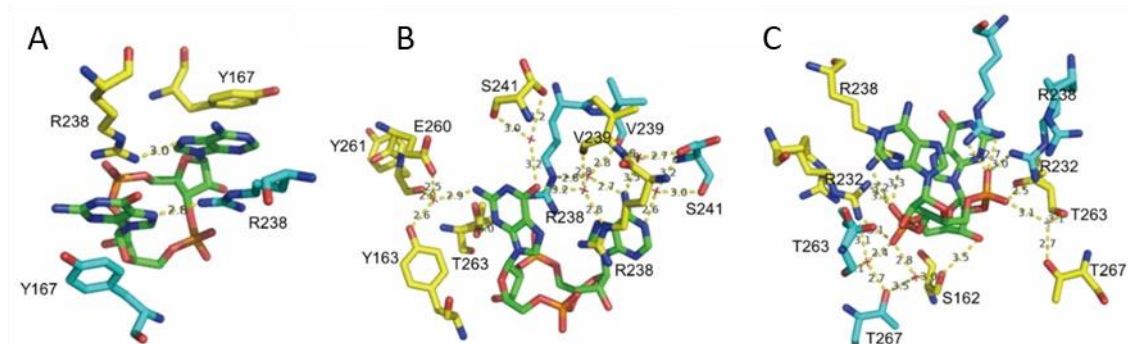


Figure 11. (A) interactions entre les bases puriques et les résidus R238 et Y167 de hSTING ; (B) liaisons hydrogène entre les nucléobases et hSTING ; (C) liaisons hydrogène entre les liens phosphate diester et hSTING (PDB : 4KSY)⁵⁶

L'ensemble de ces interactions semble expliquer la très haute affinité de hSTING pour le 2',3'-cGAMP ainsi que la très haute spécificité de détection de cette protéine pour ce ligand endogène. Différentes mesures de K_D (affinité), basées sur différentes techniques de titration calorimétrique isotherme (ITC), montrent l'ordre d'affinité décroissant de hSTING pour les différents CDNs suivants : 2',3'-cGAMP > 2',2'-cGAMP > 3',2'-cGAMP ~ 3',3'-cGAMP ~ 3',3'-di-cGMP (Tableau 2).

CDN	K_D (μ M) hSTING	K_D (μ M)		K_D (μ M)	
		hSTING	hSTING ^{R232H}	hSTING	hSTING ^{R232H}
2',3'-cGAMP (8)	0,004	0,11	5,3	0,006	3,3
2',2'-cGAMP (10)	0,29	0,17	2,5	-	2,8
3',2'-cGAMP (9)	2,6	-	-	-	-
3',3'-cGAMP (3)	1,0	1,4	5,4	1,6	5,4
3',3'-di-cGMP (2)	1,2	-	-	2,8	2,8

Tableau 2. Valeurs d'affinité (K_D) de CDNs avec le hSTING et un mutant de hSTING mesurées par ITC^{37,55,57}

Parmi les CDNs cités, le 3',2'-cGAMP (9) est un CDN naturel que l'on retrouve chez les invertébrés et notamment chez les drosophiles (Figure 12),⁵⁶ contrairement au 2',2'-cGAMP (10) qui n'existe pas naturellement (ligand purement synthétique).

⁵⁶ Shang, M.; Lu, K.; Guan, W.; Cao, S.; Ren, M.; Zhou, C. 2',3'-Cyclic GMP-AMP Dinucleotides for STING-Mediated Immune Modulation: Principles, Immunotherapeutic Potential, and Synthesis. *ChemMedChem*. **2022**, 17, 671-703.

⁵⁷ Wang, Z. H.; Zhao, C. C.; Zhang, Q. Z.; Wang, C. L.; Zhang, H.; Ma, D. J.; Wang, D. W.; Wen, X.; Li, L. Y.; Xi, Z. Design, synthesis and systematic evaluation of all possible cyclic dinucleotides (CDNs) that activate human stimulator of interferon genes (STING) variants. *Sci. China Chem*. **2020**, 63, 534-545.

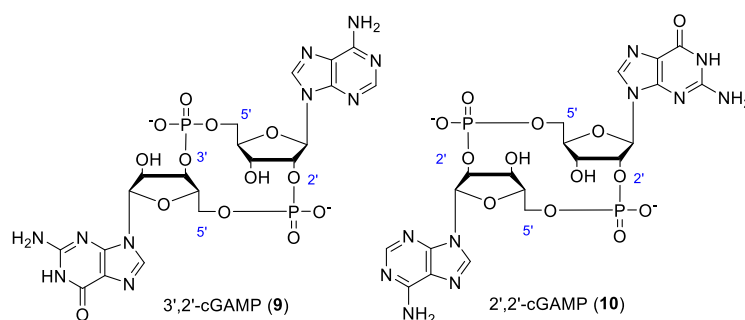


Figure 12. Autres analogues de cGAMP

Par ailleurs, Kao *et al.* ont identifié différents allèles naturels responsables de l'expression de hSTING, le principal étant le hSTING^{WT} (Wild Type) exprimé à 57,9%.^{58,59} On retrouve le hSTING^{R71H-G230A-R293Q} (HAQ, 20,4%), le hSTING^{R232H} (13,7%), hSTING^{G230A-R293Q} (AQ, 5,2%) et hSTING^{R293Q} (1,5%), qui induisent des modifications structurales de la protéine. Par exemple, le hSTING^{R232H} voit son affinité avec le 2',3'-cGAMP drastiquement réduite et certains mutants, comme le hSTING^{R232A}, ne sont plus du tout actifs en présence du 2',3'-cGAMP.^{55,60} Ce constat souligne l'importance du résidu R232 dans le mécanisme de liaison du cGAMP à hSTING, mais également la difficulté que rencontrent certains ligands synthétiques à être actifs sur l'ensemble des isoformes de hSTING. Or, l'efficacité d'un ligand agoniste de hSTING se mesure à sa capacité d'activer ces différents variants.

Outre sa grande affinité pour les divers variants de hSTING et mSTING, le 2',3'-cGAMP est l'analogue qui induit la meilleure réponse immunitaire par rapport aux autres CDNs naturels (Tableau 3).²³ Toutefois les valeurs d'EC₅₀ peuvent varier dans la littérature, en fonction de la souche cellulaire étudiée, du facteur mesuré, etc. ; ces variations dans les divers modèles biologiques *in vitro* utilisés rendent parfois la comparaison des activités biologiques des différents analogues de CDNs compliquée.

Dinucléotide cyclique	EC ₅₀ apparent	Modèle biologique de mesure
2',3'-cGAMP (8)	19 nM	Mesure de l'ARN-IFN-β par qRT-PCR chez des cellules L929 perméabilisées à la digitonine
3',3'-cGAMP (3)	19 nM	
3',3'-c-diAMP (2)	51 nM	
3',3'-c-diGMP (1)	540 nM	Mesure de l'activité de la phosphatase alcaline embryonnaire sécrétée (SEAP) chez les cellules ISG-THP-1-BLUE™

Tableau 3. Mesures d'EC₅₀ associées aux CDNs naturels

⁵⁸ Yi, G.; Brendel, V. P.; Shu, C.; Li, P.; Palanathan, S.; Cheng Kao, C. Single nucleotide polymorphisms of human STING can affect innate immune response to cyclic dinucleotides. *PLoS ONE* **2013**, *8*, 77846-77862.

⁵⁹ Patel, S.; Jin, L. TMEM173 variants and potential importance to human biology and disease. *Genes Immun.* **2019**, *20*, 82-89.

⁶⁰ Diner, E. J.; Burdette, D. L.; Wilson, S. C.; Monroe, K. M.; Kellenberger, C. A.; Hyodo, M.; Hayakawa, Y.; Hammond, M. C.; Vance, R. E. The innate immune DNA sensor cGAS produces a noncanonical cyclic dinucleotide that activates human STING. *Cell Rep.* **2013**, *3*, 1355-1361.

II.3) Stabilité et décomposition enzymatique du cGAMP

Généralement, les cascades de signalisations induites par les CDNs, dont cGAS-STING, sont stoppées par l'hydrolyse de ces molécules par des phosphodiesterases (PDE), dont onze sont responsables de la dégradation du cGAMP et du cGMP.⁶¹ Il a été montré que les nucléases S1 et P1 sont des enzymes spécialisées dans le clivage des liens 3',5'-phosphates diester du 2',3'-cGAMP pour délivrer le dinucléotide linéaire.⁶⁰ L'ectonucléotidase pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 (ENPP1) présente une activité digestive uniquement sélective du 2',3'-cGAMP : le 3',3'-cGAMP n'est pas un substrat dégradé par cette dernière.⁶² Cette enzyme, présente sur les membranes plasmiques et le RE, va cliver en priorité le lien 2',5' phosphate diester du 2',3'-cGAMP par rapport au lien 3',5'. Par ailleurs, certains virus sont capables de dégrader le 2',3'-cGAMP : le virus de la vaccine, en libérant une enzyme (la poxine) qui hydrolyse de manière spécifique le lien 3',5'-phosphate diester du 2',3'-cGAMP, échappe ainsi à la réponse immunitaire provoquée par cGAS-STING.⁶³

Le 2',3'-cGAMP est ainsi instable dans le sérum, $t_{1/2}$ = 35 min (sérum humain) et $t_{1/2}$ = 4,4 min (sérum de rat), à cause de ces hydrolases. Par ailleurs, les CDNs sont des molécules hydrophiles qui présentent des charges négatives au niveau de leur fonctions phosphodiesters. La pharmacocinétique et la biodisponibilité du cGAMP sont par conséquent limitées et ne permettent pas de l'utiliser comme substance médicamenteuse. La synthèse d'analogues de 2',3'-cGAMP, ou de CDNs de type « drug-like », est alors devenue incontournable pour le développement de nouvelles thérapies ciblant STING avec ce type d'agonistes. Ces nouveaux ligands doivent conserver une activité biologique de l'ordre du 2',3'-cGAMP tout en ayant des propriétés ADME accrues.^{23,46,56} Par exemple, il existe des prodrogues de type SATE-CDN,⁶⁴ où ces charges sont masquées lors de la pénétration cellulaire, puis clivées, afin de libérer le CDN au sein de la cellule. Nous allons voir par la suite quels sont les analogues synthétiques qui ont été produits dans cette perspective, ainsi que les voies de synthèse associées.

⁶¹ Maurice, D. H.; Ke, H.; Ahmad, F.; Wang, Y.; Chung, J.; Manganiello, V. C. Advances in targeting cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2014**, 13, 290-314.

⁶² (a) Li, L.; Yin, Q.; Kuss, P.; Maliga, Z.; Millán, J. L.; Wu, H.; Mitchison, T. J. Hydrolysis of 2'3'-CGAMP by ENPP1 and Design of Nonhydrolyzable Analogs. *Nat. Chem. Biol.* **2014**, 10, 1043-1048; (b) Namasivayam, V.; Lee, S. Y.; Müller, C. E. The promiscuous ectonucléotidase NPP1: molecular insights into substrate binding and hydrolysis. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2017**, 1861, 603-614.

⁶³ Eaglesham, J. B.; Pan, Y.; Kupper, T. S.; Kranzusch, P. J. Viral and metazoan poxins are cGAMP-specific nucleases that restrict cGAS-STING signalling. *Nature* **2019**, 566, 259-263.

⁶⁴ Xie, Z.; Lu, L.; Wang, Z.; Luo, Q.; Yang, Y.; Fang, T.; Chen, Z.; Ma, D.; Quan, J.; Xi, Z. S-acylthioalkyl ester (SATE)-based prodrugs of deoxyribose cyclic dinucleotides (dCDNs) as the STING agonist for antitumor immunotherapy. *Eur. J. Med. Chem.* **2022**, 243, 114796.

III) Les analogues synthétiques du cGAMP

III.1) Analogues aux liens phosphates et thiophosphates diesters

III.1-1) Synthèses enzymatiques

Bien que la protéine cGAS soit très spécifique de la synthèse du 2',3'-cGAMP, cette dernière peut synthétiser, en absence d'ATP et de GTP, des analogues du 2',3'-cGAMP à partir de dérivés de nucléotide triphosphates (NTP) de type purine.⁶⁵ Cette propriété unique de cette enzyme a initialement été utilisée pour la synthèse de l'ensemble des CDNs naturels mais aussi de nouveaux analogues du cGAMP.^{66,67} La synthèse enzymatique présente l'avantage d'être moins chère à mettre en place, plus rapide, éco-responsable et fiable par rapport à la synthèse totale de CDN. Néanmoins, elle reste très substrat-dépendante et limite à terme les possibilités de diversification structurale.

En 2014, Li *et al.* ont utilisé cette méthode pour synthétiser trois thio-2',3'-cGAMPs (Schéma 4) à partir de l' α S-GTP (**11**) et l' α S-ATP (**12**) et du cGAS de souris (mcGAS) stimulé par de l'ADN double brin (dsADN).^{62a} Ont été obtenus le 2',3'-cGsAMP (**13**), le 2',3'-cGsAMP (**14**) et le 2',3'-cGsAsMP (**15**), dont la catalyse par mcGAS est moins efficace. Des études *in vivo* ont montré que le 2',3'-cGsAsMP a une très bonne capacité d'induction de l'INF- β , l'EC₅₀ de cet analogue étant dix fois inférieur à celui du 2',3'-cGAMP, et une stabilité nettement améliorée vis-à-vis des hydrolases. De plus, les liens thiophosphates ne sont pas sous forme anionique à pH physiologique.

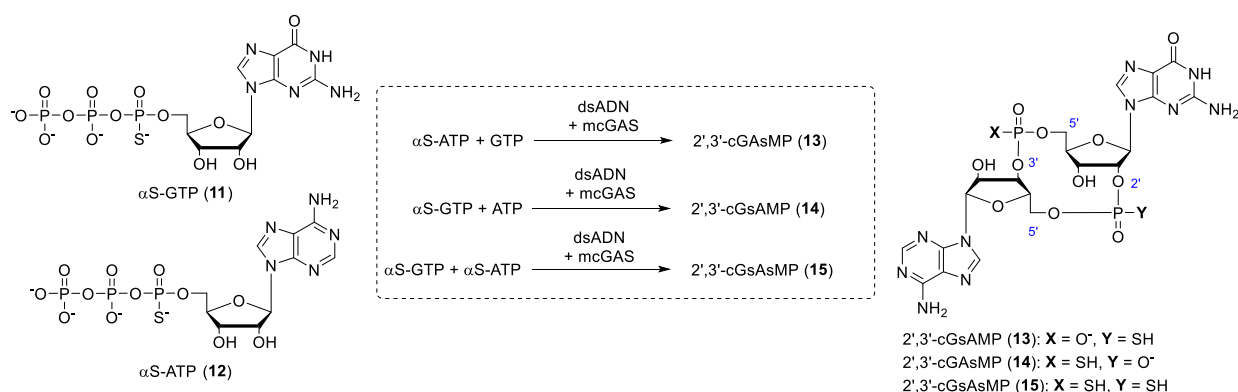


Schéma 4. Synthèse enzymatique de CDN thiophosphate

En 2019, Birkus *et al.* ont publié un travail conséquent sur le criblage de synthèses enzymatiques de 33 analogues de 2',3'-cGAMP à partir de 46 dérivés de NTP.⁶⁷ Ces dérivés de NTP présentaient diverses modifications sur la nucléobase, le ribose et le lien phosphate, et ont été criblés pour la synthèse enzymatique

⁶⁵ Rosenthal, K.; Becker, M.; Rolf, J.; Siedentop, R.; Hillen, M.; Nett, M.; Lütz, S. Catalytic promiscuity of cGAS: a facile enzymatic synthesis of 2'-3'-linked cyclic dinucleotides. *Chembiochem.* **2020**, 21, 3225-3228.

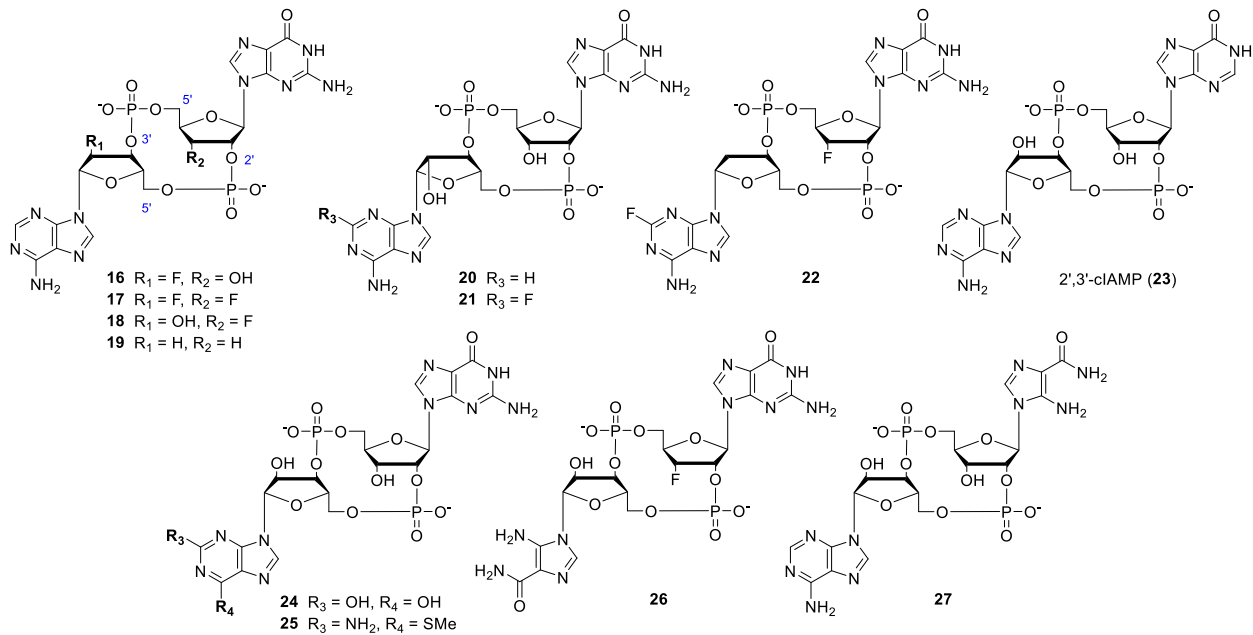
⁶⁶ Launer-Felty, K. D.; Strobel, S. A. Enzymatic synthesis of cyclic dinucleotide analogs by a promiscuous cyclic-AMP-GMP synthetase and analysis of cyclic dinucleotide responsive riboswitches, *Nucleic Acids Res.* **2018**, 46, 2765-2776.

⁶⁷ Novotná, B.; Vaneková, L.; Zavřel, M.; Buděšínský, M.; Dejmek, M.; Smola, M.; Gutten, O.; Tehrani, Z. A.; Pimková Polidarová, M.; Brázdová, A.; Liboska, R.; Štěpánek, I.; Vavřina, Z.; Jandoušek, T.; Nencka, R.; Rulíšek, L.; Bouřa, E.; Brynda, J.; Páv, O.; Birkuš, G. Enzymatic preparation of 2'-5',3'-5'-cyclic dinucleotides, their binding properties to stimulator of interferon genes adaptor protein, and structure/activity correlations. *J. Med. Chem.* **2019**, 62, 10676-10690.

en présence du hcGAS, mcGAS ou du cGAS-poulet (ccGAS). Comme attendu, les conversions en l'analogue CDN varient en fonction de la nature de l'enzyme et du substrat NTP. Parmi les enzymes utilisées, le mcGAS est celle qui présente le moins de spécificité de substrat et qui reste le meilleur choix pour la synthèse des analogues de 2',3'-cGAMP. La plupart des analogues synthétisés présentent une activité agoniste de STING, cependant un nombre plus restreint montre une activité égale ou supérieure au 2',3'-cGAMP. Les analogues présentant les meilleures et les plus basses activités sont les suivants (Tableau 4) :

CDN	$\Delta T_m^{[a]}$	EC50 ^[b] (μM)	Cytokines ^[c]			CDN	$\Delta T_m^{[a]}$	EC50 ^[b] (μM)	Cytokines ^[c]		
			INF γ	TNF α	INF β				INF γ	TNF α	INF β
2',3'-cGAMP (8)	15,3	0,02	1	1	1	21	12,3	0,2	3,2	3,4	2,4
2',3'-cGsAMP (14)	13,8	0,06	2,2	1,6	1,2	22	16,1	0,02	1,2	0,4	1,9
2',3'-cGsAsMP (15)	14,6	0,03	2,4	1,3	2	23	10,7	0,05	0,1	2,3	0
16	20,5	0,01	1,3	0,6	0,9	24	2,4	1,8	0	0	0
17	20,3	0,02	5,1	4,3	0,5	25	3,5	0,3	1,1	3,2	0
18	16,2	0,02	4	0,8	0,6	26	1,7	0,32	0	0	0
19	13,5	0,06	1,6	0,6	1,3	27	0,6	0,83	0	0	0
20	17	0,04	3,2	2,6	1						

Tableau 4



CDN	$\Delta T_m^{[a]}$	EC50 ^[b] (μM)	Cytokines ^[c]			CDN	$\Delta T_m^{[a]}$	EC50 ^[b] (μM)	Cytokines ^[c]		
			INF γ	TNF α	INF α				INF γ	TNF α	INF α
2',3'-cGAMP (8)	15,3	0,02	1	1	1	21	12,3	0,2	3,2	3,4	2,4
2',3'-cGsAMP (14)	13,8	0,06	2,2	1,6	1,2	22	16,1	0,02	1,2	0,4	1,9
2',3'-cGsAsMP (15)	14,6	0,03	2,4	1,3	2	23	10,7	0,05	0,1	2,3	0
16	20,5	0,01	1,3	0,6	0,9	24	2,4	1,8	0	0	0
17	20,3	0,02	5,1	4,3	0,5	25	3,5	0,3	1,1	3,2	0
18	16,2	0,02	4	0,8	0,6	26	1,7	0,32	0	0	0
19	13,5	0,06	1,6	0,6	1,3	27	0,6	0,83	0	0	0
20	17	0,04	3,2	2,6	1						

Tableau 4. [a] test DSF, $\Delta T_m = (T_m \text{ complexe CDN-hSTING}) - (T_m \text{ hSTING})$; [b] dosage du rapporteur de digitonine dépendant de l'IRF-3 sécrété par les cellules 293T exprimant hSTING^{WT}; [c] ratio d'induction de cytokines sécrétées par les cellules

Cette étude a montré que le 2',3'-cGAsMP et le 2',3'-cGsAsMP ont une affinité similaire à celle du 2',3'-cGAMP de référence, et que leurs activités d'induction de cytokines sont supérieures (EC_{50} et ratio) à ce dernier. Les analogues **16**, **17**, **18**, où les groupements hydroxyles portés en position C-2' de l'adénosine et en C-3' de la guanosine, ont été substitués par des fluors, présentent un effet de thermostabilisation ($\Delta T_m > 15,3$) au sein de STING: cela traduit un gain de stabilité pour le complexe ligand/protéine qui signifie une affinité accrue de ces ligands envers la cible. Leur activité biologique est également supérieure à celle du 2',3'-cGAMP. Des effets similaires sur les ligands synthétisés sont observés lorsque l'adénosine du cGAMP est remplacée par une 2'-déoxyadénosine ou *ara*-adénosine (**19**, **20**). En revanche, l'ensemble des analogues de **21** à **27** ont vu leur affinité pour STING diminuer, ainsi que leur activité biologique, suite à la modification d'une base purique. Seul l'analogue **23** fait exception : le changement de la guanine par une base inosine a montré des propriétés intéressantes. Ce résultat montre l'importance qu'un groupement accepteur et donneur de liaison hydrogène soit porté en position C-6 pour la complexation à la protéine.

En 2019, Zhu *et al.* ont rapporté la production de 2',3'-cGAMP par la bactérie *E. coli*, où le gène codant de mcGAS a été intégré à une plasmide, permettant l'expression de mcGAS par ce micro-organisme.⁶⁸ Le mcGAS exprimé reconnaît l'ADN exogène pour catalyser la synthèse du 2',3'-cGAMP qui est ensuite sécrété hors de la bactérie. Cette méthode permet d'isoler efficacement cette molécule d'intérêt à l'échelle de 140 mg par litre de culture et représente actuellement l'une des stratégies les plus avancées pour une production en grande quantité.

III.1-2) Synthèses chimiques

Si la synthèse enzymatique est efficace et pratique pour la synthèse de CDNs, elle n'est pas compatible avec les dérivés de NTP, où les modifications structurales sont trop importantes. De plus, la synthèse de CDNs avec deux liens 2',2' ou sans lien phosphate diester est impossible. La synthèse chimique intervient alors comme une alternative dans la préparation d'analogues de CDNs, complémentaire à la synthèse enzymatique pour augmenter la diversité moléculaire.

Les analogues de CDNs sont à l'origine des sous-produits observés par Khorana *et al.* en 1958 lors de synthèse d'oligonucléotides *via* la méthode phosphodiester.⁶⁹ Après la découverte de leurs rôles biologiques dans les années 80, comme l'inhibition de l'ARN polymérase⁷⁰ ou la régulation de processus vitaux bactériens,^{51,52} un intérêt croissant pour le développement de méthodes synthétiques visant la formation de telles molécules a vu le jour. Différentes approches ont été mises au point afin de synthétiser une plus grande variété de CDNs ; la principale difficulté réside en la formation du macrocycle par deux liens phosphates diesters. Ces approches synthétiques sont les suivantes :

- **La synthèse supportée sur phase solide**, issue de la chimie des oligonucléotides, s'affranchit de l'isolement des intermédiaires réactionnels permettant des synthèses en « one-pot » beaucoup plus

⁶⁸ Lv, Y.; Sun, Q.; Wang, X.; Lu, Y.; Li, Y.; Yuan, H.; Zhu, J.; Zhu, D. Highly efficient preparation of cyclic dinucleotides via engineering of dinucleotide cyclases in *Escherichia coli*. *Front. Microbiol.* **2019**, 10, 2111.

⁶⁹ Tener, G. M.; Khorana, H. G.; Markham, R.; Pol, E. H. Studies on polynucleotides. II.¹ The synthesis and characterization of linear and cyclic thymidine oligonucleotides². *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, 80, 6223-6230.

⁷⁰ Hsu, C.-Y. J.; Dennis, D. RNA polymerase: linear competitive inhibition by bis-(3'→5')-cyclic dinucleotides, NpNp, *Nucleic Acids Res.* **1982**, 10, 5637-5647

pratiques.⁷¹ Cela évite en effet les longues phases de purification et donne accès à des analogues de CDNs avec d'excellentes puretés.

- **La synthèse en phase liquide** qui est, à l'opposé, plus appropriée à de hautes échelles de production (ordre du gramme) et plus tolérante à des substrats nucléotidiques hautement modifiés, donnant alors accès à une plus grande diversité structurale de CDN.

Ces approches procèdent de manière similaire dans la mesure où un intermédiaire acyclique est d'abord formé puis engagé dans une étape de cyclisation menant au dinucléotide cyclique.

a) Synthèse supportée sur phase solide

Sintim *et al.* ont rapporté deux synthèses de CDNs supportées sur phase solide qui illustrent les grandes étapes de cette méthode.⁷² Ces synthèses sont basées sur l'utilisation d'une liaison éthylsulfonyl-phosphate qui est aisément clivée en présence d'une base, comme l'ammoniaque, pour libérer le CDN formé (Schéma 5) :

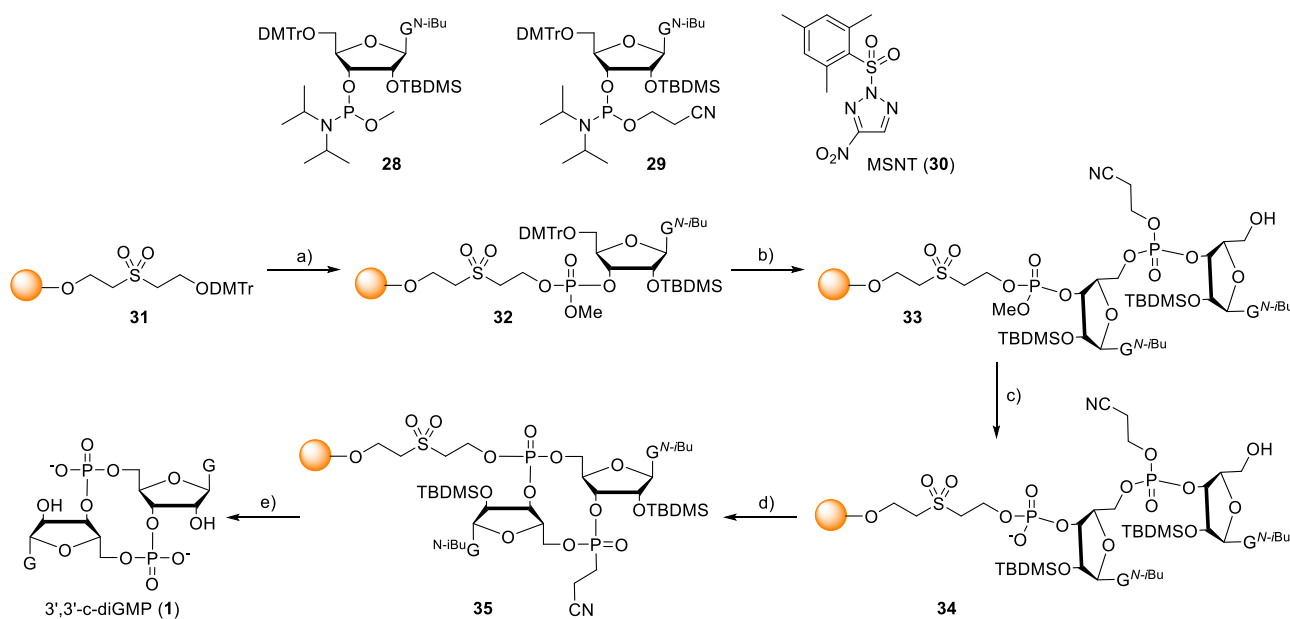


Schéma 5. Réactifs et conditions : (a)-i) 28; -ii) I_2 , Pyr., H_2O ; -iii) DCA, CH_2Cl_2 ; (b)-i) 29, tétrazole; -ii) I_2 , Pyr., H_2O ; -iii) DCA, CH_2Cl_2 ; (c) Na_2S_2 ; (d) MSNT, Pyr.; (e) conc. aq. NH_4OH , $NEt_3/3.HF$.

La synthèse s'appuie sur la chimie au P(III), et commence par un couplage entre le *P*-méthoxyphosphoramidite (28) et le 2-(4,4'-diméthoxytrytyloxy)éthylsulfonyl (31) greffé à un support solide de type CPG (« Controlled Pore Glass ») commercial, sous conditions oxydantes en présence de I_2 dans la pyridine et

⁷¹ (a) Frieden, M.; Grandas, A.; Pedrosa, E. Making cyclic RNAs easily available. *Chem. Commun.* **1999**, 16, 1593-1594 ; (b) Gaglione, M.; Di Fabio, G.; Messere, A. Current methods in synthesis of cyclic oligonucleotides and analogues. *Curr. Org. Chem.* **2012**, 16, 1371-1389.

⁷² Kiburu, I. ; Shurer, A. ; Yan, L.; Sintim, H. O. A simple solid-phase synthesis of the ubiquitous bacterial signaling molecule, c-di-GMP and analogues. *Mol. Biosyst.* **2008**, 4, 518-520.

l'eau. Le mono-nucléoside supporté **32** est ensuite couplé avec le cyanoéthyl-phosphoramidite **29** pour former l'intermédiaire dinucléotide acyclique **33**. Le *P*-méthoxy-phosphate est alors sélectivement déprotégé en présence de Na_2S_2 ; ces conditions n'affectent pas le groupement cyanoéthyl. La cyclisation de l'intermédiaire phosphate **34** se déroule en présence du 1-mésitylènesulfonyl-3-nitro-1,2,4-triazole (MSNT ; **30**) ou en présence de chlorure de 2,4,6-triisopropyl-benzènesulfonyl (TPSCI) et *N*-méthylimidazole, menant à l'intermédiaire cyclique **35**, toujours greffé au CPG. Un traitement par un mélange de triéthylamine et d'acide fluorhydrique ($\text{NEt}_3/3.\text{HF}$) libère sélectivement le CDN avec un rendement inférieur à 50%. Ce rendement s'explique par une conversion incomplète de l'intermédiaire acyclique **34** en produit cyclisé **35**. Pour convertir davantage de composé acyclique, l'étape de cyclisation doit être réitérée plusieurs fois, montrant que cette étape est limitante lorsqu'elle est supportée en phase solide. Il a été montré par la suite que l'étape de cyclisation est bien plus efficace lorsque l'espèce acyclique n'est plus greffée au solide mais lorsqu'elle se trouve en solution (**Schéma 6**). L'intermédiaire **32** est couplé avec le *P*-méthoxy-phosphoramidite (**28**) pour former l'intermédiaire acyclique **36** sans groupement protecteur 3-hydroxypropionitrile. Ce dernier est alors clivé du CPG sous condition basique pour être transféré en solution (**37**), puis cyclisé en présence d'une solution de MSNT (0,1 M). S'ensuit l'étape de déprotection, sans purification préalable, permettant d'obtenir le CDN désiré (**1**) avec une excellente pureté. Cette méthode donne accès à l'ensemble des analogues de 3',3'-CDN.

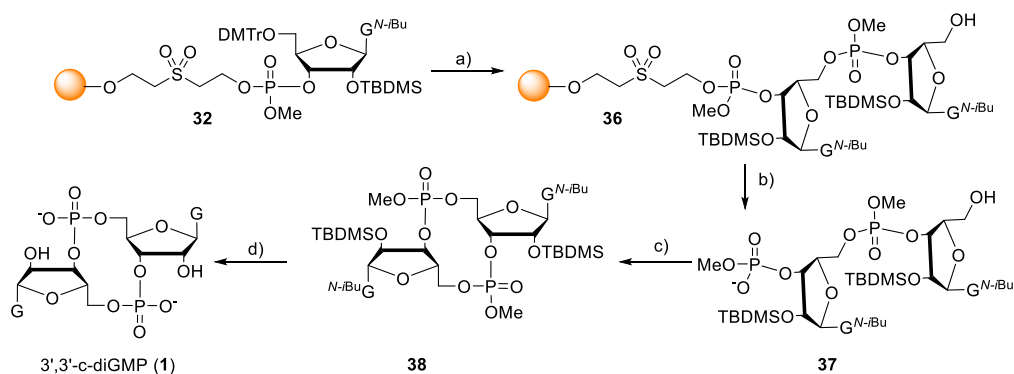


Schéma 6. Réactifs et conditions : (a)-i) **28**, tétrazole; -ii) I_2 , Pyr., H_2O ; -iii) DCA, CH_2Cl_2 ; (b) NEt_3 , MeCN; (c) MSNT, Pyr.; (d) conc. aq. NH_4OH , $\text{NEt}_3/3.\text{HF}$.

D'autres phases solides de support CPG peuvent être utilisées pour la synthèse de CDNs : la phase solide 3-chloro-4-hydroxyphénylacétate CPG **39** (Figure 13) permet un clivage sélectif de la forme cyclisée par un mélange de tétraméthylguanidinium (TMG) et *syn*-pyridine-2-aldoxime (PBO).⁷³ Shanahan *et al.* ont rapporté l'utilisation du 3-(4,4'-diméthoxytrityloxy)-2,2-(dicarboxyméthylamino)propyl-1-O-succinoyl-CPG (3'-CPR-II CPG ; **40**) qui permet d'accéder à l'ensemble des analogues de c-di-GMP.⁷⁴

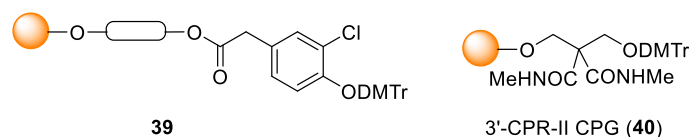


Figure 13. Autres phases solides greffées CPG

⁷³ Micura, R. Cyclic oligoribonucleotides (RNA) by solid-phase synthesis. *Chem. Eur. J.* **1999**, 5, 2077-2082.

⁷⁴ Shanahan, C. A.; Gaffney, B. L.; Jones, R. A.; Strobel, S. A. Differential analogue binding by two classes of c-di-GMP riboswitches. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 15578-15592.

b) Synthèses en phase liquide

La synthèse en phase liquide des CDN permet de pallier les limitations synthétiques de la synthèse supportée, c'est-à-dire permettre la production de CDN à des échelles plus conséquentes, mais aussi pouvoir apporter une plus grande diversité de modifications structurales. Toutefois, le principal défi de cette approche est l'utilisation de groupements protecteurs orthogonaux, incluant la protection des groupements amine des bases nucléiques, les hydroxyles du ribose et celle du groupement phosphate. Un contrôle très précis de ces groupements protecteurs est requis afin de mener des réactions hautement sélectives, nécessitant ainsi une préparation précautionneuse des substrats nucléosidiques. Actuellement, plusieurs méthodes de synthèse sont décrites pour la formation d'une large variété de dérivés de CDN aux liens phosphates ou thiophosphates.

L'approche **phosphate triester** est la première à avoir été mise en place pour la synthèse de ces structures. Elle est basée sur le couplage d'un réactif du P(V) (le phosphorodichlorate de 2-chlorophényle ; **41**), sur l'hydroxyle libre d'un nucléoside précurseur (position C-2' ou C-3') en présence de 1*H*-1,2,4-triazole par le passage d'un intermédiaire activé **42** (Schéma 7).⁷⁵ Le phosphate (V) diester **44** formé est alors protégé par le 3-hydroxypropionitrile. L'éther de 4,4'-diméthoxytrityle (DMTr) en position C-5' est clivé par une solution à 3% de DCA, donnant accès à l'intermédiaire alcool en C-5' **45**. Les précurseurs phosphates **44** et **45** sont ensuite couplés en présence de MSNT et offrent sous ces conditions le dinucléotide acyclique **46**. Un traitement par une solution de DCA puis de *t*BuNH₂ permet de cliver respectivement le groupe DMTr et le 3-hydroxypropionitrile. L'étape de cyclisation se déroule sous haute dilution pour favoriser la réaction intramoléculaire en présence de MSNT. La déprotection des phosphates triesters de l'intermédiaire cyclique **47** se fait par l'utilisation du système TMG-PBO, suivie de la déprotection des nucléobases par un traitement basique avec NH₄OH concentré, puis des groupements silylés par le mélange NEt₃/3.HF ou du TBAF. Après purification, le CDN désiré (*i.e.* le 3',3'-c-diGMP ; **1**) est obtenu.

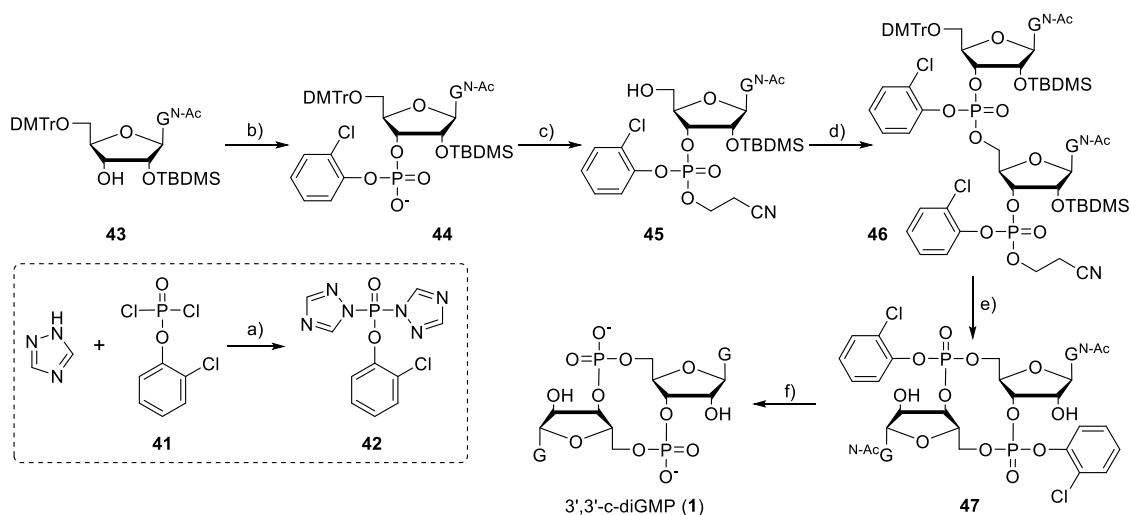


Schéma 7. Réactifs et conditions : (a) NEt₃, CH₂Cl₂; (b) **44**, CH₂Cl₂; (c-i) 3-hydroxypropionitrile, MSNT, Pyr.; -ii) DCA, CH₂Cl₂; (d-i) **46**, MSNT, Pyr.; -ii) DCA, CH₂Cl₂; (e-i) *t*BuNH₂, MeCN; -ii) MSNT, Pyr.; (f-i) PBO, TMG, 1,4-dioxane, H₂O; -ii) MeNH₂/EtOH; -iii) NEt₃/3.HF, Pyr., NEt₃.

⁷⁵ Jenny, H. C.-Y.; Don, D.; Oger, J. Synthesis and physical characterization of bis 3'→5' cyclic dinucleotides (NpNp): RNA polymerase inhibitors. *Nucleos. Nucleot.* **2006**, *4*, 377-389.

Le principal avantage de cette approche réside dans le fait que les différents intermédiaires produits sont facilement isolables et stables. Par cette méthode, le groupe de Xi a pu synthétiser toutes les combinaisons possibles de CDNs à partir des nucléosides naturels (A, G, C, U) et de l'inosine (I), incluant les quatre types de liens phosphates diesters (2'-3', 3'-2', 3'-3' et 2'-2') (Figure 14).^{57,76} L'ensemble des 55 composés produits ont alors été évalués biologiquement *in vitro* sur l'ensemble des variants de hSTING (WT, HAQ, R232H, R293Q et AQ) afin de mesurer leur activité agoniste ainsi que leur stabilité dans le sérum de veau fœtal (Tableau 5). Ce travail de relation structure-activité (SAR) a permis d'établir bon nombre de principes fondamentaux pour la conception de nouveaux analogues de CDNs orientés vers une utilisation en immunothérapie ciblant hSTING :

- Les dinucléotides cycliques présentant deux bases puriques ont une meilleure activité agoniste vis-à-vis de hSTING^{WT} comparés aux CDNs di-pyrimidiques ; leur activité agoniste fluctue en fonction des variants de hSTING. Des exceptions néanmoins sont à souligner puisque les 2',3'-cGUMP et 3',2'-cGUMP activent dans une certaine mesure le hSTING^{WT}, et le 2',2'-cGUMP a montré des activités biologiques similaires à celles du 2',3'-cGAMP.
- Les analogues 3',3'-cGAMP, 3',3'-c-di-AMP et 3',3'-c-di-GMP, bien que moins affins de hSTING, induisent une forte réponse de l'IFN-I.
- La stabilité des CDNs vis-à-vis des enzymes présentent dans le sérum ou l'ENPP1 décroît dans l'ordre suivant : 3',3'-CDNs > 2',3'-CDNs ~ 3',2'-CDNs > 2',2'-CDNs.
- L'ensemble des cIAMPs (i.e. 3',2'-, 2',3'-, 3',3'- et 2',2'-) ont montré une meilleure activité biologique que les dérivés de cIGMP et de c-di-IMP qui sont déjà de bons agonistes sur l'ensemble des variants de hSTING, confirmant ainsi les résultats de Birkus *et al.*⁶⁷

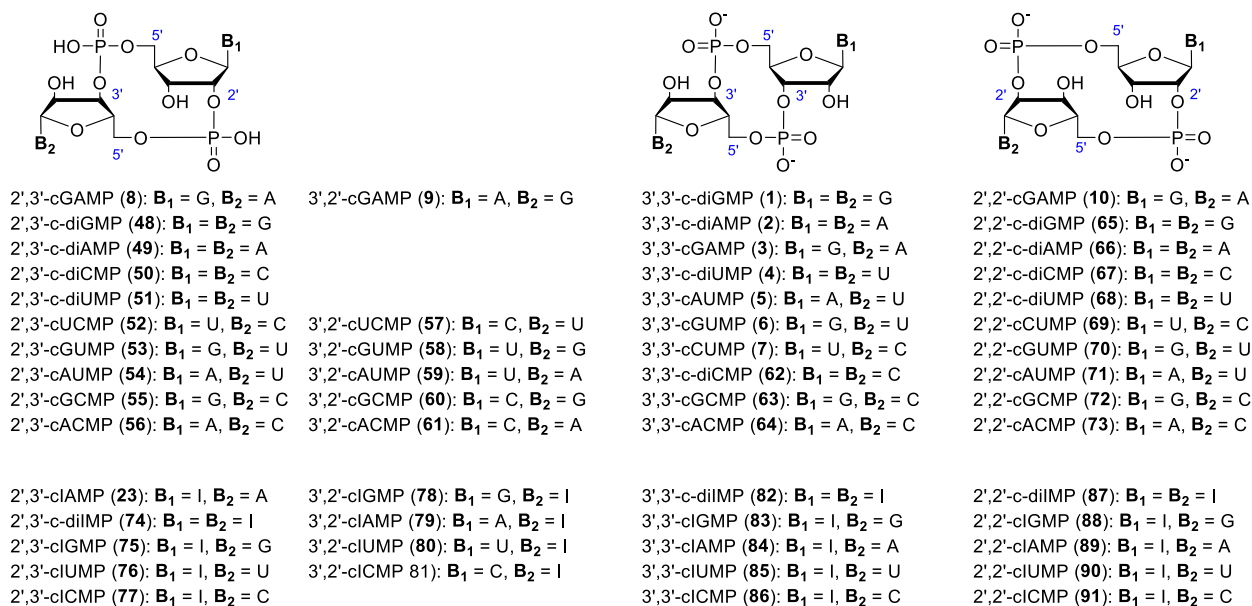


Figure 14. Ensemble des CDNs synthétisés par Xi *et al.*

⁷⁶ Wang, Z.-H.; Zhao, C.; Wang, C.; Zhang, H.; Ma, D.; Zhang, Q.; Wen, X.; Li, L.; Xi, Z. Synthesis and biological evaluation of all possible inosine-mixed cyclic dinucleotides that activate different hSTING variants. *Bioorg. Med. Chem.* **2021**, *29*, 115899.

Type de lien	CDN	Coefficient multiplicateur de l'activité des CDNs vis-à-vis des variants de hSTING ^[a]					t _{1/2} dans le sérum de veau fœtal
		WT	HAQ	R232H	R293Q	AQ	
	Contrôle	1	1	1	1	1	20-40 h
2',3'-CDN	2',3'-cGAMP (8)	7,7	19,6	8,4	58,4	87,1	20-40 h
	2',3'-c-diGMP (48)	5,3	5,3	1,2	1,1	45,5	
	2',3'-c-diAMP (49)	6,1	12,7	2,8	31,2	95,8	
	2',3'-c-diCMP (50)	0,5	1	1,8	0,8	0,9	
	2',3'-c-diUMP (51)	0,6	0,8	1,2	0,9	1,1	
	2',3'-cUCMP (52)	0,8	0,9	1,7	1,2	38,3	
	2',3'-cGUMP (53)	4,7	6,1	1,3	0,8	64,8	
	2',3'-cAUMP (54)	1,1	0,9	0,8	0,8	11,4	
	2',3'-cGCMP (55)	0,8	1	1,1	1,2	3,1	
	2',3'-cACMP (56)	0,9	1,2	0,7	0,9	1	
3',2'-CDN	3',2'-cGAMP (9)	6,9	14,9	4,1	14,1	78,4	20-40 h
	3',2'-cUCMP (57)	3,6	2,6	1,6	1,2	6,6	
	3',2'-cGUMP (58)	4,4	4,8	1,4	1,8	54,5	
	3',2'-cAUMP (59)	3,2	2,4	1,4	1	29,1	
	3',2'-cGCMP (60)	0,9	1	1,8	0,8	10	
	3',2'-cACMP (61)	2,5	1,3	0,8	1	29,2	
3',3'-CDN	3',3'-c-diGMP (1)	6,7	2,5	3,6	1	44,2	> 50
	3',3'-c-diAMP (2)	5,5	10,1	1,4	6,7	82,9	
	3',3'-cGAMP (3)	6,7	14	4	33,1	87	
	3',3'-c-diUMP (4)	0,8	1,1	1,2	0,9	12,8	
	3',3'-cAUMP (5)	0,9	1,3	1,5	0,7	1	
	3',3'-cGUMP (6)	0,8	1,2	1,8	0,8	1,5	
	3',3'-cUCMP (7)	0,6	1	1,2	1,2	12	
	3',3'-c-diCMP (62)	0,8	1,2	1	1,1	1,1	
	3',3'-cGCMP (63)	0,9	1,2	1,5	0,8	1,1	
	3',3'-cACMP (64)	0,8	1,3	1	0,8	0,9	
2',2'-CDN	2',2'-cGAMP (10)	5,1	14,9	2,8	32,3	70,7	6-20 h
	2',2'-c-diGMP (65)	5,8	10,9	2,4	5,9	69,4	
	2',2'-c-diAMP (66)	5,1	15,9	1,8	9,2	68,4	
	2',2'-c-diCMP (67)	0,7	1,3	1,6	0,8	1	
	2',2'-c-diUMP (68)	2,4	0,9	1,4	0,8	19,6	
	2',2'-cCUMP (69)	0,9	1,2	1,5	1	1,5	
	2',2'-cGUMP (70)	5,9	15,7	8,2	31,2	106,2	
	2',2'-cAUMP (71)	0,7	1,1	1,4	0,7	15,7	
	2',2'-cGCMP (72)	3	6,3	1,4	1,6	40,9	
	2',2'-cACMP (73)	1	1,1	0,8	0,8	4,6	

Tableau 5. [a] Evalué d'après le dosage de l'induction du gène l'IRF-3 par la luciférase dans les cellules HEK293T transfectées avec des vecteurs exprimant hSTING.

La seconde approche synthétique de CDNs passe par des **couplages de type phosphoramidite et H-phosphonate**. Cette approche, décrite par Jones en 2010, reste la plus usitée actuellement pour la synthèse d'analogues de cGAMP : celle-ci se déroule en 8 étapes successives en « one-pot », sur trois jours et sans isolement des intermédiaires, les rendements globaux étant compris entre 17% et 30%.⁷⁷ La préparation du 2',3'-cGAMP par cette synthèse a été publiée en 2013 par Gao et al. (Schéma 8).⁷⁸ Le premier lien phosphate est construit par couplage phosphoramidite et la macrocyclisation du dinucléotide se déroule *via* le couplage de type H-phosphonate. Cette méthode repose sur l'oxydation d'un précurseur phosphoramidite, ou phosphate (III), en phosphate (V) durant la synthèse.

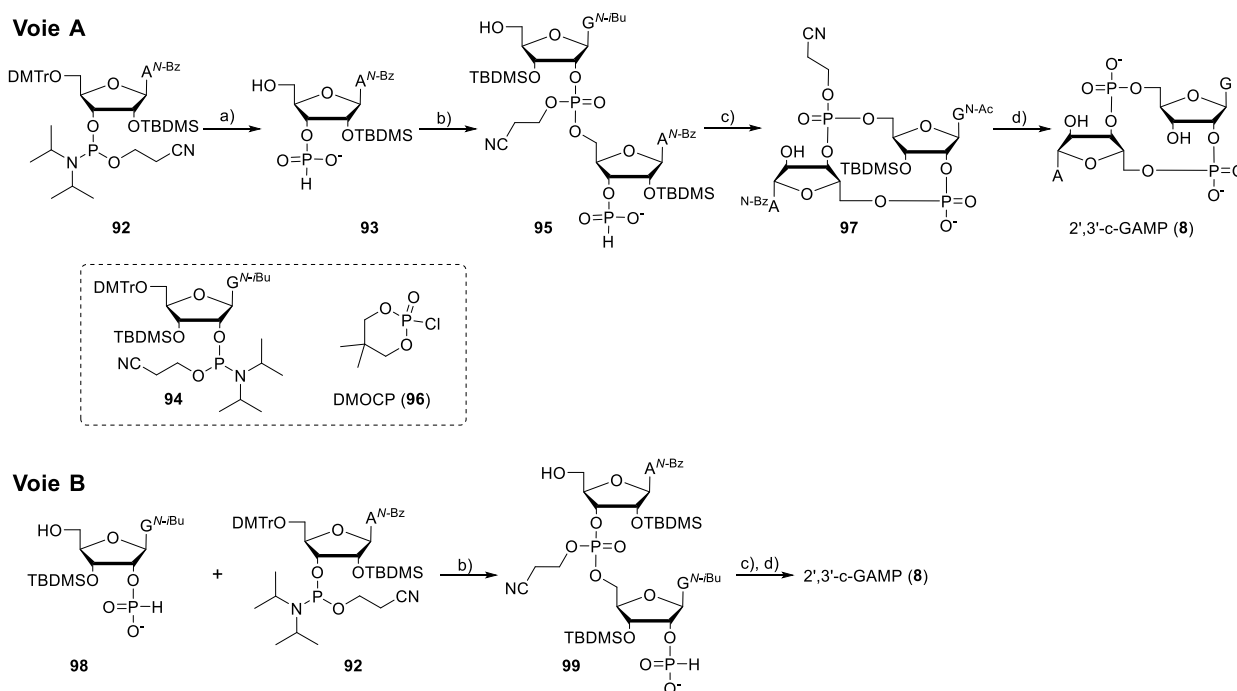


Schéma 8. Réactifs et conditions : (a)-i) TFA, Pyr., H₂O, MeCN; -ii) tBuNH₂; -iii) DCA, H₂O, CH₂Cl₂; (b)-i) **94**, Pyr., TBHP; -ii) DCA, H₂O, CH₂Cl₂; (c)-i) DMOCP; -ii) I₂, H₂O; (d)-i) MeNH₂/EtOH; -ii) NEt₃/3.HF, NEt₃.

La procédure commence par le dérivé d'adénosine phosphoramidite protégé **92** (voie A) qui est traité successivement par du pyridinium trifluoroacétate (Py-TFA) aqueux puis par le tBuNH₂ pour transformer le phosphoramidite en H-phosphonate. Une déprotection du 5'-DMTr en présence de DCA donne accès à l'intermédiaire **93**. Ensuite, la pyridine est ajoutée au milieu et génère le sel de pyridinium dichloroacétate qui sert de catalyseur au couplage du second nucléoside phosphoramidite **94** avec l'hydroxyle en position C-5' de **93**. Après oxydation du phosphite triester intermédiaire et déprotection du second 5'-DMTr par le DCA, le dinucléotide linéaire **95** est obtenu. Après co-évaporations avec la pyridine, le résidu est traité sous haute dilution par le 5,5-diméthyl-2-oxo-2-chloro-1,3,2-dioxaphosphinane (DMOCP, **96**) pour induire la cyclisation intramoléculaire. L'intermédiaire H-phosphonate diester produit est alors oxydé par un mélange I₂/H₂O pour donner le dérivé phosphate diester **97**. Différents traitements permettent la déprotection du second lien phosphate, des nucléobases et du ribose. Par addition d'acétone dans le milieu réactionnel, le CDN cristallise

⁷⁷ Gaffney, B. L.; Veliath, E.; Zhao, J.; Jones, R. A. One-flask syntheses of c-di-GMP and the [Rp,Rp] and [Rp,Sp] thiophosphate analogues. *Org. Lett.* **2010**, 12, 3269-3271.

⁷⁸ Gao, P.; Ascano, M.; Wu, Y.; Barchet, W.; Gaffney, B. L.; Zillinger, T.; Serganov, A. A.; Liu, Y.; Jones, R. A.; Hartmann, G.; Tuschl, T.; Patel, D. J. Cyclic [G(2',5')pA(3',5')p] is the metazoan second messenger produced by DNA-activated cyclic GMP-AMP synthase. *Cell* **2013**, 153, 1094-1107.

et est obtenu par filtration. De plus, l'ordre de construction des liens phosphate diester 2'-5' et 3'-5' n'influence en rien le rendement global de la réaction (voie B).⁵⁶

D'autres synthèses d'analogues de 3',3'-cGAMP ont été décrites par les groupes de Grajkowski,⁷⁹ Hayakawa⁸⁰ et Lam.⁸¹ Les méthodes ainsi mises au point forment d'abord un lien inter-nucléotidique phosphate triester puis cyclisent intra-moléculairement l'intermédiaire dinucléotidique *via* un phosphoramidite ou un second phosphate triester (qui remplacent le couplage par le H-phosphonate). Les intermédiaires cyclisés protégés peuvent être purifiés sur chromatographie sur gel de silice mais sont obtenus sous la forme d'un mélange de quatre diastéréoisomères. Contrairement à la méthode de Jones, ces dernières ne sont utilisées que pour accéder aux analogues du 3',3'-cGAMP avec deux liens phosphates diesters.

En effet, en remplaçant les oxydants I₂/H₂O ou *t*BuOOH, par le 3-((diméthylaminométhylidène)-amino)-3*H*-1,2,4-dithiazole-5-thione (DDTT, **100**), le bis-(phénylacétyl)-disulfide (PADS, **101**), le bis-(triéthoxysilylpropyl)tétrasilfide (TEST, **102**) ou le 3*H*-1,2-benzodithiol-3-one (**103**), il est possible d'obtenir des analogues thio-CDNs.⁷⁷ En suivant cette stratégie, Jones *et al.* ont préparé avec succès deux dithio-2',3'-CDNs (Schéma 9). Après le couplage du phosphoramidite **92** avec le H-phosphonate **105a** ou **105b**, la sulfuration de l'intermédiaire mène à l'obtention de deux diastéréomères du thiophosphate (*R_P* et *S_P*) **106**. La cyclisation est achevée avec le DMOCP, l'intermédiaire phosphonate est alors oxydé avec le 3*H*-1,2-benzodithiol-3-one (**103**), au lieu du mélange I₂/H₂O pour donner les di-PS-dinucléotides cycliques protégées **107a-b**. Cependant, seul le diastéréoisomère *R_P* est obtenu sur le deuxième lien thiophosphate, lors de cette étape de cyclisation par le H-phosphonate et sulfuration. Malgré l'obtention d'un mélange de diastéréoisomères *R-R* et *R-S*, ces isomères peuvent être isolés de manière pure après l'étape de déprotection, menant aux composés dithio-CDN **108**, **109**, **110** et **111**.

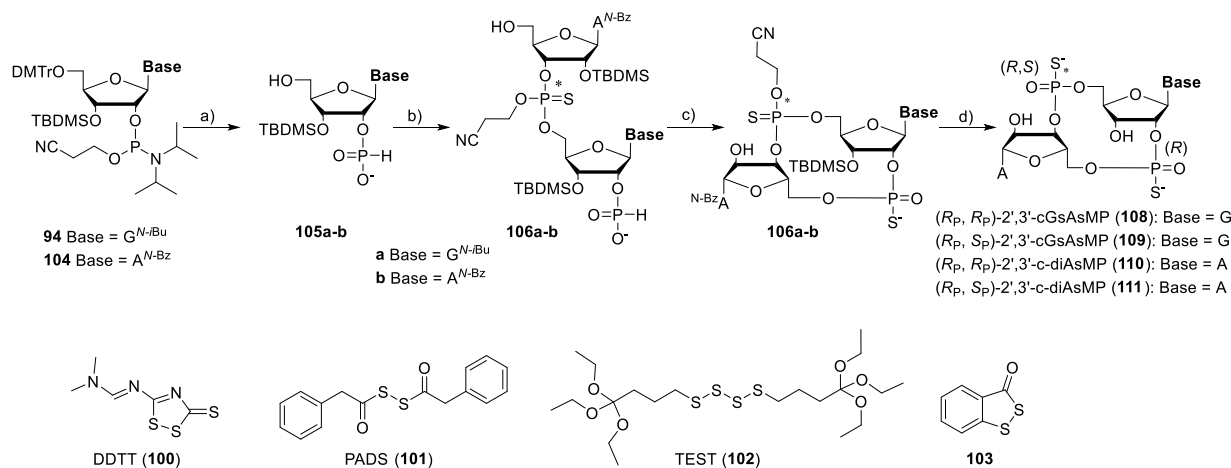


Schéma 9. Réactifs et conditions : (a)-i) TFA, Pyr., H₂O, MeCN; -ii) *t*BuNH₂; -iii) DCA, H₂O, CH₂Cl₂; (b)-i) **92**, Pyr.; -ii) DDTT; -iii) DCA, H₂O; (c)-i) DMOCP; -ii) **103**; (d)-i) *t*BuNH₂; -ii) MeNH₂/EtOH; -iii) NEt₃/3.HF, Pyr., NEt₃.

Gajewski *et al.* ont montré que ces derniers induisent de manière très efficace une réponse immunitaire liée à STING chez les cellules murines et humaines, ainsi qu'une stabilité accrue vis-à-vis des

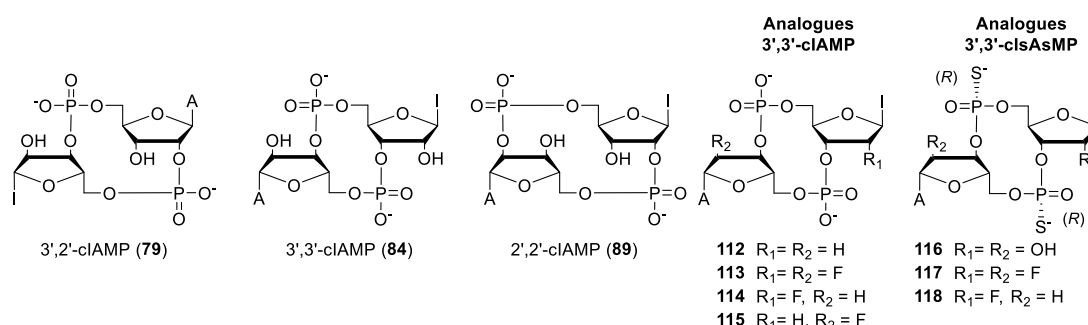
⁷⁹ Grajkowski, A.; Cieslak, J.; Gapeev, A.; Schindler, C.; Beaucage, S. L. Convenient synthesis of a propargylated cyclic (3'-5') diguanylic acid and its "click" conjugation to a biotinylated azide. *Bioconjugate Chem.* **2010**, 21, 2147-2152.

⁸⁰ Hayakawa, Y.; Nagata, R.; Hirata, A.; Hyodo, M.; Kawai, R. A facile synthesis of cyclic bis(3'→5')diguanylic acid. *Tetrahedron* **2003**, 59, 6465-6471.

⁸¹ Ching, S. M.; Tan, W. J.; Chua, K. L.; Lam, Y. Synthesis of cyclic di-nucleotidic acids as potential inhibitors targeting diguanylate cyclase. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, 18, 6657-6665.

hydrolases par rapport au 2',3'-cGAMP.⁸² Le plus prometteur d'entre eux : le (*R_p*, *R_p*)-2',3'-c-diAsMP (**110**, connu sous le nom de ML RR-S2 CDA ou ADU-S100), a été développé par Aduro Biotech pour des traitements anticancéreux ; il a montré d'excellentes activités anti-tumorales dans de nombreux modèles de cancers. Ce composé est le premier analogue de 2',3'-cGAMP à être entré en phase clinique pour des traitements d'immunothérapie contre le cancer.⁸³

En suivant la méthode « one-pot » de Jones, Lioux et son équipe ont synthétisé divers analogues de cAIMP, où des modifications ont été portées sur les riboses et sur les liens phosphates diesters (Tableau 6).⁸⁴ Si le dérivé 3',2'-cIAMP (**79**) montre une activité agoniste de STING similaire au 2',3'-cGAMP, c'est le 3',3'-cIAMP (**84**) dans les analogues « classiques » de CDN qui présente la meilleure activité biologique. En revanche, la substitution des deux hydroxyles par des fluores, ainsi que le remplacement des liens phosphates par des liens thiophosphates diesters, conduisent à l'obtention d'un CDN nettement plus actif : le 3',3'-cIsAsMP fluoré (**117**). Ce composé est prometteur pour le développement d'immunothérapies basées sur STING.



Composé	Induction de l'IRF3 chez les macrophages murins	Induction de gènes chez des cellules THP-1		Sang humain complet	Composé	Induction de l'IRF3 chez les macrophages murins	Induction de gènes chez des cellules THP-1		Sang humain complet
	EC ₅₀ (μM)	EC ₅₀ ^{IRF3} (μM)	EC ₅₀ ^{NF-κB} (μM)			EC ₅₀ (μM)	EC ₅₀ ^{IRF3} (μM)	EC ₅₀ ^{NF-κB} (μM)	
2',3'-cGAMP (8)	18,8	7,2	39,1	19,6	113	5,1	1,1	15,4	0,7
2',3'-cIAMP (23)	6,1	12,5	54,3	15,5	114	9,1	1,4	25,5	3,6
3',2'-cIAMP (79)	15,9	15,1	60,6	11,2	115	5,0	2,3	32,3	2,8
3',3'-cIAMP (84)	8,4	5,1	15,9	6,4	116	4,0	1,6	7,8	10,6
2',2'-cIAMP (89)	17,4	17,9	110,9	20,5	117	0,6	0,3	1,6	0,4
112	11,6	10	62,3	9,9	118	2,2	1,9	9,9	4,7

Tableau 6. Activité biologique des analogues de cIAMP

La substitution des hydroxyles en position C-2' et C-3' par des fluorures induit une baisse de la flexibilité conformationnelle des CDNs qui est entropiquement plus favorable pour la liaison à STING.⁸⁵ De plus, ce remplacement par des fluorures permet d'augmenter le caractère lipophile du CDN. Parmi d'autres analogues

⁸² Corrales, L.; Glickman, L. H.; McWhirter, S. M.; Kanne, D. B.; Sivick, K. E.; Katibah, G. E.; Woo, S.-R.; Lemmens, E.; Banda, T.; Leong, J. J.; Metchette, K.; Dubensky, T. W.; Gajewski, T. F. Direct activation of STING in the tumor microenvironment leads to potent and systemic tumor regression and immunity. *Cell Rep.* **2015**, 11, 1018-1030.

⁸³ Corrales, L.; McWhirter, S. M.; Dubensky, T. W.; Gajewski, T. F. The host STING pathway at the interface of cancer and immunity. *J. Clin. Invest.* **2016**, 126, 2404-2411.

⁸⁴ Lioux, T.; Mauny, M.-A.; Lamoureux, A.; Bascoul, N.; Hays, M.; Vernejoul, F.; Baudru, A.-S.; Boullaran, C.; Lopes-Vicente, J.; Qushair, G.; Tiraby, G. Design, synthesis, and biological evaluation of novel cyclic adenosine-inosine monophosphate (cAIMP) analogs that activate stimulator of interferon genes (STING). *J. Med. Chem.* **2016**, 59, 10253-10267.

⁸⁵ Smola, M.; Gutten, O.; Dejmek, M.; Kožíšek, M.; Evangelidis, T.; Tehrani, Z. A.; Novotná, B.; Nencka, R.; Birkuš, G.; Rulíšek, L.; Boura, E. Ligand strain and its conformational complexity is a major factor in the binding of cyclic dinucleotides to STING protein. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, 60, 10172-10178.

de cGAMP fluorés produits par la méthode « one-pot », le MK-1454 (**119**) développé par Merck et l'E7766 (**120**) par Eisai H3 Biomedicine (Figure 15), ont rejoint l'ADU-S100 (**110**) dans les essais cliniques de phase II pour le développement de traitements anti-cancéreux.^{86,87} L'E7766 présente la particularité d'être ponté entre les N-6 de ses deux bases adénine par une chaîne but-2-ène, conférant ainsi à la structure encore plus de rigidité.

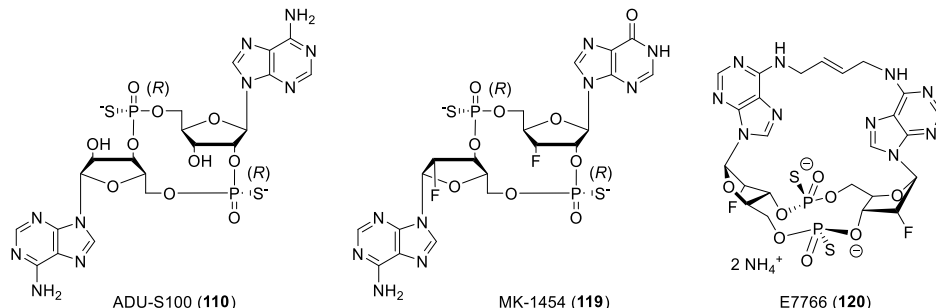


Figure 15. Analogues de thio-CDN les plus avancés en phase clinique

Afin de contrôler la stéréochimie des thiophosphates diesters lors de la synthèse d'analogues thio-CDN, Baran *et al.* ont développé les réactifs (*R*)- Ψ (**121**) et (*S*)- Ψ (**122**) permettant l'insertion diastéréosélective d'un dithiophosphate (Schéma 10).⁸⁸ Chaque réaction de couplage (S_N2) est alors sous contrôle complet de la stéréochimie du réactif Ψ utilisé : le (*R*)- Ψ (**121**), une fois inséré au nucléoside induit le diastéréoisomère (*S*) puis le diastéréoisomère (*R*) lors du couplage avec le second nucléoside ; inversement le (*S*)- Ψ (**121**), induit le diastéréoisomère (*R*) puis le diastéréoisomère (*S*) après le couplage.

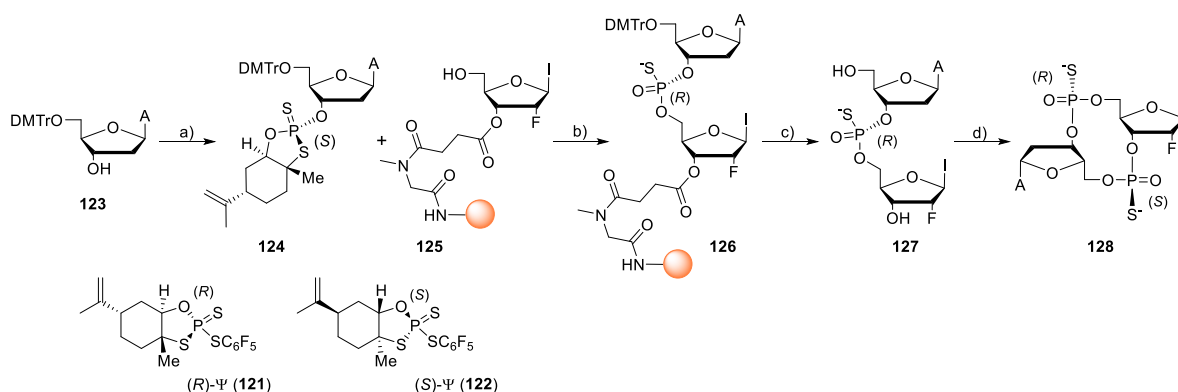


Schéma 10. Réactifs et conditions : (a) **121**, DBU, MeCN; (b) DBU, MeCN; (c-i) NH_4OH aq. conc.; -ii) DCA, CH_2Cl_2 ; (d) **122**, DBU, MeCN.

Puisqu'il a été montré qu'une conformation plus rigide des riboses est bénéfique pour l'activité des ligands de type CDN, des analogues de LNA-CDNs (Figure 16), portant des nucléosides bloquées (ou « locked

⁸⁶ Chang, W.; Altman, M. D.; Lesburg, C. A.; Perera, S. A.; Piesvaux, J. A.; Schroeder, G. K.; Wyss, D. F.; Cemerski, S.; Chen, Y.; DiNunzio, E.; Haidle, A. M.; Ho, T.; Kariv, I.; Knemeyer, I.; Kopinja, J. E.; Lacey, B. M.; Laskey, J.; Lim, J.; Long, B. J.; Ma, Y.; Maddess, M. L.; Pan, B.-S.; Presland, J. P.; Spooner, E.; Steinhuebel, D.; Truong, Q.; Zhang, Z.; Fu, J.; Addona, G. H.; Northrup, A. B.; Parmee, E.; Tata, J. R.; Bennett, D. J.; Cumming, J. N.; Siu, T.; Trotter, B. W. Discovery of MK-1454: a potent cyclic dinucleotide stimulator of interferon genes agonist for the treatment of cancer. *J. Med. Chem.* **2022**, 65, 5675-5689.

⁸⁷ Kim, D. S.; Endo, A.; Fang, F. G.; Huang, K. C.; Bao, X.; Choi, H. W.; Majumder, U.; Shen, Y. Y.; Mathieu, S.; Zhu, X.; Sanders, K.; Noland, T.; Hao, M. H.; Chen, Y.; Wang, J. Y.; Yasui, S.; TenDyke, K.; Wu, J.; Ingersoll, C.; Loiacono, K. A.; Hutz, J. E.; Sarwar, N. E7766, a macrocycle-bridged stimulator of interferon genes (STING) agonist with potent pan-genotypic activity. *ChemMedChem.* **2021**, 16, 1740-1743.

⁸⁸ Knouse, K. W.; deGruyter, J. N.; Schmidt, M. A.; Zheng, B.; Vantourout, J. C.; Kingston, C.; Mercer, S. E.; McDonald, I. M.; Olson, R. E.; Zhu, Y.; Hang, C.; Zhu, J.; Yuan, C.; Wang, Q.; Park, P.; Eastgate, M. D.; Baran, P. S. Unlocking P(V): reagents for chiral phosphorothioate synthesis. *Science* **2018**, 361, 1234-1238.

nucleic acid »), ont été synthétisés par la méthode « one-pot » de Jones.⁸⁹ Cet ensemble de composés, breveté par Aduro Biotech., présente des valeurs d' $EC_{50} < 20 \mu M$ (cellules THP-1) meilleures que celle de l'ADU-S100 ($EC_{50} = 41,5 \mu M$) et le 2',3'-cGAMP ($EC_{50} = 252,5 \mu M$). Ces analogues de LNA-CDNs ont ainsi un bon potentiel agoniste de STING, et certains d'entre eux ont montré une activité antitumorale prometteuse.

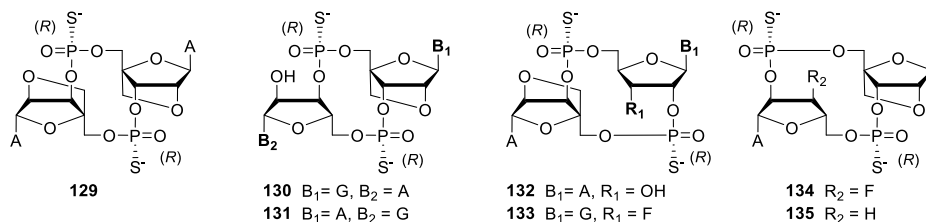


Figure 16. Analogues de LNA-CDNs

De son côté, Takeda Pharmaceuticals a synthétisé une série de CDNs incluant une pyrimidine carbocyclique dans l'intention de proposer des analogues avec une meilleure résistance face aux hydrolyses chimiques et enzymatiques, ainsi qu'une meilleure lipophilie pour traverser la membrane cellulaire. Après une étude de relation structure activité (RSA), le composé **136** (Figure 17), a été identifié comme un agoniste de STING prometteur. Dans les faits, cet analogue présente une affinité comparable au 2',3'-cGAMP avec le hSTING et a une activité cellulaire plus importante que l'ADU-S100 (Tableau 7).⁹⁰ Par ailleurs, sa perméabilité de la membrane cellulaire est environ 6 fois plus importante que celle de l'ADU-S100, faisant de lui l'agoniste de hSTING avec les meilleures propriétés ADME à ce jour.

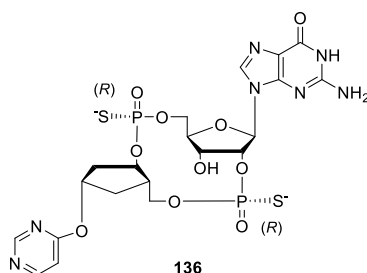


Figure 17. Analogue carba-nucléoside CDN

Composé	Complexation à STING ^[a]	Cellules THP-1	EC ₅₀ (μM)		Ratio de perméabilité ^[c]	t _{1/2} (min) dans le sérum humain
			HEK293-hSTING ^{R232} avec digitonine ^[b]	HEK293-hSTING ^{R232} sans digitonine		
2',3'-cGAMP (8)	0,05	16,0	0,028	19,0	67,8	35
ADU-S100 (110)	0,70	7,2	0,85	15,0	17,6	> 289
136	0,10	0,83	0,28	0,94	3,3	> 289

Tableau 7. [a] test de ligation compétitive à STING mesuré par TR-FRET ; [b] transfection du gène variant STING en présence de digitonine ; [c] Ratio = (EC_{50} HEK293-hSTING^{R232}(sans digitonine))/(EC_{50} HEK293-hSTING^{R232}(avec digitonine)).

⁸⁹ Kanne, D. B.; Ndubaku, C. O.; Bruml, J. R.; Le, T. N. L.; McKenna, J.; Tria, G. S.; Canham, S. Locked nucleic acid cyclic dinucleotide compounds and uses thereof. **2018**, WO2018009466.

⁹⁰ Vyskocil, S.; Cardin, D.; Ciavarrri, J.; Conlon, J.; Cullis, C.; England, D.; Gershman, R.; Gigstad, K.; Gipson, K.; Gould, A.; Greenspan, P.; Griffin, R.; Gulavita, N.; Harrison, S.; Hu, Z.; Hu, Y.; Hata, A.; Huang, J.; Huang, S.-C.; Janowick, D.; Jones, M.; Kolev, V.; Langston, S. P.; Lee, H. M.; Li, G.; Lok, D.; Ma, L.; Mai, D.; Malley, J.; Matsuda, A.; Mizutani, H.; Mizutani, M.; Molchanova, N.; Nunes, E.; Pusalkar, S.; Renou, C.; Rowland, S.; Sato, Y.; Shaw, M.; Shen, L.; Shi, Z.; Skene, R.; Soucy, F.; Stroud, S.; Xu, H.; Xu, T.; Abu-Yousif, A. O.; Zhang, J. Identification of novel carbocyclic pyrimidine cyclic dinucleotide STING agonists for antitumor immunotherapy using systemic intravenous route. *J. Med. Chem.* **2021**, 64, 6902-6923.

Outre les modifications portant sur le ribose, certains analogues conjuguent un CDN avec la biotine (**137**),⁷⁹ ou un agent fluorescent (**138** ; Figure 18),⁹¹ afin de créer des sondes permettant l'étude des interactions du 3',3'-cGAMP avec ses différents récepteurs, et notamment, avec STING. Ces couplages se situent en général sur l'hydroxyle en C-2 car celui-ci est connu pour ne pas être prépondérant dans les interactions avec la protéine. L'introduction de ces chaînes de nature lipophile améliore nettement la perméabilité cellulaire de ces analogues malgré la présence de charges sur le squelette. Cet effet de masquage a également été observé par le groupe Sperovio bioscience Inc.,⁹² où l'introduction d'une chaîne grasse sur le lien thiophosphate diester (usuellement chargé) permet de masquer la seconde charge portée par l'analogue **140**, ce qui a considérablement amélioré l'activité biologique du composé **139**, passant d'un EC₅₀ = 1,88 µM à un EC₅₀ = 6 nM pour **140**.

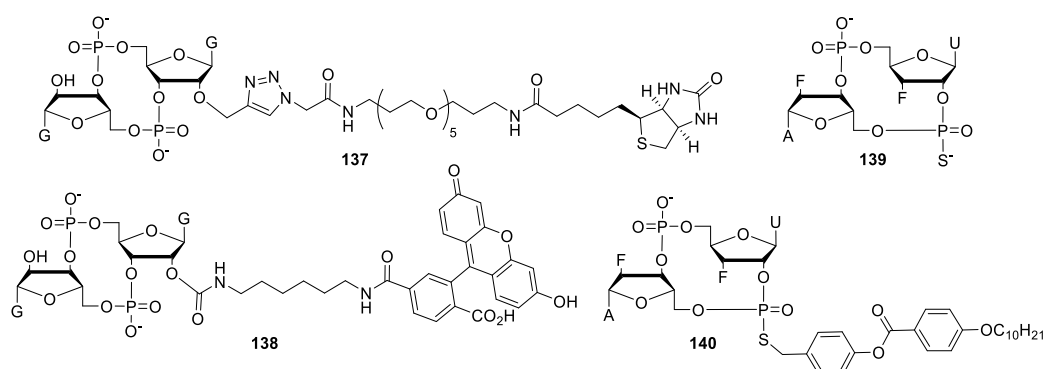


Figure 18. Analogues de CDNs greffés

Ainsi, la synthèse d'analogues de CDNs portant des liens phosphates diesters est depuis plus de dix ans un sujet majeur et très prolifique, où de nombreuses techniques de synthèse bien spécifiques ont été mises au point dans le but d'accéder à une grande diversité moléculaire. L'accent a été mis sur l'obtention d'analogues plus stables biologiquement, où les liens portés sont non ionisables (ou les charges masquée), avec des activités biologiques agonistes similaires ou supérieures à celle du 2',3'-cGAMP vis-à-vis des divers variants de hSTING. À l'heure actuelle, les SAR tendent à montrer que les meilleurs agonistes sont constitués de deux liens (*R_P*, *R_P*)-thiophosphates diesters, avec deux nucléobases puriques (deux adénines en particulier), et dont la conformation des riboses doit être assez rigide. Néanmoins, une SAR plus claire et précise reste à établir. Parmi toutes les structures d'analogues citées, une douzaine a montré un potentiel agoniste très prometteur en phase pré-clinique et sont actuellement évalués en phase clinique. Malheureusement, l'ADU-S100 et le MK-1454, principaux « hits » agonistes dans le développement de thérapies antitumorales, ont vu leur phase II d'essais clinique suspendue, dû au manque de données concluantes de leur utilisation en monothérapie chez l'homme. Ces derniers doivent être combinés avec le spartalizumab (inhibiteur PD-1) ou le pembrolizumab pour avoir un effet significatif sur les tumeurs des patients recrutés.^{46,47} De plus, leur administration pose des difficultés à cause de leur faible pharmacocinétique : seule la voie intraveineuse (IV) ou intra-tumorale (IT) ont été envisagées. Ces difficultés sont liées à leur caractère très polaire (faible pénétration cellulaire), de moyennes propriétés ADME et des temps de demi-vie trop courts dans le sérum.

⁹¹ Düvel, J.; Bertinetti, D.; Möller, S.; Schwede, F.; Morr, M.; Wissing, J.; Radamm, L.; Zimmermann, B.; Genieser, H.-G.; Jänsch, L.; Herberg, F. W.; Häussler, S. A chemical proteomics approach to identify c-di-GMP binding proteins in *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Microbiol. Methods* **2012**, 88, 229-236.

⁹² Lyer, R.; Sheri, A.; Padmanabhan, S.; Meher, G.; Zhou, S.; Challa, S.; Gimi, R.; Cleary, D. Compounds, compositions, and the methods for the treatment of disease. **2018**, WO2018009648.

Le composé **136** semble corriger ces défauts, mais ce dernier doit encore être évalué en phase pré-clinique avant de pouvoir être avéré comme plus efficace et passer en phase II. Par ailleurs, il a été soulevé des risques de suractivation généralisée de STING due à l'injection de ces CDNs, ce qui entraîne une toxicité liée à une réponse immunitaire trop importante et dérégulée chez le sujet. Ces observations, réalisées dans le cadre des essais cliniques, incitent à poursuivre la recherche de nouveaux analogues de CDNs ne portant plus de liens phosphates ou thiophosphates diesters afin que ceux-ci présentent une meilleure ADME que ceux mentionnés jusqu'ici.

III.2) Analogues de CDNs dépourvus de lien phosphate diester

Le remplacement des liens ionisables phosphates diesters sur les CDNs par des liens dits « neutres » ou non-ionisables reste très attractif. En effet, de tels analogues pourraient présenter une meilleure pénétration cellulaire, ainsi qu'une stabilité *in vivo* accrue, puisqu'ils seraient de nature plus « drug-like » que les analogues de CDNs décrits précédemment. En plus d'améliorer leurs propriétés ADME, leur administration ne serait plus restreinte à la voie intraveineuse ou intra-tumorale. Dans cet objectif, des structures d'analogues du 2',3'-cGAMP sans lien inter-nucléotidique de type phosphodiester ont été explorées par différents groupes avec des fonctions inter-nucléotidiques non-ionisables.

IFM Therapeutics a développé des 3',3'-diadénosines cycliques portant des liens de type urée (**141-a**), thiourée (**141-b**) et guanidine (**141-c**, **141-d**) avec des activités agonistes de l'ordre du 2',3'-cGAMP, les liaisons hydrogène étant conservées par la présence de ce groupement (Figure 19).⁹³ Ces derniers montrent une $EC_{50}^{141-a} = 25,4 \mu M$ et $EC_{50}^{141-b} = 22,2 \mu M$ sur l'activation du NF- κB (cellules THP-1), contre $39,1 \mu M$ chez le 2',3'-cGAMP. Pal et Chakraborty ont également synthétisé des 3',3'-CDNs de type di-pyrimidique (**142a-c**) comportant deux liens amides (la synthèse des analogues di-purique n'a pas abouti).⁹⁴ Ces derniers n'ont pas été évalués biologiquement sur STING.

Formé à partir de deux liens inter-nucléotidiques de type 1,2,3-triazole, l'analogue (**143**) proposé par Fujino *et al.* n'a pas été évalué biologiquement sur STING ; en revanche cet analogue a montré une conformation ouverte similaire à celle du 3',3'-c-di-GMP auquel il a été comparé par modélisation moléculaire.⁹⁵ Il en va de même pour les composés acycliques pontés par un 1,2,3-triazole (**144**) proposés par Fernicola *et al.* ; ces derniers miment parfaitement le 3',3'-c-di-GMP et inhibent l'activité des diguanylates cyclases, mais n'ont pas d'activité agoniste de la voie cGAS-STING.⁹⁶ Dialer *et al.* ont proposé la synthèse convergente (en 20 étapes) d'un analogue mixte (**145**) porteur d'un lien 1,2,3-triazole d'un côté, et d'un lien amide de l'autre. Ce dernier n'a montré aucune affinité envers la protéine STING du fait que sa conformation soit plus ouverte en solution que celle du 2',3'-cGAMP.⁹⁷ Ces exemples ne permettent pas, hélas, de clairement statuer sur l'utilisation du 1,2,3-triazole comme isostère du phosphate diester dans la synthèse de nouveaux CDNs. Enfin, un dimère cyclique de morpholinoside a été décrit par Kinzie *et al.* Toutefois, les auteurs n'ont pas réussi à intégrer les nucléobases dans des conditions de Vorbrüggen sur le substrat (**146**), marquant ainsi l'arrêt du projet et un manque de données sur l'intérêt de ce squelette par rapport à celui des CDNs naturels.⁹⁸ Contrairement aux synthèses décrites précédemment, les synthèses de ces dérivés sans lien phosphate sont particulièrement longues.

⁹³ (a) Gaffney, B. L.; Jones, R. A. Synthesis of c-di-GMP analogs with thiourea, urea, carbodiimide, and guanidinium linkages. *Org. Lett.* **2014**, 16, 158-161. (b) Glick, G.; Ghosh, S.; Roush, W. R.; Olhava, E. J.; Jones, R. Cyclic dinucleotide analogs for treating conditions associated with STING (Stimulator of Interferon Genes) activity. **2018**, WO2018045204.

⁹⁴ Pal, C.; Chakraborty, T. K. Synthesis of amide-linked cyclic dinucleotide analogues with pyrimidine bases. *Asian J. Org. Chem.* **2017**, 6, 1421-1427.

⁹⁵ Fujino, T.; Okada, K.; Isobe, H. Conformational restriction of cyclic dinucleotides with triazole-linked cyclophane analogues. *Tetrahedron Lett.* **2014**, 55, 2659-2661.

⁹⁶ Fernicola, S.; Torquati, I.; Paiardini, A.; Giardina, G.; Rampioni, G.; Messina, M.; Leoni, L.; Del Bello, F.; Petrelli, R.; Rinaldo, S.; Cappellacci, L.; Cutruzzola, F. Synthesis of triazole-linked analogues of c-di-GMP and their interactions with diguanylate cyclase. *J. Med. Chem.* **2015**, 58, 8269-8284.

⁹⁷ Dialer, C. R.; Stazzoni, S.; Drexler, D. J.; Müller, F. M.; Veth, S.; Pichler, A.; Okamura, H.; Witte, G.; Hopfner, K.; Carell, T. A Click-chemistry linked 2'3'-cGAMP analogue. *Chem. Eur. J.* **2019**, 25, 2089-2095.

⁹⁸ Kinzie, C. R.; Steele, A. D.; Pasciolla, S. M.; Wuest, W. M. Synthesis of cyclic dimeric methyl morpholinoside - a common synthetic precursor to cyclic dinucleotide analogs. *Tetrahedron Lett.* **2014**, 55, 4966-4968.

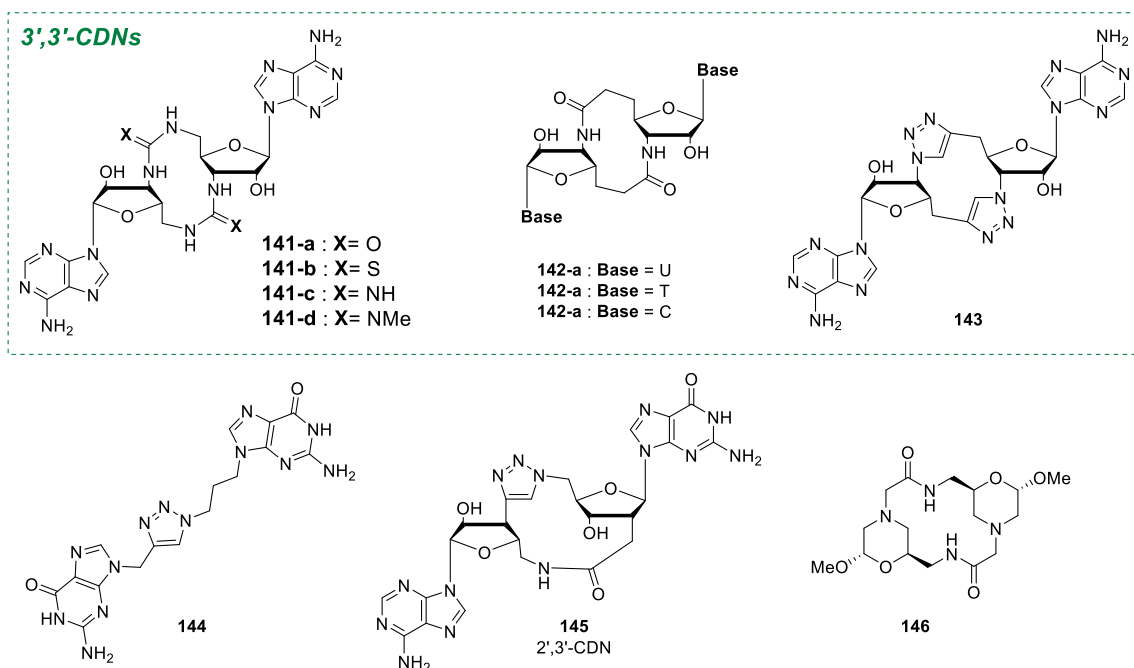


Figure 19. Analogues de CDNs au squelette non-phosphaté

Finalement, ce genre d'analogues de CDN a été assez peu exploré en comparaison des analogues anioniques de type phosphate ou thiophosphate, mais reste encore d'actualité. Il suscite également toujours de nombreux défis tels que le remplacement de ces groupements phosphates qui confèrent aux CDNs cette structure macrocyclique si particulière, mais qui à la fois est source de toutes les difficultés mentionnées précédemment. Les modifications de la structure du 2',3'-cGAMP (Figure 20), comme nous l'avons vu, peuvent s'effectuer sur les 3 points stratégiques que sont les liens inter-nucléotidiques, les riboses et les nucléobases, afin de proposer de nouvelles structures agonistes. Malgré le nombre important de travaux publiés sur le sujet, l'exploration autour de cette structure ne fait que commencer.

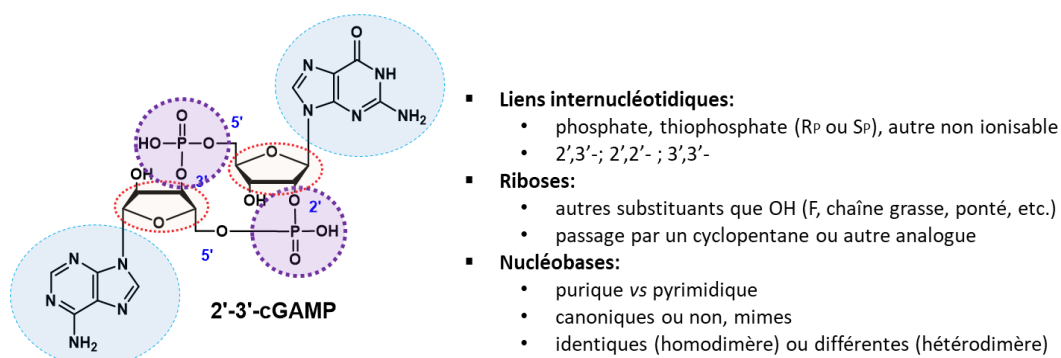


Figure 20. Modulations possibles du 2',3'-cGAMP

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes orientés vers la synthèse d'analogues de CDNs sans lien inter-nucléotidique phosphate ou thiophosphate, mais avec des liens non-ionisables apolaires, dans l'intention d'explorer cette famille d'analogues de CDNs.

IV) Agonistes de STING de nature hétérocyclique

Contrairement aux analogues anioniques de CDNs très hydrophiles, de petites molécules de nature aromatique (non-nucléotidique) présentent des propriétés de type « drug-like » bien plus intéressantes, notamment une perméabilité cellulaire accrue, tout en conservant la capacité d'être des agonistes (ou antagonistes) spécifiques et efficaces de STING. Le développement de ce genre de molécule suscite encore un réel engouement afin de proposer des substances avec de meilleures propriétés pharmacocinétiques et une facilité d'administration par voie systémique. Néanmoins, l'un des principaux enjeux reste la découverte de structures capables d'activer les différents isoformes de STING (les variants de hSTING) dans le but de développer cliniquement de potentiels agonistes (ou antagonistes) universels de cette protéine.⁴⁶

IV.1) Les agonistes de type flavonoïde

L'acide flavone-8-acétique ou FAA (**147**, Figure 21) est un dérivé de flavonoïde initialement synthétisé en tant que médicament anti-inflammatoire non stéroïdien présentant initialement des propriétés antitumorales.⁹⁹ De son échec en phase clinique, a abouti la conception de nouveaux dérivés cherchant à optimiser ses propriétés biologiques comme l'acide xanthénone-4-acétique ou XAA (**148**) et l'acide 5,6-diméthylxanthénone-4-acétique ou DMXAA (**149**).

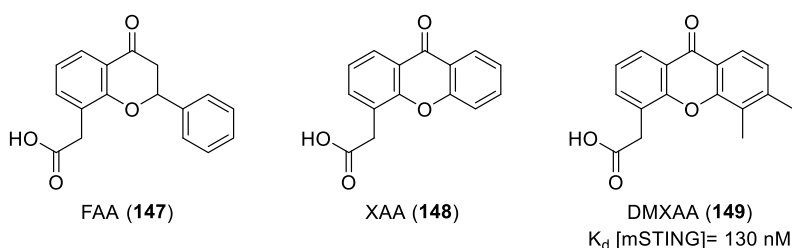


Figure 21. Analogues de type flavonoïde

Ces composés ont montré de puissantes activités antitumorales chez la souris, en impliquant la réponse immunitaire induite par STING.¹⁰⁰ Le DMXAA, combiné avec des agents chimiothérapeutiques (*i.e.* le paclitaxel ou le carboplatine), a réussi la phase II des essais cliniques chez l'homme pour le traitement du cancer du poumon « non à petites cellules » (ou NSCLC). Cependant, le traitement a été stoppé en début de phase III par manque avéré d'efficacité.¹⁰¹ Pour cause, il a été montré *a posteriori*, par des études cristallographiques, que le DMXAA se complexe uniquement avec le mSTING et non avec le hSTING.¹⁰² Ces études ont mis néanmoins en évidence un nouveau mode d'activation agoniste de la protéine STING par

⁹⁹ Corbett, T. H.; Bissery, M. C.; Wozniak, A.; Plowman, J.; Polin, L.; Tapazoglou, E.; Dieckman, J.; Valeriote, F. Activity of flavone acetic acid (NSC-347512) against solid tumors of mice. *Invest. New Drugs* **1986**, 4, 207-220.

¹⁰⁰ Baguley, B. C.; Ching, L. M. DMXAA: an antivasculature agent with multiple host responses. *Int. J. Radiat. Oncol., Biol., Phys.* **2002**, 54, 1503-1511.

¹⁰¹ (a) Prantner, D.; Perkins, D. J.; Lai, W.; Williams, M. S.; Sharma, S.; Fitzgerald, K. A.; Vogel, S. N. 5,6-Dimethylxanthone-4-acetic acid (DMXAA) activates stimulator of interferon gene (STING)-dependent innate immune pathways and is regulated by mitochondrial membrane potential. *J. Biol. Chem.* **2012**, 287, 39776-39788; (b) Baguley, B. C.; Siemann, D. W. Temporal aspects of the action of ASA404 (vadimezan: DMXAA). *Expet. Opin. Invest. Drugs* **2010**, 19, 1413-1425.

¹⁰² Gao, P.; Zillinger, T.; Wang, W.; Ascano, M.; Dai, P.; Hartmann, G.; Tuschl, T.; Deng, L.; Barchet, W.; Patel, D. J. Binding-pocket and lid-region substitutions render human STING sensitive to the species-specific drug DMXAA. *Cell Rep.* **2014**, 8, 1668-1676.

introduction de deux molécules de faible poids moléculaire (ici le DMXAA, Figure 22) au sein du site principal de complexation. Malgré les modulations menées sur le DMXAA par Hwang *et al.*,¹⁰³ aucun des nouveaux analogues synthétisés n'a montré de meilleure affinité vis-à-vis des divers variants de hSTING.

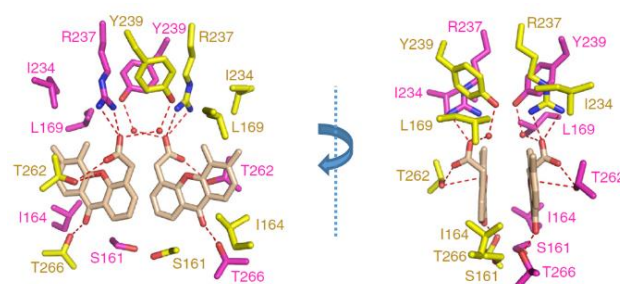


Figure 22. Complexation du DMXAA au sein de STING

L'histoire du 10-carboxyméthyl-9-acridanone, ou CMA (**150**, Figure 23), est similaire à celle du DMXAA. Ce composé a été découvert vers 1980 comme étant un inducteur d'IFN-I et a montré de bonnes activités antivirales chez les rongeurs.¹⁰⁴ Malheureusement, cette activité antivirale n'a pas été observée lors des essais cliniques réalisés chez l'homme. C'est en 2013 que Cavlar *et al.* ont montré l'incapacité du CMA à activer le hSTING, et sa haute spécificité à mSTING.¹⁰⁵ Tout comme le DMXAA, ce sont deux molécules de CMA qui se complexent au site principal de mSTING pour induire son activité.

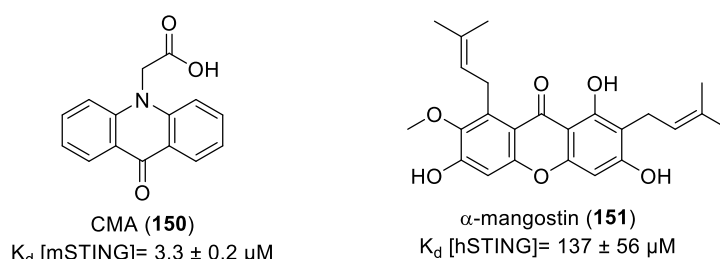


Figure 23.

Structurellement proche du DMXAA et du CMA, l'α-mangostin (**151**, Figure 23) est un flavonoïde présentant une activité antivirale et anticancéreuse par activation du hSTING.¹⁰⁶ Ce dernier est d'ailleurs plus affiné pour la protéine humaine que la protéine murine, et parmi les variants humains, le hSTING^{H232} est le plus sensible. Des tests qRT-PCR ont montré que l'α-mangostin a une activité de transcription de l'IFN-β supérieure à celle du 2',3'-cGAMP, mais que l'induction des gènes stimulés par l'IFN (*i.e.* ISG15 et CXCL10) est moindre par rapport au CDN. Cela a permis d'établir deux profils d'agonistes de STING : les agonistes à action rapide comme le 2',3'-cGAMP,³⁷ et les agonistes à action lente comme l'α-mangostin, où le pic d'induction des cytokines est plus long à être atteint mais où sa persistance dans le temps est plus durable.¹⁰⁵ L'affinité de cette molécule mesurée par MST montre un K_d = 137 ± 56 μM qui est 3 fois plus grand que celui du 2',3'-

¹⁰³ Hwang, J.; Kang, T.; Lee, J.; Choi, B. S.; Han, S. Design, synthesis, and biological evaluation of C7-functionalized DMXAA derivatives as potential human-STING agonists. *Org. Biomol. Chem.* **2019**, 17, 1869-1874.

¹⁰⁴ Taylor, J. L.; Schoenherr, C. K.; Grossberg, S. E.; High-yield interferon induction by 10-carboxymethyl-9-acridone in mice and hamsters. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1980**, 18, 20-26.

¹⁰⁵ Cavlar, T.; Deimling, T.; Ablasser, A.; Hopfner, K. P.; Hornung, V. Species-specific detection of the antiviral small-molecule compound CMA by STING. *EMBO J.* **2013**, 32, 1440-1450.

¹⁰⁶ Zhang, Y.; Sun, Z.; Pei, J.; Luo, Q.; Zeng, X.; Li, Q.; Yang, Z.; Quan, J. Identification of α-Mangostin as an agonist of human STING. *ChemMedChem.* **2018**, 13, 2057-2064.

cGAMP ($K_d = 42 \pm 15 \mu\text{M}$). Il est important de mentionner que, comme le DMXAA et le CMA, deux molécules d' α -mangostin se complexent au site actif pour induire l'activité agoniste.

Le groupe Silicon Swat a récemment proposé un travail de pharmaco-modulation autour du CMA qui a fourni une centaine de dérivés d'acide oxoacridinyl acétique (Figure 24).¹⁰⁷ Les composés ainsi produits sont à la fois affins du STING murin et humain, et le composé **152** présente un $\text{EC}_{50} < 50 \mu\text{M}$ sur les cellules THP-1 R232. Le chlorure porté en C-3 étant primordial pour la ligandation, les principales modulations ont été portées autour des positions C-4 et C-6. Le substrat fait preuve d'une grande tolérance puisque malgré la variété des substituants introduits, l'activité biologique des dérivés produits reste comparable à celle du composé **152**. Contrairement à la modification du motif acide éthylcarboxylique, l'introduction de groupements encombrés en position C-6 n'est pas défavorable pour l'activité agoniste des ligands.

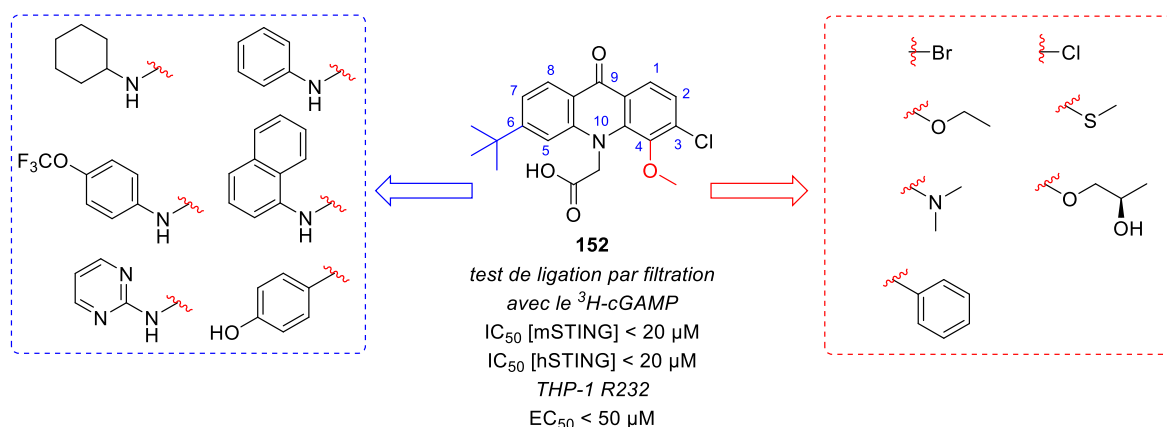


Figure 24. Diverses pharmaco-modulations du CMA

¹⁰⁷ Chamberlain, B. T.; Rice, J. M.; Jernigan, F. I.; Sherman, W.; Kulkarni, M.; Shechter, S.; Allen, B. K.; Tan, D.; Marino, K. A.; Lin, Z. Oxoacridinyl acetic acid derivatives and methods of use. **2019**, WO2019100061.

IV.2) Les agonistes de type amidobenzimidazole

En 2018, Ramanjulu *et al.* de GSK ont découvert l'agoniste de STING le plus prometteur de cette catégorie.³⁹ Lors d'un criblage à haut-débit évaluant la ligation compétitive au site actif du hSTING entre le 2',3'-cGAMP radiomarqué et de petites molécules, une série de dérivés d'amidobenzimidazoles ont été identifiés comme étant affins de STING, dont le ABZI-I (**153**, Figure 25) qui peut se lier à une sous-unité de la protéine homodimérique avec une IC_{50} de 14 μ M, contre une IC_{50} de 200 nM pour le 2',3'-cGAMP. On mesure une IC_{50} par ce test puisque la molécule prend la place du 3H -2',3'-cGAMP au sein de la protéine STING (compétition de ligation). On dose alors la quantité de 3H -2',3'-cGAMP filtrée, non liée à STING, pour connaître l'efficacité de remplacement de ce CDN par la molécule testée au sein du site. Une étude cristallographique montre qu'en réalité, ce sont deux molécules d'ABZI-I qui entrent dans le site actif pour se complexer à la protéine, ces dernières interagissant entre elles par π -stacking. De ce constat émergea l'idée de créer un dimère en reliant deux corps amidobenzimidazole par une simple chaîne butane, remplaçant la partie *N*-1-hydroxyphenetyl qui ne s'avère pas être un motif prépondérant pour la ligation. Le dimère d'amidobenzimidazole (diABZI-II, **154**) obtenu est alors beaucoup plus affiné de hSTING : l' IC_{50} associée à sa complexation compétitive avec le 3H -2',3'-cGAMP est passée à 20 nM. Diverses interactions entre le composé monomérique ABZI-I et hSTING ont été conservées lors du passage au diABZI-II : aucun résidu d'acide aminé n'interagit avec la chaîne aliphatique servant de lien lors de la ligation. De plus, le composé **154** ($EC_{50}^{app} = 3,1 \pm 0,6 \mu$ M) induit une sécrétion d'IFN- β dose-dépendante chez les PMBCs humains 18 fois plus importante que celle du 2',3'-cGAMP ($EC_{50}^{app} = 53,9 \pm 5 \mu$ M), montrant ainsi une activité agoniste nettement supérieure à celle du CDN.

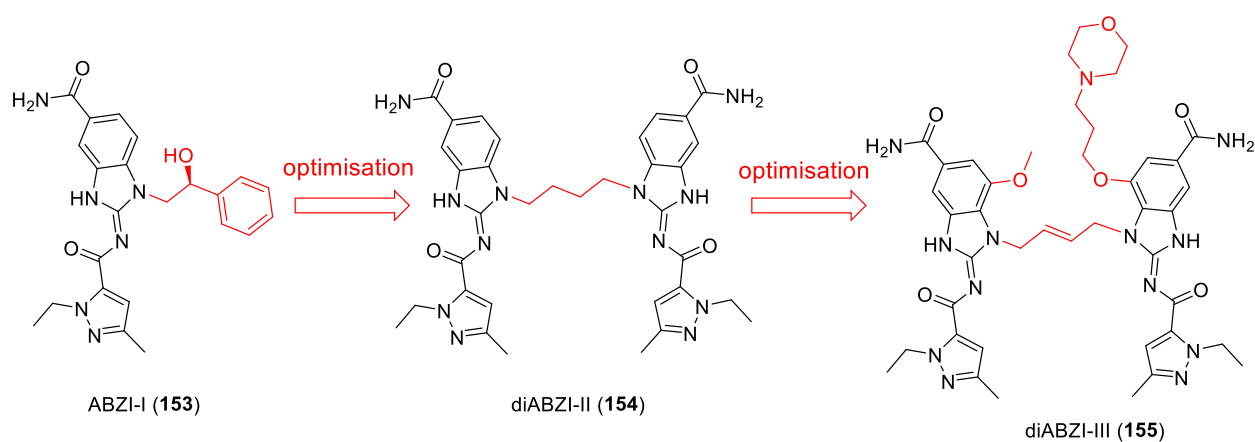


Figure 25. Analogues de type amidobenzimidazole

Par la suite, un travail de pharmaco-modulations a mené au diABZI-III (**155**), qui est dorénavant un agoniste 400 fois plus puissant que le 2',3'-cGAMP sur hSTING ($EC_{50}^{app} = 190$ nM), ses isoformes et mSTING. L'injection intraveineuse de cette substance a montré une remarquable inhibition de la croissance tumorale chez des souris de type BALB/c présentant des tumeurs colorectales. De manière surprenante, la ligation du diABZI-III à hSTING n'entraîne pas la fermeture de la protéine : au contraire celui-ci garde une conformation ouverte en maintenant une activité biologique, montrant ainsi que le repliement de cette dernière n'est pas obligatoire pour l'activation de la protéine.

IV.3) Agonistes issus de l'acide benzo[b]thiophène 2-carboxylique

Récemment, deux rapports ont décrit le potentiel d'un nouvel agoniste de STING développé chez Merck pouvant être administré par de multiples voies dont la voie orale. Pan *et al.* ont identifié le MSA-2 (acide benzothiophène oxobutanoïque, **160**, Figure 26) comme agoniste de STING par un criblage de 2,4 millions de composés sur des monocytes THP-1.¹⁰⁸ Le MSA-2 (**160**) est un composé qui possède également une bonne perméabilité cellulaire, une sélectivité vis-à-vis de la protéine STING et permet la phosphorylation de TBK1 et de IRF3 de manière dose dépendante. La manière dont ce ligand va activer STING est originale : ce dernier se dimérise préalablement en solution par interactions de type π -stacking entre deux unités aromatiques, puis le dimère préformé va se complexer à la protéine dans le site actif principal. Par cette interaction non-covalente entre deux molécules de MSA-2, la conformation fermée de hSTING est d'autant plus stabilisée.

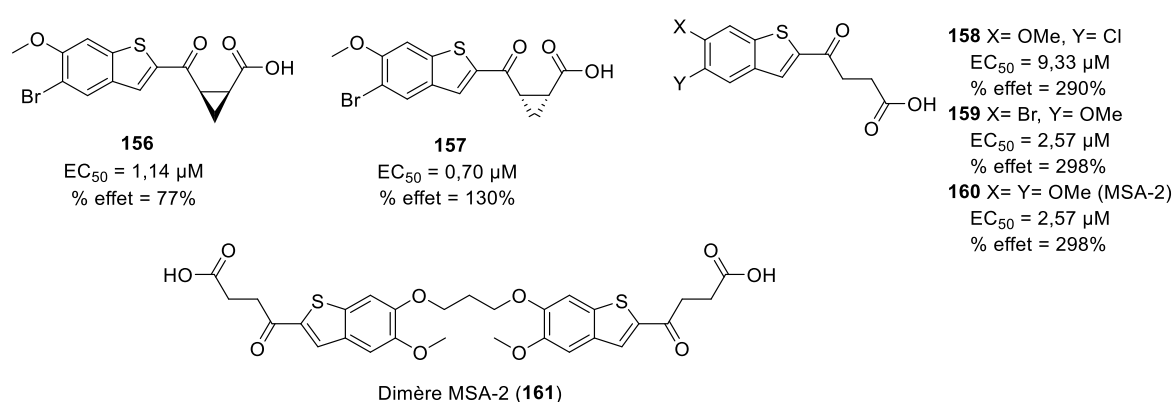


Figure 26. Dérivés de benzothiophène. EC_{50} mesurée par test de ligand par filtration avec le 3H -cGAMP. La valeur % effet représente la capacité d'induction du composé testé à induire la sécrétion d'IFN- β chez les cellules THP-1 par rapport au 2',3'-cGAMP à 30 μM .

Plusieurs tentatives de jonction entre deux motifs (**160**) par de simples liens alkyles (i.e. une chaîne propane) en remplaçant les deux groupes 5-méthoxy (i.e. Dimère MSA-2 (**161**)) jugés non prépondérants dans les interactions avec le site actif, n'ont pas permis d'obtenir un agoniste plus actif (comme dans le cas précédent du diABZI). Actuellement, cette molécule est la seule étant décrite comme pharmacologiquement active par une dimérisation intermoléculaire réversible. Par ailleurs, la fonction acide carboxylique a toute son importance puisqu'elle permet à ce composé d'être plus ou moins hydrophobe en fonction du pH environnant. Cela suggère que la molécule aurait une meilleure perméabilité cellulaire dans le micro-environnement tumoral où le pH du plasma est légèrement plus acide.¹⁰⁹ Lors d'une étude, il a été effectivement montré que chez des souris atteintes de tumeurs sous-cutanées MC38, la concentration en MSA-2 est nettement supérieure au sein de la tumeur que dans le plasma ou d'autres tissus non-tumoraux. Une forte production locale d'IFN- β et de cytokines pro-inflammatoires a également été observée. Ce composé est par conséquent très prometteur puisqu'il exploite la signature biologique de l'environnement tumoral (par exemple le pH, milieu oxydant, etc.) afin d'activer localement la protéine STING. Ce phénomène

¹⁰⁸ Pan, B.-S.; Perera, S. A.; Piesvaux, J. A.; Presland, J. P.; Schroeder, G. K.; Cumming, J. N.; Trotter, B. W.; Altman, M. D.; Buevich, A. V.; Cash, B.; Cemerski, S.; Chang, W.; Chen, Y.; Dandliker, P. J.; Feng, G.; Haidle, A.; Henderson, T.; Jewell, J.; Kariv, I.; Knemeyer, I.; Kopinja, J.; Lacey, B. M.; Laskey, J.; Lesburg, C. A.; Liang, R.; Long, B. J.; Lu, M.; Ma, Y.; Minnihan, E. C.; O'Donnell, G.; Otte, R.; Price, L.; Rakhilina, L.; Sauvagnat, B.; Sharma, S.; Tyagarajan, S.; Woo, H.; Wyss, D. F.; Xu, S.; Bennett, D. J.; Addona, G. H. An Orally available non-nucleotide STING agonist with antitumor activity. *Science* **2020**, 369, eaba6098.

¹⁰⁹ Vaupel, P.; Kallinowski, F.; Okunieff, P. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors; a review. *Cancer Res.* **1989**, 49, 6449-6465.

permet de réduire les effets secondaires tels que l'inflammation systémique, ou la toxicité, qui sont dus à une distribution et une activité aléatoires de la substance dans l'organisme.

IV.4) Autres agonistes de nature hétérocyclique

Chin et coll. ont également suivi une démarche de criblage biologique de 100 000 composés commerciaux afin d'identifier des composés agonistes.¹¹⁰ Sur cette chimiothèque, le SR-001 (**162**, Figure 27) a montré une bonne induction de l'IFN-I avec une $EC_{50} = 1.1 \mu M$ (sur des cellules THP-1) avec une bonne affinité pour hSTING par test de DSF. Cependant, lorsque le composé SR-001 a été resynthétisé par le groupe, celui-ci ne présentait plus d'activité biologique. En réalité, le produit commercialisé est accompagné d'une quantité non négligeable de produit de dé-estérification : l'acide carboxylique SR-012 (**163**). Cela a suggéré que le SR-001 agit comme une prodrogue, la fonction ester masquant l'acide carboxylique ionisable à pH physiologique pour passer la membrane cellulaire. L'acide carboxylique est libéré par hydrolyse dans le cytosol et ce dernier va activer STING. Cette hypothèse a été vérifiée et c'est bel et bien le SR-012 qui a la capacité de se complexer au hSTING et mSTING. En revanche, aucune activité biologique n'a été observée lors des tests *in vitro* à cause du caractère trop hydrophile (et ionisable) de cette molécule qui lui confère une faible perméabilité membranaire. Un travail d'optimisation du SR-012 (**163**) par Chin et al. a été entrepris et a consisté en l'amélioration du caractère lipophile de ce composé, tout en conservant la fonction acide carboxylique. En substituant deux protons du système aniline par deux atomes de fluor, la biodisponibilité du SR-717 (**164**) est augmentée ($EC_{50} = 2,2 \mu M$ sur cellules ISG-THP-1) et ce dernier peut être administré plus aisément par voie systémique. Cet analogue est affiné de tous les variants de hSTING et de mSTING et se complexe sous forme de dimère dans le site actif de STING. Les études cristallographiques ont permis d'observer que les interactions entre ce ligand et la protéine sont quasi similaires à celles du 2',3'-cGAMP avec le site. Si le SR-717 a montré une activité anticancéreuse très prometteuse, le SR-301 qui est un analogue présentant une meilleure biodisponibilité, n'a montré qu'une modeste activité antitumorale.

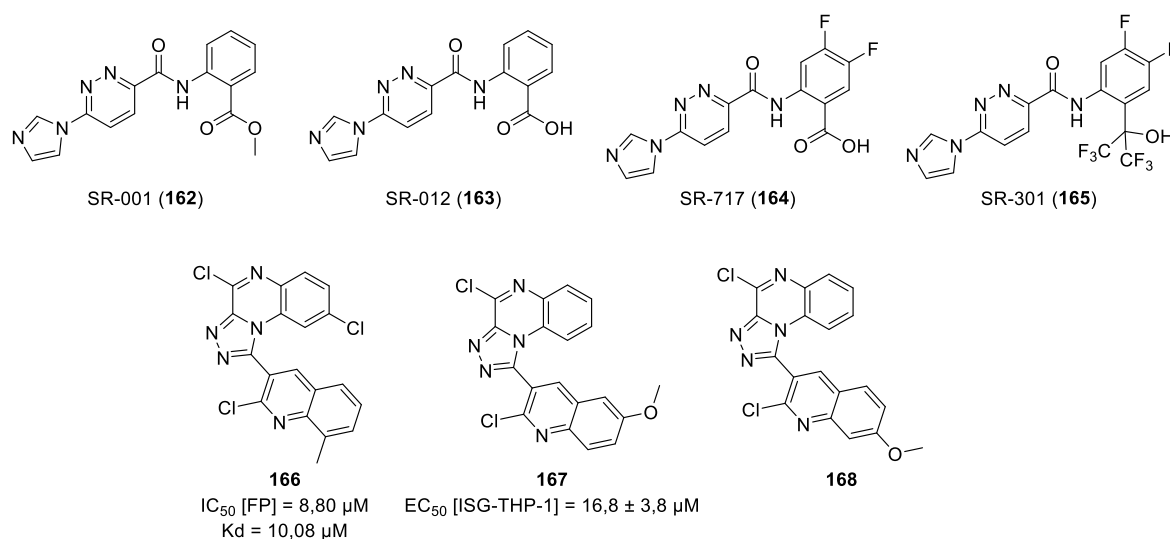


Figure 27. Autres structures agonistes de STING

¹¹⁰ Chin, E. N.; Yu, C.; Vartabedian, V. F.; Jia, Y.; Kumar, M.; Gamo, A. M.; Vernier, W.; Ali, S. H.; Kissai, M.; Lazar, D. C.; Nguyen, N.; Pereira, L. E.; Benish, B.; Woods, A. K.; Joseph, S. B.; Chu, A.; Johnson, K. A.; Sander, P. N.; Martínez-Peña, F.; Hampton, E. N.; Young, T. S.; Wolan, D. W.; Chatterjee, A. K.; Schultz, P. G.; Petrassi, H. M.; Teijaro, J. R.; Lairson, L. L. Antitumor activity of a systemic STING-activating non-nucleotide cGAMP mimetic. *Science* **2020**, 369, 993-999.

Hou *et al.* ont développé un dérivé de triazoloquinoxaline (**167**) agoniste de STING à partir d'un criblage virtuel d'une chimiothèque de 210 646 structures.¹¹¹ Après différentes étapes de tri, 64 candidats ont été sélectionnés et évalués biologiquement par test de dosage à polarisation de fluorescence (mesure d'IC₅₀), puis de DSF. Le composé **166** a été sélectionné comme le composé au meilleur potentiel. Sur la base d'une étude de complexation virtuelle de **166** sur hSTING, il a été décidé de substituer le noyau quinoléine par un groupe méthoxy en position C-6 (**167**) et C-7 (**168**). Le composé **167** a présenté la meilleure activité agoniste avec une EC₅₀ = 16,8 ± 3,8 µM sur les cellules ISG-THP-1, qui est comparable à celui du 2',3'-cGAMP (EC₅₀ = 9,1 ± 2,2 µM).

¹¹¹ Hou, H.; Yang, R.; Liu, X.; Wu, X.; Zhang, S.; Chen, K.; Zheng, M. Discovery of triazoloquinoxaline as novel STING agonists via structure-based virtual screening. *Bioorg. Chem.* **2020**, 100, 103958-103966.

V) Les agonistes indirects de STING

D'autres dérivés de nature aromatique ont la capacité d'induire une réponse immunitaire dépendante de STING (Figure 28). Toutefois, dans l'exemple du G10 (**169**) et du C11 (**170**), aucune affinité particulière de ces ligands vis-à-vis du hSTING n'a pu être observée lors de test de DSF.^{112,113} De plus, s'ils induisent la sécrétion d'IFN- β dépendante de l'activation de STING chez des fibroblastes, la transcription génique liée à l'expression du NF- κ B n'a pas été observée. Ceci laisse penser que ces composés stimulent des PPRs en amont de STING et non la protéine même. Il en va de même pour les composés DSDP (**171**) et BNBC (**172**) : ces derniers induisent la sécrétion d'interféron et de cytokines dépendante de l'activation de hSTING, mais le manque de preuves indirectes suggère que ces agonistes agissent en amont de la protéine.^{114,115} Ces molécules sont alors considérées comme des agonistes indirects de STING, car l'activité biologique qu'ils provoquent est très caractéristique d'une activation de celui-ci. Par ailleurs, leur activité antivirale reste remarquable.

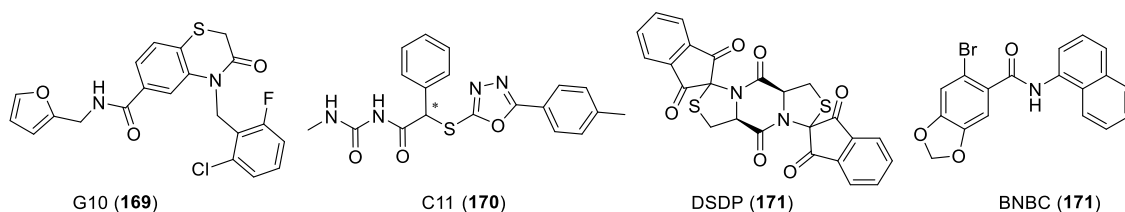


Figure 28. Agonistes indirects de STING

Cette vision d'ensemble sur les différents agonistes de STING non-nucléotidiques montre à quel point trouver une structure spécifique à la protéine est ardu, et que celle-ci soit capable d'activer l'ensemble des variants de hSTING ainsi que mSTING complique d'autant plus la tâche. Néanmoins, l'ensemble de ces structures ont été trouvées par un criblage biologique préalable identifiant un squelette de base qui est par la suite modulé afin d'obtenir des dérivés plus affins de STING. Si cette approche a montré son efficacité, très peu de structures ont été identifiées par criblage virtuel jusqu'à aujourd'hui. Or cette seconde approche mériterait plus d'attention pour la conception de nouveaux ligands visant STING, d'autant plus que la structure de la protéine est connue. D'autre part, la conception de dimère à partir d'un motif aromatique présentant une activité biologique semble très pertinente car l'ensemble des petites molécules testées se complexent à deux motifs au sein de la protéine. Néanmoins, la formation de dimère n'est pas forcément gage d'amélioration de l'activité biologique et affinité du ligand comme nous avons pu le constater. Enfin, les molécules ayant montré une activité agoniste ont des structures tellement diverses qu'il est possible

¹¹² Sali, T. M.; Pryke, K. M.; Abraham, J.; Liu, A.; Archer, I.; Broeckel, R.; Staverosky, J. A.; Smith, J. L.; Al-Shammari, A.; Amsler, L.; Sheridan, K.; Nilsen, A.; Streblow, D. N.; DeFilippis, V. R. Characterization of a novel human-specific STING agonist that elicits antiviral activity against emerging alphaviruses. *PLoS Pathog.* **2015**, 11, e1005324.

¹¹³ Gall, B.; Pryke, K.; Abraham, J.; Mizuno, N.; Botto, S.; Sali, T. M.; Broeckel, R.; Haese, N.; Nilsen, A.; Placzek, A.; Morrison, T.; Heise, M.; Streblow, D.; DeFilippis, V. R. Emerging alphaviruses are sensitive to cellular states induced by a novel small-molecule agonist of the STING pathway. *J. Virol.* **2018**, 92, e01913-17.

¹¹⁴ Liu, B.; Tang, L.; Zhang, X.; Ma, J.; Sehgal, M.; Cheng, J.; Zhang, X.; Zhou, Y.; Du, Y.; Kulp, J.; Guo, J.-T.; Chang, J. A cell-based high throughput screening assay for the discovery of cGAS-STING pathway agonists. *Antiviral Res.* **2017**, 147, 37-46.

¹¹⁵ Zhang, X.; Liu, B.; Tang, L.; Su, Q.; Hwang, N.; Sehgal, M.; Cheng, J.; Ma, J.; Zhang, X.; Tan, Y.; Zhou, Y.; Duan, Z.; DeFilippis, V. R.; Viswanathan, U.; Kulp, J.; Du, Y.; Guo, J.-T.; Chang, J. Discovery and mechanistic study of a novel human-stimulator-of-interferon-genes agonist. *ACS Infect. Dis.* **2019**, 5, 1139-1149.

d'explorer divers squelettes aromatiques qui ne sont pas encore rapportés sur le sujet. Ainsi, la synthèse de ligands visant la protéine STING dans le cadre de cette thèse s'appuie sur une approche orientée vers la diversité (ou DOS pour « Diversity Oriented Synthesis ») autour de deux charpentes aromatiques que sont le 1*H*-benzimidazole et l'oxazolo[5,4-*d*]pyrimidine.

VI) Les antagonistes de STING

Si la détection d'ADN, à la fois endogène et exogène, est cruciale pour la protection de l'organisme contre les agents infectieux et la formation de tumeurs, elle est soumise à de nombreuses perturbations. En effet, ces dernières impactent directement l'activité des senseurs associés, telle la voie cGAS-STING. Celle-ci est d'ailleurs très vulnérable à de simples déséquilibres cellulaires internes, qui peuvent entraîner une activation inadéquate de la protéine STING et, par conséquent, de la réponse immunitaire. Ces dérégulations peuvent être pérennes dans le temps (ou chroniques) et entraîner un emballement continu de l'état inflammatoire, néfaste pour l'organisme, qui est à l'origine de nombreuses maladies auto-immunes.³⁴ D'autre part, des mutations génétiques sont également à l'origine d'un dysfonctionnement intrinsèque de la protéine STING, notamment une hyperactivation, qui se traduit par des symptômes auto-inflammatoires chroniques, ou l'apparition de cancers.

Si jusqu'à présent, l'intérêt a été porté sur le développement de ligands agonistes de STING pour le développement d'immunothérapies, on s'est aperçu que les traitements basés sur STING présentent une ambivalence sur les effets biologiques qu'ils induisent. En effet, une fois injectés, les nouveaux agonistes du 2',3'-cGAMP déclenchent des réponses immunitaires incontrôlées et inappropriées dans des régions saines de l'organisme. Ces réponses immunitaires anormales entraînent ainsi un état inflammatoire nocif pour le receveur du traitement. Pour contrer ces effets indésirables et également traiter bon nombre de maladies liées au dérèglement de l'immunité innée, l'utilisation d'antagonistes de STING est nécessaire.¹¹⁶ Si l'intérêt pour ces molécules est assez récent, les mécanismes d'inhibition de la protéine sont en partie connus. On distingue deux grandes classes de composés (Figure 29) :³⁴ ceux qui visent la Cys91 impliquée dans la palmitoylation de hSTING, et ceux qui ciblent le site de complexation des CDNs. La palmitoylation de STING, qui consiste en la liaison de la protéine à un acide gras, se déroule une fois la translocation sur l'appareil de Golgi effectuée : elle enclenche ainsi la formation d'oligomères de STING sur la membrane du Golgi. Ces derniers induisent ensuite la sécrétion d'IFN-I.¹¹⁷ En bloquant cette étape (ou la translocation de STING de l'ER à l'appareil de Golgi), la cascade de la réponse immunitaire innée est alors coupée.

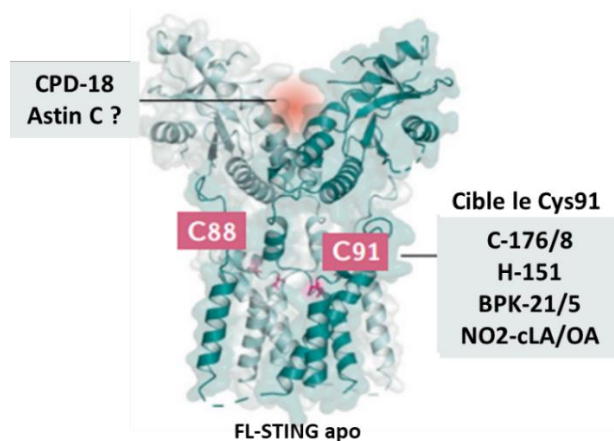


Figure 29. Sites de la protéine STING ciblés par les inhibiteurs³⁴

¹¹⁶ Zhao, J.; Xiao, R.; Zeng, R.; He, E.; Zhang, A. Small molecules targeting cGAS-STING pathway for autoimmune disease. *Eur. J. Med. Chem.* **2022**, 238, 114480-114489.

¹¹⁷ Hansen, A. L.; Mukai, K.; Schopfer, F. J.; Taguchi, T.; Holm, C. K. STING palmitoylation as a therapeutic target. *Cell Mol. Immunol.* **2019**, 16, 236–241.

Les nitrofuranes comme le C-176 (**175**), C-178 (**176**) ont été les premiers inhibiteurs identifiés de la protéine STING (Figure 30).¹¹⁸ Ces derniers bloquent l'étape de palmitylation de STING en formant une liaison covalente par addition 1,4 de Michael avec le résidu de cystéine 91 (Schéma 11) ; le site est alors bloqué de manière irréversible. Ce mode d'inhibition est partagé par les molécules d'acide gras nitré NO₂-Fas (**178**),¹¹⁶ ou les acrylamides BPK-21 (**179**) ou BPK-25 (**180**),¹¹⁹ qui présentent tous un accepteur de Michael. Le composé H-151 (**177**) interagit également de manière covalente avec STING au travers de la Cys91 (d'après les études de masse réalisées par Haag *et al.*).¹¹⁷

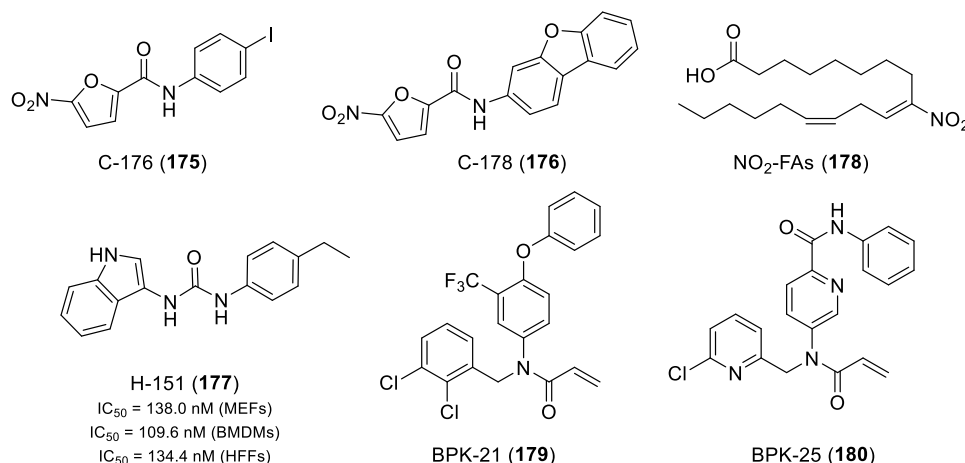
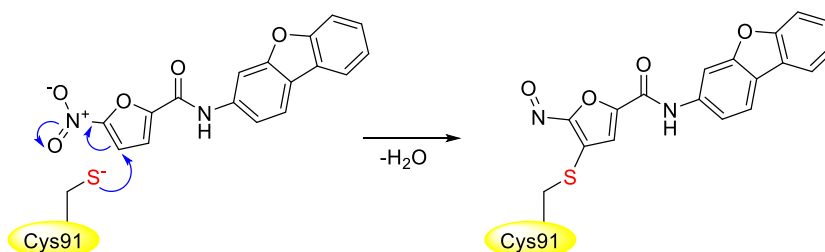


Figure 30. Inhibiteurs de la palmitylation de hSTING (site de la Cys91)



Contrairement aux autres composés, l'Astin C (**172**) est supposée inhiber le hSTING par occupation du site actif principal,¹²⁰ mais cela n'a malheureusement pas été démontré, laissant planer des incertitudes quant au mode d'interaction de cette molécule.

¹¹⁸ Haag, S. M.; Gulen, M. F.; Reymond, L.; Gibelin, A.; Abrami, L.; Decout, A.; Heymann, M.; van der Goot, F. G.; Turcatti, G.; Behrendt, R.; Ablasser, A. Targeting STING with covalent small-molecule inhibitors. *Nature* **2018**, 559, 269-273.

¹¹⁹ Vinogradova, E. V.; Zhang, X.; Remillard, D.; Lazar, D. C.; Suciu, R. M.; Wang, Y.; Bianco, G.; Yamashita, Y.; Crowley, V. M.; Schafroth, M. A.; Yokoyama, M.; Konrad, D. B.; Lum, K. M.; Simon, G. M.; Kemper, E. K.; Lazear, M. R.; Yin, S.; Blewett, M. M.; Dix, M. M.; Nguyen, N.; Shokhirev, M. N.; Chin, E. N.; Lairson, L. L.; Melillo, B.; Schreiber, S. L.; Forli, S.; Tejjaro, J. R.; Cravatt, B. F. An activity-guided map of electrophile-cysteine interactions in primary human T cells. *Cell* **2020**, 182, 1009-1026.

¹²⁰ Li, S.; Hong, Z.; Wang, Z.; Li, F.; Mei, J.; Huang, L.; Lou, X.; Zhao, S.; Song, L.; Chen, W.; Wang, Q.; Liu, H.; Cai, Y.; Yu, H.; Xu, H.; Zeng, G.; Wang, Q.; Zhu, J.; Liu, X.; Tan, N.; Wang, C. The cyclopeptide Astin C specifically inhibits the innate immune CDN sensor STING. *Cell Rep.* **2018**, 25, 3405-3421.

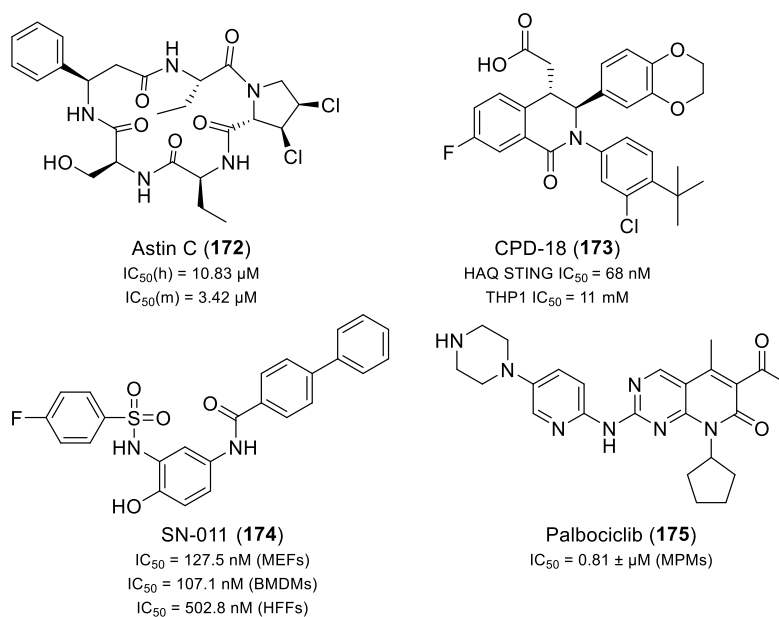


Figure 31. Inhibiteurs non-covalents de hSTING

Les inhibiteurs non-covalents comme le CPD-18 (**173**),¹²¹ SN-011 (**174**),¹²² et Palbociclib (**175**, Figure 31),¹²³ occupent le site actif principal de la protéine et s'y lient de manière réversible. Il y a donc compétition de complexation entre ces ligands et les agonistes naturels comme le 2',3'-cGAMP. Les activités biologiques de ces composés, comme dans le cas des CDNs, ne sont pas comparables directement par leurs mesures d' IC_{50} associées du fait que celles-ci dépendent de la souche cellulaire et de la nature du test réalisé

¹²¹ Siu, T.; Altman, M. D.; Baltus, G. A.; Childers, M.; Ellis, J. M.; Gunaydin, H.; Hatch, H.; Ho, T.; Jewell, J.; Lacey, B. M.; Lesburg, C. A.; Pan, B.-S.; Sauvagnat, B.; Schroeder, G. K.; Xu, S. Discovery of a novel cGAMP competitive ligand of the inactive form of STING. *ACS Med. Chem. Lett.* **2019**, 10, 92-97.

¹²² Hong, Z.; Mei, J.; Li, C.; Bai, G.; Maimaiti, M.; Hu, H.; Yu, W.; Sun, L.; Zhang, L.; Cheng, D.; Liao, Y.; Li, S.; You, Y.; Sun, H.; Huang, J.; Liu, X.; Lieberman, J.; Wang, C. STING inhibitors target the cyclic dinucleotide binding pocket. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2021**, 118, e2105465118.

¹²³ Gao, J.; Zheng, M.; Wu, X.; Zhang, H.; Su, H.; Dang, Y.; Ma, M.; Wang, F.; Xu, J.; Chen, L.; Liu, T.; Chen, J.; Zhang, F.; Yang, L.; Xu, Q.; Hu, X.; Wang, H.; Fei, Y.; Chen, C.; Liu, H. CDK inhibitor Palbociclib targets STING to alleviate autoinflammation. *EMBO Rep.* **2022**, 23, e53932.

Chapitre II] Objectifs de thèse et plan de travail

Dans le contexte actuel où de nombreux virus émergents menacent nos sociétés, développer de nouveaux traitements antiviraux pour lutter contre les zoonoses est une nécessité. Ce développement est alors possible par une identification et une connaissance plus approfondie des mécanismes à l'œuvre lors de l'apparition de ces maladies, en particulier à l'interface homme-animal-environnement. L'une des principales approches consisterait à se servir du système immunitaire inné, qui dispose naturellement des outils de détection et d'élimination des agents pathogènes, pour traiter les infections virales. Cette stratégie thérapeutique repose sur la stimulation des voies de signalisation cellulaires propres à la réponse immunitaire. Parmi toutes les cibles possibles, une retient particulièrement notre attention, notamment par son rôle central dans la détection et réponse antivirale : la protéine STING. En effet, cette dernière est au carrefour de la détection des virus à ADN, à ARN et les rétrovirus, et suscite un vif intérêt pour le développement de nouvelles immunothérapies, et thérapies antivirales. Récemment, des essais *in vitro* et *in vivo* contre le SARS-CoV-2, ont mis en exergue l'activité antiviral de cette voie lorsque celle-ci est stimulée par une substance agoniste (ici le diABZI) : le résultat est alors une inhibition de l'infection par le pathogène. Il y a donc un vif potentiel à développer de nouveaux agonistes spécifiques de cette voie de signalisation.

L'objectif de cette thèse consiste en conception et la synthèse de nouveaux ligands, visant la protéine STING de la voie de signalisation cellulaire éponyme cGAS-STING. Cette exploration se déroule sur deux familles de composés : la famille des dinucléotides cycliques (CDNs) et la famille des dérivés hétérocycliques.

Dans le troisième chapitre, nous détaillerons la synthèse d'analogues de dinucléotides cycliques portant des liens inter-nucléotidiques non ionisables (ou neutres), *i.e.* un lien triazole et une chaîne carbonée insaturée. Ces liens ont été choisis pour améliorer la perméabilité cellulaire des analogues synthétisés. En effet, le 2',3'-cGAMP et ses analogues thiophosphates ont de faibles ADME (ou pharmacocinétiques) en raison de leur caractère très polaire (présence de charges), ce qui les empêche d'accéder au cytosol où se trouve STING. De plus, les liens phosphates sont aussi responsables de leur instabilité enzymatique. Par ailleurs, leur nature non « drug-like » rend leur administration plus difficile. Deux approches synthétiques ont été étudiées dans l'ordre suivant :

- **La première approche** (Schéma 12) repose sur la synthèse convergente d'un macrocycle à partir d'un « pool chiral » osidique. Les nucléobases ont été introduites en fin de synthèse pour offrir de la diversité moléculaire par la formation d'hétérodimères et d'homodimères de 3',3'-CDN. Le macrocycle est alors construit par (1) une cycloaddition [1,3] dans les conditions de Huisgen; (2) une macrocyclisation *via* une métathèse cyclisante catalysée au ruthénium. La dernière étape clé est (3) le couplage des bases nucléiques avec le macrocycle par *N*-glycosylation dans les conditions de Vorbrüggen. L'insertion peut se faire étape par étape pour former des hétérodimères, ou en une seule étape pour former des hétérodimères. Le principal verrou identifié de cette synthèse est la réaction de *N*-glycosylation de Vorbrüggen.

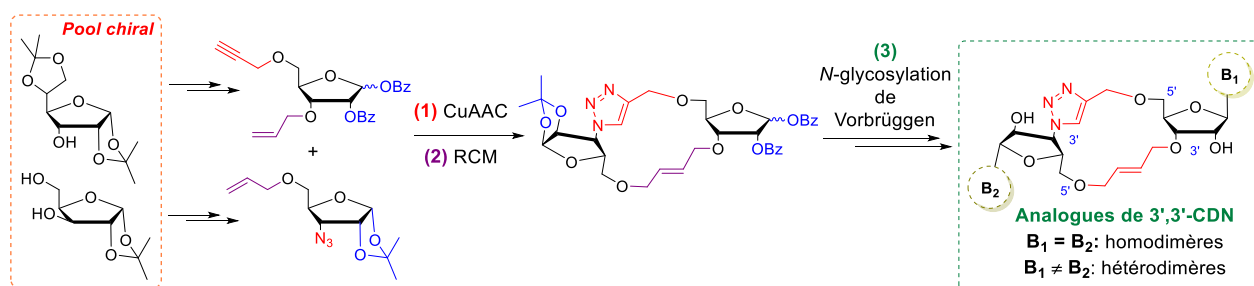


Schéma 12. Première approche synthétique des analogues de CDNs

- La seconde approche** (Schéma 13) utilise un nucléoside comme substrat initial (ici l'adénosine) pour former un dinucléotide cyclique de manière convergente à partir du couplage (1) par CuAAC de deux précurseurs nucléosidiques, suivi (2) d'une métathèse cyclisante. La structure de ce nouvel analogue a été sélectionnée par ciblage *in silico*. Cette synthèse s'affranchit de l'étape de couplage des bases nucléiques par *N*-glycosylation de Vorbrüggen qui est le verrou majeur de la première approche. Néanmoins la diversité moléculaire finale est plus restreinte et se concentre sur la formation d'un homodimère 2',2'-CDN. La présence des nucléobases (adénine) peut être un obstacle pour la fermeture de cycle par RCM.

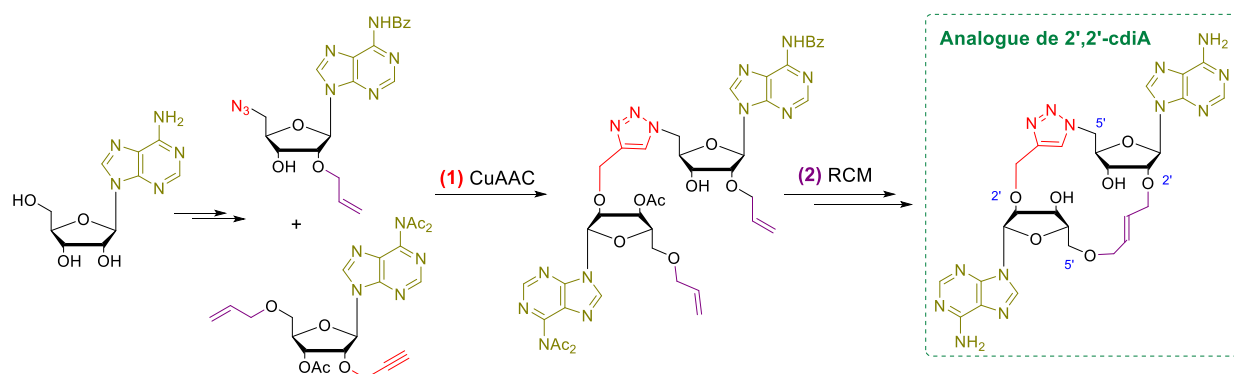


Schéma 13. Deuxième approche synthétique de CDN envisagée

Dans le quatrième chapitre, nous présenterons la synthèse de petites chimiothèques de molécules dérivées du noyau benzimidazole et oxazolo[5,4-*d*]pyrimidine. Ici, l'approche synthétique est orientée vers la diversité. Un criblage biologique, réalisé en amont sur une chimiothèque interne, a permis d'identifier plusieurs dérivés portant un noyau benzimidazole comme biologiquement actifs.

- L'objectif sur **la série 1H-benzimidazole** est de réaliser une première pharmaco-modulation autour du motif aryle terminal du « hit » identifié (**Figure 32**). Les nouveaux produits ont été évalués biologiquement, et à partir de ces résultats, une seconde modulation de la structure a porté sur le motif central pipérazine en conservant le motif aryle favorable à l'activité biologique.

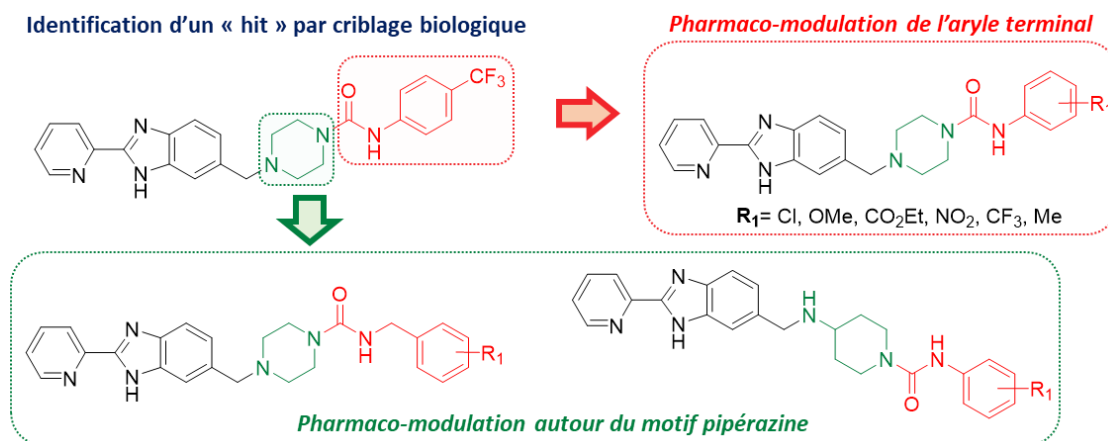


Figure 32. Objectifs de modulation autour du « hit » benzimidazole identifié

- Pour la série oxazolo[5,4-*d*]pyrimidine, l'exploration chimique s'est effectuée autour de la réactivité du squelette 5-chloro-2-phényloxazolo[5,4-*d*]pyrimidine vis-à-vis des organolithiens, de couplages palladés et de SNAr (Figure 33). Les couplages palladés ont permis l'insertion de groupements de type aromatique alors que des dérivés de type amine ont été introduits par SNAr.

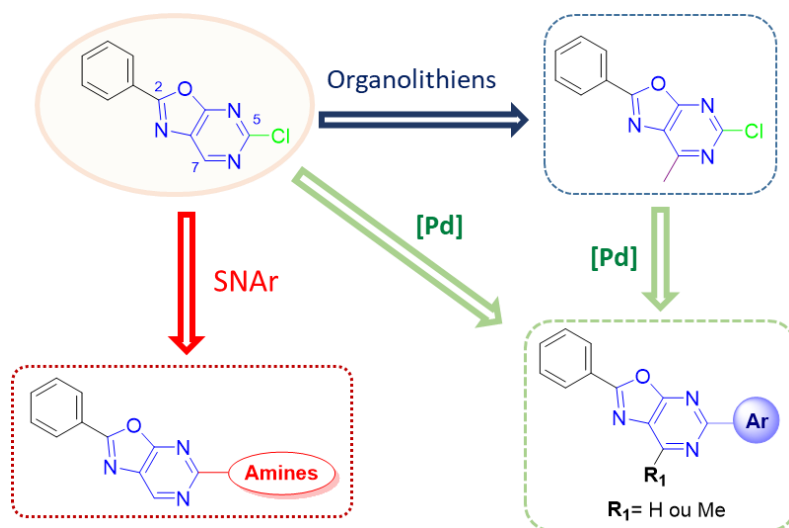


Figure 33. Exploration autour du squelette 5-chloro-2-phényloxazolo[5,4-*d*]pyrimidine

- Parmi les dérivés 5-amino-2-phényloxazolo[5,4-*d*]pyrimidine, certains ont été fonctionnalisés par leur amine secondaire pour donner des structures proches des dérivés de 1*H*-benzimidazole précédents (Figure 34).

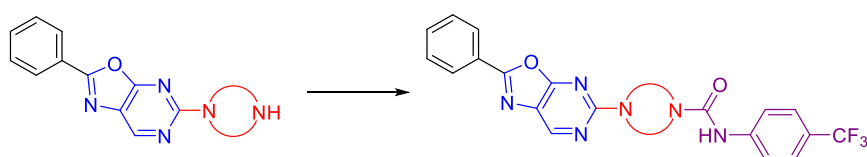


Figure 34.

- Un travail de modulation autour de la position C-2 du noyau oxazolo[5,4-*d*]pyrimidine a également été envisagé afin de proposer plus de diversité structurale (Figure 35). La principale difficulté réside en l'utilisation de la 5-aminouracil comme produit de départ insoluble dans la plupart des solvants organiques.

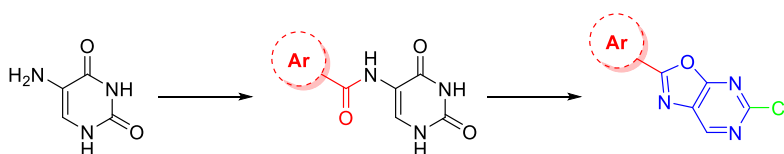


Figure 35. Modulation de la position C-2

- Une évaluation biologique systématique des produits synthétisés a été effectuée afin d'identifier les molécules au meilleur potentiel. La formation de dimères a été alors tentée à partir de ces monomères issus des deux séries (benzimidazole et oxazolopyrimidine) afin de proposer de nouvelles structures inspirées de la découverte du diABZI.

Chapitre III] Synthèse de nouveaux analogues de dinucléotides cycliques

Introduction

Comme précisé dans le chapitre I, de nombreux analogues de CDNs ont été synthétisés afin de pallier la faible perméabilité cellulaire et l'instabilité du 2',3'-cGAMP (**1**) face aux enzymes phosphatases et hydrolases (ENPP1); ces dernières clivant préférentiellement la liaison 2',5' phosphate diester. Les modifications synthétiques jusqu'alors entreprises ont concerné les nucléobases, les parties riboses et surtout les liens inter-nucléotidiques afin de rendre les analogues produits de qualité plus « drug-like » que les CDNs naturels. Par ces modifications, certains de ces composés ont montré une activité agonistique bien plus élevée que le 2',3'-cGAMP lui-même, les plus prometteurs étant actuellement évalués en essais cliniques pour des applications anticancéreuses. Nous pouvons citer l'ADU-S100 (**2**), développé par Aduro Biotech, qui est le plus avancé dans les phases d'essais cliniques, le MK-1454 (**3**) développé par Merck et l'E7766 (**4**) par Eisai H3 Biomedicine (Figure 36). Les liens 2',5' et 3',5' inter-nucléotidiques de ces analogues ont été remplacés par des liens thiophosphates qui sont non ionisables à pH physiologique et stables face aux hydrolases. L'ADU-S100 et l'E7766 sont des diadénosines cycliques contrairement au MK-1454 qui est un adénosine-guanosine cyclique. D'autres analogues ont montré une activité agoniste intéressante, comme le CDN développé par Sperovie Biosciences (**5**) combinant une base uracile à une adénine, ou celui développé par Takeda Pharmaceuticals où un nucléoside a été remplacé par un nucléoside carbocyclique portant une base non-canonique (**6**).

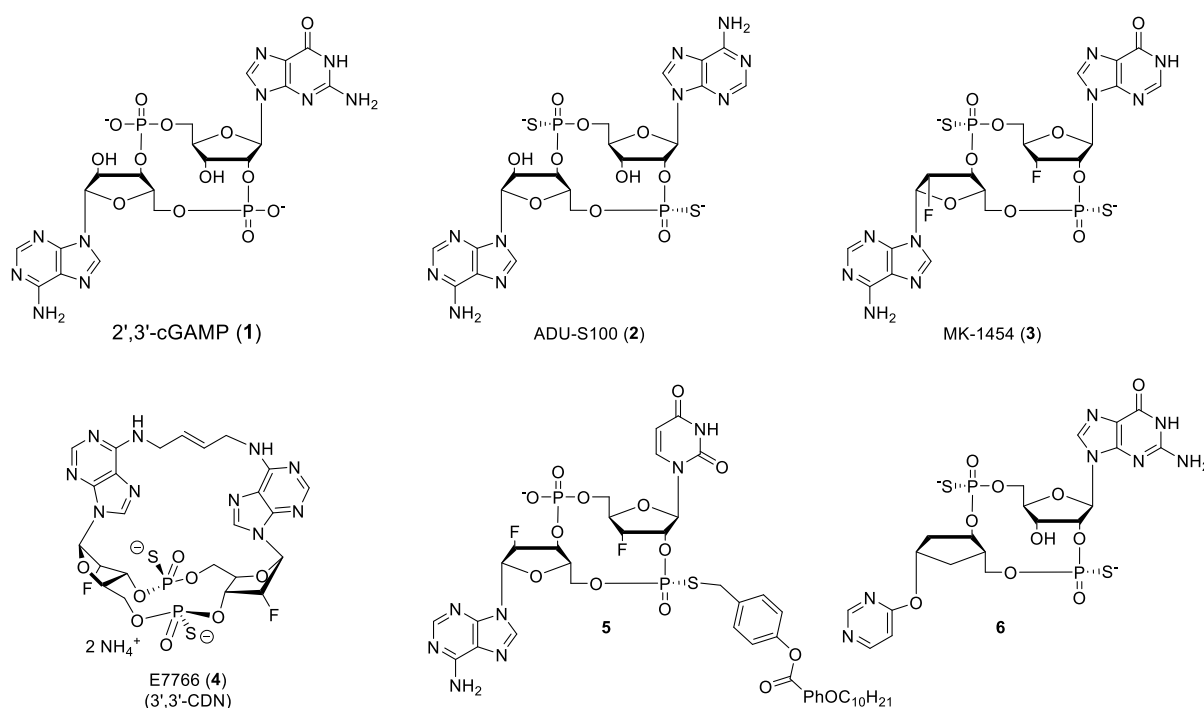


Figure 36. Structures des principaux CDNs agonistes de STING

En parallèle, des structures d'analogues du 2',3'-cGAMP sans lien inter-nucléotidique de type phosphodiester, ont été explorées avec des fonctions inter-nucléotidiques non-ionisables. IFM Therapeutics a développé des 3',3'-diadénosines cycliques portant des liens urée (**7**) et thiourée (**8**) avec des activités agonistes de l'ordre du 2',3'-cGAMP, les liaisons hydrogène étant conservées par la présence de ces groupements (Figure 37). Formé à partir de deux liens inter-nucléotidiques de type 1,2,3-triazole, l'analogue (**9**) proposé par Fujino *et al.* n'a pas été évalué biologiquement sur STING ; en revanche cet analogue a montré

une conformation ouverte similaire à celle du 3',3'-c-di-GMP auquel il a été comparé par modélisation moléculaire. Il en va de même pour les composés acycliques pontés par un 1,2,3-triazole (**10**) proposés par Fernicola *et al.* ; ces derniers miment parfaitement le 3',3'-c-di-GMP et inhibent l'activité des diguanylates cyclases mais n'ont pas d'activité agoniste de la voie cGAS-STING. Dialer *et al.* ont proposé la synthèse convergente (en 20 étapes cumulées) d'un analogue mixte (**11**) porteur d'un lien 1,2,3-triazole d'un côté et d'un lien amide de l'autre. Ce dernier n'a montré aucune affinité envers la protéine STING, du fait que sa conformation est plus ouverte en solution que celle du 2',3'-cGAMP. Enfin, un dimère cyclique de morpholinose a été envisagé par Kinzie *et al.* Cependant les auteurs n'ont pas réussi à intégrer les nucléobases dans des conditions de Vorbrüggen sur le substrat (**12**), marquant ainsi l'arrêt du projet et un manque de données sur l'intérêt de ce squelette par rapport à celui des CDNs classiques. Ces exemples d'analogues sont intéressants car ils présentent des liens non ionisables à pH physiologique et rendent les molécules en question moins polaires que les CDNs classiques ou les thio-CDNs. La conséquence directe très prometteuse est l'amélioration du caractère « drug-like » et des propriétés ADME. En revanche, la principale difficulté reste l'obtention de composés capables d'induire une activité agoniste sur STING de l'ordre du 2',3'-cGAMP, voire supérieure.

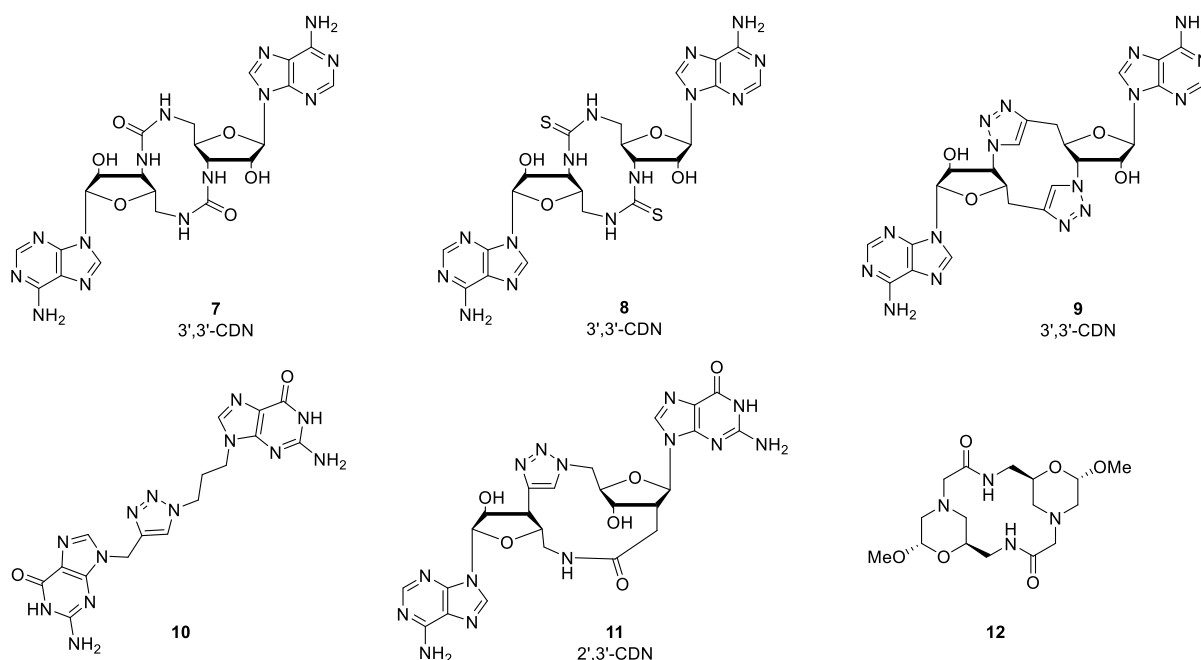


Figure 37. Analogues de CDNs au squelette non-phosphaté

Bien que la diversité structurale des analogues de CDNs soit très importante, une SAR claire est difficile à établir du fait que les interactions entre les CDNs et la protéine STING sont multifactorielles. Certains mécanismes sont encore méconnus (*e.g.* les contributions enthalpiques des divers substituants sur la conformation du CDN) malgré les divers travaux de modélisation moléculaire du système d'interaction ligand-protéine.⁸⁵ Néanmoins, quelques principes généraux peuvent être tirés de ces travaux pour aider à la conception de nouveaux analogues :¹²⁴

- D'après la structure cristallisée 2',3'-cGAMP-hSTING^{H232}, les nucléobases de type purine interagissent avec les résidus Tyr167 et Arg238 de chaque partie monomérique de STING, respectivement par

¹²⁴ Wang, Z.; Xi, Z. Chemical evolution of cyclic dinucleotides: perspective of the analogs and their preparation. *Tetrahedron* **2021**, *87*, 132096-132124.

interaction π -stacking *via* le cycle aromatique et liaisons hydrogène par la position *N*-7, cette dernière étant l'interaction prépondérante lors de la complexation du ligand. De leur côté, les bases nucléiques de type pyrimidine ne présentent que l'interaction de π -stacking avec les résidus Tyr167, même si celle-ci est plus forte que chez les purines. Ainsi les bases puriques ont une meilleure affinité vis-à-vis de la protéine STING que les bases pyrimidiques, exception faite de l'uracile. Ces interactions fixent le 2',3'-cGAMP dans une conformation de type « U ».

- D'après les études cristallographiques, les motifs riboses n'ont que peu d'interactions spécifiques dans le site actif de la protéine, notamment les groupements hydroxyles en 2' ou 3'. Certaines modifications, en particulier celles portées en 2' en insérant une longue chaîne lipophile, ont permis d'améliorer la réponse agoniste des analogues de CDN produits. Les substitutions des groupements hydroxyles par des atomes de fluor produisent également le même résultat. Ces observations indiquent donc l'importance de la conformation des sucres lors de la complexation des CDNs à STING : cette dernière détermine la projection des nucléobases dans l'espace.
- Les CDNs comportant un lien 2'-5' entre deux unités ont une meilleure capacité à activer STING que les CDNs possédant un lien 3'-5'. Les 2',3'-CDNs possèdent en effet un lien 2'-5' phosphate diester leur permettant de former des liaisons hydrogène supplémentaires au sein du site actif de STING (médiées par des molécules d'eau présentes), qui stabilisent la conformation active du CDN.
- Par ailleurs, le lien 3'-5' phosphate diester présente une meilleure stabilité vis-à-vis des hydrolases et phosphatases que le lien 2'-5'.
- La modification du squelette phosphate diester montre une augmentation de la stabilité des structures contre les enzymes de dégradation. Parmi les fonctions de substitution explorées, les CDNs thiophosphate diester présentent les meilleurs potentiels d'activation tout en ayant la stabilité requise. En effet, la structure « phosphate » étant conservée, les conformations adoptées des analogues produits restent identiques à celles du 2',3'-cGAMP.
- Les CDNs masquant la charge du phosphate diester (*via* une fonction « prodrug »), ou ceux portant des fonctions non ionisables, ont une meilleure capacité à traverser la membrane cellulaire, ce qui augmente ainsi leur biodisponibilité vis-à-vis de la protéine STING.

Si les principaux CDNs en phase clinique ont un squelette thiophosphate diester, leur mode d'administration (uniquement intratumoral) est très limité à cause de leur faible ADME. En effet, ces composés, malgré des liens non ionisables à pH physiologique, restent de nature très polaire ce qui limite leur pénétration cellulaire. Les autres voies systémiques sont donc évitées alors qu'elles sont plus avantageuses d'un point de vue thérapeutique. D'autre part, malgré des résultats pré-cliniques très encourageant, ceux des phases cliniques sont bien plus modérés : ces nouvelles molécules s'avèrent, entre autre, plus efficaces en bithérapie qu'en monothérapie. A priori, le composé **6** vient combler ces limitations et serait plus efficace que l'ADU-S100 en termes d'ADME, cependant ce dernier doit être encore éprouvé biologiquement pour attester de son efficacité en tant que nouveau médicament.

De nombreuses méthodes synthétiques ont été mises au point afin de produire le 2',3'-cGAMP et ses analogues CDNs, mais ces dernières se concentrent uniquement sur la formation des liens phosphates et thiophosphates diesters. Compte tenu de l'état de l'art sur les analogues de CDNs, les pistes d'explorations

restantes sont les modifications du squelette et celles des liens inter-nucléotidiques en utilisant des fonctions isostères ou non du phosphate diester afin d'éviter l'apparition de charges et augmenter la perméabilité cellulaire (et stabilité enzymatique). Il est alors question de la simplification (*i.e.* les analogues acycliques synthétisés par Fernicola *et al.*) ou de la conservation de la structure macrocyclique des CDNs. Conserver le squelette disaccharide semble aussi nécessaire pour fixer la conformation de type « U » adoptée par les CDNs lors de la complexation à STING ; tandis qu'un squelette « linéaire » conférerait trop de flexibilité à la structure. Afin d'orienter notre travail, nous avons opté pour des analogues portant un motif 1,2,3-triazole et une chaîne insaturée comme liens inter-nucléotidiques (Figure 38).

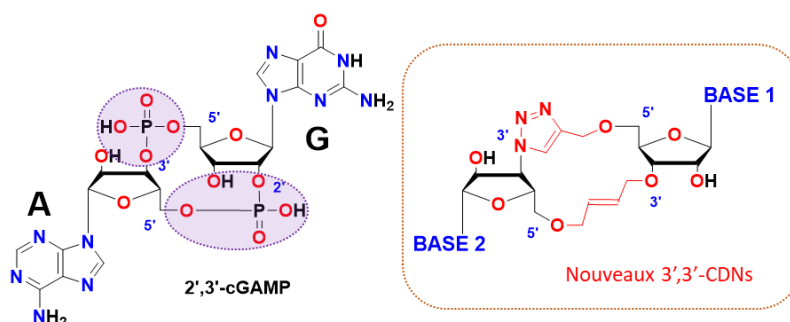


Figure 38. Structure des analogues de CDN visée

Le 1,2,3-triazole, en tant qu'isostère connu du phosphate,^{96,125,126,127} est un motif qui mérite d'être plus amplement exploré dans ce contexte. La chaîne insaturée accroît la perméabilité membranaire et la stabilité des composés, ainsi que la rigidité des CDNs formés. La diversité chimique qu'elle peut offrir en combinaison avec le motif 1,2,3-triazole est aussi intéressante. L'utilisation de ces deux liens permet en effet la réalisation de structures macrocycliques modulables et de tailles variables, ce qui offre des perspectives pertinentes pour la formation de nouveaux analogues de CDNs. Par ailleurs, ceux-ci permettent de maintenir une conformation de type « U » tout en offrant une flexibilité moléculaire relative en fonction de leur positionnement sur le squelette (paramètre pouvant être crucial pour l'affinité du ligand vis-à-vis de la cible).¹²⁸ Une différence de conformation des analogues produits (notamment au niveau des riboses), et une orientation différente dans l'espace des nucléobases peuvent être attendues par rapport aux CDNs de référence, du fait que les liens inter-nucléotidiques sont modifiés. Néanmoins, le site actif visé en forme de « V » présente une ouverture assez large de 63 Å et se module en fonction du ligand complexé en son sein, rendant possible, en théorie, une large reconnaissance de substrats de nature variable. Nous pouvons alors imaginer que les ligands nouvellement conçus pourraient se complexer à la protéine *via* d'autres parties du site de fixation.

En outre, la complexation des CDNs étant principalement régie par les interactions entre les nucléobases et les résidus Arg238 et Tyr167, nous voulons garder cette contribution majoritaire, en introduisant une adénine et une guanine pour être proche du cGAMP, ou bien en plaçant deux fois les mêmes

¹²⁵ (a) El-Sagheer, A. H.; Sanzone, A. P.; Gao, R.; Tavassoli, A.; Brown, T. Biocompatible artificial DNA linker that is read through by DNA polymerases and is functional in Escherichia coli. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2011**, 108, 11338-11343; (b) El-Sagheer, A. H.; Brown, T. A triazole linkage that mimics the DNA phosphodiester group in living systems. *Quart. Rev. Biophys.* **2015**, 48, 429-436.

¹²⁶ Bonandi, E.; Christodoulou, M. S.; Fumagalli, G.; Perdicchia, D.; Rastelli, G.; Passarella, D. The 1,2,3-triazole ring as a bioisostere in medicinal chemistry. *Drug. Discov. Today* **2017**, 22, 1572-1581.

¹²⁷ Baraniak, D.; Boryski, J. Triazole-modified nucleic acids for the application in bioorganic and medicinal chemistry. *Biomedicines* **2021**, 9, 628-663.

¹²⁸ Forrey, C.; Douglas, J. F.; Gilson, M. K. The fundamental role of flexibility on the strength of molecular binding. *Soft Matter* **2012**, 8, 6385-6392.

bases de type purique sur le squelette macrocyclique ; ces bases nucléiques favorisent de meilleures interactions de type π -stacking et liaison H avec les résidus cités que les nucléobases pyrimidiques. Comprendre les impacts des modifications structurales sur l'affinité résultante des nouveaux ligands avec la cible contribue à la compréhension globale du mécanisme d'action des CDNs sur la protéine STING, ce dernier n'étant pas encore totalement élucidé.²³

La synthèse de ces analogues peut s'effectuer à partir de précurseurs osidiques, ou de précurseurs nucléosidiques. La première stratégie permet de réaliser les modifications structurales du squelette sans être gêné par la présence des nucléobases, puisque ces dernières possèdent de multiples centres réactionnels pouvant complexifier la réactivité des substrats. Cependant, cette première stratégie repose sur l'introduction en cours ou en fin de synthèse des bases nucléiques, étape qui peut s'avérer limitante bien qu'elle puisse donner accès à une plus grande diversité moléculaire finale. La seconde stratégie, quant à elle, offre la possibilité de s'affranchir de l'étape limitante que constitue l'insertion des nucléobases. Elle oblige en revanche à sélectionner les nucléosides constitutifs de l'analogue de CDN visé, ce qui empêche une diversification moléculaire en cours de synthèse. Ces deux stratégies ont été explorées au cours de cette thèse et sont présentées dans ce chapitre.

I) Synthèse de CDN à partir de précurseurs osidiques

I.1) Rétrosynthèse envisagée

Notre première cible d'analogue consiste à remplacer les deux liens phosphates diesters du 2',3'-cGAMP par un lien 1,2,3-triazole et une chaîne insaturée, en partant de sucres chiraux. Nous proposons de former un macrocycle précurseur reliant deux riboses par les liens inter-nucléotidiques décrits précédemment, qui dans un premier temps sont aisément accessibles chimiquement (Figure 38). Les nucléobases classiques seront insérées sur ce squelette macrocyclique lors des dernières étapes pour former de manière convergente des analogues hétérodimériques (bases nucléiques différentes) et homodimériques (bases nucléiques identiques).

L'insertion des nucléobases sera faite par *N*-glycosylation dans les conditions de Vorbrüggen,¹²⁹ cette réaction permet le couplage de nombreuses bases pyrimidiques et puriques sur des substrats osidiques dans des conditions douces. Elle nécessite néanmoins la présence d'un groupement participant porté en position C-2 des riboses pour que l'anomère β soit le seul formé (voir paragraphe sur la réaction de Vorbrüggen). Les positions C-3 et C-5 demeurent donc libres pour créer les liens inter-nucléotidiques, orientant la synthèse vers l'obtention de dinucléotides cycliques portant deux liens 3',5' (analogues du 3',3'-cGAMP).

La formation du lien alcène peut être envisagée par une réaction de métathèse catalysée au ruthénium et le lien triazole *via* l'utilisation d'une réaction de CuAAC. Ces deux réactions sont largement utilisées pour la formation d'espèces macrocycliques.¹³⁰

Stratégiquement, insérer en dernier les bases nucléiques prend tout son sens dans la mesure où le catalyseur de Grubbs (lors de la réaction de métathèse) peut être « empoisonné » *via* la chélation du ruthénium par les hétéroatomes (*i.e.* azotes) présents sur ces dernières, à moins que les fonctions en question ne soient protégées et/ou éloignées du centre de réactivité.^{131,132}

Par ailleurs, le lien triazole est synthétisé avant le lien alcène car :

- La réaction CuAAC permet de coupler de manière sélective et efficace les fragments alcyne et azoture sous conditions douces.
- Cela évite de réaliser une métathèse croisée en première intention de couplage. Cette réaction menant à la formation d'un mélange d'isomères *E* et *Z* et de potentiels produits d'homo-couplage. Au contraire, les conditions opératoires de la RCM permettent d'être sélectif de l'isomère *E* et limiter les homo-couplages.

¹²⁹ Vorbrüggen, H.; Ruh-Polenz, C. Synthesis of nucleosides. *Org. React.* **1999**, 55, 1-162.

¹³⁰ Yu, X.; Sun, D. Macrocyclic drugs and synthetic methodologies toward macrocycles. *Molecules* **2013**, 18, 6230-6268.

¹³¹ Lafaye, K.; Bosset, C.; Nicolas, L.; Guérinot, A.; Cossy, J. Beyond catalyst deactivation: cross-metathesis involving olefins containing N -heteroaromatics. *Beilstein J. Org. Chem.* **2015**, 11, 2223-2241.

¹³² Compain, P. Olefin metathesis of amine-containing systems: beyond the current consensus. *Adv. Synth. Catal.* **2007**, 349, 1829-1846.

- Le motif fonctionne comme une agrafe en contraignant l'intermédiaire acyclique formé dans ses degrés de liberté, permettant une meilleure rencontre des motifs *O*-allyles du précurseur **C** (Schéma 14) et favoriser ainsi une métathèse intramoléculaire.¹³³

Ainsi, la synthèse de nos analogues de 3',3'-CDN s'articule ainsi autour de ces 3 étapes clés dans l'ordre suivant (Schéma 14) :

- (1) la réaction de CuACC.
- (2) la réaction de métathèse cyclisante (RCM).
- (3) la *N*-glycosylation de type Vorbrüggen.

La rétrosynthèse envisagée est décrite dans le schéma 2 suivant :

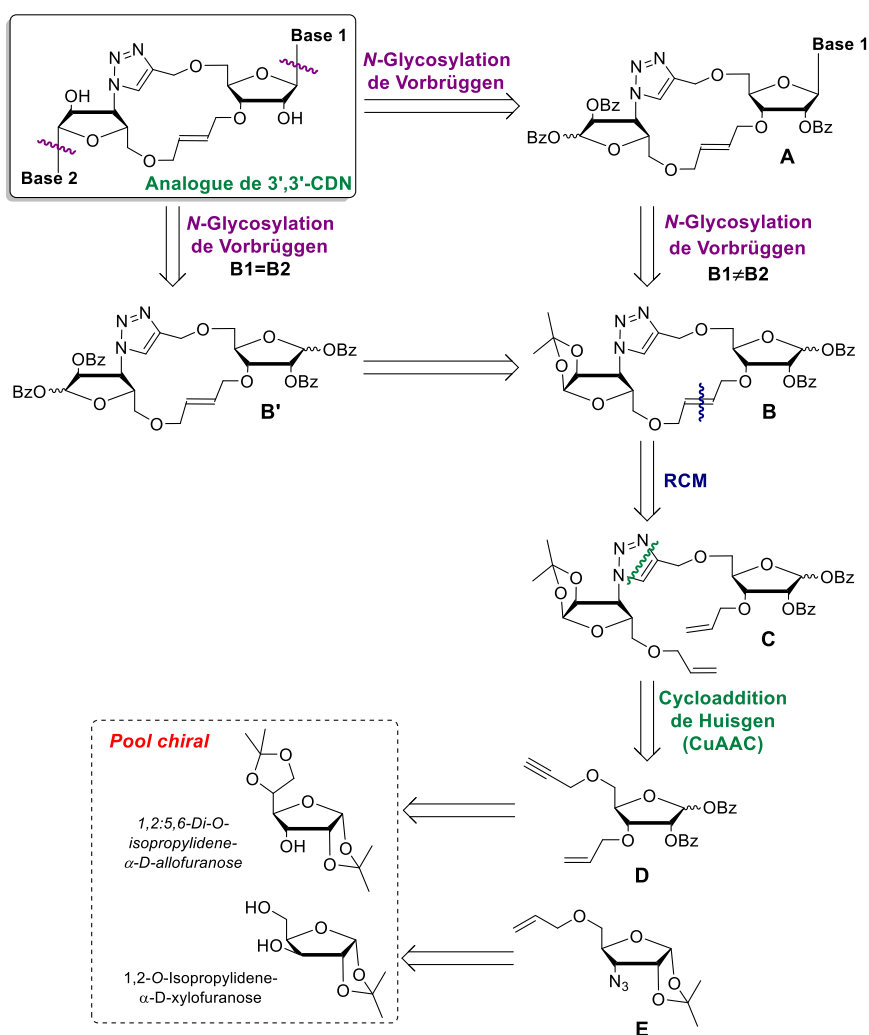


Schéma 14. Rétrosynthèse des analogues 3',3'-CDN visés

¹³³ Maurya, S. K.; Rana, R. An eco-compatible strategy for the diversity-oriented synthesis of macrocycles exploiting carbohydrate-derived building blocks. *Beilstein J. Org. Chem.* **2017**, 13, 1106-1118.

L'analogue 3',3'-CDN hétérodimère peut être obtenu à la suite d'une dernière étape de couplage d'une nucléobase avec le synthon **A**, lui-même étant issu d'une étape de *N*-glycosylation dans les conditions de Vorbrüggen sur le macrocycle **B** (Schéma 14). L'analogue homodimère peut provenir du synthon tétrabenzoylé **B'** par une double *N*-glycosylation en étape finale, **B'** étant obtenu à partir de **B**. Des homodimères peuvent être aussi formés à partir de **A** par réaction de transglycosylation.

Le macrocycle **B** est accessible *via* une métathèse cyclisante (ou RCM) à partir du substrat acyclique **C**, ce dernier pouvant être construit par réaction CuAAC qui formera le 1,2,3-triazole par couplage des synthons **D** et **E**.

Les synthons **D** et **E** proviennent de furanoses chiraux et leurs synthèses respectives sont en partie décrites dans la littérature.¹³³ Ceux-ci peuvent être synthétisés à partir d'une succession de substitutions nucléophiles à partir de sucres commerciaux.

I.2) Outils chimiques utilisés

I.2-1) La cycloaddition dipolaire de Huisgen catalysée au Cu(I)

Former le noyau 1,2,3-triazole entre les fragments **E** et **F** est la première des étapes clés de cette synthèse. Ce motif a été décrit pour la première fois par Huisgen en 1963 en réalisant une cycloaddition 1,3-dipolaire entre un alcyne et un azoture sous activation thermique.¹³⁴ Son utilisation était cependant limitée par l'obtention équimolaire des régioisomères 1,4- et 1,5-disubstitués, et les conditions réactionnelles (températures supérieures à 90 °C) non compatibles à tous les substrats.

C'est en 2002 qu'une version régiosélective à température ambiante de cette cycloaddition est décrite par Sharpless *et al.*¹³⁵ et Meldal *et al.*,¹³⁶ ce qui leur vaudra de recevoir, avec Bertozzi, le prix Nobel de Chimie en 2022 pour leurs travaux respectifs. La réaction entre un alcyne vrai et un azoture est, cette fois-ci, catalysée par du cuivre (I) -CuAAC pour le terme anglais « Copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition »- et mène au 1,2,3-triazole 1,4-disubstitué de manière quantitative et sélective. *A contrario*, le régioisomère 1,5 disubstitué peut être obtenu majoritairement en utilisant un complexe de ruthénium comme catalyseur ; on parle alors de RuAAC.¹³⁷ Le mécanisme réactionnel a été proposé par Fokin *et al.*¹³⁸ et confirmé par Passerone en 2019 (Schéma 15) :¹³⁹

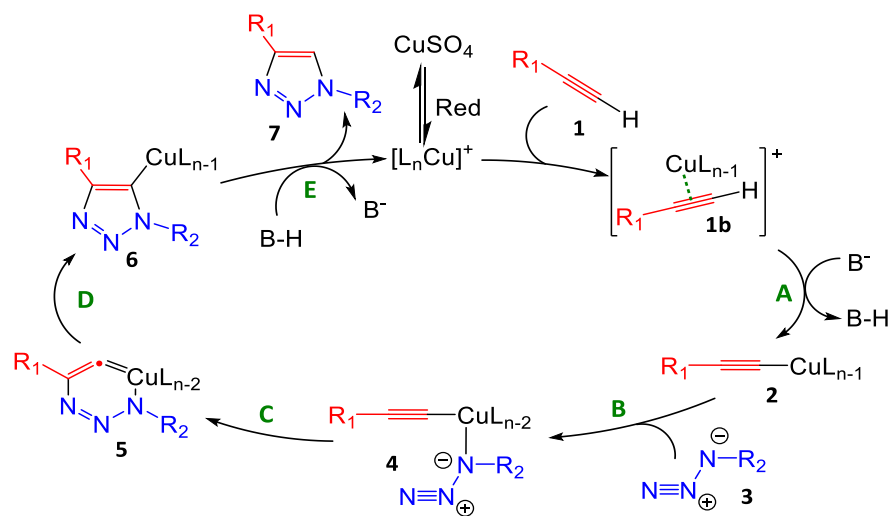


Schéma 15. Mécanisme réactionnel de la CuAAC

¹³⁴ Huisgen, R. 1,3-Dipolar cycloadditions. Past and future. *Angew. Chem. Int., Ed. Engl.* 1963, 2, 565-598.

¹³⁵ Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, 41, 2596-2599.

¹³⁶ Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regioselective copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 3057-3064.

¹³⁷ Zhang, L.; Chen, X.; Xue, P.; Sun, H. H.; Williams, I. D.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V.; Jia, G. Ruthenium-catalyzed cycloaddition of alkynes and organic azides. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 15998-15999.

¹³⁸ (a) Rodionov, V. O.; Fokin, V. V.; Finn, M. G.; Mechanism of the ligand-free CuI-catalyzed azide-alkyne cycloaddition reaction. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 2210-2215; (b) Himo, F.; Lovell, T.; Hilgraf, R.; Rostovtsev, V. V.; Noodleman, L.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. Copper(I)-catalyzed synthesis of azoles. DFT study predicts unprecedented reactivity and intermediates. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 210-216.

¹³⁹ Danese, M.; Bon, M.; Piccini, G.; Passerone, D. The reaction mechanism of the azide-alkyne Huisgen cycloaddition. *Phys. Chem.* **2019**, 21, 19281-19287.

Le sulfate de cuivre (II) est généralement le pré-catalyseur employé lors de la CuACC comme source de cuivre. L'espèce cuivre (I) est alors formée *in situ via* réduction par un agent réducteur, le plus courant étant l'ascorbate de sodium. En présence d'un alcyne, le cuivre (I) va former un acétylure de cuivre (2, étape A) intermédiaire. Un ligand va être échangé avec l'azoture qui va se lier au complexe cuivreux par l'azote nucléophile N-1 (4, étape B). Une espèce métallo-cyclique est alors formée (5, étape C) puis, par attaque du N-1 sur le C-5, va contracter le cycle pour former le 1,2,3-triazole (6, étape D). Une protonation permet de libérer le produit final et de régénérer le catalyseur (7, étape E).

Cette réaction présente l'avantage d'être chimiosélective des azotures et alcynes, permettant ainsi de travailler avec des substrats portant d'autres fonctions chimiques tels des amines, aldéhydes, alcools, ou des groupements partants, ceci dans de nombreux solvants, dont l'eau. Cette réaction est particulièrement efficace et représente un outil de choix pour la synthèse d'analogues nucléosidiques.¹⁴⁰ Par ailleurs, d'autres complexes cuivreux tels que le $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4]\text{PF}_6$ ou le IMesCuBr, peuvent être utilisés comme catalyseur de cette réaction dans des solvants uniquement organiques.¹⁴¹

¹⁴⁰ Amblard, F.; Cho, J. H.; Schinazi, R. F. Cu(I)-catalysed Huisgen azide-alkyne 1,3-dipolar cycloaddition reaction in nucleoside, nucleotide, and oligonucleotide chemistry. *Chem. Rev.* **2009**, 109, 4207-4220.

¹⁴¹ Broggi, J.; Diez-Gonzalez, S.; Petersen, J. L.; Berteina-Raboin, S.; Nolan, S. P.; Agrofoglio, L. A. Study of copper(I) catalysts for the synthesis of carbanucleosides via azide-alkyne 1,3-dipolar cycloaddition. *Synthesis* **2008**, 1, 141-148.

1.2-2) La métathèse d'oléfines cyclisante

La seconde étape clé de cette synthèse est la formation de l'espèce macrocyclique **C** par réaction de métathèse cyclisante ou métathèse par fermeture de cycle ; « Ring Closing Metathesis » ou RCM en anglais. Cette réaction est devenue au fil du temps un outil très puissant et de choix en synthèse organique pour la formation de liaisons carbone-carbone insaturées. Les exemples de son utilisation étant très fournis dans la littérature, elle trouve son application aussi bien dans la synthèse de produits naturels¹⁴² que la synthèse de petites molécules complexes,¹⁴³ dont des analogues de nucléosides.¹⁴⁴

Chauvin et Hérisson¹⁴⁵ sont les premiers à avoir décrit le mécanisme (Schéma 16) de cette réaction en 1971, ainsi que celui des autres métathèses d'oléfines existantes que sont la métathèse croisée (CM), l'ouverture de cycle par métathèse (ROM) ou encore la métathèse polymérisante (ROMP).¹⁴⁶ L'essor de cette réaction dans l'industrie pétrolière et sa compréhension sont attribués à Yves Chauvin, Robert Schrock¹⁴⁷ et Robert Grubbs¹⁴⁸ qui recevront en 2005 le prix Nobel de chimie pour leurs travaux.

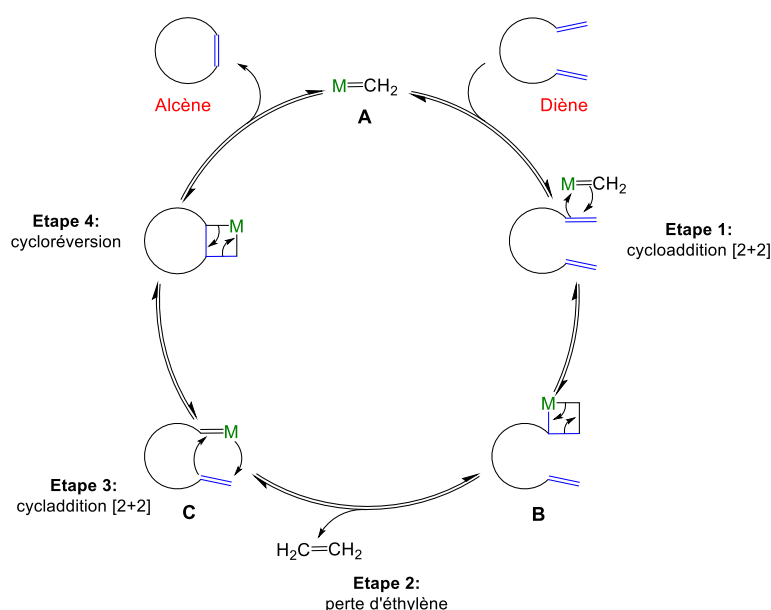


Schéma 16. Mécanisme de la métathèse cyclisante

La métathèse cyclisante, initiée par un catalyseur de type métal carbénique, est décrite comme un échange de fragments carbéniques entre deux oléfines présentes sur la même molécule. La première étape du cycle catalytique est une réaction de cycloaddition [2+2] entre le complexe métal carbénique **A** et une des deux oléfines du diène acyclique, formant le métallacyclobutane **B**. Une cycloréversion libère alors une

¹⁴² Higman, C. S.; Lummiss, J. A. M.; Fogg, D. E.; Olefin metathesis at the dawn of implementation in pharmaceutical and specialty-chemicals manufacturing. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 3552-3565.

¹⁴³ Nicolaou, K. C.; Bulger, P. G.; Sarlah, D., Metathesis reactions in total synthesis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 4490-4527.

¹⁴⁴ Agrofoglio, L. A. ; Nolan, S. P. Olefin metathesis route to antiviral nucleosides. *Curr. Top. Med. Chem.* **2005**, 5, 1541-1558.

¹⁴⁵ Hérisson, J. L.; Chauvin, Y. Catalyse de transformation des oléfines par les complexes du tungstène. II. Télomérisation des oléfines cycliques en présence d'oléfines acycliques. *Makromol. Chem.* **1971**, 141, 161-176.

¹⁴⁶ Hoveyda, A. H.; Zhugralin, A., The remarkable metal-catalysed olefin metathesis reaction. *Nature* **2007**, 450, 243-252.

¹⁴⁷ Schrock, R. R., Multiple metal-carbon bonds for catalytic metathesis reactions (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 3748-3759.

¹⁴⁸ Grubbs, R. H., Olefin-metathesis catalysts for the preparation of molecules and materials (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 45, 3760-3765.

molécule d'éthylène et un nouveau carbène métallique **C**. Se produit alors une seconde cycloaddition avec l'autre oléfine suivie d'une cycloréversion permettant la formation du macrocycle et de régénérer le complexe métal carbénique **A**.

Les premiers catalyseurs ont été développés par Schrock à base de molybdène **14**, cependant ces derniers ne présentent qu'une faible stabilité face à l'air et à l'eau. Aujourd'hui, ces catalyseurs sont toujours utilisés dans la synthèse d'oléfines tri/tétrasubstituées aux inductions chirales.¹⁴⁹ Par leurs travaux, Grubbs *et al.*¹⁵⁰ ont pu démontrer ce mécanisme et approfondir sa compréhension vis-à-vis des substrats et conditions utilisés, afin de créer des catalyseurs de plus en plus stables, polyvalents et performants, à base ruthénium. On dénombre actuellement trois générations différentes de catalyseurs de Grubbs (Figure 39) :

- Le catalyseur de Grubbs de première génération **15**¹⁵¹ possède deux ligands de type phosphine le rendant instable et sensible à l'humidité et à l'air comme le catalyseur de Schrock.
- Les catalyseurs de seconde génération **16**¹⁵² ont un ligand phosphine remplacé par un carbène *N*-hétérocyclique (NHC) donnant une liaison σ au métal. Ces complexes métalliques sont devenus ainsi stables à l'air mais aussi dans l'eau, plus réactifs que leurs prédécesseurs, permettant leur utilisation sur une gamme plus large de substrats et de conditions réactionnelles.
- Les catalyseurs de troisième génération **18**¹⁵³ peuvent s'affranchir de la présence de groupements coordinants par remplacement du ligand PCy₃ par un noyau pyridine ou halogénopyridine, les rendant plus adaptés à la CM.

Hoveyda¹⁵⁴ a développé ses propres catalyseurs de première **17a** et seconde génération **17b** à partir de ceux de Grubbs, connus sous le nom d'Hoveyda-Grubbs, où une liaison dative entre le métal et l'oxygène du ligand éther-benzylidène rend l'initiation du catalyseur (passage d'une espèce à 16e⁻ à 14e⁻) plus rapide.¹⁵⁵

¹⁴⁹ Hoveyda, A. H. Evolution of catalytic stereoselective olefin metathesis: from ancillary transformation to purveyor of stereochemical identity. *J. Org. Chem.* **2014**, 79, 4763–4792.

¹⁵⁰ Dias, E. L.; Nguyen, S.-B. T.; Grubbs, R. H. Well-defined ruthenium olefin metathesis catalysts: mechanism and activity. *Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 3887–3897.

¹⁵¹ Adjiman, C. S.; Clarke, A. J.; Cooperb, G.; Taylor, P. C., Solvents for ring-closing metathesis reactions, *Chem. Commun.*, 2008, 24, 2806–2809.

¹⁵² Scholl, M.; Ding, S.; Lee, C. W.; Grubbs, R. H. Synthesis and activity of a new generation of ruthenium-based olefin metathesis catalysts coordinated with 1,3-dimesityl-4,5-dihydroimidazol-2-ylidene ligands. *Org. Lett.* **1999**, 16, 953–956.

¹⁵³ Love, J. A.; Morgan, J. P.; Trnka, T. M.; Grubbs, R. H. A practical and highly active ruthenium-based catalyst that effects the cross metathesis of acrylonitrile. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 4035–4037.

¹⁵⁴ Garber, S. B.; Kingsbury, J. S.; Gray, B. L.; Hoveyda, A. H., Efficient and recyclable monomeric and dendritic Ru-based metathesis catalysts. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 8168–8179.

¹⁵⁵ Nelson, D. J.; Manzini, S.; Urbina-Blanco, C. A.; Nolan, S. P. Key processes in ruthenium-catalysed olefin metathesis. *Chem. Commun.* **2014**, 50, 10355–10375.

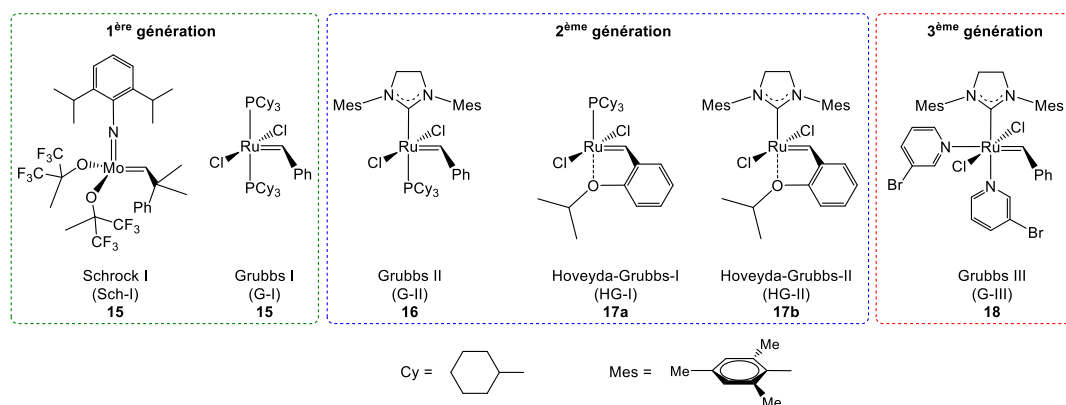


Figure 39. Structures de quelques catalyseurs de métathèse

De principe, la réaction de RCM peut mener à l'obtention de deux isomères géométriques : l'isomère *E* ou *Z*. La stéréosélectivité va ainsi dépendre du catalyseur, de la tension de cycle et du diène initial. En général, l'isomère *Z* va être favorisé lors de la formation de petit cycle, permettant de minimiser la tension de cycle.¹⁵⁶ *A contrario*, lors de la formation de macrocycles, l'isomère *E* est le plus souvent obtenu puisque les conditions thermodynamiques appliquées lors de la réaction favorisent l'isomère le plus stable, *i.e.* l'isomère *E*. De plus, les catalyseurs au ruthénium NHC favorisent la formation d'isomères *trans* : la gêne stérique entre substituants les oblige à adopter une configuration *trans* lors de la formation de l'intermédiaire métallacyclobutane, conformation la plus stable qui mène donc à l'isomère *E*.¹⁵⁷ La synthèse d'isomères *Z* stéréo-purs a été rendue possible par l'utilisation d'un catalyseur permettant la formation de macrocycle *Z* avec une sélectivité de 94% (Figure 40), rapporté par Grubbs en 2013.¹⁵⁸ Cette sélectivité repose sur l'encombrement stérique des ligands du complexe ruthénique qui favorise l'état de transition menant à l'isomère *cis* et qui au contraire, défavorise celui menant à l'isomère *trans*.

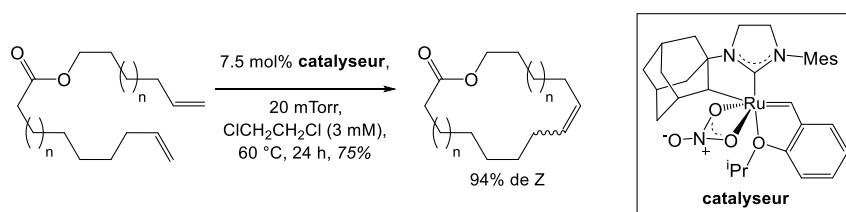


Figure 40. Métathèse cyclisante *Z* sélective

Il est bon de mentionner que des fonctions donneuses de liaisons hydrogène et bases de Lewis, *e.g.* amines et amides, peuvent réduire voire inhiber l'activité catalytique des catalyseurs de Grubbs lors d'une réaction de RCM.^{131,132} Afin d'empêcher la coordination de ces fonctions au complexe, il est nécessaire de désactiver leur doublet nucléophile, en particulier, les amines et amides primaires, à l'aide de groupements protecteurs, acides de Lewis ou la formation d'ammonium par protonation. Cette stratégie se retrouve lorsque des substrats de type nucléosidique sont utilisés comme précurseurs de métathèse.¹⁵⁹

¹⁵⁶ Anslyn, E. V.; Dougherty, D. A. Strain and stability. *Modern Physical Organic Chemistry*, Murdzek, J., Ed. University Science Books, **2006**, 110-114.

¹⁵⁷ Lee, C. W.; Grubbs, R. H. Stereoselectivity of macrocyclic ring-closing olefin metathesis. *Org. Lett.* **2000**, 2, 2145-2147.

¹⁵⁸ Marx, V. M.; Herbert, M. B.; Keitz, B. K.; Grubbs, R. H. Stereoselective access to *Z* and *E* macrocycles by ruthenium-catalyzed *Z* - selective ring-closing metathesis and ethenolysis. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 94-97.

¹⁵⁹ Busca, P.; Etheve-Quellejeu, M.; Valéry, J.-M. Synthesis of 2'-O,3'-O bicyclic adenosine analogues using ring closing metathesis. *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 9131-9134.

1.2-3) La réaction de *N*-glycosylation de type Vorbrüggen

Cette réaction de *N*-glycosylation a été rapportée pour la première fois par Vorbrüggen et Niedballa en 1970.¹⁶⁰ Elle est une extension de la réaction d'Hilbert-Johnson pour la préparation d'hétérosides, plus particulièrement les *N*-hétérosides ou nucléosides, par condensation d'un sucre peracétylé ou 1-halogéné, et d'une base hétérocyclique *O,N*-silylée en présence d'un acide de Lewis. Cette dernière s'effectue généralement « one-pot » dans l'acétonitrile ou le dichloroéthane, sous atmosphère anhydre, le TMSOTf ou le SnCl₄ comme acide de Lewis les plus usités.^{129,161,162} Son application reste large et prépondérante dans la synthèse de molécules de type nucléosidique.

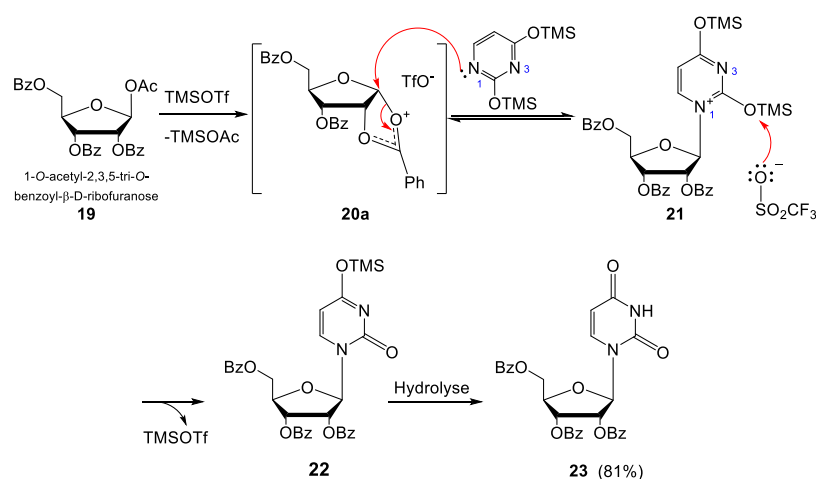


Schéma 17. Mécanisme de la *N*-glycosylation de type Vorbrüggen

Le mécanisme de la réaction débute par la formation *in situ* du cation oxocarbénium intermédiaire **20a** stabilisé par le groupement participant porté en C-2, par la perte d'un acyle (*i.e.* acétate, benzoate) sous action du triméthyltriflate. Une attaque nucléophile de la position anomérique par l'azote le plus nucléophile de la base hétérocyclique silylée mise en présence se produit alors, menant de manière réversible à l'intermédiaire **21**. L'ion triflate va ensuite attaquer l'éther d'énol silylé le plus électrophile et le déprotéger, régénérant du TMSOTf (catalyseur) et l'espèce **22**. Le nucléoside non silylé **23** est obtenu à la suite d'une hydrolyse.

La présence de groupe directeur (ou participant) en position C-2-α permet de contrôler la configuration des nucléosides formés au niveau du site anomérique : l'anomère β est formé majoritairement (Schéma 17). Il a été montré que les sucres peracétylés réagissent sous ces conditions de *N*-glycosylation plus aisément que leurs analogues benzoates.¹⁶³ Néanmoins ces derniers induisent une meilleure sélectivité de formation du nucléoside β contre le nucléoside α.¹⁶⁴

¹⁶⁰ Niedballa, U.; Vorbrüggen, H. A general synthesis of pyrimidine nucleosides. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1970**, 9, 461-462.

¹⁶¹ Vorbrüggen, H.; Lagoja, I. M.; Herdewijn, P. Synthesis of ribonucleosides by condensation using trimethylsilyl triflate. *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* **2007**, Chapter 1: Unit 1.13.

¹⁶² Choi, W. B.; Wilson, L. J.; Yeola, S.; Liotta, D. C.; Schinazi, R. F. In situ complexation directs the stereochemistry of *N*-glycosylation in the synthesis of thialanyl and dioxolanyl nucleoside analogs. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 9377-9379.

¹⁶³ van Tilburg, E. W.; van der Klein, P. A. M.; von Frijtag Drabbe Künzel, J.; de Groote, M.; Stannek, C.; Lorenzen, A.; IJzerman, A. P. 5'-O-Alkyl ethers of N,2-substituted adenosine derivatives: partial agonists for the adenosine A1 and A3 receptors. *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 2966-2975.

¹⁶⁴ Vorbrüggen, H.; Höfle, G. On the mechanism of nucleoside synthesis. *Chem. Ber.* **1981**, 114, 1256-1268.

L'acide de Lewis doit être assez puissant pour former le cation oxocarbénium (intermédiaire **20a-b**) à partir du 1-*O*-acyl-carbohydate **19**. Cependant sa coordination avec le nucléophile peut mener à la formation d'un complexe σ stable **27a** avec le centre le plus nucléophile, notamment l'azote en position *N*-1 lorsque la réaction se déroule en présence de SnCl_4 dans l'acétonitrile. Le nucléophile « bloqué » va alors attaquer le carbocation avec son second centre nucléophile « nu », entraînant la formation d'un second isomère constitutionnel, le nucléoside-*N*-3 **28** (Schéma 18) :^{129,162}

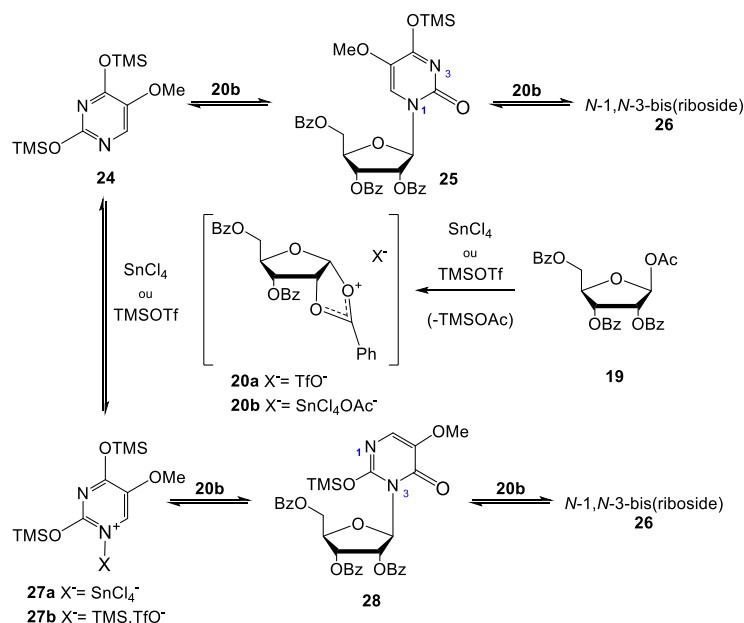


Schéma 18. Formation des différents isomères de la 5-méthoxyuridine

En revanche, le TMSOTf étant un acide de Lewis bien plus faible que le SnCl_4 , la formation du complexe σ **27b** est effective mais en moindre quantité lors de l'équilibre réactionnel, menant à une meilleure conversion en le nucléoside-*N*-1 **25**. Étant aussi volatile, cet acide de Lewis évite la formation d'émulsions lors des traitements aqueux contrairement au chlorure d'étain (IV). À noter que les deux nucléosides protégées **25** et **28** peuvent de nouveau réagir avec l'intermédiaire **20a-b** et former le *N*-1, *N*-3-bis(riboside).

La nature du solvant influence directement l'équilibre entre les différentes espèces intermédiaires décrites précédemment. Contrairement au solvant apolaire DCE ($\epsilon = 10,36$), l'acétonitrile (polaire, $\epsilon = 37,5$) pousse l'équilibre réactionnel dans le sens où la nucléobase silylée (forme **24**) et le cation oxocarbénium **20a-b** sont les espèces majoritaires dans le milieu réactionnel, favorisant ainsi la formation du nucléoside-*N*-1 naturel **25**. La réaction de silyl-Hilbert-Johnson, tirant son originalité de la silylation préalable de la nucléobase, rend possible la conversion de composés fortement polaires, comme les bases pyrimidines et purines, en dérivés lipophiles solubles dans les solvants organiques de travail. Elle permet alors de mener des réactions en milieu homogène. De plus, le groupement silyle est facilement solvolysable et sa grande mobilité fait que seul l'hétérocycle silylé le plus stable thermodynamiquement est obtenu. Par ailleurs l'effet électrodonneur du silicium exacerbe la nucléophilie des hétérocycliques silylées comparé aux hétérocycles alcoyles initiaux. De principe, chaque atome d'azote présent sur la base engagée (*i.e.* **24** et **29**) lors de la réaction est susceptible (en tant que centre nucléophile) de former la liaison *N*-hétérosidique avec le substrat osidique. La formation très largement majoritaire d'un isomère nucléosidique par rapport à un autre se contrôle alors de manière cinétique ou thermodynamique, nécessitant une exploration des conditions opératoires propre à chaque hétérocycle voulant être couplé. Néanmoins, il a été observé que les bases

pyrimidiques classiques réagissent préférentiellement par leur azote le plus nucléophile, *i.e.* en position *N*-1, pour former la liaison *N*-glycosidique avec de bons rendements (Schéma 17).^{129,165} Du point de vue des bases puriques, prédire et contrôler leur réactivité devient plus complexe même s'il est rapporté que le produit de *N*-glycosylation thermodynamique est le nucléoside-*N*-9 et que le produit cinétique est le nucléoside-*N*-7 ou -*N*-3 en fonction des substituants portés (Schéma 19).^{129,165,166,167} Le nucléoside est alors obtenu dans des rendements plus faibles que dans le cadre des bases pyrimidiques, avec des mélanges d'isomères de position.

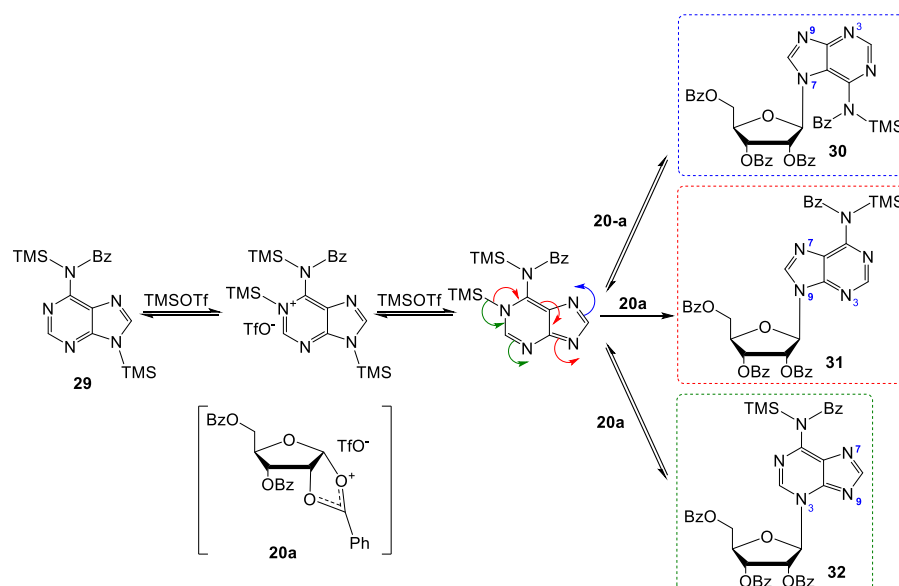


Schéma 19. Formation des différents isomères de la *N*-6-benzoyladénosine

¹⁶⁵ Zhang, X.; Xia, H.; Dong, X.; Jin, J.; Meng, W.-D.; Qing, F.-L. 3-Deoxy-3,3-difluoro-d-arabinofuranose: first stereoselective synthesis and application in preparation of gem-difluorinated sugar nucleosides. *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 9026-9033.

¹⁶⁶ Boryski, J.; Framski, G. Kinetic and thermodynamic products in glycosylation of adenine. *Collection Symposium Series*, **2002**, 5, 150-153.

¹⁶⁷ Boryski, J.; Framski, G. Mechanism of ribosylation of adenine. *Collection Symposium Series* **2005**, 7, 177-181.

I.3) Résultats et discussion

I.3-1) Synthèse des précurseurs

a) Synthèse du 5-*O*-allyl-3-azido-3-déoxy-1,2-*O*-isopropylidène- α -D-xylofuranose (**37**)

La formation de ce composé se déroule suivant 5 étapes (Schéma 8) :^{133,168}

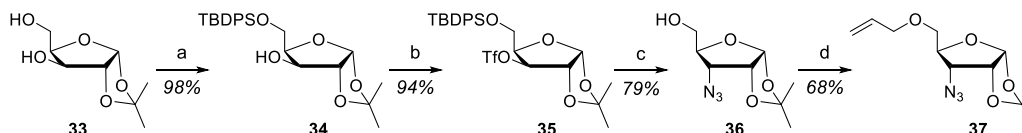


Schéma 8. Réactifs et conditions : (a) TBDPSCl, imidazole, DMAP, CH₂Cl₂, t.a., 2 h; (b) Tf₂O, Pyr., DMAP, CH₂Cl₂, t.a., 2 h; (c)-i) NaN₃, nBu₄NBr, DMF, M.W. 80 °C (25 W), 10 min; -ii) TBAF, THF, t.a., 30 min; (d) NaH, bromure d'allyle, THF, t.a., 2 h.

Le 1,2-*O*-isopropylidène- α -D-xylofuranose (**33**) commercial est protégé sélectivement en position 5 par le groupe *tert*-butyldiphénylsilyle (TBDPS) en formant l'éther de silyle **34** de manière quantitative (98%). Ce groupement protecteur a été choisi pour la présence des deux substituants phényles portés, permettant un suivi CCM des réactions sous UV. Le groupement hydroxyle porté en C-3 est ensuite activé en nucléofuge par la formation d'un groupement triflate. Cet intermédiaire **35** peut être isolé par chromatographie flash sur gel de silice, avec un rendement de 94%. Le triflate **35** est ensuite mis en présence de NaN₃ et d'un agent de transfert dans le DMF anhydre pour former l'azoture correspondant. L'agent de transfert sert à avoir une meilleure dissociation et solubilisation du sel de NaN₃ dans le DMF afin de favoriser la réaction de S_N2 par rapport au produit d'élimination correspondant en travaillant à 50 °C.^{169,170} Divers agents de transfert peuvent être utilisés d'après la littérature,¹⁷¹ nous avons opté pour l'utilisation du bromure de tétrabutylammonium (ou TBAB) présent au laboratoire et moins cher que le chlorure de tétrabutylammonium (TBAC). Le fluorure de tétrabutylammonium (TBAF) ne peut quant à lui être utilisé pour cette réaction, puisqu'il mène majoritairement au produit d'élimination qui est concomitant avec la déprotection de l'éther silylé en C-5. Afin d'améliorer la cinétique de la réaction, nous avons utilisé le micro-onde: un travail d'optimisation a été réalisé sur la température de chauffage, le temps et la quantité de l'agent de transfert (Tableau 8).

¹⁶⁸ Gadthula, S.; Chu, C. K.; Schinazi, R. F. Synthesis and anti-HIV activity of β -D-3'-azido-2',3'-unsaturated nucleosides and β -D-3'-azido-3'-deoxyribofuranosyl nucleosides. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2005**, 24, 1707-1727.

¹⁶⁹ Daley, L.; Monneret, C. An improved synthesis of methyl N-trifluoroacetyl-6-hydroxy- α -L-daunosame. *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 3749-3752.

¹⁷⁰ Gruner, S. A. W.; Truffault, V.; Voll, G.; Locardi, E.; Stöckle, M.; Kessler, H. Design, synthesis, and NMR structure of linear and cyclic oligomers containing novel furanoid sugar amino acids. *Chem. Eur. J.* **2002**, 8, 4365-4376.

¹⁷¹ (a) Baer, H. H.; Gan, Y. Synthesis of the methyl 3-amino-3-deoxy- α - and β -D-allopyranosides and-allofuranosides. *Carbohydr. Res.* **1991**, 210, 233-245; (b) Fernandez, J. M. G.; Mellet, C. O.; Blanco, J. L. J.; Fuentes, J. Enantiopure 2-thioxotetrahydro-1,3-O,N-heterocycles from carbohydrates. 3. Enantiopure C-4 chiral oxazine- and oxazolidine-2-thiones from 3-deoxy-3-isothiocyanato sugars. *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 5565-5572.

Entrée	Agent de transfert	Chauffage	Température	Temps	Rendement
1	<i>n</i> Bu ₄ NCl (4 mol%)	Thermique	50 °C	5 h	70%
2	<i>n</i> Bu ₄ NBr (4 mol%)	Micro-onde	80 °C	30 min	Dégradation
3	<i>n</i> tBu ₄ NBr (4 mol%)	Micro-onde	80 °C	20 min	46%
4	<i>n</i> Bu ₄ NBr (4 mol%)	Micro-onde	80 °C	10 min	77%
5	<i>n</i> Bu ₄ NBr (4 mol%)	Micro-onde	80 °C	5 min	55%
6	<i>n</i> Bu ₄ NBr (1 mol%)	Micro-onde	80 °C	10 min	79%

Tableau 8. Réaction de substitution du triflate **35** par le NaN₃ (2.0 eq.) dans le DMF

Initialement menée sous chauffage thermique classique à 50 °C (entrée 1), la réaction de substitution de l'azoture de sodium est complète au bout de 5 heures en présence de 4 mol% de *t*Bu₄NCl, menant à un rendement de 70% de l'azoture correspondant et aucune trace du produit d'élimination. La transposition au chauffage par micro-onde s'est basée sur les tables prévues à cet effet fournies par Biotage. Après 30 min de chauffage à 80 °C (entrée 2), la conversion du triflate est totale, mais le produit majoritaire est celui de l'élimination. Le temps de réaction a été abaissé par tranche de 10 min. Si le produit d'élimination s'observe après 20 min de réaction à 80 °C (entrée 3), ce dernier n'est pas présent lors de la réaction sur 10 min (entrée 4) et sur 5 min (entrée 5). Cependant, le temps réactionnel de 5 min est trop court pour voir une conversion totale du triflate de départ : d'où un rendement inférieur à celui issu du chauffage sur 10 min. Néanmoins, chauffer davantage sur un temps aussi court (5 min) n'est pas avantageux car ceci mène directement au produit d'élimination et non à celui de substitution. Ainsi, le temps et la température de chauffage sont fixés à 10 min sous 80 °C. Un dernier essai, utilisant 1 mol% d'agent de transfert (entrée 6) sous les mêmes consignes, a permis d'obtenir un rendement (de 79%) similaire au test n°4. Ces conditions sont donc retenues pour la synthèse du précurseur azoture.

Après optimisation des conditions réactionnelles (entrée 6), l'intermédiaire azoture est directement traité par du TBAF dans le THF pour déprotéger le 5-hydroxyle du groupement TBDPS (conditions classiques), menant au dérivé **36** avec 79% de rendement (sur deux étapes). Le composé **36** est ensuite soumis à une *O*-alkylation en présence de bromure d'allyle et de NaH afin de former par SN₂ le 5-allyl-3-azido-3-déoxy ribose **37** avec 68% de rendement.¹³³

En conclusion, la synthèse de ce précurseur a été réalisée sur l'échelle de plusieurs centaines de milligrammes et de la dizaine de grammes, avec un rendement global de 49% sur 4 étapes.

b) Synthèse du 3-O-2-allyl-5-O-2-propynyl-1,2-dibenzoate- α/β -D-ribofuranose (**43**)

La formation du précurseur **43** suit le chemin synthétique suivant en 5 étapes (Schéma 9) :^{133,172}

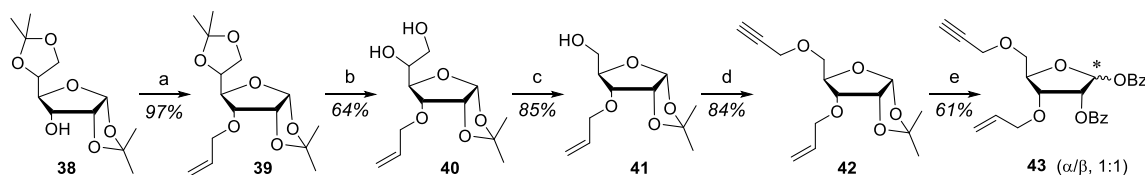


Schéma 9. Réactifs et conditions : (a) NaH, bromure d'allyle, THF, t.a., 3 h; (b) AcOH/Ac. formique/H₂O, t.a., 1 h; (c)-i) NaIO₄, EtOH/H₂O, t.a., 1 h; -ii) NaBH₄, EtOH, t.a., 30 min; (d) NaH, bromure de propargyle, THF, t.a., 3 h; (e)-i) Ac. formique/H₂O, 60 °C, 1 h; -ii) BzCl, Pyr., DMAP, CH₂Cl₂, t.a., 2 h.

La synthèse débute par une réaction de *O*-alkylation du 1,2:5,6-di-*O*-isopropylidène- α -D-allofuranose (**38**) de l'hydroxyle en position C-3 *via* une S_N2 sur le bromure d'allyle en présence de NaH, permettant d'accéder au dérivé 3-*O*-allylique **39** avec un rendement de 97%. Ce sucre a été choisi comme produit de départ car il est facilement accessible sur le marché, contrairement au 1,2-*O*-isopropylidène- α -D-ribofuranose, CAS [37077-81-9], qui est moins accessible et lui-même issu de ce produit commercial. L'utilisation du ribofuranose aurait également demandé une protection préalable par un éther de silyle de la fonction hydroxyle portée en position 5- avant engagement dans l'étape de *O*-alkylation ; or le motif 5,6-*O*-isopropylidène joue parfaitement le rôle de groupement protecteur de la fonction hydroxyle « cachée » au commencement de la synthèse décrite.

L'étape de *O*-alkylation est suivie de la déprotection sélective du 5,6-acétone par un mélange d'acide acétique, d'acide formique et d'eau qui conduit au diol **40** avec un rendement de 64%.¹⁷² Le clivage oxydatif de ce diol vicinal en présence de NaIO₄ succède à l'étape de déprotection. L'aldéhyde intermédiaire correspondant formé est directement réduit par NaBH₄ pour donner le motif ribofuranose **41** souhaité avec un rendement de 85%. Si quelques travaux reportent que l'aldéhyde peut être isolé puis analysé par RMN,¹⁷² nous n'y sommes pas parvenus lors de nos travaux. Celui-ci semble trimériser ou polymériser rapidement après purification et isolement (Schéma 20).

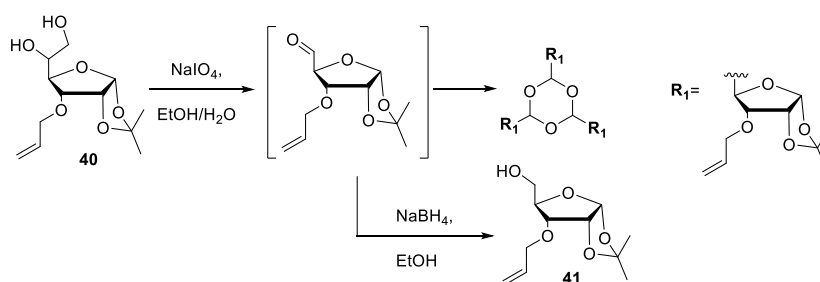


Schéma 20. Réaction de clivage oxydatif du diol **40**

Une réaction de *O*-alkylation de **41** avec du bromure de propargyle et NaH fourni le composé **42** avec un rendement de 84%. Avec notre objectif de former des analogues de CDNs de type hétérodimérique, le

¹⁷² Carlucci, M.; Kierzek, E.; Olejnik, A.; Turner, D. H.; Kierzek, R. Chemical synthesis of LNA-2-thiouridine and its influence on stability and selectivity of oligonucleotide binding to RNA. *Biochem.* **2009**, 48, 10882-10893.

dernier groupe protecteur acétonide (ou le 1,2-*isopropylidène*) a été clivé dans un mélange acide formique/eau (6:1) porté à 60 °C. Après co-évaporations à l'aide de pyridine puis de toluène pour éliminer les traces d'acides, l'intermédiaire brut est engagé en présence de chlorure de benzoyle pour conduire au composé dibenzoate **43** sous la forme d'un mélange d'anomères α et β (α/β : 1:1) (proportions déterminées par RMN, Figure 41) avec un rendement de 64%.¹⁷³

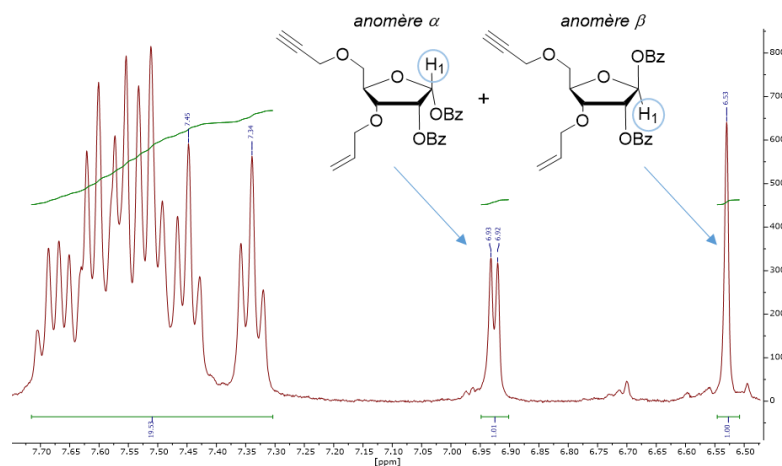


Figure 41. Spectre RMN ¹H (Acétone-d₆, 400 MHz) du mélange d'anomères α/β (1 : 1) **43**

La protection *via* un di-benzoate plutôt qu'un di-acétate se justifie par la facilité de suivre l'avancement des réactions ultérieures par analyses CCM et LC-MS, ainsi que la purification des produits formés. La nature du groupement participant porté en 2-, qu'il s'agisse d'un acétyle ou d'un benzoyle, n'influe pas de manière significative sur la réaction de *N*-glycosylation puisque tous deux stabilisent convenablement l'ion oxocarbénium intermédiaire formé *in situ*. Seul l'aspect cinétique de la réaction est impacté. Par ailleurs, la configuration du benzoate anomérique n'a pas d'impact sur la stéréosélectivité lors de la *N*-glycosylation dans les conditions de Vorbrüggen, où la formation de β -nucléoside est favorisée (voir paragraphe sur la réaction de Vorbrüggen).¹⁷⁴ Nous avons donc décidé de travailler avec des mélanges α/β en position anomère à partir du composé **43** lors des étapes suivantes et jusqu'à la réaction d'insertion des bases nucléiques. Ainsi tous les composés suivants (i.e. **44**, **45**, **46**) ont été obtenus sous forme de mélanges équimolaires de diastéréoisomères α et β .

En conclusion, la synthèse de ce précurseur a été réalisée sur l'échelle de plusieurs centaines de milligrammes, ainsi que de la dizaine de grammes, avec un rendement global de 27% sur 5 étapes.

¹⁷³ Ding, H.; Li, W.; Ruan, Z.; Yang, R.; Mao, Z.; Xiao, Q.; Wu, J. Concise total synthesis of two marine natural nucleosides: trachycladines A and B. *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 1681-1685.

¹⁷⁴ Zhong, M.; Nowak, I.; Robins, M. J. 6-(2-Alkylimidazol-1-yl)purines undergo regiospecific glycosylation at N9. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 4601-4603.

I.3-2) Formation du macrocycle à 17 chaînons

Une fois le précurseur azoture **37** et le précurseur propargyle ether **43** obtenus, ces derniers peuvent être couplés *via* une réaction CuAAC pour former l'intermédiaire acyclique **44**, par la création du 1,2,3-triazole en tant que premier lien inter-nucléotidique (Schéma 21).

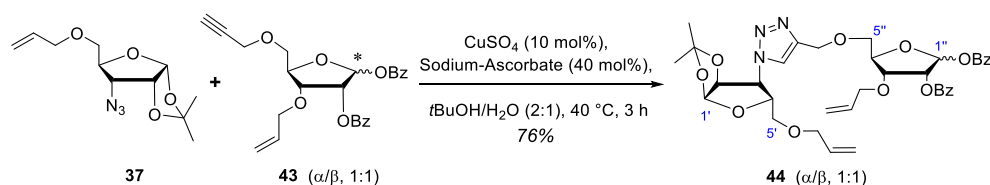


Schéma 21. Réaction CuAAC menant à l'intermédiaire acyclique **44**

Contrairement à Maurya et Rana, qui utilisent l'iodure de cuivre(I) ou CuI (5 mol%) comme catalyseur dans l'eau à 70 °C,¹³³ nous avons préféré utiliser le système réactionnel classique de CuAAC, *i.e.* le sulfate de cuivre (II) comme source de cuivre (I) par réduction *in situ* par l'ascorbate de sodium, dans un mélange tBuOH/H₂O (2:1). D'une part, le système de solvants utilisé permet la dissolution complète des précurseurs **37** et **43** ainsi que des autres espèces réactives. D'autre part, le sulfate de cuivre (II) est soluble dans l'eau à température ambiante contrairement à l'iodure de cuivre (I), nous pouvons travailler avec des températures inférieures à 70 °C (puisque les réactifs sont tous solubilisés). Par ailleurs, il a été préférable d'utiliser des catalyseurs de CuAAC inorganiques qui sont commercialement plus accessibles comparés aux complexes [Cu(CH₃CN)₄]PF₆ et IMeCuBr. De plus les sous-produits de la réaction étant fortement polaires, ces derniers peuvent être séparés du produit de réaction par extraction liquide-liquide, rendant la réaction de CuAAC plus « propre » que dans le cadre d'utilisation de catalyseurs organiques solubles dans les phases organiques d'extractions. Les purifications par chromatographie flash sur gel de silice en sont alors facilitées.

Nous avons réalisé divers essais afin d'optimiser les conditions réactionnelles pour ce couplage entre l'azoture **37** et le composé **43** (Tableau 9). À température ambiante, en présence de 5 mol% de CuSO₄ et 0,2 eq. d'ascorbate de sodium, la conversion de **43** reste incomplète après 5 heures de réaction (entrée 1). L'augmentation de la température à 40 °C permet toutefois l'obtention d'un rendement de 42% (entrée 2) sur la même durée. En doublant la quantité de pré-catalyseurs (entrée 3), le composé **44** a pu être obtenu avec un rendement de 76% sur une durée totale de 3 heures de réaction. Ici, le chauffage par micro-onde, qui permettrait de réduire le temps réactionnel de cette étape, n'a pas été retenu car le chauffage thermique classique reste le plus pertinent pour travailler à des échelles de plusieurs grammes pour cette réaction de couplage.

Entrée	CuSO ₄ , 5.H ₂ O	Ascorbate de sodium	Température	Temps	Rdt.
1	5 mol%	0,2 eq.	25 °C	5 h	12%
2	5 mol%	0,2 eq.	40 °C	5 h	42%
3	10 mol%	0,4 eq.	40 °C	3 h	76%

Tableau 9. Essais de couplage par CuAAC de l'azoture **37** et l'alcyne **43**

Comme le composé **43** existe sous forme d'un mélange d'anomères α/β (1:1), le produit de couplage est aussi obtenu sous la forme de deux diastéréoisomères dans des proportions équimolaires. Le diastéréoisomère β a pu être partiellement isolé afin de mener les analyses RMN et de masse, confirmant l'obtention du produit désiré. La régioisomérie 1,4 a été confirmée par analyse RMN du composé **50b**, où la corrélation entre le $H_{\text{triazole}}/H_{4'}$ est visible par effet NOE (Figure 42).

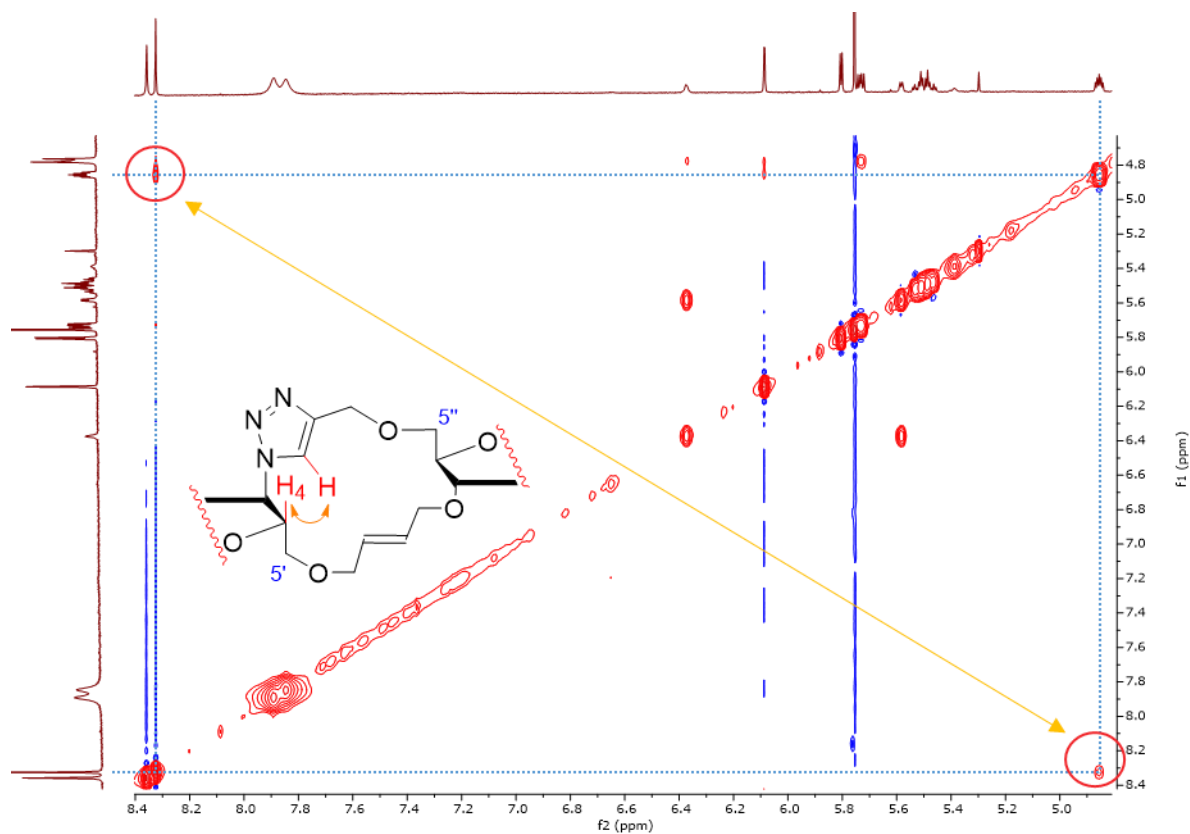


Figure 42. Corrélation $H_{\text{triazole}}/H_{4'}$ sur le spectre NOESY du composé **50b**

Une fois le lien 1,2,3-triazole synthétisé, la macrocyclisation est effectuée par une réaction de métathèse d'oléfines cyclisante pour donner accès à l'intermédiaire **45** (Schéma 22).

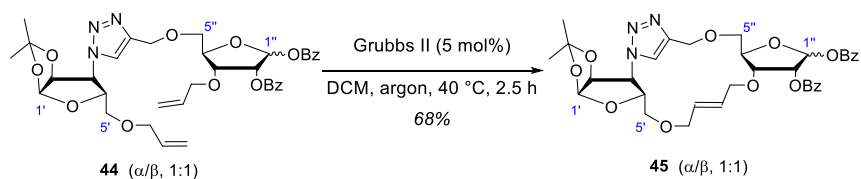


Schéma 22. Macrocyclation du composé **44** par RCM dans le CH_2Cl_2 (7 $\mu\text{mol/mL}$)

Après optimisation (Tableau 3), la RCM se déroule en présence de 5 mol% de catalyseur de Grubbs II dans le CH_2Cl_2 à 40 °C sous haute dilution du substrat (7 $\mu\text{mol/mL}$) et atmosphère inerte. Le composé macrocyclique **45** est ainsi obtenu avec un rendement de 68% sous la forme d'un mélange de diastéréoisomères α/β (1:1). Un essai sous activation par les ultrasons (80 kHz) à 55 °C a été réalisé, cependant la conversion de l'intermédiaire acyclique est faible sur un temps de réaction de 3 heures.

Entrée	Catalyseur de Grubbs	Température	Temps	Rdt.
1	20 mol%	40 °C	2 h 30	62%
2	10 mol%	40 °C	2 h 30	65%
3	5 mol%	40 °C	2 h 30	68%

Tableau 10. Essais sur la réaction de RCM sur le composé **44**

Le motif 1,2,3-triazole agissant comme une manille, celui-ci oblige les deux unités ribose à se rapprocher, favorisant ainsi la rencontre des deux chaînes *O*-allyliques pour une réaction intramoléculaire dans des conditions ultra-diluées. La structure du produit de RCM avec une configuration β **45** a été confirmée par analyse HRMS et RMN ^1H . La disparition du signal caractéristique des groupements *O*-allyles à $\delta = 5,83$ ppm appartenant au composé **44**, suivi de l'apparition de doublets de doublets dédoublés à $\delta = 5,48$ ppm dont la constante de couplage principale égale 15,5 Hz, signaux correspondant à des protons alcényles de type *E*, témoignent de la formation du *trans*-macrocycle **45**. Ces observations sont en accord avec ce qui était attendu des conditions opératoires appliquées mais également avec ce qui est mentionné dans la littérature.¹³³

I.3-3) Introduction de nucléobase et fin de synthèse

a) Formation d'analogues de type hétérodimère

Dans un premier temps, la synthèse d'hétérodimères à partir du mélange du composé **45** a été explorée : ce dernier est engagé dans une première *N*-glycosylation afin d'insérer la *N*-6-benzoyladénine en position anomérique et former le premier nucléoside **46** (Schéma 23).

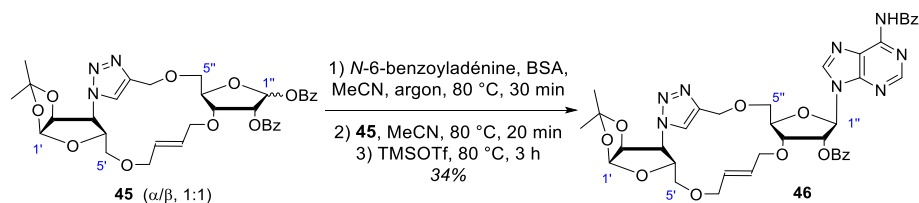
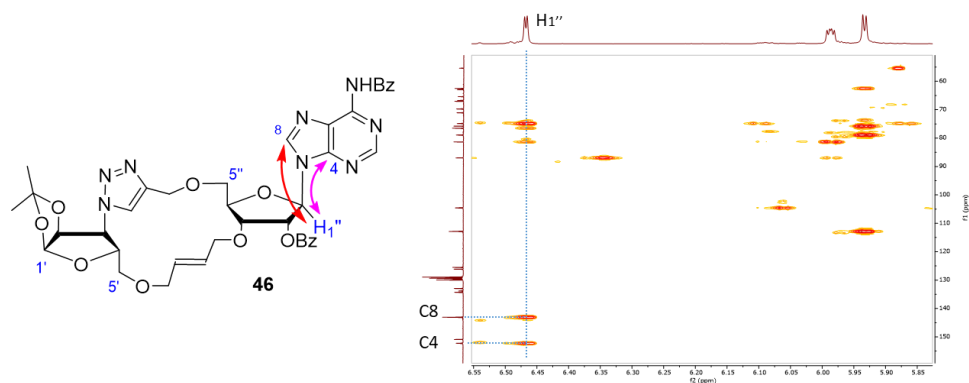


Schéma 23. Réaction de *N*-glycosylation de la *N*-6-benzoyladénine sur le macrocycle **45**

Cette réaction est menée avec le *N,O*-bis(triméthylsilyl)acétamide (BSA) comme agent de silylation de la nucléobase et le TMSOTf en tant qu'acide de Lewis recommandés lors de réactions de *N*-glycosylation des bases puriques, d'après les conditions décrites par Vorbrüggen.^{97,161} La réaction a été menée en « one-pot » dans le MeCN sous atmosphère anhydre et inerte (argon) : la nucléobase (2,0 eq. par rapport au substrat) est d'abord silylée par le BSA (4,0 eq.), l'aspect visuel de la réaction, *i.e.* une solution limpide et homogène, indique la silylation complète de la base au bout de 30 minutes de reflux (80 °C). Le substrat **45** est alors additionné, suivi après 30 minutes de reflux, par l'acide de Lewis (2,5 eq.). À l'issue des 2 heures à reflux dans le MeCN, la consommation du composé **45** était totale d'après le suivi CCM et LC-MS. Le composé mono-nucléosidique **46** a été isolé avec un rendement de 34% après purification. Les analyses RMN (1D et 2D) de ce composé ont permis de conclure que le régioisomère *N*-9 a été obtenu majoritairement : l'analyse HMBC montre une corrélation entre le proton H_{1''} et les carbones C-4 et C-8 de la base purique (Figure 43).



Les autres produits secondaires n'ont pas été caractérisés en RMN mais identifiés par analyse LC-MS. L'un d'entre eux serait le régioisomère *N*-1 (et non le régioisomère *N*-7) qui est obtenu avec 10% de rendement sous nos conditions opératoires, isomère cinétique décrit dans les travaux de Boryski et Framski.¹⁶⁷ L'isomérisation de ce dernier en adénosine *N*-9 est possible dans le chlorobenzène en présence d'APTS. Toutefois, cette étape supplémentaire n'a pas été testée dans le but d'augmenter le rendement du

composé **46**. L'apparition d'une masse correspondant au substrat **45** déprotégé d'un benzoyle en position anomérique suggère que la réaction n'était pas arrivée à terme : le temps réactionnel devrait alors être allongé afin que la conversion du substrat **45** en produit de *N*-glycosylation soit totale, et ainsi augmenter le rendement en produit **46**. Cependant, ces différentes pistes d'optimisation du couplage de la première base nucléique n'ont pas été explorées, les efforts ayant d'abord été mis sur la validité de notre modèle synthétique visant la formation d'hétérodimères.¹⁷⁵

Une fois le composé **46** isolé, ce dernier est directement engagé dans la déprotection du groupement acétonide restant, suivi de l'estérification en benzoate des hydroxyles en position C-1' et C-2'. Sont alors appliquées les mêmes conditions réactionnelles que celles décrites pour la formation du composé **43**. Après une purification difficile, l'intermédiaire di-benzoate **47** a été obtenu avec un rendement d'environ 70% sous la forme d'un mélange de deux diastéréoisomères α/β (1:1), uniquement caractérisé par LC-MS. Bien qu'un léger excès de chlorure de benzoyle ait été introduit lors de la formation du di-benzoate, la benzylation de l'amide *N*-6 porté par l'adénine n'a pas été observée par cette analyse. Le dérivé **47** est alors soumis à une seconde *N*-glycosylation en présence de 6-chloropurine dans les mêmes conditions de condensation de Vorbrüggen, décrites précédemment (Schéma 24). La 6-chloropurine a été choisie au vu de sa facilité d'insertion dans ces conditions, notamment par rapport à des nucléobases guanines protégées, cela, afin de valider notre modèle.

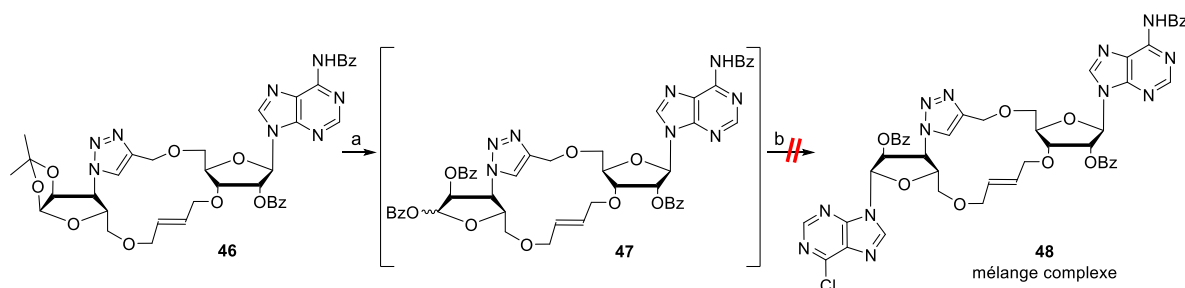


Schéma 24. Réactifs et conditions : (a)-i) Ac. formique/H₂O, 60 °C, 1 h; -ii) BzCl, Pyr., DMAP, CH₂Cl₂, t.a., 2 h; (b) 6-Chloropurine, BSA, TMSOTf, MeCN, 80 °C, 2.5 h.

Malheureusement, cette réaction a mené à l'obtention d'un mélange complexe de divers sous-produits de sorte que l'hétérodimère souhaité **48** n'a pas pu être isolé (Schéma 24). Celui-ci apparaît sous forme de traces lors d'analyses LC-MS par rapport à d'autres produits de réaction secondaire, tel que celui issu de la substitution de la *N*-6-benzoyladénine par la 6-chloropurine *via* une réaction de trans-glycosylation. Celle-ci survient par élimination de la première nucléobase insérée sous l'action du TMSOTf, générant ainsi l'ion oxocarbénium correspondant qui est susceptible de se faire attaquer par la 6-chloropurine ensuite. Il convient de noter que cet ion entre en compétition pour la condensation des nucléobases avec le deuxième ion oxocarbénium formé, celui-ci se situant à son opposé sur la structure macrocyclique. Il est possible d'imaginer que les deux sites soient sujets à une double *N*-glycosylation avec la même base nucléique, d'où les observations de traces d'un dérivé homodimérique de 6-chloropurine. Il est également envisageable que la *N*-6-benzoyladénine migre depuis la position anomérique C-1'', à la position anomérique C-1'.¹⁶⁷ En plus de la trans-glycosylation, s'ajoute l'addition compétitive (entre les positions *N*-7 et *N*-9) des bases puriques, menant à la formation des deux régioisomères correspondants, puisque la 6-chloropurine ne déroge pas à la

¹⁷⁵ Arzel, L.; Dubreuil, D.; Dénès, F.; Silvestre, V.; Mathé-Allainmat, M.; Lebreton, J. Synthesis of ribonucleosidic dimers with an amide linkage from d-xylose. *J. Org. Chem.* **2016**, 81, 10742-10758.

règle.¹⁷⁶ Ainsi, le nombre de possibilités de produits synthétisables lors de cette seconde réaction de *N*-glycosylation devient important, expliquant ainsi l'obtention d'un mélange final très complexe. Dans l'ensemble, cette approche synthétique ne semble pas adaptée pour la formation de CDNs hétérodimériques par réactions de Vorbrüggen successives.

Il serait alors possible d'envisager de changer la voie de synthèse pour que la seconde base ne soit pas introduite par réaction de *N*-glycosylation, mais plutôt par une approche régiosélective qui soit compatible avec la présence de la première nucléobase insérée. Ce premier essai semble donc peu prometteur et oriente la synthèse de nos analogues CDNs vers de nouvelles perspectives.

b) Formation d'analogues de type homodimère

Si l'approche hétérodimère n'a pas été concluante, le macrocycle **45** peut facilement être modifié afin d'orienter la synthèse vers la formation de CDNs homodimériques. Le composé di-benzoate est alors placé sous les mêmes conditions acides de déprotection du groupement 1,2-*isopropylidène* précédentes dans le but de cliver le dernier restant. Le di-hydroxyle produit est alors aussitôt engagé dans la réaction d'estérification en di-benzoate de manière à fournir le composé tétrabenzoate **49** avec un rendement de 56% sous la forme d'un mélange de quatre diastéréoisomères α/α , α/β , β/α et β/β en proportion (1:1:1:1) (Schéma 25).

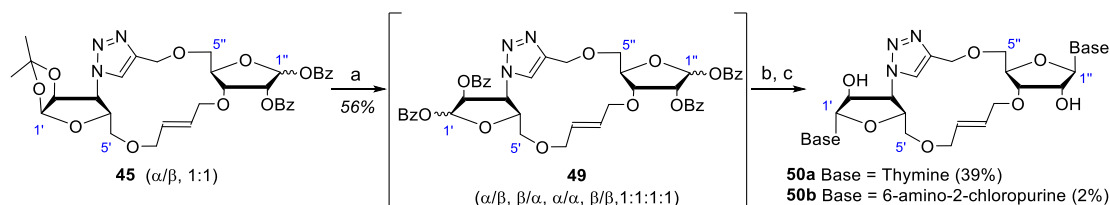


Schéma 25. Réactifs et conditions : (a)-i) Ac. formique/H₂O, 60 °C, 1 h; -ii) BzCl, Pyr., DMAP, CH₂Cl₂, t.a., 2 h; (b) thymine (**50a**) et 2,6-dichloropurine (**50b**), BSA, TMSOTf, MeCN, 80 °C; (c) NH₃ in MeOH (7N), t.a., 48 h.

La composition de ce mélange a été observée par analyse RMN ¹H et se déduit d'après les observations antérieures lors des essais de clivage/protection menant au précurseur **43**. L'analyse HRMS confirme l'obtention du composé désiré : le tétrabenzoate **49**. Cet intermédiaire est ensuite soumis aux conditions de Vorbrüggen adaptées à notre système afin d'insérer simultanément deux nucléobases (Schéma 25).^{94,177}

Les essais sur cette réaction « one-pot » ont été menés avec la thymine (Tableau 11), qui est reconnue comme facilement insérable dans les conditions de Vorbrüggen. Par ailleurs la présence du groupement méthyle porté en C-5 est un bon indicateur de l'insertion des deux bases lors d'analyses RMN.

¹⁷⁶ Boryski, J. Reactions of transglycosylation in the nucleoside chemistry. *Curr. Org. Chem.* **2008**, 12, 309–325.

¹⁷⁷ Amiot, N.; Heintz, K.; Giese, B. New approach for the synthesis of c-di-GMP and its analogues. *Synthesis* **2006**, 24, 4230-4236.

Entrée	Thymine	BSA	TMSOTf	Temps	Conversion	Rendement
1	6,0 eq.	10,0 eq.	6,0 eq.	2 h	70%	-
2	6,0 eq.	10,0 eq.	6,0 eq.	3 h	100%	58%
3	6,0 eq.	10,0 eq.	6,0 eq.	4 h	100%	70%

Tableau 11. Essais de double N-glycosylation sur le substrat **49** avec la thymine dans l'acétonitrile à 80 °C.

Un premier essai a alors été mené en présence de 6,0 eq. de thymine, 10,0 eq. de BSA et 6,0 eq. de TMSOTf dans l'acétonitrile (entrée 1) à 80 °C. Après ajout du TMSOTf, le milieu est porté à 80 °C pour 2 heures, cependant la conversion de l'intermédiaire **49** n'était pas totale (estimée à 70% par LC-MS). Un ajout de 2,0 eq. de TMSOTf et 1 heure de reflux supplémentaire ont permis d'obtenir une conversion totale de ce dernier avec un rendement de 58% (entrée 2). Lors d'un dernier essai, une conversion totale a été observée après 4 heures de réaction à la même température avec un rendement de 70% (entrée 3).

Une fois le dimère de thymine formé, celui-ci est directement engagé en présence d'une solution d'ammoniac dans le MeOH (7N), dans l'intention de cliver par aminolyse les deux fonctions benzoates en position C-2' et C-2'', et libérer les fonctions hydroxyles. Cette réaction, menée à température ambiante reste néanmoins longue (48 heures) mais permet une déprotection douce de notre premier analogue CDN homodimère **50a** avec un rendement de 39%.

Les premiers essais étant concluants avec la thymine, nous avons voulu transposer ces conditions pour l'addition de bases puriques et non pyrimidiques (Tableau 12), qui sont les nucléobases de choix pour la ligation à STING.

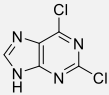
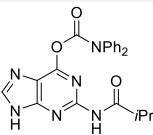
Entrée	Nucléobase (6,0 eq.)	BSA	TMSOTf	Temps (N-glycosylation)	Conversion de 49	Rdt. (après étapes de déprotection)
1		10,0 eq.	6,0 eq.	4 h	100%	2%
2		10,0 eq.	6,0 eq.	4 h	100%	non isolé
3		10,0 eq.	6,0 eq.	4 h	100%	non isolé
4		10,0 eq.	6,0 eq.	4 h	100%	non isolé

Tableau 12. Essais de double N-glycosylation avec les bases puriques

Si la conversion du macrocycle **49** est de manière générale observée dans chaque cas, les analyses de suivi réactionnel (CCM et LC-MS) indiquent la formation de nombreux produits suite à la réaction de Vorbrüggen, rendant les purifications des intermédiaires di-glycosylés assez fastidieuses. Les fractions contenant le produit majoritaire sont grossièrement isolées dans des proportions correspondant à 40% de la

masse attendue. Elles sont ensuite engagées dans les étapes de déprotection en espérant une simplification des mélanges obtenus. Dans le cas de l'analogue 6-chloropurine, 2,6-dichloropurine et *N*-6-benzoyladénine, une réaction d'aminolyse à l'aide d'une solution d'ammoniac dans le MeOH (7N) est réalisée sur 48 h à température ambiante. Outre le fait d'offrir des conditions de déprotection douces par rapport à des conditions utilisant, soit le méthanolate de sodium (NaOMe), soit l'hydroxyde de sodium (NaOH), la possibilité de réaliser une substitution nucléophile aromatique d'un atome de chlore par le nucléophile engagé est à considérer. Or, dans le cadre de l'aminolyse des chloropurines, la substitution d'un atome de chlore par l'ammoniac mènera à la formation de l'aminopurine correspondante, ce qui reste intéressant pour l'obtention finale d'analogues de type di-adénosine. Concernant l'analogue di-guanine, une première étape de déprotection en milieu acide à l'aide du TFA (10,0 eq.) dans le CH₂Cl₂ à 0 °C permet de cliver le groupement carbamate présent, suivie d'une étape d'aminolyse pour cliver le groupement isobutyryle.

Malheureusement l'effet escompté de simplification du nombre d'espèces présentes par la réaction de déprotection semble avoir mené à la perte du produit désiré, d'après les analyses LC-MS. Ceci a été le cas pour l'analogue di-guanine, où le traitement par le TFA a mené à la formation de nombreux sous-produits ne correspondant pas à celui attendu. Il en va de même pour le di-*N*-6-benzoyladénosine et le di-6-chloropurine, où l'aminolyse semble avoir dégradé l'intermédiaire réactionnel. En revanche, dans le cas de l'analogue 2,6-dichlorpurine, une simplification du milieu réactionnel a pu être observée. Le produit majoritaire a été isolé en très petite quantité ; les analyses RMN et LC-MS montrent que deux substitutions du chlore par l'ammoniaque ont bien été effectuées, menant à l'analogue 6-amino-2-chloropurine **50b** avec un rendement global de 2% sur les deux étapes.

En dépit des efforts déployés pour caractériser et isoler les produits désirés, le faible rendement obtenu pour le produit **50b**, de même que pour l'ensemble des résultats préliminaires sur la formation des analogues homodimères de purine, nous montrent qu'un travail plus approfondi et méthodologique est nécessaire pour que ce chemin synthétique soit valide pour des séries puriques. Le projet a donc été interrompu à ce stade dans l'optique de nous concentrer sur d'autres synthèses moins chronophages, puisque la longueur de cette synthèse explorée, les difficultés de séparation et les limitations en temps, sont trop conséquentes pour les résultats escomptés.

Néanmoins, les principaux verrous rencontrés lors de ces dernières étapes de synthèse, proviennent principalement du couplage des bases puriques sous les conditions de Vorbrüggen : la possibilité d'obtenir des mélanges de régiosomères, due à la compétition entre les positions *N*-7 (cinétique) et *N*-9 (thermodynamique), mène en général à l'obtention de rendements faibles. Dans le cadre de la double *N*-glycosylation, cette problématique est multipliée par deux puisque chaque position anomérique peut mener à la formation de deux isomères, augmentant ainsi à 4 le nombre de diastéréoisomères synthétisables dans ces conditions. Il en résulte alors un mélange complexe de produits finaux.

Il peut paraître alors intéressant de comprendre l'influence de l'acide de Lewis (utilisation de SnCl₄), de la nature du solvant (MeCN/DCE/Toluène) et du temps réactionnel sur la formation d'homodimères portant des bases puriques, puisque peu de travaux y font mention. De plus, tester des conditions d'isomérisation de *N*-7 en *N*-9 sur ce type d'analogue de CDN ferait également sens, particulièrement si le ratio d'isomère *N*-9-*N*-9 peut être augmenté une fois la double *N*-glycosylation effectuée. Réaliser une réaction de couplage, accompagnée d'une transglycosylation à partir du substrat **46** activé en présence d'un large excès d'une nucléobase à insérer afin de former un homodimère, est une piste éventuelle qui n'a pas été encore explorée.

En conclusion, ce premier travail de synthèse d'analogues de CDN nous a conduit à l'obtention de deux produits homodimères grâce à la voie de synthèse explorée ; celle-ci ne semble cependant pas adaptée à la formation de produits hétérodimères. Par ailleurs, l'obtention des analogues homodimères est contrastée : si l'insertion de bases pyrimidiques se déroule sans trop de difficultés, il en va différemment pour les bases puriques, où la double insertion semble plus hasardeuse, répercussion mesurable sur les rendements obtenus sur chacune des familles. L'analogue di-thymine **50a** a été obtenu avec un rendement global de 5,5% sur l'ensemble des étapes en partant de la voie azoture et avec un rendement global de 3,1% depuis la voie alcyne. L'analogue di-6-amino-2-chloropurine **50b** a quant à lui été produit respectivement dans des rendements globaux de 0,3% et 0,2% en partant des voies azoture et alcyne. Un travail méthodologique sur la série purine serait donc nécessaire afin de trouver des conditions optimisées pour l'insertion simultanée de deux de ces nucléobases.

1.3-4) Analyses spectrales des CDNs obtenus

La pureté des deux analogues de dinucléotides cycliques (**50a** et **50b**) a été évaluée par analyse HPLC sur phase inverse, celle-ci s'élevant à 97% pour **50a** et 95% pour **50b**. Ces composés ont été caractérisés par RMN (700 MHz) ^1H et ^{13}C ainsi que les techniques 2D usuelles. Un seul set de résonnance apparaît sur les spectres du proton et du carbone, affirmant la présence d'un seul isomère. La double configuration anomérique β est confirmée par analyse des spectres 1D et 2D :

- Les constantes de couplage entre les protons $\text{H}_{1'}$ et $\text{H}_{2'}$, ainsi que $\text{H}_{1''}$ et $\text{H}_{2''}$, respectivement de l'ordre de 2.0 Hz et 5.0 Hz, indiquent une configuration *trans* sur la partie ribose.
- Un effet NOE, montre un couplage entre le proton $\text{H}_{1'}$ (5.83 ppm pour l'analogue **50a**, 6.09 ppm pour l'analogue **50b**) et le proton $\text{H}_{4'}$ (4.72 ppm pour l'analogue **50a**, 4.86 ppm pour l'analogue **50b**). De même que le proton $\text{H}_{1''}$ (5.73 ppm pour l'analogue **50a**, 5.81 ppm pour l'analogue **50b**) et le proton $\text{H}_{4''}$ (3.94 ppm pour l'analogue **50a**, 4.05 ppm pour l'analogue **50b**).

Par ailleurs, l'analyse NOE permet de confirmer la formation du 1,4-triazole lors de la réaction CuAAC par la présence d'un couplage entre le proton porté par ce motif et le proton $\text{H}_{3'}$. Enfin, la constante de couplage entre les protons alcènes étant de 15,5 Hz atteste de la conformation *trans*- obtenue majoritairement lors de l'étape de RCM.

Les spectres d'absorption UV de ces composés ont été analysés lors de l'analyse HPLC (système eau/MeOH). Le maximum d'absorbance de nos composés, $\lambda = 260 \text{ nm}$, est en accord avec la littérature et permet donc d'attester la formation de dinucléotides de type pyrimidique et purique.

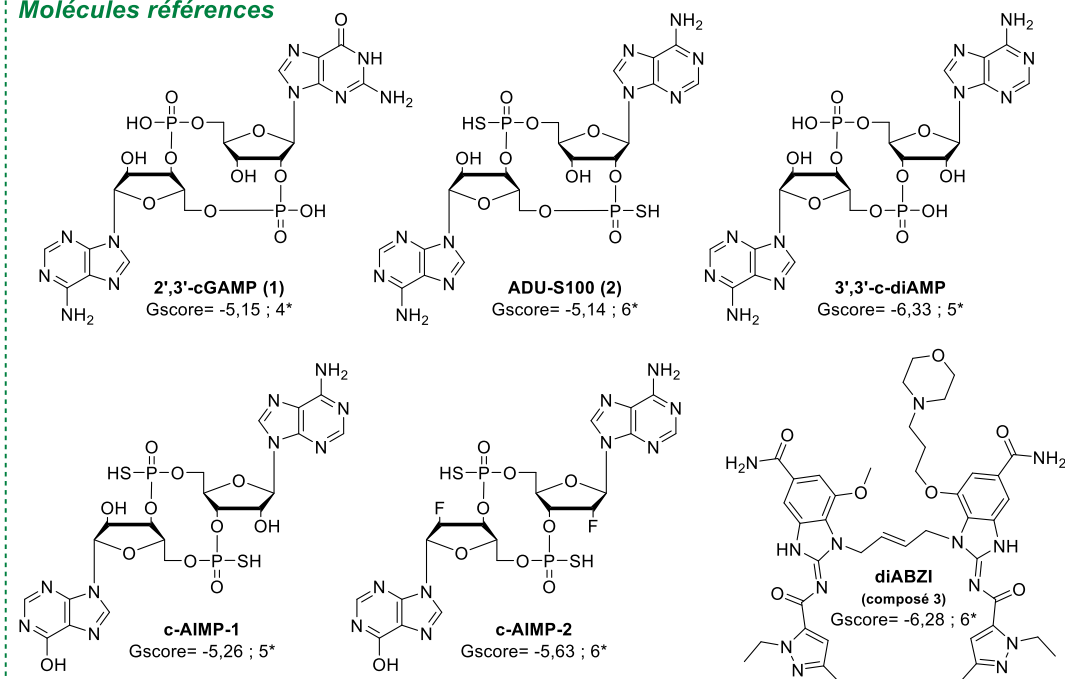
II) Synthèse de CDNs à partir d'un précurseur nucléosidique

La réaction de *N*-glycosylation de Vorbrüggen étant une étape assez délicate pour l'insertion des nucléobases purines dans le cadre de la formation de CDN hétérodimères et homodimères, nous avons décidé d'explorer une seconde stratégie permettant de s'affranchir de cette étape réactionnelle. La nouvelle synthèse est fondée sur les modifications successives d'un nucléoside comme substrat initial, afin de former deux précurseurs spécifiques qui seront couplés sur les dernières étapes menant à la formation d'un analogue de CDN. Cette stratégie est d'ailleurs largement suivie dans la littérature pour la synthèse de dinucléotides cycliques. Elle nécessite néanmoins la mise en place raisonnée de groupements protecteurs orthogonaux lors de la formation de chaque précurseur, ceux-ci devant être compatibles avec les réactions de couplage finales.

Le nucléoside choisi, parmi les nucléosides classiques, est l'adénosine puisqu'elle est reconnue comme portant l'une des meilleures nucléobases favorisant la liaison à STING et est intégrée dans de très nombreux analogues synthétiques de CDNs ayant une activité agoniste prometteuse (voir Chapitre I). Les liens inter-nucléotidiques cibles restent le motif triazole et la chaîne insaturée. L'utilisation de l'outil informatique et d'un travail de modélisation *in silico* ont permis de sélectionner quelques CDNs candidats, dont la structure ayant le meilleur potentiel et répondant aux critères synthétiques mentionnés (Figure 44).

Ce modèle a été élaboré par Dawid Warszycki et Andrzej J. Bojarski de la Polish Academy of Sciences à partir des structures de HDAC stockées dans la banque de structures PDB récemment décrites par Smola *et al.* (PDBids : 6Z15, 6YDZ, 6S86, 6YDB, 6Z0Z, 6YEA, 6XNP)⁸⁵ et trois complexes de STING co-cristallisés avec un seul ligand. Ont été extraits de ce premier criblage les résidus d'acide aminé prépondérants dans les interactions avec les ligands actifs : S162, G166, Y167, R232, R238, E260 et T263. Un profil type d'interaction entre ligand et site actif de la protéine STING est alors établi. Par la suite, nos analogues de CDNs candidats (Figure 44) sont criblés à travers ce filtre par ancrage virtuel avec le site actif de la protéine. Chaque composé se voit attribuer un Gscore et un score étoile ; ces valeurs indiquent respectivement si la complexation à la cible est favorable (ou non) et le nombre d'interactions favorables avec les résidus d'acides aminés retenus comme prépondérants dans les interactions avec les ligands. À des fins de validation de ce modèle, des ligands aux activités agonistes connues (*i.e.* le 2',3'-cGAMP, le 3',3'-cdiAMP, l'ADU-S100, le diABZI (composé 3), le c-AIMP-1 et le c-AIMP-2), et non présents dans la banque PDB ont également été criblés à travers ce filtre et ont montré des Gscores inférieurs à -4,8 (Gscore minimal requis). Ceci témoigne donc une bonne affinité avec la protéine de manière virtuelle permettant de corroborer le modèle (Figure 44).

Molécules références



Molécules cibles

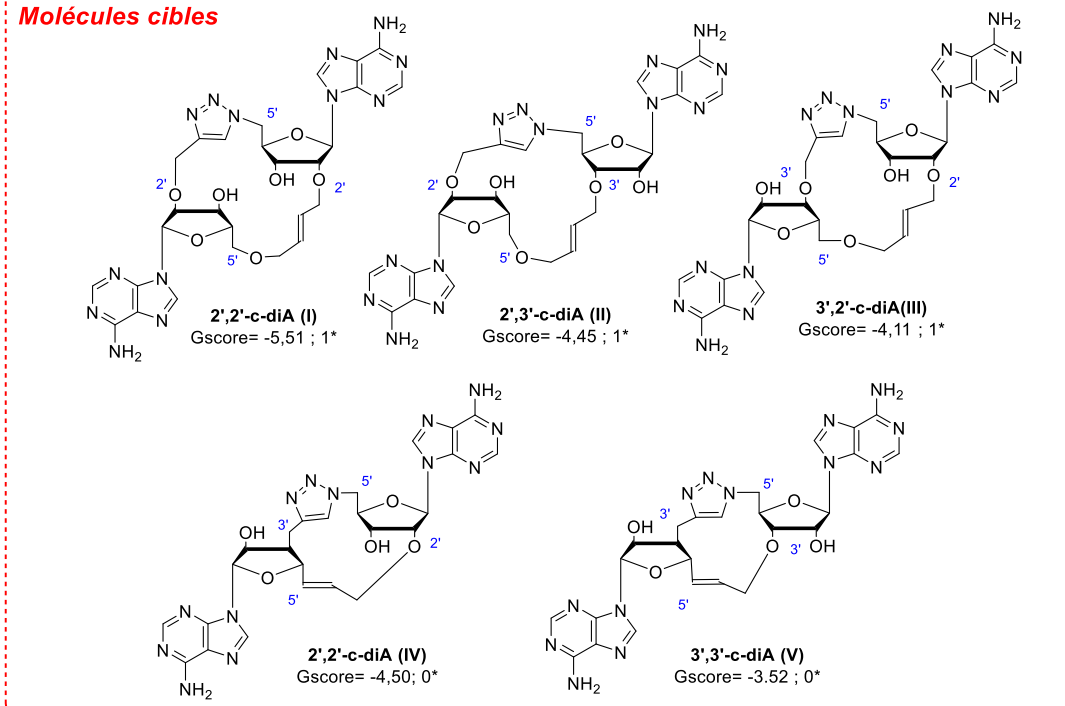


Figure 44. Résultats du criblage *in silico* sur les CDNs références et les analogues ciblés

Ainsi, le CDN cible est le suivant (Figure 45) :

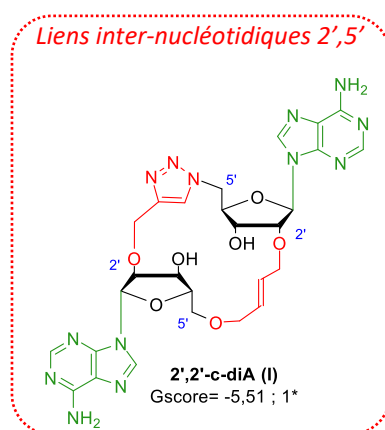


Figure 45. Structure de 2',2'-c-diA ciblée

Ce 2',2'-diadénosine cyclique (2',2'-c-diA) est relié par deux liens inter-nucléotidiques 2'-5'. L'utilisation de l'adénosine comme substrat initial donne accès à la formation de liens 2'-5', contrairement à la précédente approche (*via* les substrats osidiques). En effet, la nucléobase est insérée par *N*-glycosylation de type Vorbrüggen en position anomérique ; la formation très majoritaire du β -nucléoside étant orientée par la formation de l'oxocarbénium. Or la présence d'un groupement participant en C-2' assez activant est nécessaire (par exemple un acyle) : malheureusement, le lien éther chaîne alkyle en C-2 n'est pas suffisant pour orienter l'insertion en β . La position C-2 était donc réservée à ce groupement participant, qui dans le cadre de cette nouvelle approche, n'a plus lieu d'être. À noter que le motif 1,2,3-triazole est porté ici en position C-5' sur l'un des nucléosides, contrairement aux analogues précédents sur lesquels il est porté en position C-3' : cela confère à la nouvelle structure macrocyclique un peu plus de flexibilité. De plus, nous souhaitons conserver l'alcène *trans* sur ce type d'analogue puisqu'il est l'isomère le plus facile à synthétiser.

II.1) Rétrosynthèse et stratégie de synthèse envisagées

La rétrosynthèse de cet analogue peut s'envisager de la manière suivante (Schéma 26) :

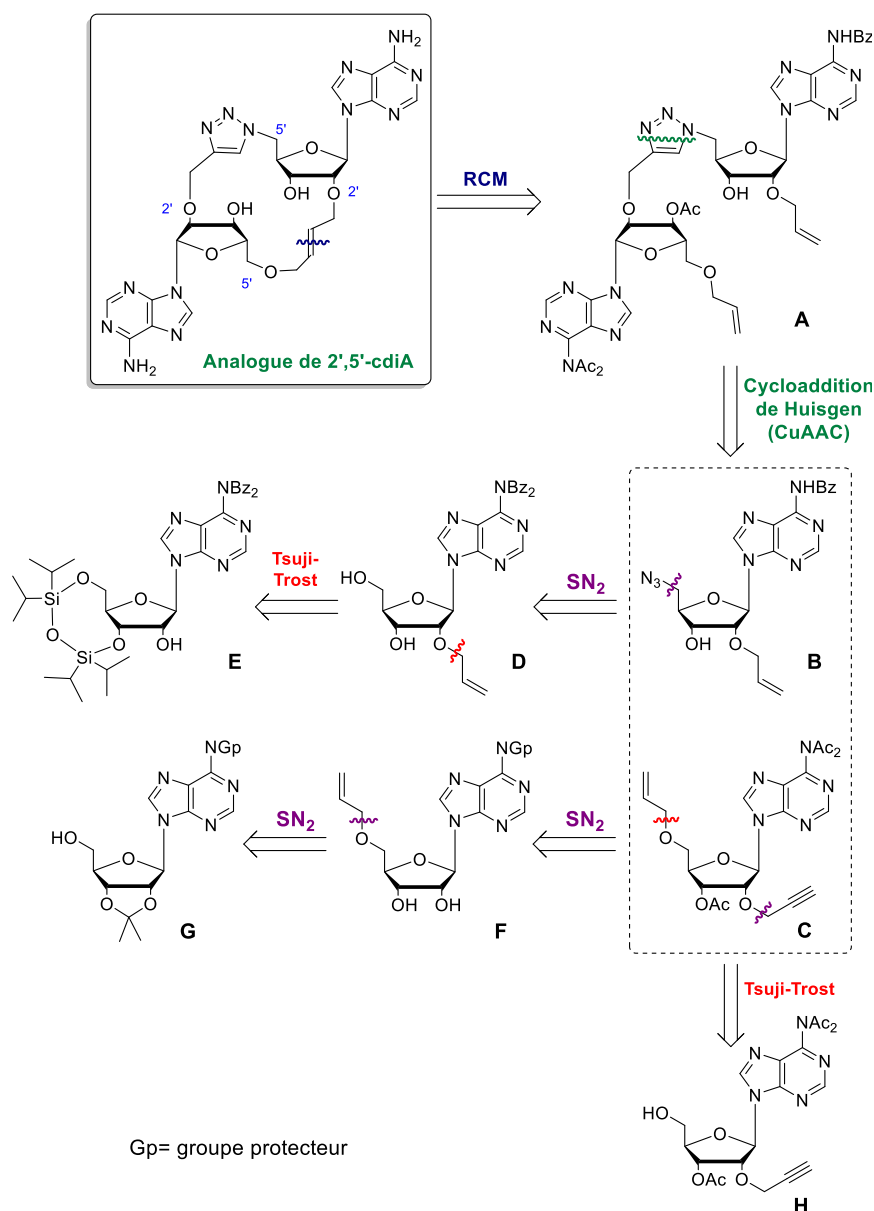


Schéma 26. Rétrosynthèse du nouvel analogue 2',5'-c-diA

En reprenant nos précédents travaux, la formation du dinucléotide cyclique peut se faire à la suite d'une étape de métathèse cyclisante à partir du dinucléotide acyclique **A**. Ce dernier est alors issu d'une réaction de CuAAC entre le fragment azoture **B** et le fragment alcyne **C**. L'azoture **B** peut être obtenu suite à l'azidation régiosélective sur le dérivé 2'-O-allyladénosine **D**, lui-même obtenu à partir d'une O-alkylation régiosélective en C-2' sur l'adénosine protégée **E**. Quant au fragment alcyne **C**, il peut être vu comme la O-alkylation régiosélective en C-2' du fragment 5'-O-allyladénosine **F**, fragment formé à partir de la O-alkylation régiosélective en 5' de l'adénosine protégée **G**. Ou inversement, il peut être issu de la O-alkylation régiosélective en C-5' du dérivé 2'-O-propargyladénosine **H**.

La stratégie de synthèse de ce nouvel analogue repose sur une synthèse convergente où deux fragments dérivés d'adénosine sont couplés sur les étapes de fin dans le but de former le CDN, comme pour les précédentes synthèses d'analogues de CDNs décrites dans ce chapitre.

Comme il a été mentionné, travailler avec un catalyseur de Grubbs en présence de fonction hétéroatomique, comme les amines, peut engendrer un empoisonnement du catalyseur et ainsi inhiber la réaction de métathèse. L'amine portée en C-6 de chaque adénosine doit donc être protégée pour éviter ce désagrément, et parmi les groupements possibles, les acyles ont déjà montré leur efficacité dans la littérature.¹⁵⁹ L'amine correspondante est alors transformée en amide à l'aide d'un chlorure de benzoyle ou d'acétyl, pour que son pouvoir chélatant sur le ruthénium soit amoindri. D'autres fonctions, comme les carbamates, sont également des groupes protecteurs compatibles avec la réaction de métathèse cyclisante.¹⁷⁸ Par ailleurs, la position C-2' et C-5' des deux chaînes allyles semble être assez éloignée des deux bases adénines sur le substrat afin que le centre de la réaction de métathèse se déroule sans être gêné par ces centres de chélation. Un second obstacle vient de l'emploi de l'adénosine comme substrat initial : cette molécule présente de nombreux sites réactifs, dont quatre centres nucléophiles. Des protections bien choisies sont donc nécessaires pour mener des réactions de substitution sélectives et efficaces sur le substrat pour mener aux produits souhaités.¹⁷⁹

Les synthèses des divers précurseurs prennent donc en compte l'ensemble des contraintes mentionnées précédemment. Ainsi, l'obtention de l'azoture **B** repose sur une *O*-alkylation de Tsuji-Trost et la substitution régiosélective en C-5' de l'alcool par l'ion azoture N_3^- comme étapes clés. Concernant le précurseur alcyne **C**, deux voies de synthèse peuvent être envisagées en fonction des étapes de *O*-alkylation clés employées (Schéma 27) pour l'introduction des motifs allyle et propargyle :

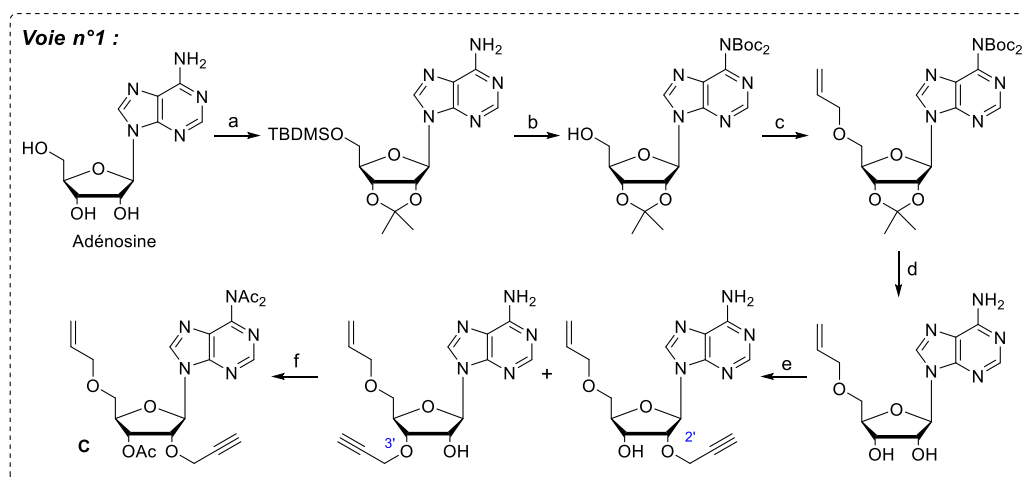


Schéma 27. Réactifs et conditions : (a)-i) orthoformiate d'éthyle, APTS, acétone, t.a. ; -ii) TBDMSCl, Pyr., t.a. ; (b)-i) Boc_2O , DMAP, MeCN, t.a. ; -ii) TBAF, THF, t.a. ; (c) NaH, bromure d'allyle, THF, t.a. ; (d) TFA/ H_2O / CH_2Cl_2 , t.a. ; (e) nBu_2SnO , bromure de propargyle, TBAI, DMF, t.a. ; (f) Ac_2O , Pyr., t.a.

Cette première stratégie de synthèse introduit en premier l'allyle en position 5' en présence de NaH et de bromure d'allyle. La présence de groupements protecteurs est nécessaire pour que cette réaction soit sélective de cette position (Schéma 29), ceux-ci devant être en mesure de résister à des conditions basiques

¹⁷⁸ O'Leary, D. J.; Ferguson, M. L.; Grubbs, R. H. Ring-closing metathesis synthesis of N-Boc-3-pyrroline. *Org. Synth.* **2003**, 80, 85-92.

¹⁷⁹ Muranaka, K.; Ichikawa, S.; Matsuda, A. Design, and synthesis of 3',5'-ansa-adenosines as potential Hsp90 inhibitors. *Tetrahedron Lett.* **2009**, 50, 5102-5106.

afin d'éviter une déprotection partielle, qui mènerait à une seconde *N*- ou *O*-alkylation. L'utilisation de groupements Boc et acétonide est ainsi compatible avec ces prérequis, contrairement au benzyle qui est bien plus sensible et demande de travailler en conditions anhydres poussées. Des essais sous ces conditions drastiques ont été réalisés (Schéma 28) :

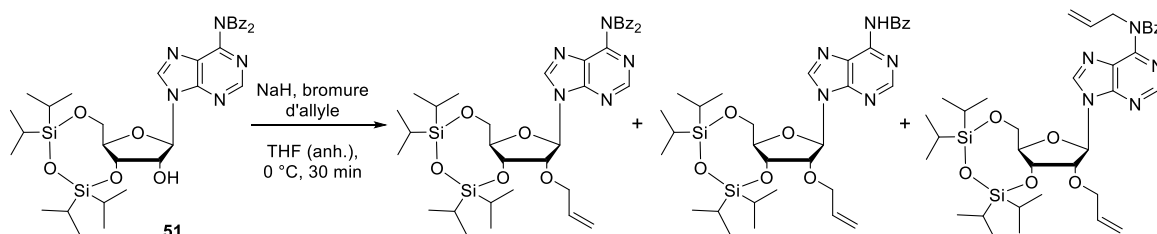


Schéma 28. Essai de conditions de *O*-alkylation classiques sur le substrat **51**

Le résultat obtenu est alors un mélange des différentes espèces alkylées ci-dessus, ainsi qu'une partie du substrat n'ayant pas réagi. Le clivage d'un groupement *N*-benzoyl indique la présence de traces d'ions hydroxyde dans le milieu : ces traces peuvent provenir du NaH utilisé (dispersion dans l'huile minérale), qui contient des traces d'hydroxyde de sodium en absorbant l'humidité de l'air. Ce problème de qualité du NaH motive, d'une part, l'utilisation des conditions d'alkylation Tsuji-Trost pour la position C-2' sur le précurseur **B**, d'autre part, l'insertion du bromure de propargyle sur un autre substrat que le **51**.

De plus, cette première stratégie repose sur l'introduction du motif propargyle par catalyse à l'oxyde de dibutylétain, menant à l'obtention des deux régioisomères (le C-2' et C-3') de *O*-alkylation.^{180,181} Cette réaction étant spécifique des fonctions diols, aucun groupement protecteur en particulier ne semble obligatoire lors de cette étape. Cependant, le précurseur alcyne se doit d'avoir l'amine portée en C-6 protégée en amide, ou en imide, afin d'être un substrat compatible avec la RCM ultérieure, d'où une protection totale par des acétates.

¹⁸⁰ Zhou, Y.; Li, J.; Zhan, Y.; Pei, Z.; Dong, H. Halide promoted organotin-mediated carbohydrate benzylation: mechanism and application. *Tetrahedron* **2013**, 69,2693-2700.

¹⁸¹ Srivastava, S. C.; Raza, S. K. Synthesis of propargyl modified nucleosides and phosphoramidites and their incorporation into defined sequence oligonucleotides. 1995, WO9518139.

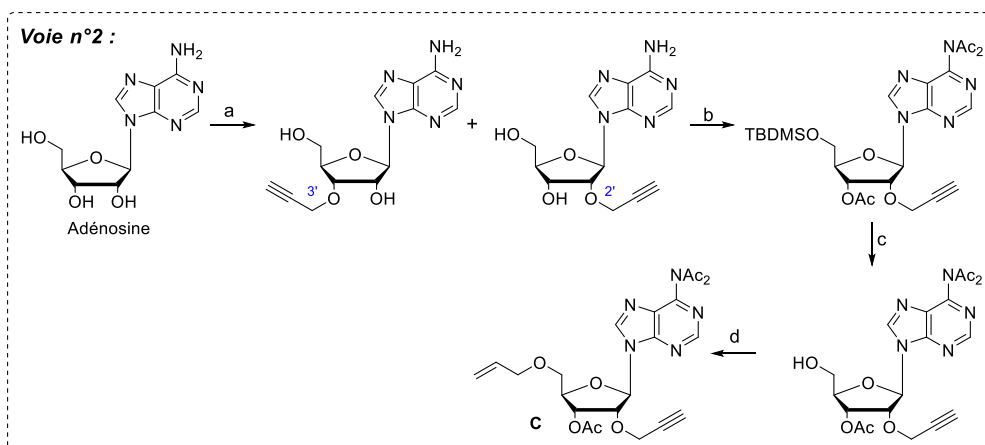


Schéma 29. Réactifs et conditions : (a) NaH, bromure de propargyle, DMF, 50 °C ; (b)-i) TBDMSCl, Pyr., t.a. ; -ii) Ac₂O, Pyr., t.a. ; (c) TBAF, AcOH (20%), THF, t.a. ; (d) allyléthylcarbonate, Pd₂(dba)₃, DPPB, THF, 90 °C.

La seconde stratégie de synthèse (Schéma 29) insère quant à elle le motif propargyle en tout début de synthèse en présence de NaH et TBAI (conditions d'*O*-alkylation classique), menant à l'obtention des régioisomères C-2' et C-3'.¹⁸² Une protection régiosélective en C-5' par un éther de silyle accompagnée d'une protection totale du substrat par les acétates, permet d'obtenir, une fois le clivage du silyle par le TBAF, l'hydroxyle libre en position C-5'. Ceci, afin d'ajouter le motif allyle par *O*-alkylation de Tsuji-Trost : conditions compatibles avec l'acétate en C-3' et l'imide portée en N-6.

Ces deux voies de synthèse résument les deux grandes approches possibles pour la formation de ce précurseur alcyne **C**, les groupements protecteurs employés étant sélectionnés en fonction des réactions d'*O*-alkylation clés. Ces étapes ne sont d'ailleurs pas totalement régiosélectives, ce qui conduit à des mélanges d'isomères, sauf dans le cas où la position de substitution souhaitée reste libre, avec l'ensemble des autres bloquées par des groupes protecteurs (cas de la réaction de Tsuji-Trost).

¹⁸² Jawalekar, A. M.; Op de Beeck, M.; van Delft, F. L.; Madder, A. Synthesis and incorporation of a furan-modified adenosine building block for DNA interstrand crosslinking. *Chem. Commun.* **2011**, 47, 2796-2798.

II.2) Résultats et discussion

II.2-1) Synthèses des précurseurs

a) Synthèse du 2'-O-allyl-5'-azido-5'-déoxy-(N-benzoyl)-adénosine (**54**)

La synthèse de ce fragment azoture **54** suit le chemin synthétique suivant en 4 étapes (Schéma 30) :¹⁵⁹

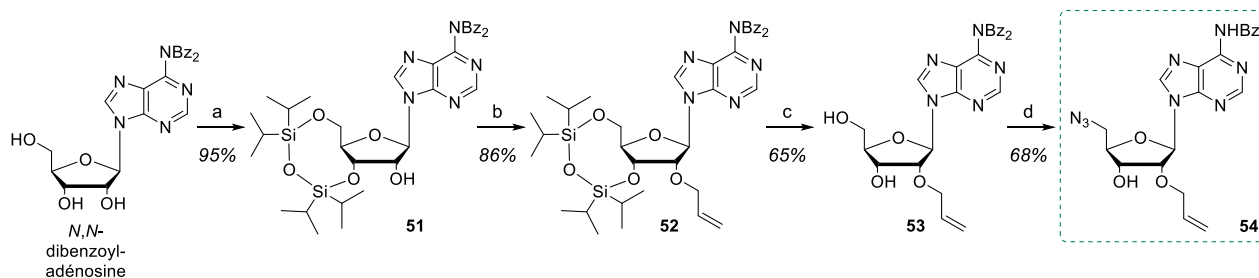


Schéma 30. Réactifs et conditions : (a) TIPDSCl₂, Pyr., t.a., 3 h ; (b) allyléthylcarbonate, Pd₂(dba)₃, DPPB, THF, 70 °C, 30 min ; (c) TBAF, AcOH, THF, t.a., 2,5 h ; (d) CBr₄, PPh₃, NaN₃, DMF, r.t., 3 h.

La *N,N*-dibenzoyladénosine est synthétisée à partir de l'adénosine en suivant le protocole décrit par Zhu *et al.*¹⁸³ avec 95% de rendement. Cette dernière est mise en présence de TIPDSCl₂ dans la pyridine afin que les positions 3' et 5' soient sélectivement silylées par ce réactif, qui mène au composé **51** avec 95% de rendement. L'hydroxyle en 2' subit une réaction d'alkylation dans des conditions de Tsuji-Trost. Cette réaction d'allylation décrite par plusieurs groupes,^{159,184,185} utilise l'allyléthylcarbonate puisque cette espèce nous place dans des conditions de Tsuji-Trost irréversibles : le groupement nucléofuge éthylcarbonate libéré par formation du π -cation va se dégrader en CO₂ et éthanolate.

L'intermédiaire 2'-O-allyl-adénosine **52** est isolé avec un rendement de 86%. Le clivage du motif TIPDS se fait à l'aide de TBAF dans le THF tamponné à l'acide acétique (20% du volume de solution de TBAF 1M ajouté) pour éviter le clivage du *N*-benzoylbenzamide en benzamide porté en *N*-6.¹⁸⁶ Ce dernier a été observé sur une réaction test. En procédant ainsi, l'attaque nucléophile sur l'imide en *N*-6 par l'ion alcoolate généré en C-5' est évitée. Cette méthode est également utilisée dans la littérature lors de déprotections au TBAF qui peuvent être à l'origine de clivages de fonctions esters.¹⁸⁷ Le *N,N*-dibenzoyl-2'-O-2-propényladénosine **53** est alors obtenu avec un rendement de 65%. Concernant l'addition de l'azoture de sodium régiosélective en position C-5', plusieurs conditions opératoires pouvant y mener ont été testées pour sélectionner celles au meilleur potentiel (Schéma 31) :

¹⁸³ Zhu, X.-F.; Williams Jr., H. J.; Scott, A. I. An improved transient method for the synthesis of *N*-benzoylated nucleosides. *Synth. Commun.* **2003**, 33, 1233-1243.

¹⁸⁴ Sproat, B. S.; Iribarren, A. I.; Guimil Garcia, R.; Beijer, B. New synthetic routes to synthons suitable for 2'-O-allyl oligonucleotide assembly. *Nucleic Acids Res.* **1991**, 19, 733-738.

¹⁸⁵ Odazic, D.; Engels, J. W. Different strategies for the synthesis of 2'-O-aminoethyl adenosine building blocks. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2007**, 26, 873-877.

¹⁸⁶ Smith, A. B.; Ott, G. R. Total synthesis of (–)-macrolactin A. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 13095-13096.

¹⁸⁷ Crouch, R. D. Selective deprotection of silyl ethers. *Tetrahedron* **2013**, 69, 2383-2417.

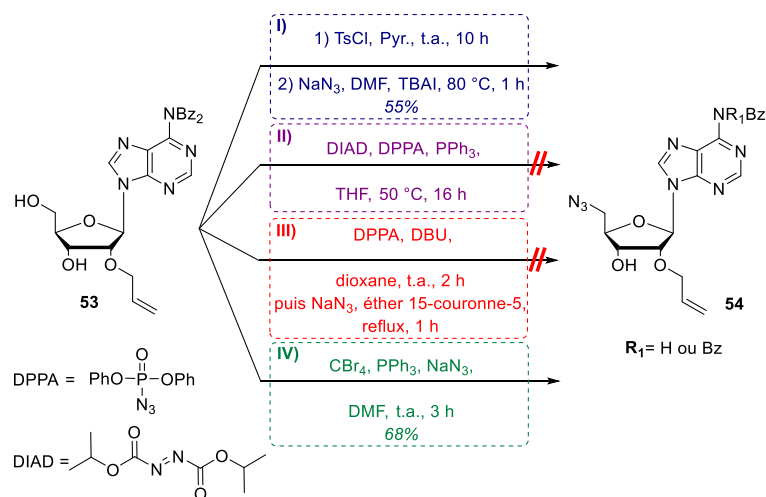


Schéma 31. Conditions opératoires testées de formation de l'azoture **54**

La première voie testée (conditions I) est la formation de l'azoture par activation sélective de l'hydroxyle en 5' en sulfonate, suivie de la substitution nucléophile de type 2 par l'azoture dans le DMF.^{188,189} La première étape se déroule dans la pyridine anhydre à température ambiante en présence de 1,1 eq. de chlorure de tosylé (Tableau 13, entrée 1) afin d'être sous contrôle cinétique (le produit d'addition étant plus rapide à se former sur un hydroxyle primaire que sur un secondaire) et former sélectivement le tosylate en 5'. Cependant la cinétique de cette réaction est assez lente dans ces conditions (16 h) pour avoir une conversion complète du substrat. Le second désavantage étant que l'intermédiaire ne peut pas être purifié sur gel de silice (dégradation partielle observée), il est donc nécessaire de l'engager directement dans l'étape de substitution par le NaN_3 . D'autres conditions opératoires ont donc été explorées pour la première (Tableau 13) et pour la seconde étape (Tableau 14), afin d'optimiser l'obtention de **54** :

Entrée	TsCl	Solvant	Température	Temps	Conversion de 53	Rdt. après substitution par NaN_3
1	1,1 eq.	Pyridine	25 °C	16 h	100%	47%
2	1,1 eq.	Pyridine	40 °C	8 h	100%	43%
3	1,5 eq.	Pyridine	25 °C	10 h	100%	55%
4	1,5 eq.	CH_2Cl_2 /Pyridine	25 °C	10 h	100 %	48%

Tableau 13. Essais sur l'étape de formation du tosylate intermédiaire

L'augmentation de la température (entrée 2) améliore la cinétique de la réaction, cependant des traces du produit de double tosylate ont été observées, menant à des mélanges un peu plus complexes en produits après réaction de NaN_3 . Le second levier d'amélioration de la cinétique est l'utilisation de 1,5 eq. de TsCl (entrée 3) : la réaction se termine après 10 h d'agitation à 25 °C. Un essai en changeant le solvant (CH_2Cl_2) avec un léger excès de pyridine (2,0 eq.) dans le but de diminuer la part de cette dernière et faciliter le

¹⁸⁸ Ciuffreda, P.; Loseto, A.; Santaniello, E. Deamination of 5'-Substituted-2',3'-Isopropylidene Adenosine Derivatives Catalyzed by Adenosine Deaminase (ADA, EC 3.5.4.4) and Complementary Biotransformations Catalyzed by Adenylate Deaminase (AMPDA, EC 3.5.4.6): A Viable Route for the Preparation of 5'-Substituted Inosine Derivatives. *Tetrahedron* **2002**, 58, 5767-5771.

¹⁸⁹ Travaux internes au laboratoire du Dr. Vincent Hervin (non publiés)

traitement intermédiaire, permet d'avoir un rendement de 48% d'azoture, des traces issues de l'intermédiaire double tosylate ayant été observées.

Entrée	NaN ₃	Agent de transfert	Température	Temps	Rendement
1	4,0 eq.	-	80 °C	2 h	43%
2	2.5 eq.	TBAI (4 mol%)	80 °C	1 h	55%
3	2.5 eq.	TBAI (10 mol%)	110 °C (M.W.)	10 min	47%

Tableau 14. Optimisation de la réaction de substitution

La seconde partie des essais a porté sur la substitution de l'azoture : si la réaction donne accès à 43% de produit désiré en présence de 4,0 équivalents de NaN₃ sous conditions classiques (Tableau 14, entrée 1), l'ajout du TBAI comme agent de transfert montre son efficacité en permettant de travailler avec 2,5 équivalents de NaN₃. La réaction est complète en 1 heure de chauffage (entrée 2) et conduit au produit souhaité avec 55% de rendement. Le passage au micro-onde (entrée 3) a également été testée mais de manière non approfondie : le premier essai à 110 °C ayant montré plus de sous-produits lors des analyses de suivi que dans les conditions préalables ; la température est alors trop conséquente et devrait être diminuée.

En conclusion, l'utilisation d'un léger excès de TsCl (1,5 eq.) dans la pyridine, suivi de la substitution par le NaN₃ accompagnée de TBAI dans le DMF à 80 °C ont été les conditions ayant permis d'obtenir le meilleur rendement pour l'obtention de l'azoture **54** avec le groupement *N*-6-imide restant intacte (R₁= Bz). Nous avons également testé d'autres conditions se déroulant en une seule étape en vue de les comparer avec la première méthode de formation de l'azoture. Parmi elles, nous retrouvons une réaction de type Mitsunobu (conditions II) et deux réactions de type substitution d'Appel (conditions III et IV).

Dans les conditions de Mitsunobu (conditions II) décrites par Lu *et al.*¹⁹⁰, l'utilisation du DIAD (1,5 eq.) et de PPh₃ (1,5 eq.) permet l'activation de l'alcool en tant que groupe nucléofuge en formant un intermédiaire phosphinium. La source d'azoture est le DPPA (2,0 eq.), soluble dans des solvants organiques, autres que le DMF, permettant la libération de cet anion lorsque cette espèce est attaquée par l'adduit DIAD-PPh₃. Menée à température ambiante sur 16 h puis à 50 °C sur 2 h, aucune conversion du substrat n'a été observée lors des suivis réactionnels. Ceci vient de la présence du second groupement hydroxyle libre qui vient parasiter la réaction.

Les premières conditions d'Appel testées (conditions III) ont été décrites par les groupes de Huang et Aldrich.¹⁹¹ Celles-ci utilisent le DPPA (1,5 eq.) en présence de DBU (2,0 eq.) dans le 1,4-dioxane afin de former l'intermédiaire phophonium en libérant l'ion azoture *in situ*, suivi de l'ajout de NaN₃ (4,0 eq.) accompagné d'éther 15-couronne-5 (1 mol%) permettant la capture du cation sodium et rendre nu l'ion azoture. Après un reflux (105 °C) de 3 heures, on observe une faible conversion du substrat. Ceci peut s'expliquer par l'utilisation du 1,4-dioxane qui est un moins bon solvant de dissociation des charges qu'est le DMF. Enfin, les dernières conditions d'Appel testées (conditions IV) sont celles utilisées pour la formation de 5'-azido-5'-

¹⁹⁰ Lu, X.; Zhang, H.; Tonge, P. J.; Tan, D. S. Mechanism-based inhibitors of MenE, an acyl-CoA synthetase involved in bacterial menaquinone biosynthesis. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, 5963-5966.

¹⁹¹ (a) Zhang, G.; Richardson, S. L.; Mao, Y.; Huang, R. Design, synthesis, and kinetic analysis of potent protein N-terminal methyltransferase 1 inhibitors. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, 13, 4149-4154; (b) Nelson, K. M.; Viswanathan, K.; Dawadi, S.; Duckworth, B. P.; Boshoff, H. I.; Barry, C. E.; Aldrich, C. C. Synthesis and pharmacokinetic evaluation of siderophore biosynthesis inhibitors for *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Med. Chem.* **2015**, 58, 5459-5475.

deoxynucléosides à partir du nucléoside non protégé.^{192,193} Le mécanisme de cette réaction de substitution est le suivant (Schéma 32) :

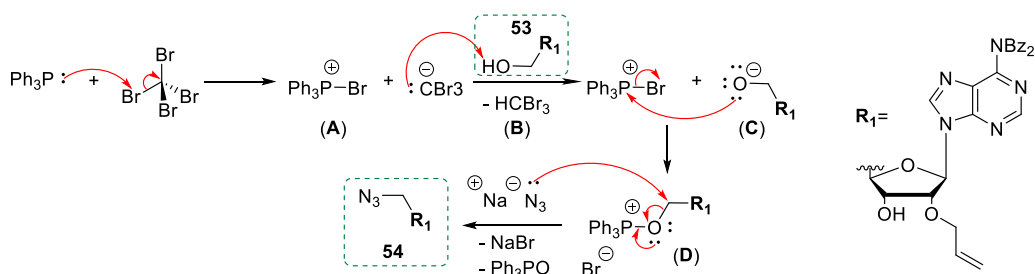


Schéma 32. Mécanisme d'azidation du composé **53**

Le CBr_4 (1,5 eq.) et la PPh_3 (1,43 eq.) vont former un sel de bromure de phosphonium (**A**) et du bromoforme (**B**) par déprotonation d'un alcool du substrat menant à l'alcoolate intermédiaire (**C**). Ce dernier va substituer le bromure de phosphonium, formant l'intermédiaire (**D**) qui va par la suite être substitué ($\text{S}_\text{N}2$) par l'azoture de sodium (3,0 eq.) et former le produit de substitution **54**. Néanmoins la formation d'espèces nucléophiles dans le milieu va mener au clivage d'un des *N*-benzoyles du *N*-6-imide, le benzamide correspondant ($\text{R}_1 = \text{H}$) est alors formé. Dans ces conditions, la 5-azido-5-déoxy-*N*-benzoyl-2'-*O*-2-propényl-adenosine (**54**) est obtenue de manière efficace en one-pot avec un rendement de 68%. Cette méthode est donc retenue pour la formation de l'azoture désiré. Celle-ci est en outre transposable de l'échelle de la centaine de milligramme à plusieurs centaines de milligramme (environ 300 mg).

En conclusion, le précurseur azoture **54** a été obtenu sur une échelle de la centaine de milligramme en suivant la voie de synthèse décrite, avec un rendement global de 36% sur 4 étapes en partant de la *N,N*-dibenzoyladénosine.

¹⁹² Yamamoto, I.; Sekine, M.; Hata, T. One-step synthesis of 5'-azido-nucleosides. *J. Chem. Soc. Perk. Trans. I* **1980**, 306-310.

¹⁹³ Peterson, T. V.; Streamland, T. U. B.; Awad, A. M. A tractable and efficient one-pot synthesis of 5'-azido-5'-deoxyribonucleosides. *Molecules* **2014**, 19, 2434-2444

b) Synthèse du 3'-acétate-5'-O-allyl-2'-O-2-propynyl-N,N-diacétyladénosine (63)

La formation de ce précurseur commence par la première stratégie de synthèse précédemment décrite. L'adénosine est d'abord protégée par un 2',3'-O-isopropylidène en présence d'orthoformate d'éthyle et de APTS dans l'acétone. L'acétale correspondant est obtenu de manière quantitative (98%). L'étape de protection de l'hydroxyle en 5' par un groupement silyle (TBDMS) mène au dérivé **55** avec un rendement de 97%. Elle est suivie de la protection de l'amine portée en N-6 par la formation de carbamates *via* des groupements de type Boc (Schéma 33).^{194,195}

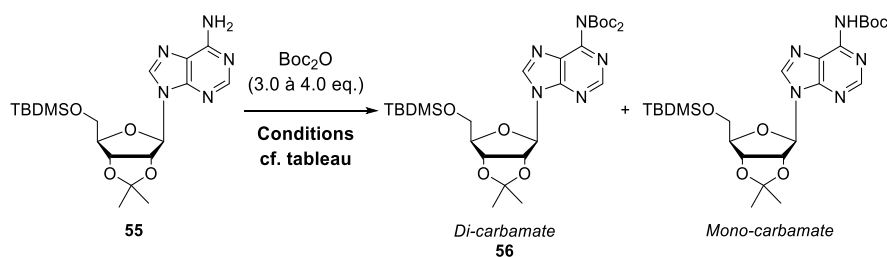


Schéma 33. Essais sur la formation du di-carbamate en N-6

Entrée	Base	Solvant	Rdt. <i>Mono-carbamate</i>	Rdt. <i>Di-carbamate</i>
1	DMAP (10 mol%)	MeCN	95%	0%
2	NEt ₃ (5,0 eq)	DMF	87%	0%
3	NaH (2,0 eq.)	THF	94%	0%
4	NaH (2,0 eq.)	DMF	2%	98%

Tableau 15. Conditions de formation du di-carbamate en N-6 en présence de Boc₂O (4,0 eq.) à t.a. sur 10 h.

L'utilisation du dicarbonate de di-*tert*-butyle (Boc₂O) en large excès (4,0 eq.) avec une quantité catalytique de DMAP (10 mol%) dans l'acétonitrile (Tableau 15; entrée 1) n'a pas permis la conversion du substrat en espèce *N,N*-di-carbamate mais seulement *N*-mono-carbamate. Nous faisons le même constat lorsque le système utilise de la triéthylamine dans le DMF (entrée 2). Former l'espèce avec une double protection en N-6 a nécessité l'usage de NaH (entrées 3 et 4) pour activer de manière nucléophile la fonction carbamate et permettre l'addition du second Boc. Si dans le THF la conversion s'arrête à l'espèce mono-carbamate, elle est au contraire totale dans le DMF et permet l'obtention de l'espèce de type imide **56** avec 98% de rendement. L'acétonide et le *N,N*-di-carbamate ont été sélectionnés pour leur stabilité face aux conditions basiques fortes utilisées lors de l'étape d'allylation. La déprotection de l'éther de silyle par le TBAF permet de libérer l'alcool **57** en 5' avec un rendement de 76% ; intermédiaire étant engagé dans une réaction de *O*-alkylation en présence de NaH et de bromure d'allyle, donnant accès à l'espèce mono-alkylée **58** avec un rendement de 91%.

¹⁹⁴ Ikeuchi, H.; Meyer, M. E.; Ding, Y.; Hiratake, J.; Richards, N. G. J. A critical electrostatic interaction mediates inhibitor recognition by human asparagine synthetase. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 6641-6650.

¹⁹⁵ Ruysscher, D. D.; Pang, L.; De Graef, S.; Nautiyal, M.; De Borggraeve, W. M.; Rozenski, J.; Strelkov, S. V.; Weeks, S. D.; Van Aerschot, A. Acylated sulfonamide adenosines as potent inhibitors of the adenylate-forming enzyme superfamily. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, 174, 252-264.

Le 2',3'-isopropylidène et le *N,N*-di-carbamate portés par **58** étant des fonctions clivables en conditions acides fortes, une double déprotection en « one-pot » est envisagée par utilisation d'un mélange TFA/CH₂Cl₂/H₂O (5:4:1).¹⁹⁴ Cependant, le produit de déprotection attendu n'a pas été obtenu après 30 minutes de réaction à température ambiante (Tableau 16, entrée 1), mais un produit de dégradation du nucléoside : l'allyladénine et le ribose. Plusieurs tentatives de conditions de clivage de ces groupes ont été testées afin de contourner ce problème (Tableau 16) :

Entrée	Acide	Quantités	Solvant	Température	Temps	Observations
1	TFA /H ₂ O	20 eq./15 eq.	CH ₂ Cl ₂	25 °C	30 min	Dégradation du substrat
2	TFA/CH ₂ Cl ₂ /H ₂ O	20 eq./15 eq.	CH ₂ Cl ₂	0 °C	30 min	Dégradation du substrat et clivages partiels Boc
3	TFA/CH ₂ Cl ₂ /H ₂ O	5,0 eq./5,0 eq.	CH ₂ Cl ₂	0 °C	30 min	Dégradation du substrat et clivages partiels Boc
4	TFA/CH ₂ Cl ₂	2,5 eq.	CH ₂ Cl ₂	25 °C	30 min	Clivages partiels Boc
5	TFA/CH ₂ Cl ₂	2,5 eq.	CH ₂ Cl ₂	0 °C	30 min	Cinétique très lente, clivages partiels Boc
6	TBAF/THF	4,0 eq.	THF	70 °C	1,5 h	Clivages partiels Boc

Tableau 16. Essais de conditions de déprotection sur 1 mmol de dérivé **58**

En plaçant le milieu réactionnel à 0 °C dans le même mélange TFA/CH₂Cl₂/H₂O (entrée 2), le constat reste le même au bout de 30 minutes : le produit résultant est un mélange complexe de dégradation du substrat (estimée à 70%) et de produits de déprotections intermédiaires dont le produit attendu. Les suivis CCM et LC-MS, réalisés toutes les 5 minutes, indiquent une conversion plutôt rapide vers les produits de dégradation et le produit *N*-mono-carbamate. Le constat reste le même lorsque le TFA est ajouté en quantité moindre (5.0 eq.), la cinétique est néanmoins plus lente (entrée 3). La présence d'eau est alors éliminée en espérant un effet moins délétère pour le substrat et ne favoriser que le clivage des deux groupements carbamates de l'amine (entrée 4) : un mélange complexe est également obtenu. Placé à 0 °C (entrée 5), la cinétique est lente et la conversion du substrat n'est pas complète après 30 minutes même si les produits de clivage total et partiel des carbamates sont observés. Un essai de déprotection en « conditions nucléophiles », utilisant le TBAF comme agent de clivage des carbamates est tenté (entrée 6).¹⁹⁶ Après 1,5 h de reflux, la conversion de **58** est totale, toutefois un mélange de produits de déprotection des carbamates est alors observé. Une prolongation du temps de chauffe de 30 min et d'une heure ne suffisent pas à simplifier le mélange obtenu. Même observation lorsqu'un ajout de 1,0 eq. de TBAF est accompagné de 30 min de chauffage supplémentaire.

En conclusion de ces tests, la déprotection totale « one-pot » du substrat **58** n'est pas concluante dans les conditions explorées. Cette dernière devrait *a priori* se dérouler en deux temps : le clivage du *N,N*-di-carbamate en premier, suivi du clivage de l'acétonide. Cependant, les conditions de déprotection explorées ne sont pas efficaces lorsque la fonction imide *N*-6 est la seule ciblée. En effet, le substrat semble sensible aux conditions acides nécessaires à la déprotection des hydroxyles 2' et 3' ce qui est problématique. Cette voie

¹⁹⁶ Routier, S.; Saugé, L.; Ayerbe, N.; Coudert, G.; Mérour, J.-Y. A mild and selective method for N-Boc deprotection, *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 589-591.

de synthèse requiert à ce stade une exploration plus approfondie de conditions de clivage efficaces afin d'obtenir le dérivé entièrement déprotégé **59**.

Nos efforts se sont portés sur la seconde voie de synthèse proposée qui semble plus prometteuse. La première voie de synthèse du précurseur **C** se termine à cette étape (Schéma 34) :

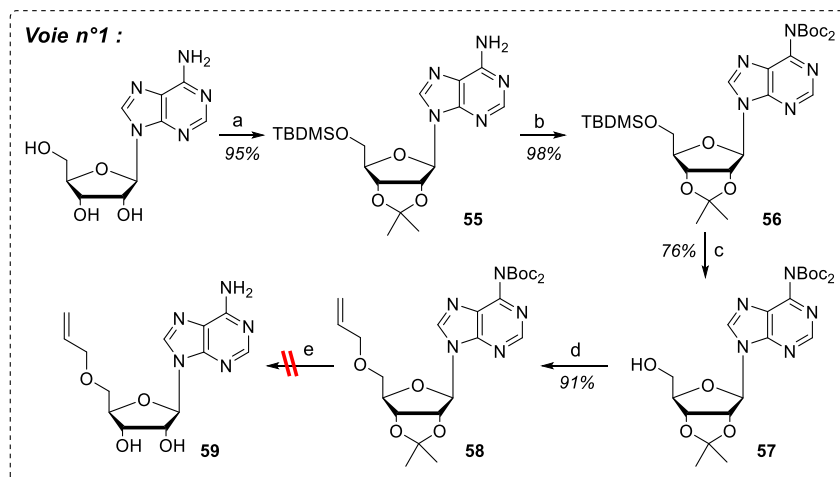


Schéma 34. Réactifs et conditions : (a-i) orthoformiate d'éthyle, APTS, acétone, t.a., 8 h ; -ii) TBDMSO, Pyr., t.a., 4 h ; (b) Boc₂O, NaH, DMF, t.a., 10 h ; (c) TBAF, THF, t.a., 3 h ; (d) NaH, bromure d'allyle, THF, t.a., 4 h ; (e) TFA/H₂O/CH₂Cl₂, t.a., 1 h.

En parallèle, la seconde voie mentionnée a permis l'obtention du précurseur désiré en 4 étapes (Schéma 35) :

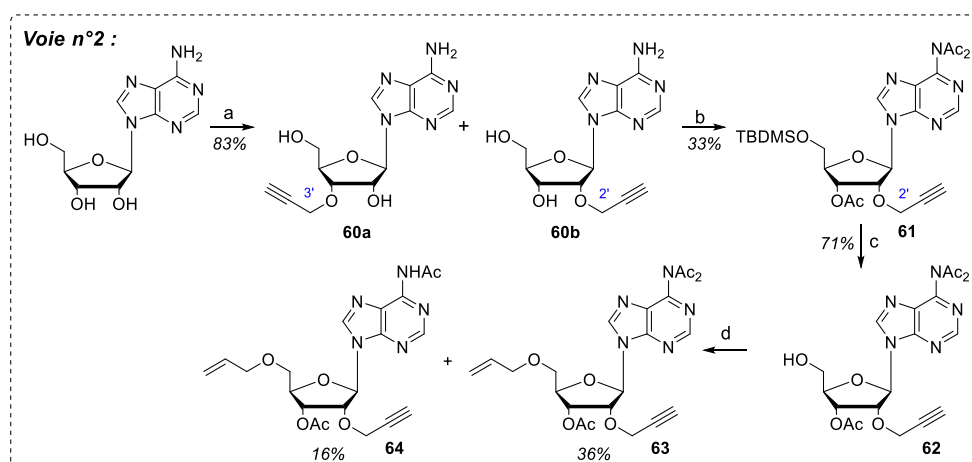


Schéma 35. Réactifs et conditions : (a) NaH, bromure de propargyle, DMF, 50 °C, 16 h ; (b-i) TBDMSO, Pyr., t.a., 4 h ; -ii) AcCl, Pyr., CH₂Cl₂, t.a., 6 h ; (c) TBAF, AcOH (20%), THF, t.a., 1,5 h ; (d) allyléthylcarbonate, Pd₂(dba)₃, DPPB, THF, 70 °C, 1 h.

L'adénosine est d'abord O-alkylée sélectivement en position 2' et 3' en présence de NaH, TBAI et de bromure de propargyle dans le DMF à 50 °C durant 16 h, aboutissant au mélange des régioisomères C-2' et C-3' (respectivement **60b** et **60a**) dans les proportions (1:1) avec un rendement de 83%.¹⁸² Ces derniers sont inséparables par chromatographie flash sur gel de silice, ni par recristallisation de l'EtOH. La sélectivité de cette réaction s'explique de la manière suivante (Schéma 36) :

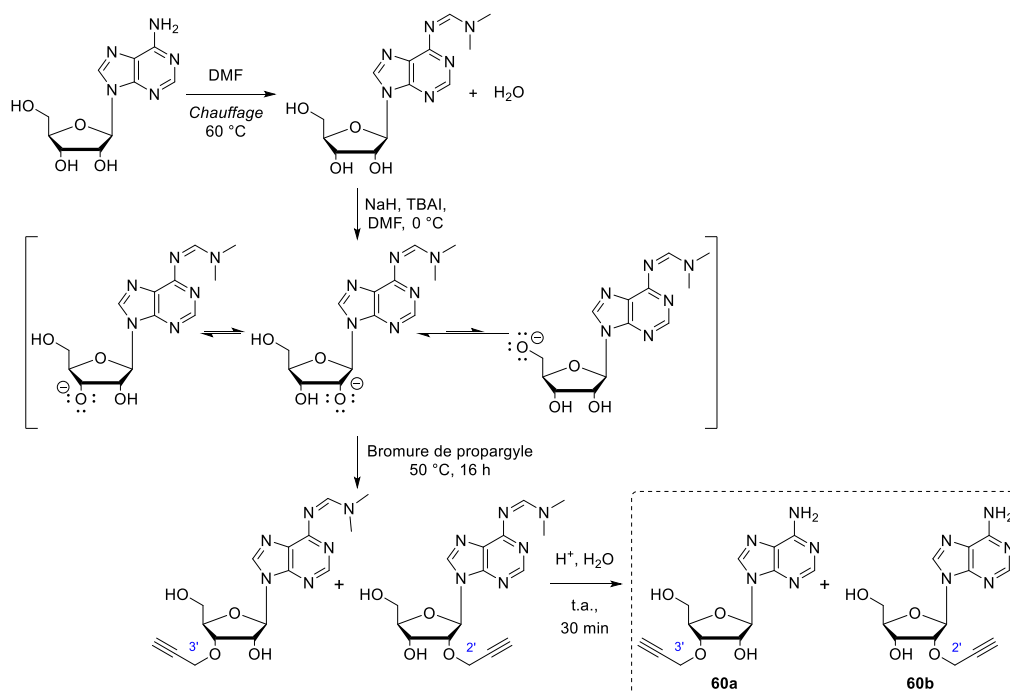


Schéma 36. Formation des isomères 2' et 3' de la O-2-propynyladénosine

Une pré-condensation du DMF sur l'adénosine à 60 °C en formant une molécule d'eau et l'imine intermédiaire sur la position N-6 permet de solubiliser le nucléoside dans le DMF par formation de ce groupement protecteur. Cette fonction imine bloque ainsi la nucléophilie de l'amine primaire de l'adénosine sur le reste de la réaction. Une fois le milieu réactionnel refroidi à 0 °C, le NaH est introduit avec le TBAI afin de déprotoner les groupes hydroxyles. La thermodynamique de la réaction étant régie par les pK_a de ces fonctions, l'hydroxyle en C-5' ($pK_{a5'} = 14,78$) est déprotoné en dernier par rapport aux hydroxyles équivalents des positions C-2' et C-3' ($pK_{a2'} = 12,45$ et $pK_{a3'} = 13,89$). Ces alcoolates en C-2' et C-3' vont donc réagir en premier par S_N2 sur le bromure de propargyle, expliquant ainsi la sélectivité des positions C-2' et C-3' sous ces conditions. Le TBAI est également utilisé ici pour avoir une meilleure solubilisation et dissociation des charges, favorisant la réaction de S_N2 , tout comme le chauffage de la réaction à 50 °C sur 16 h. À la suite d'une réaction de silylation par le TBDMSCl dans la pyridine, le régioisomère C-2' silylé est séparé du régioisomère C-3', avec un rendement de 44%. Une étape d'acétylation totale de cet intermédiaire silylé par un excès de chlorure d'acétyle dans un mélange de pyridine et CH_2Cl_2 mène au composé tri-acétyle **61** qui est alors isolé avec 75% de rendement (soit un rendement total de 33% sur ces deux étapes). Un essai avec de l'anhydride acétique (5,0 eq.) dans la pyridine n'a pas permis d'obtenir le composé tri-acétate mais di-acétate ; cela sur le même temps réactionnel de 6 heures. Or, il est primordial que toutes les fonctions nucléophiles, autres que celles à alkyler, soient « masquées » afin d'éviter une sur-alkylation lors de l'étape de Tsuji-Trost.^{159,185} C'est pourquoi la protection du substrat en tri-acétate est obligatoire pour la suite de la synthèse.

Le dérivé **61** est par la suite mis en présence de TBAF dans un milieu THF tamponné avec de l'acide acétique dans l'intention de préserver les groupements acétates. L'alcool obtenu **62** (71% de rendement) est engagé dans une réaction d'alkylation de Tsuji-Trost reprenant les mêmes conditions que celles décrites pour l'obtention du composé **52**. Si le produit majoritaire est le produit tri-acétate désiré **63**, isolé avec un rendement de 36%, une seconde fraction non négligeable de produit issu de la perte d'un acétyle sur la fonction imide a été isolée avec 16% de rendement, correspondant à l'intermédiaire amide **64**. Cette perte d'acétyle résulte de la libération *in situ* d'éthanolate suite à la formation du cation π -allyle à partir de

l'allyléthylcarbonate et du Pd⁰; l'anion éthanolate va attaquer l'imide en *N*-6, menant à la formation de l'amide **64** et d'acétate d'éthyle volatile. Ce phénomène de déprotection n'a pourtant pas été observé lors de l'utilisation du *N*-benzoylbenzamide précédent, qui doit être plus stable vis-à-vis de cette espèce nucléophile. Le composé **64** reste cependant intéressant pour la suite de la synthèse, puisque la fonction amide sert de groupe protecteur vis-à-vis du catalyseur lors de la réaction de métathèse.

En conclusion de ce travail sur le précurseur alcyne, la voie de synthèse n°2 a permis d'obtenir le composé **63** avec un nombre d'étapes raisonnable, sur des quantités de l'ordre de 300 mg, contrairement à la voie de synthèse n°1. La principale limite de celle-ci réside dans l'obtention de deux régioisomères difficilement séparables lors de la première étape de synthèse, demandant une quantité double d'adénosine de départ pour obtenir la quantité de l'isomère 2' souhaité. La quantité restreinte obtenue de ce précurseur va limiter le nombre de tentatives possibles sur les dernières étapes de la synthèse.

II.2-2) Synthèse du macrocycle

a) Formation du 1,2,3-triazole par CuAAC

Une fois le précurseur azoture **54** et le précurseur propargyle **63** (et **64**) obtenus, ces derniers peuvent être couplés *via* une réaction CuAAC pour former l'intermédiaire acyclique di-adénosine **65** par la formation du 1,2,3-triazole en tant que premier lien inter-nucléotidique (Schéma 37).

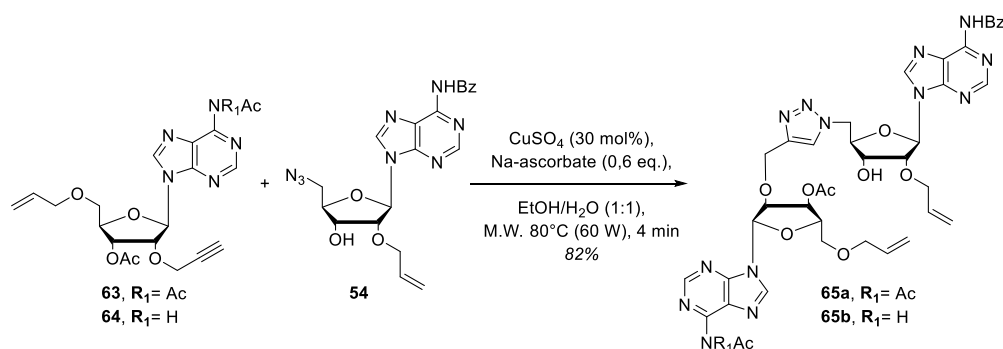


Schéma 37. Réaction de CuAAC menant à l'intermédiaire acyclique **65**

Ici également, le système réactionnel classique de CuAAC est utilisé, *i.e.* sulfate de cuivre (II) et ascorbate de sodium, dans un mélange EtOH/H₂O (1:1) pour effectuer ce couplage. Les motivations d'utilisation de ce système restent identiques à celles mentionnées précédemment : une purification simplifiée des produits désirés par chromatographie flash sur gel de silice. Des conditions opératoires ont été déjà explorées au sein de l'équipe sur ce genre de substrats,¹⁹⁷ permettant ainsi de transposer facilement les conditions trouvées et optimisées à notre système (échelle allant de 30 mg à 115 mg du substrat alcyne). L'éthanol remplace ici l'isopropanol et un chauffage par micro-onde à 80 °C sur 4 min est appliqué, permettant un gain de temps considérable. Cependant, aucun autre essai portant sur la réduction de la quantité de pré-catalyseur et de réducteur n'a été réalisé par défaut de temps et de produit. Par ces conditions, le couplage de **54** avec **63** et celui de **54** avec **64**, mènent respectivement, à l'obtention du dinucléotide acyclique **65a** et **65b** dans des rendements identiques, c'est-à-dire 82% de rendement. Cela montre que les groupes *N*-acétamide et *N,N*-diacétylamine sont équivalents lors de cette réaction et n'ont pas d'influence sur celle-ci, démontrant une fois de plus la grande compatibilité de ce système de couplage CuAAC pour la synthèse nucléosidique.

¹⁹⁷ De Schutter, C.; Roy, V.; Favetta, P.; Pavageau, C.; Maisonneuve, S.; Bogliotti, N.; Xie, J.; Agrofoglio, L.A. Synthesis and characterization of various 5'-dye-labeled ribonucleosides. *Org. Biomol. Chem.* **2018**, 16, 6552-6563.

b) Etape de fermeture du cycle par métathèse cyclisante

L'intermédiaire acyclique **65** est ensuite soumis à une réaction de métathèse cyclisante, permettant sa macrocyclisation (Schéma 38). Malgré différentes tentatives de changement de conditions opératoires (*i.e.* quantité catalyseur, source d'activation, solvant- Tableau 17) sur de petites échelles (de l'ordre de 30 mg du substrat), nous ne sommes malheureusement pas parvenus à isoler le produit macrocyclique **66**.

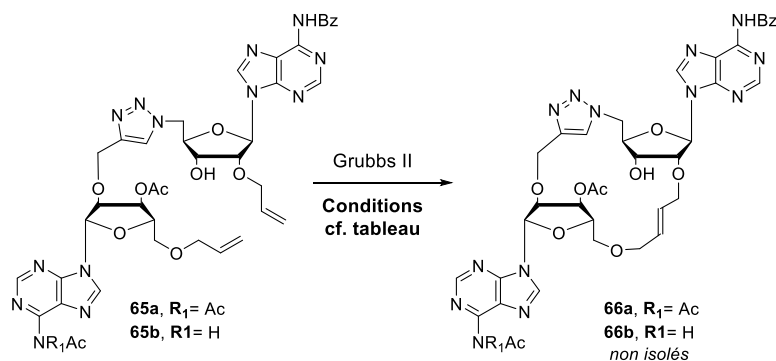


Schéma 38. Macrocyclisation du composé **65** par RCM

Entrée	Catalyseur	Solvant	Température	Temps	Conversion 65a ou 65b	Rdt.
1	0,25 eq.	CH ₂ Cl ₂	40 °C	8 h	Aucune	-
2	0,25 eq.	CH ₂ Cl ₂	40 °C	8 h	Aucune	-
3	0,5 eq.	CH ₂ Cl ₂	50 °C	8 h	Estimée à 10%*	-
4	0,25 eq.	CH ₂ Cl ₂	55 °C (ultrasons)	8 h	Aucune	-
5	0,25 eq.	H ₂ O	55 °C (ultrasons)	8 h	Aucune	-
6	0,75 eq.	CH ₂ Cl ₂	50 °C	8 h	Estimée à 50%*	-
7	1,1 eq.	CH ₂ Cl ₂	50 °C	8 h	Estimée à 100%*	-

Tableau 17. Conditions réactionnelles explorées pour la synthèse du composé **66** (7 µmol/mL) ; *déterminé par CCM et LC-MS

La réaction se déroule sous atmosphère inerte et sous haute dilution du substrat (7 µmol/mL) afin de toujours favoriser la métathèse intra-moléculaire (RCM). En reprenant des conditions classiques (entrée 1), aucune conversion du substrat n'est observée par suivi CCM et LC-MS toutes les heures et ce jusqu'à 8 h de réaction. Un prolongement jusqu'à 14 h de réaction (avec ajout de catalyseur) n'y change rien. Il en va de même lorsque la charge catalytique est augmentée à 0,5 eq. (entrée 2) sur 8 h de réaction à 40 °C. Un chauffage plus conséquent à 50 °C (entrée 3) a permis de voir un faible début de conversion du dérivé acyclique. Un essai sous ultrasons à 55 °C durant 8 h avec 0,25 eq. de catalyseur (entrée 4) ne permet pas d'observer la conversion du produit initial.

Des travaux au sein du laboratoire ont montré que le CH_2Cl_2 peut être remplacé par l'eau afin de favoriser des réactions de métathèse croisée sous activation par ultrasons.¹⁹⁸ L'eau en tant que solvant favorise un repliement intramoléculaire des parties hydrophobes du substrat sur elles-mêmes, favorisant la rencontre des oléfines. Par ailleurs, le catalyseur de Grubbs II est compatible avec des conditions aqueuses. Un essai où le CH_2Cl_2 est remplacé par l'eau sous activation par ultrasons, est réalisé (entrée 5). Nous pensons ainsi favoriser un repliement intramoléculaire permettant la rencontre des deux motifs allyles. Cependant, nous travaillons à plus haute dilution dans le cadre de la RCM. Cela a pour effet d'obtenir un mélange inhomogène (suspension) qui ne semble pas favoriser la dissolution et la rencontre des espèces malgré une température à 55 °C et des ultrasons.

D'autres essais portant sur l'augmentation de la quantité de catalyseur ont été réalisés dans le CH_2Cl_2 à 50 °C sur 8 h, dont un avec 0,75 eq. de Grubbs II (entrée 6) et un autre avec 1,1 eq. (entrée 7). La conversion du substrat reste incomplète dans le premier essai, alors que dans le second, elle semble totale, d'après les suivis CCM et LC-MS. Cependant, aucun produit d'intérêt, **66a** ou **66b**, n'a pu être isolé à partir de ces réactions, la quantité de catalyseur rendant les purifications difficiles, du fait que les traces résiduelles du Grubbs aient une polarité similaire à celle du nouveau produit formé. Les tentatives de purification par filtration sur charbon actif, ou par précipitation avec le DMSO, n'ont pas permis de réduire la quantité de traces de catalyseur. Un essai de déprotection sur une fraction de l'intermédiaire majoritaire isolée avec une solution de méthanolate de sodium dans le méthanol n'a pas rendu possible la simplification du mélange initial ; l'analogue de CDN attendu sans groupements acyles n'a malheureusement pas été observé par LC-MS dans le produit de réaction. La faible quantité de substrat **65** précédemment obtenue n'a pas permis de conduire d'autres tests. Mais le temps nous faisant défaut, nous avons été dans l'incapacité de produire des quantités plus conséquentes de dérivé acyclique, mettant en arrêt le projet à ce stade.

La conversion du substrat **65** commençant à être observable lorsque 0,75 eq. de catalyseur sont introduits dans le milieu suggère un empoisonnement de ce dernier par le substrat, cela malgré la présence de groupements acétyles présents sur les amines *N*-6 des nucléobases. Le test avec 1,1 eq. de Grubbs indiquant une conversion complète va également dans ce sens. Ceci peut s'expliquer par la présence importante d'atomes d'azote, au nombre de 13 sur le substrat, pouvant entraîner une chélation du centre métallique et ainsi bloquer la réactivité du catalyseur. Les atomes *N*-1, *N*-3 et *N*-7 des bases adénines ont notamment ce caractère de base de Lewis prononcé pouvant entraîner ce phénomène de chélation.

Un autre frein à la réactivité peut être dû à la contrainte stérique qui n'est pas favorable au rapprochement des unités riboses, et par conséquent, des motifs allyles. L'acétate porté en C-3' peut être responsable de cette répulsion stérique vis-à-vis du second nucléoside. Par ailleurs, l'intermédiaire acyclique doit préférer une conformation de type linéaire ouverte où les deux motifs allyles sont les plus éloignés l'un de l'autre, qu'à une conformation pré-cyclique fermée (Figure 46-48). La rencontre des deux oléfines terminales semble donc moins favorable, même sous agitation thermique.

¹⁹⁸ (a) Gulajski, L.; Sledz, P.; Lupa, A.; Grela, K. Olefin metathesis in water using acoustic emulsification. *Green Chem.* **2008**, 10, 271-274; (b) Travaux internes au laboratoire du Dr. Maxime Bessièrès (non publiés).

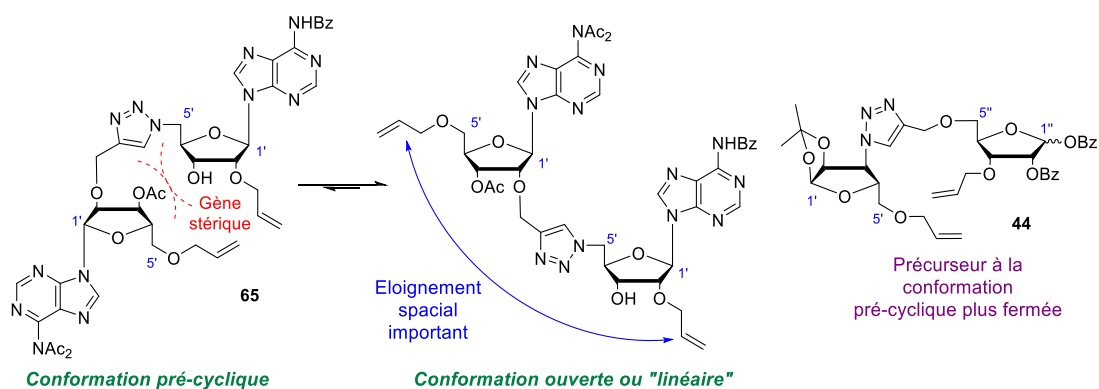


Figure 46. Structures des divers précurseurs acycliques synthétisés

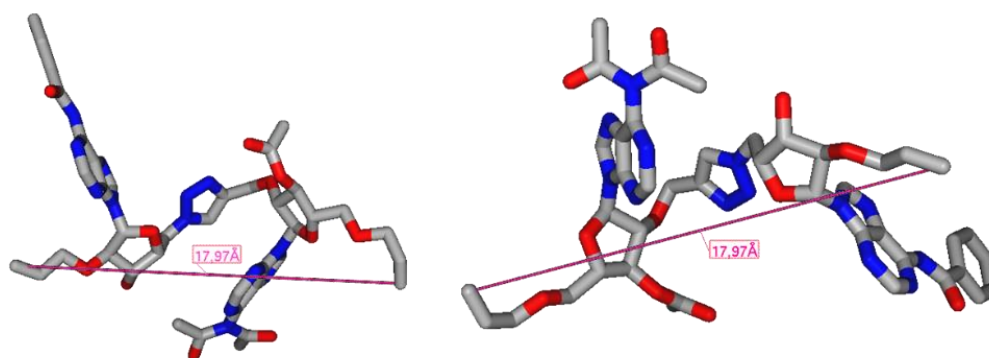


Figure 47. Vue 3D de l'intermédiaire acyclique 65

À titre de comparaison, le précurseur acyclique **44** peut adopter une conformation pré-cyclique favorable grâce au 1,2,3-triazole qui contraint le système en ce sens (Figure 48), l'étape de RCM étant nettement avantageée dans cet exemple.

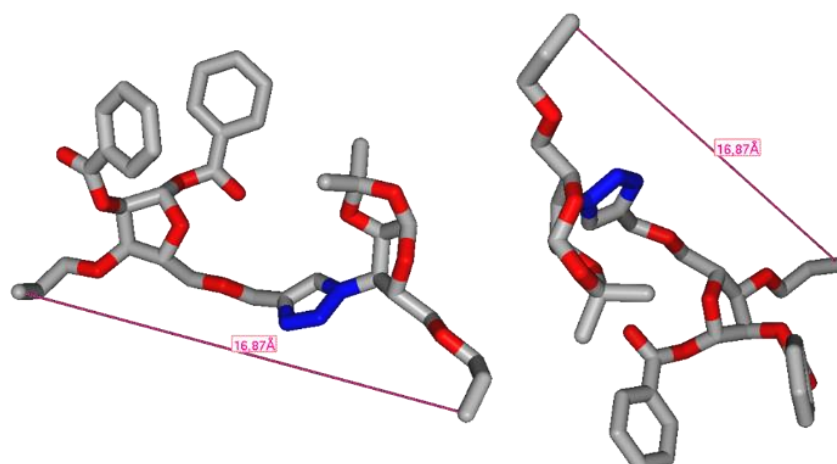


Figure 48. Vue 3D de l'intermédiaire acyclique 44

Ces différentes hypothèses peuvent alors expliquer la difficulté à faire cycliser le substrat **65** par réaction de métathèse cyclisante. D'autres conditions opératoires restent à explorer, en vue de valider ou non cette étape de macrocyclisation :

- ✓ Ajouter un acide faible tel que le pTSA ou l'acide camphorsulfonique pour protoner les amines et former des ions ammonium inertes vis-à-vis du catalyseur.¹⁹⁹
- ✓ Ajouter 20 mol% de Ti(OiPr)₄ pour également contrer l'effet chélatant des divers azotes.²⁰⁰
- ✓ Tester d'autres catalyseurs de Grubbs, notamment ceux ayant une meilleure solubilité aqueuse, afin d'opérer de manière plus adéquate en conditions aqueuses.^{201,202}

Pour conclure ce second travail de synthèse d'analogues de CDN, seul un produit acyclique a pu être obtenu grâce à la voie de synthèse explorée ; la réaction de métathèse cyclisante n'ayant pas permis d'obtenir le produit de macrocyclisation désiré. Par rapport au précédent travail, cette étape demande une exploration plus approfondie des conditions réactionnelles afin de valider l'accession de l'analogue souhaité par la stratégie de synthèse proposée.

¹⁹⁹ (a) Edwards, A. S.; Wybrow, R. J.; Johnstone, C.; Adams, H.; Harrity, J. P. A. A new approach to functionalised spiropiperidines through tandem RCM and nitrogen-directed reactions. *Chem. Commun.* **2002**, 1542-1543. (b) Verhelst, S. H. L.; Paez Martinez, B.; Timmer, M. S. M.; Lodder, G.; van der Marel, G. A.; Overkleeft, H. S.; van Boom, J. H. A short route toward chiral, polyhydroxylated indolizidines and quinolizidines. *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 9598-9603. (c) Pearson, W. H.; Aponick, A.; Dietz, A. L. Synthesis of N,N-bis(3-butenyl)amines from 2-azaallyl dication synthetic equivalents and conversion to 2,3,6,7-tetrahydroazepines by ring-closing metathesis. *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 3533-3539.

²⁰⁰ Yang, Q.; Xiao, W.-J.; Yu, Z. Lewis acid assisted ring-closing metathesis of chiral diallylamines: an efficient approach to enantiopure pyrrolidine derivatives. *Org. Lett.* **2005**, 7, 871-874.

²⁰¹ Hong, S. H.; Grubbs, R. H. Highly active water-soluble olefin metathesis catalyst. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 3508-3509.

²⁰² Tomasek, J.; Schatz, J. Olefin metathesis in aqueous media. *Green Chem.* **2013**, 15, 2317-2338.

III) Evaluation biologique

III.1) Tests cellulaires *in vitro*

STING est une protéine située sur la membrane du réticulum endoplasmique des cellules de l'immunité innée (notamment les macrophages), orientée vers le cytosol. Lorsque celle-ci est activée par un ligand agoniste, toute une cascade cellulaire est enclenchée dont l'induction de l'IRF3 et NF- κ B, induisant la sécrétion d'interférons de type I et III (IFNs) et de cytokines pro-inflammatoires vers le milieu extracellulaire. Cette sécrétion d'IFN-I est l'élément déclencheur de la réponse immunitaire innée (ou réponse inflammatoire). La cytokine, qui nous intéresse en particulier, est la CXCL10 ou la protéine 10, induite par l'interféron-gamma (IP-10). La production de CXCL10 est mesurée par test ELISA lors des criblages *in vitro*. C'est un indicateur indirect de l'activation de la voie STING par un ligand agoniste. En effet, la voie de signalisation cGAS-STING semble être indépendante des autres voies de détection de l'ADN, telles que la voie du récepteur de type Toll 9 (TLR9). Cependant, ce dernier induit également l'IRF3 et NF- κ B pour enclencher la réponse immunitaire innée. Or, le TLR9 est principalement exprimé chez les lymphocytes B et les cellules dendritiques plasmacytoïdes, alors que STING est exprimée chez toutes les cellules de l'immunité.

Dans un premier temps, les criblages sont effectués sur des macrophages dérivés de la moelle osseuse (BMDM) de souris C57/BL6 (B6). Les composés sont alors testés sur le STING de souris (mSTING) qui partage 70% d'homologie avec le STING humain (hSTING), cela de manière à présélectionner les structures présentant une activité biologique. Soit le composé est mis seul en présence des macrophages et la sécrétion d'IP-10 est mesurée ; soit le composé est accompagné du cGAMP en présence des macrophages, et c'est l'inhibition de la sécrétion d'IP-10 qui est mesurée. Le premier test évalue le caractère agoniste du composé, alors que le second mesure son caractère antagoniste. Les molécules les plus prometteuses sont à nouveau testées afin de déterminer leur valeur d'EC₅₀ (agoniste) ou d'IC₅₀ (antagoniste). En parallèle, la cytotoxicité des molécules synthétisées a été évaluée par mesure de l'activité métabolique mitochondriale cellulaire (test MTT). Cette technique indique par une mesure d'absorbance, l'activité enzymatique mitochondriale correspondant au nombre de macrophages encore viables dans le milieu de culture après incubation avec le composé testé. Cette mesure est comparée avec celle d'un témoin, qui est une culture de macrophage vierge de toute stimulation.

D'autres tests biologiques sont réalisés afin de démontrer le ciblage de la protéine STING par nos ligands. Pour les molécules antagonistes, celles-ci sont mise en présence de macrophages BMDMs, déficients pour l'expression de la protéine STING (STING K.O.). Si le taux de production d'IP-10 est réduit, cela confirme la spécificité de la molécule pour STING. En revanche, si la production d'IP-10 reste similaire, cela signifie que la molécule interagit avec une autre protéine que STING, impliquée dans la cascade de la réponse immunitaire. Avec le précédent test, les molécules antagonistes montrent qu'elles interagissent avec la protéine STING ou plus loin dans la cascade de signalisation associée (voir chapitre I). Dans l'optique de discriminer la cible des molécules actives, les macrophages de souris et les macrophages STING K.O., en présence du composé testé, sont stimulés par un agoniste de la voie des TLR3 : l'acide polyinosinique-polycytidylique (Poly I:C). Si le taux d'inhibition et la valeur d'IC₅₀ restent identiques, ou sont inférieurs à ceux du premier test, cela signifie que le composé en question touche une autre cible en aval de STING. Au contraire, si la valeur d'IC₅₀ est supérieure, le composé n'inhibe pas la voie TLR3, et il y a de fortes chances

que le composé interagisse spécifiquement au niveau de la protéine STING sur la voie de signalisation cGAS-STING.

Un dernier test est effectué en utilisant des macrophages de souris exprimant le gène codant de la protéine STING humaine (hSTING KI), en lieu et place de mSTING ; on retrouve alors le même environnement cellulaire que précédemment avec une protéine STING modifiée. Ce test donne l'occasion d'évaluer l'activité biologique des composés synthétisés sur le hSTING. Des tests de DSF ont été également réalisés pour évaluer l'affinité des molécules synthétisées avec le site actif principal de hSTING.

De plus, en vue d'inscrire ce projet de thèse dans une approche de type « One Health », les composés sont évalués sur des macrophages de poulet. En effet, cette approche se focalise sur l'interface humain-animal-environnement dans l'intention de comprendre et prévenir les phénomènes de zoonose qui peuvent être à l'origine de nouveaux agents infectieux comme le Covid-19. Actuellement, peu d'études portent sur la compréhension de la voie de signalisation cGAS-STING chez les oiseaux. Outre détecter une activité biologique d'intérêt chez ces espèces, les molécules testées servent également à établir un modèle sur les mécanismes cellulaires mis en jeu chez les oiseaux d'élevage et en avoir une meilleure compréhension afin de les prévenir des maladies aviaires. Les tests biologiques ici se déroulent sur des macrophages exprimant le STING poulet (cSTING). Toutefois, la mesure de l'activité biologique se base sur le taux d'expression de gènes impliqués dans la réponse immunitaire (IFNB, ISG12.2, CCL4, IL1B, IL8L2).

III.1-1) Evaluation biologique sur des macrophages (BMDM) de souris

Les composés **50a** et **50b** (Figure 49) ont été évalués biologiquement sur des macrophages de souris type BMDMs (la cible est ici mSTING) par l'équipe du Dr. Valérie QUESNIAUX au laboratoire INEM.

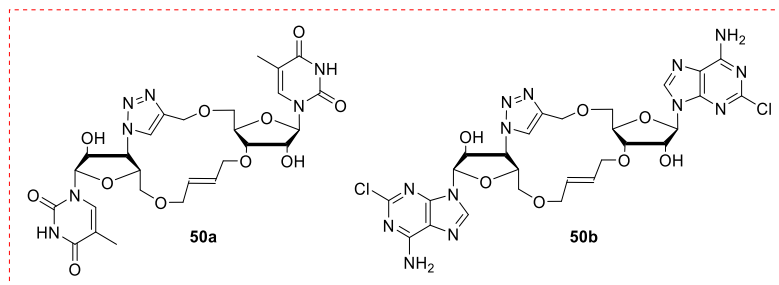


Figure 49. Structures des analogues de CDNs évalués

Mesure d'activité agoniste : les macrophages sont incubés pendant 18 h avec les différents composés à des concentrations de 10, 3 et 1 μ M. Deux contrôles sont effectués en parallèle :

- ✓ Le contrôle sans stimulation, où les macrophages sont uniquement mis en présence du milieu de culture.
- ✓ Le contrôle positif, au cours duquel les macrophages sont mis en présence du 2',3'-cGAMP à différentes concentrations (14, 10, 3 et 1 μ M), la sécrétion de CXCL10 passant par STING étant induite par le cGAMP.

On mesure alors le taux de sécrétion de CXCL10 des différents tests par dosage ELISA. Les taux issus des molécules testées sont ensuite comparés à ceux du contrôle positif. Dans le cadre des molécules **50a** et **50b**, aucune sécrétion de CXCL10 n'a été observée, indiquant que les molécules ne présentent pas d'activité agoniste vis-à-vis de la cible (Figure 50).

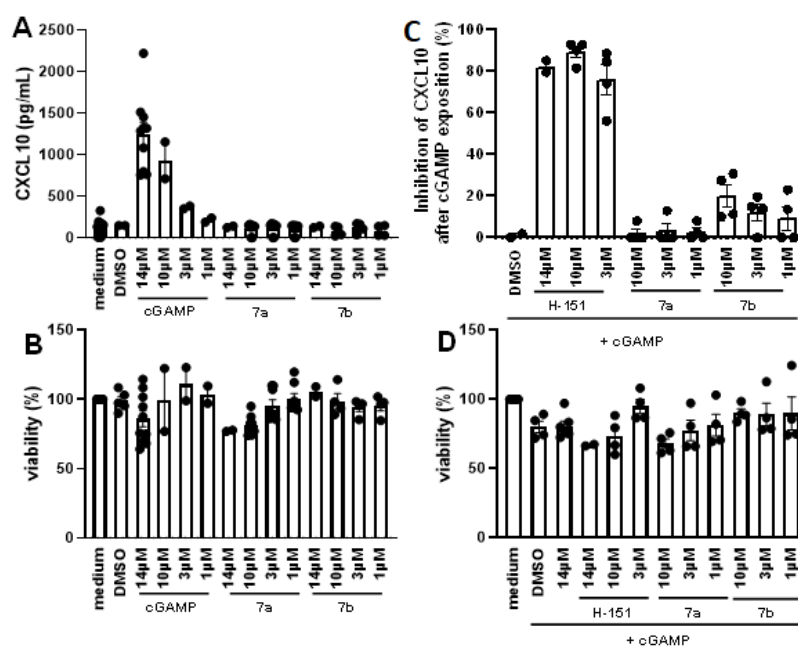


Figure 50. Évaluation biologique des composés **50a** et **50b** testés comme agoniste (A, B) ou antagoniste (C, D) de STING sur des macrophages dérivés de la moelle osseuse. L'agoniste de référence 2',3'-cGAMP et l'antagoniste de référence le H151.

Mesure d'activité antagoniste : les macrophages sont incubés pendant 3 h avec les différents composés à des concentrations de 10, 3 et 1 μ M, puis sont stimulés avec le 2',3'-cGAMP (14 μ M) pendant 18 h. Deux contrôles sont effectués en parallèle :

- ✓ Le contrôle sans stimulation, où les macrophages sont uniquement mis en présence du milieu de culture.
- ✓ Le contrôle positif, dans lequel les macrophages sont mis en présence d'un inhibiteur commercial de STING (le H-151 ou SN-011) à différentes concentrations (14, 10, 3 et 1 μ M) durant 3 h, puis stimulés avec 14 μ M de 2',3'-cGAMP pendant 18 h. Les IC₅₀ associées à ces inhibiteurs commerciaux sont recalculées du fait que les valeurs prises dans la littérature ne correspondent pas au modèle cellulaire que nous testons pour nos composés.

On mesure également le taux de sécrétion de CXCL10 des différents tests par dosage ELISA, qui peut dans ce cas présent aussi être exprimé en un taux d'inhibition de sécrétion. Les taux issus des molécules testées sont ensuite comparés à ceux du contrôle positif.

Dans le cadre des molécules **50a** et **50b**, aucune inhibition de la sécrétion de CXCL10 n'a été observée, indiquant que les molécules ne présentent pas d'activité antagoniste vis-à-vis de la cible. Par ailleurs, les composés ne présentent pas de toxicité significative par tests de MTT.

III.1-2) [Evaluation biologique sur des macrophages de poulet](#)

Le composé **50a** (Figure 9) est en cours d'évaluation biologique sur des macrophages de poulet (cSTING) par le Dr. Rodrigo GUABIRATA-BRITO au laboratoire INRAE.

III.1-3) [Mesure de l'affinité ligand/protéine par test de DSF](#)

Les tests de fluorimétrie différentielle à balayage (DSF) ont été effectués par le Dr. Dominika Chalupska de l'Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Czech Academy of Sciences. Cette technique est une méthode de dépistage rapide et peu coûteuse pour identifier des ligands de faible poids moléculaire pouvant se complexer et stabiliser des protéines isolées sous leur forme native.^{203,204} Elle exploite la mesure de la variation de chaleur associée à la dénaturation thermique de la molécule lorsque celle-ci est chauffée à vitesse constante.

En solution, une biomolécule est en équilibre entre ses conformations natives (repliées) et dénaturées (dépliées). Plus la température médiane de transition thermique (T_m) est élevée, plus la protéine est stable.

²⁰³ Vedadi, M.; Niesen, F. H.; Allali-Hassani, A.; Fedorov, O. Y.; Finerty, P. J.; Wasney, G. A.; Yeung, R.; Arrowsmith, C.; Ball, L. J.; Berglund, H.; Hui, R.; Marsden, B. D.; Nordlund, P.; Sundstrom, M.; Weigelt, J.; Edwards, A. M. Chemical screening methods to identify ligands that promote protein stability, protein crystallization, and structure determination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, 103, 15835-15840.

²⁰⁴ Niesen, F. H.; Berglund, H.; Vedadi, M. The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nat. Protoc.* **2007**, 2, 2212-2221.

On mesure alors l'enthalpie (ΔH) qui résulte d'un changement de conformation induit par une élévation de température (ici la dénaturation ou dépliement de la protéine). Un fluorophore, mis en présence de la protéine, va alors se lier aux parties hydrophobes de la protéine au fur et à mesure que celle-ci se déplie avec l'augmentation de la température. Cela permet alors de doser la quantité de protéine dénaturée.

Lorsqu'un ligand affin de la protéine est ajouté, la structure se retrouve stabilisée par ses interactions avec la petite molécule. Par conséquent, la température de transition de la protéine va augmenter. En mesurant la variation de température de dénaturation de la protéine entre la forme libre et la forme complexée, on peut déduire par calcul quelle est l'affinité du ligand pour la protéine.

Dans ce contexte, la molécule **50a** est alors testée avec la protéine hSTING dans le DMSO. Le test référence utilise le 3',3'-cGAMP (agoniste naturel) avec cette protéine dans le même solvant. On observe que la protéine STING a une T_m d'environ 57,7 °C avec le ligand naturel 3',3'-cGAMP et une T_m de seulement 50,6 °C en présence de **50a**. Cela montre que le composé a un moindre effet de stabilisation envers hSTING : il est donc non affin de la protéine.

IV) Conclusion et perspectives

Pour conclure ce chapitre, deux stratégies de synthèse visant la formation d'analogues de dinucléotides cycliques originaux ont été explorées ; ces analogues ayant la particularité de porter un lien 1,2,3-triazole et une chaîne insaturée comme liens inter-nucléotidiques, en vue d'augmenter la stabilité et la perméabilité vis-à-vis de la membrane cellulaire de ces composés.

La première stratégie a débuté à partir de sucres comme composés initiaux et repose sur trois réactions clés, afin de former des analogues 3',3'-CDN hétérodimères et homodimères : (1) CuAAC, (2) métathèse cyclisante et (3) *N*-glycosylation de Vorbrüggen. Parmi ces trois étapes, seule la réaction de Vorbrüggen a posé quelques difficultés. D'abord, cette stratégie n'a pas été concluante pour la formation d'analogues hétérodimériques, notamment à cause de réactions de tans-glycosylation parasites. En revanche, du point de vue des homodimères, deux analogues de CDN ont pu être obtenus grâce à cette voie de synthèse. Le résultat demeure toutefois contrasté car, si la double insertion d'une base pyrimidique est possible avec un rendement correct, la double insertion d'une base purique mène, quant à elle, à l'obtention de mélanges complexes constitués de plusieurs régioisomères. La réaction de Vorbrüggen restant donc un verrou, un travail méthodologique plus approfondi est nécessaire pour trouver des conditions opératoires plus favorables à cette étape de double *N*-glycosylation de bases puriques, qui reste assez peu décrite dans la littérature. Ainsi, l'influence de l'acide de Lewis (quantité stœchiométrique ou catalytique, TMSOTf ou SnCl₄), celle du solvant utilisé (MeCN, DCE, Toluène), de la température (et mode de chauffage : classique ou micro-onde) et du temps réactionnel (conditions thermodynamiques), doivent être davantage étudiées. En plus de ces pistes, il pourrait être intéressant de traiter le produit de la réaction de Vorbrüggen par de l'APTS dans le chlorobenzène, dans le but de converger vers l'obtention du régioisomère *N*-9-*N*-9 attendu par isomérisation des sous-produits de *N*-glycosylation.¹⁶⁷ Une autre perspective serait éventuellement de repartir du substrat, où une première nucléobase est déjà couplée au macrocycle (précurseur hétérodimère), pour former un analogue de type homodimère (Schéma 39), *via* une *N*-glycosylation (en un point), et une trans-glycosylation (de l'autre), en utilisant un large excès de nucléobase.

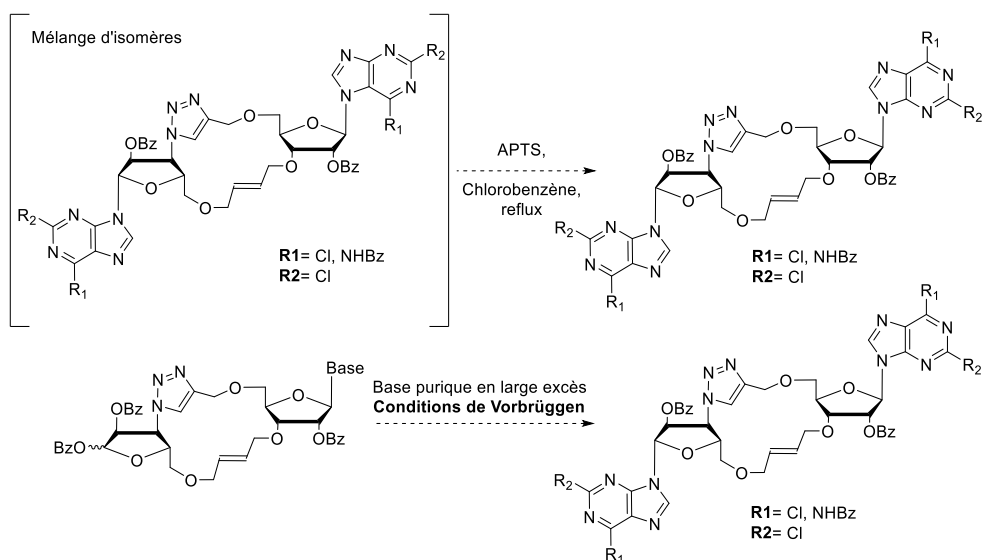


Schéma 39. Autres tentatives de formation d'analogues homodimères

La seconde stratégie repose sur un travail préalable de modélisation moléculaire par criblage *in silico*, de manière à identifier de potentielles nouvelles cibles à synthétiser. Cette stratégie, contrairement à la précédente, utilise l'adénosine comme composé de départ pour éviter le verrou précédent qu'est la réaction de Vorbrüggen. L'analogue ainsi choisi est construit à partir de deux précurseurs issus de ce nucléoside, qui sont par la suite couplés *via* (1) une CuAAC et (2) une métathèse cyclisante (les deux réactions clés) pour construire un analogue 2',2'-CDN homodimère. Si le couplage des précurseurs par CuAAC est un succès, l'étape de macrocyclisation *via* une RCM bloque : l'empoisonnement par chélation du catalyseur, dû aux bases adénines et ce, malgré la présence de groupements protecteurs, empêche la formation du CDN désiré. La quantité de précurseur acyclique étant réduite, d'autres tests manquent pour valider, ou non, la possibilité de synthétiser l'analogue par cette voie de synthèse. L'une des principales pistes serait l'utilisation d'acide de Lewis pour empêcher la chélation de centre métallique par les bases de Lewis présentes. Une autre piste consisterait en un criblage de catalyseurs de Grubbs de façon à pouvoir opérer dans d'autres solvants de réaction tels que l'eau.

Plus généralement, les synthèses explorées, bien que convergentes, restent longues (15 étapes cumulées) et sont confrontées à un écueil sur la dernière étape, entravant l'accès aux produits souhaités (*N*-glycosylation de Vorbrüggen ou RCM). Cela représente donc un enjeu capital, mais aussi une difficulté majeure pour mener à terme ces synthèses, puisqu'un travail méthodologique conséquent est attendu, nécessitant de grandes quantités de composés qui sont parfois difficiles à obtenir.

L'utilisation des liens inter-nucléotidiques décrits (i.e. lien 1,2,3-triazole et chaîne insaturée) donne lieu à envisager diverses combinaisons de liens entre deux unités nucléosidiques. En outre, les CDNs étant des structures moléculaires intervenants dans de nombreux mécanismes biologiques, le travail exploratoire ainsi débuté pose les premiers jalons sur un espace chimique qui ne demande qu'à être exploré.

Partie expérimentale

Chemistry

Commercially available chemicals were provided as reagent grade and used as received. Some reactions requiring anhydrous conditions were carried out using oven-dried glassware and under an atmosphere of dry Argon. All anhydrous solvents were provided from commercial sources as very dry reagents. The reactions were monitored by thin layer chromatography (TLC) analysis using silica gel precoated plates (Kieselgel 60F254, E. Merck). Compounds were visualized by UV irradiation and/or spraying with sulfuric acid (H₂SO₄ 5% in ethanol) stain followed by charring at average 150 °C. Flash column chromatography was performed on Silica Gel 60 M (0.040-0.063 mm, E. Merck). The infrared spectra were measured with Perkin–Elmer Spectrometer. The ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on BrukerAvance DPX 250 or BrukerAvance 400 Spectrometers. Chemical shifts are given in ppm and are referenced to the deuterated solvent signal or to TMS as internal standard and multiplicities are reported as s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quartet) and m (multiplet). Carbon multiplicities were assigned by distortion less enhancement by polarization transfer (DEPT) experiments. ¹H and ¹³C signals were attributed on the basis of H–H and H–C correlations. High Resolution Mass spectra were performed on a Bruker Q-TOF MaXis spectrometer by the “Fédération de Recherche” ICOA/CBM (FR2708) platform. LC-MS data was acquired on a Thermo-Fisher UHPLC-MSQ system equipped with an electron spray ionization source (ESI). The temperature of the source was maintained at 350 °C. Initially, the cone voltage was set at 35 V and after 5 min was increased to 75V. In full scan mode, data was acquired between 100 and 1000 m/z in the positive mode with a 1.00 S scan time. In addition, a UV detection was performed with a Diode array detector at three wavelengths 273, 254 and 290 nm, respectively. A water/methanol (70%/30%) solution mixture with 0.1% formic acid was used as mobile phase. The composition of the mobile phase was increased to 100% methanol with 0.1% formic acid with a 7% ramp. The flow rate was set at 0.300 mL.min⁻¹. Samples diluted in the mobile phase were injected (3 µL) on a C18 column (X-terra, Waters), 2.1 mm internal diameter, and 100 mm length placed into an oven at 40 °C. Electronic extraction of ions was performed and the subsequent areas under the corresponding chromatographic peaks determined.

General procedure (A) for acetonide deprotection and subsequent benzoylation.

The acetonide intermediate (c = 0.18 mol/L, 1.0 eq.) was dissolved in formic acid/H₂O (85:15 v/v) and the resulting mixture was heated for 1 hour at 60 °C. Toluene was added and all volatiles were evaporated under reduced pressure. After an aqueous workup with sat. aq. NaHCO₃ and extractions with EtOAc, the combined organic layers were dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure. The resulting yellowish residue was co-evaporated with dry pyridine/toluene (1:1) and then dissolved in CH₂Cl₂ under a dried and inert atmosphere (argon). Dry pyridine (4.0 eq.) and DMAP (5 mol%) were added followed by benzoyl chloride (2.5 eq.) at 0 °C. The reaction mixture was allowed to warm at room temperature for 3 hours. The reaction was quenched by addition of H₂O (10 mL), and the resulting mixture was extracted by CH₂Cl₂ (2 x 30 mL). The organic layer was subsequently washed with 1 N HCl solution and sat. aq. NaHCO₃, dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure.

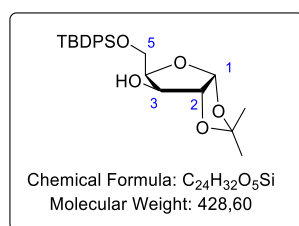
General procedure (B) for N-glycosylation under Vorbrüggen conditions.

N,O-Bis(trimethylsilyl)acetamide (10.0 eq.) was added under argon to a stirred suspension of the nucleobase (c = 0.18 mol/L, 6.0 eq.) in dry MeCN (8 mL) and heated to 80 °C for 30 minutes until a clear solution was obtained. A solution of activated sugar (200 mg, 0.24 mmol, 1.0 eq.) in dry MeCN (2 mL) was added and the resulted mixture was stirred at 80 °C for additional 30 minutes. The reaction mixture was brought to room temperature and treated with trimethylsilyl triflate (8.0 eq.). The dark red solution was

stirred at 80 °C for 4 hours. The reaction was quenched with sat. aq. NaHCO₃ and extracted with EtOAc. The organic layers were dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure. The residue was filtered through silica (silica gel, CH₂Cl₂ 100% -> CH₂Cl₂/MeOH, 98:2). After concentration under reduced pressure, the obtained material was diluted with a solution of NH₃ (7N) in MeOH (15 mL) and the resulted mixture was let stirred at room temperature for 48 hours until complete conversion of the intermediate material. The volatiles were evaporated under reduced pressure and the residue was purified by flash-column chromatography (silica gel, CH₂Cl₂ 100% -> CH₂Cl₂/MeOH, 98:2 -> CH₂Cl₂/MeOH, 95:5) to provide the final compound.

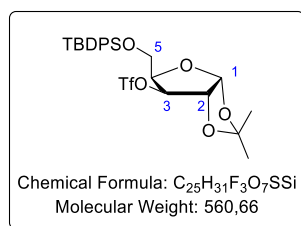
1) Synthesis of precursor (37)

5-*O*-(*tert*-Butyldiphenylsilyl)-1,2-*O*-isopropylidene- α -D-xylofuranose (34)



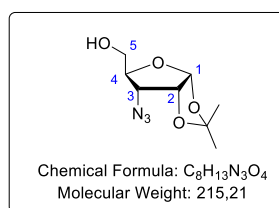
Under a dried and inert atmosphere (nitrogen), was added imidazole (1.15 g, 16.83 mmol, 1.6 eq.), a catalytic amount of DMAP (5 mol%) and dropwise TBDPSCI (3.3 mL, 12.62 mmol, 1.2 eq) to a stirred solution of 1,2-*O*-isopropylidene- α -D-xylofuranose (**33**) (2.00 g, 10.52 mmol, 1.0 eq.) in dry CH₂Cl₂ (40 mL) at 0 °C. The reaction mixture was allowed to warm to room temperature for 2 h. The reaction was quenched by addition of sat. aq. NaHCO₃ and then the mixture was extracted with CH₂Cl₂. The combined organic layers were washed with water and brine, then dried over Na₂SO₄, and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, PE/EtOAc, 4:1) to afford compound (**34**) as a white solid (4.42 g, 10.31 mmol) in 98% yield. *R*_f= 0.26 (silica, PE/EtOAc, 4:1). **¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆):** δ 7.65 (m, 4H, *o*-Ph), 7.45 (m, 6H, *m*-, *p*-Ph), 5.82 (d, ³*J* = 3.6 Hz, 1H, H₁), 5.22 (d, ³*J* = 5.0 Hz, 1H, -OH), 4.37 (d, ³*J* = 3.6 Hz, 1H, H₂), 4.12 (m, 1H, H₄), 3.98 (dd, ³*J* = 4.4 Hz, ³*J* = 5.0 Hz, 1H, H₃), 3.89 (dd, ³*J* = 5.0 Hz, ³*J* = 10.6 Hz, 1H, H_{5b}), 3.73 (dd, ³*J* = 6.6 Hz, ³*J* = 10.6 Hz, 1H, H_{5a}), 1.37 (s, 3H, C(CH₃)₂), 1.23 (s, 3H, C(CH₃)₂), 1.00 (s, 9H, SiC(CH₃)₃). **¹³C NMR (101 MHz, DMSO- *d*₆):** δ 135.6 (2 x CH, -Ph), 135.5 (2x CH, -Ph), 133.5 (2x quat C, -Ph), 130.3 (2x CH, -Ph), 128.3 (4x CH, -Ph), 110.9 (quat C, C(CH₃)₂), 104.9 (CH, C₁), 85.4 (CH, C₂), 81.5 (CH, C₄), 73.9 (CH, C₃), 62.5 (CH₂, C₅), 27.2 (3 x CH₃, SiC(CH₃)₂), 27.1 (CH₃, C(CH₃)₂), 26.6 (CH₃, C(CH₃)₂), 19.3 (quat C, SiC(CH₃)₂). **HRMS (ESI⁺)** calcd for C₂₄H₃₂NaO₅Si, 451.1911 [M +Na]⁺; found, 451.1929. The spectroscopic data are in accordance with those reported in literature (CAS # 114861-14-2).

5-*O*-(*tert*-Butyldiphenylsilyl)-1,2-*O*-isopropylidene-3-*O*-trifluoromethanesulfonyl- α -*D*-xylofuranose (**35**)



To an ice cooled and stirred solution of alcohol (**34**) (1.50 g, 3.50 mmol, 1.0 eq.) in dry CH₂Cl₂ (40 mL) was added anhydrous pyridine (0.5 mL, 6.18 mmol, 1.8 eq.) and dropwise triflic anhydride (0.7 mL, 4.15 mmol, 1.2 eq) under inert atmosphere (nitrogen). The reaction mixture was allowed to warm up to room temperature and stirred for 2 h. The reaction was quenched by addition of sat. aq. NaHCO₃ and then the mixture was extracted with CH₂Cl₂. The combined organic layers were washed with water and brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated under reduced pressure. The crude material was purified by flash-column chromatography (silica gel, CH₂Cl₂ 100%) to afford compound (**35**) as a colourless oil (1.84 g, 3.29 mmol) in 94% yield. **R_f** = 0.78 (silica, CH₂Cl₂ 100%). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)**: δ 7.68 (m, 4H, *o*-Ph), 7.42 (m, 6H, *m*-, *p*-Ph), 5.96 (d, ³*J* = 3.8 Hz, 1H, H₁), 5.35 (d, ³*J* = 2.8 Hz, 1H, H₃), 4.75 (d, ³*J* = 3.8 Hz, 1H, H₂), 4.33 (td, ³*J* = 2.8 Hz, ³*J* = 6.8 Hz, 1H, H₄), 3.89 (dd, ³*J* = 6.8 Hz, 2H, H_{5a-b}), 1.48 (s, 3H, C(CH₃)₂), 1.34 (s, 3H, C(CH₃)₂), 1.08 (s, 9H, SiC(CH₃)₃). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)**: δ 135.6 (4x CH, -Ph), 132.9-132.6 (2x quat C, -Ph), 130.0 (2x CH, -Ph), 127.8 (4x CH, -Ph), 113.0 (quat C, C(CH₃)₂), 104.6 (CH, C₁), 87.9 (CH, C₃), 82.8 (CH, C₂), 78.8 (CH, C₄), 60.0 (CH₂, C₅), 26.7 (3x CH₃, SiC(CH₃)₂), 26.6 (CH₃, C(CH₃)₂), 26.3 (CH₃, C(CH₃)₂), 19.1 (quat C, SiC(CH₃)₂). **HRMS (ESI⁺)** calcd. for C₂₅H₃₁F₃NaO₇SSi, 583.1404 [M + Na]⁺; found, 583.1400. The spectroscopic data are in accordance with those reported in literature (**CAS #** 114861-16-4).

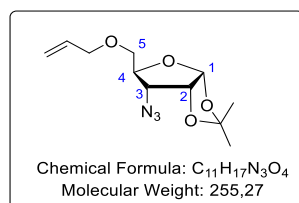
3-Azido-3-deoxy-1,2-*O*-isopropylidene- α -*D*-ribofuranose (**36**)



A mixture of triflate compound (**35**) (1.10 g, 1.96 mmol, 1.0 eq.), *n*Bu₄NBr (7 mg, 1 mol%) and sodium azide (255 mg, 3.92 mmol, 2.0 eq.) was suspended in dry DMF (20 mL) and stirred under inert atmosphere (nitrogen) at 80 °C for 10 min under microwave irradiation (25 W). The yellow suspension was diluted with brine and extracted with EtOAc. The resulting organic layer was dried over Na₂SO₄ and concentrated *under reduced pressure*. The brownish residue was diluted in dry THF (8 mL) and treated with 1 M tetrabutylammonium fluoride (2.4 mL, 2.35 mmol, 1.2 eq.) for 30 min under inert atmosphere at room temperature. The volatiles were evaporated under reduced pressure and the residue was purified by flash-column chromatography (silica gel, CH₂Cl₂ 100% → CH₂Cl₂/MeOH, 98:2), to give (**36**) as a colourless oil (330 mg, 1.55 mmol) in 79% yield (over the two steps). **R_f** = 0.4 (silica, CH₂Cl₂/MeOH, 98:2). **IR (cm⁻¹)**: 2109 (νN₃). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)**: δ 5.82 (d, ³*J* = 4.1 Hz, 1H, H₁), 4.76 (t, ³*J* = 4.1 Hz, 1H, H₂), 4.13 (dt, ³*J* = 2.7 Hz, ³*J* = 9.6 Hz, 1H, H₄), 4.02 (ddd, ³*J* = 2.7 Hz, ³*J* = 4.0 Hz, ³*J* = 12.6 Hz, 1H, H_{5b}), 3.71 (ddd, ³*J* = 3.0 Hz, ³*J* = 8.8 Hz, ³*J* = 12.6 Hz, 1H, H_{5a}), 3.61 (dd, ³*J* = 4.1 Hz, ³*J* = 9.6 Hz, 1H, H₃), 2.20 (dd, ³*J* = 4.4 Hz, ³*J* = 8.8 Hz, 1H, -OH), 1.58 (s,

3H, C(CH₃)₂), 1.38 (s, 3H, C(CH₃)₂). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃)**: δ 113.3 (quat C, C(CH₃)₂), 104.2 (CH, C₁), 80.2 (CH, C₂), 78.2 (CH, C₄), 60.0 (CH₂, C₅), 59.4 (CH, C₃), 26.4 (2x CH₃, C(CH₃)₂). **HRMS (ESI⁺)** calcd. for C₈H₁₃N₃NaO₄, 238.0798 [M + Na]⁺; found, 238.0792. The spectroscopic data are in accordance with those reported in literature (CAS # 23345-80-4).

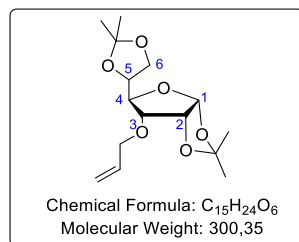
5-O-Allyl-3-azido-3-deoxy-1,2-O-isopropylidene-α-D-xylofuranose (**37**)



Under a dried and inert atmosphere (argon), a 60% emulsion of sodium hydride (70 mg, 1.74 mmol, 1.5 eq.) in mineral oil was added in three portions to a mixture of alcohol (**36**) (250 mg, 1.16 mmol, 1.0 eq.) in anhydrous THF (12 mL) stirred at 0 °C. After 15 min at this temperature, allyl bromide (0.17 mL, 1.97 mmol, 1.7 eq.) was added dropwise, and the resulting mixture was then stirred at room temperature for 2 hours. The reaction was quenched by adding EtOH (5 mL) and solvents were evaporated to give a grey viscous oil which was then diluted in EtOAc. After an aqueous workup with sat. aqueous NaHCO₃, the organic layer was dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure, a yellow sirup was obtained and purified by flash-column chromatography (silica gel, PE/EtOAc, 8:2) to afford (**37**) as a colourless oil (202 mg, 0.79 mmol) in 68% yield. **R_f** = 0.26 (silica, EP/EtOAc, 4:1). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)**: δ 5.91 (ddt, ³J = 5.9 Hz, ³J_{cis} = 10.3 Hz, ³J_{trans} = 17.2 Hz, 1H, CH₂=CH-CH₂-O), 5.83 (d, ³J = 4.0 Hz, 1H, H₁), 5.29 (ddd, ⁴J = 1.6 Hz, J_{gem} = 3.0 Hz, ³J_{trans} = 17.2 Hz, 1H, CH₂=CH-CH₂-O), 5.21 (ddd, ⁴J = 1.6 Hz, J_{gem} = 3.0 Hz, ³J_{cis} = 10.3 Hz, 1H, CH₂=CH-CH₂-O), 4.72 (t, ³J = 4.0 Hz, 1H, H₂), 4.19 (ddd, ³J = 2.6 Hz, ³J = 3.7 Hz, ³J = 9.7 Hz, 1H, H₄), 4.10 (ddd, ⁴J = 1.5 Hz, ³J = 5.7 Hz, ²J_{gem} = 12.8 Hz, 1H, CH₂=CH-CH₂-O), 4.03 (ddd, ⁴J = 1.5 Hz, ³J = 5.7 Hz, ²J_{gem} = 12.8 Hz, 1H, CH₂=CH-CH₂-O), 3.78 (dd, ³J = 2.6 Hz, ²J_{gem} = 11.2 Hz, 1H, H_{5a}), 3.62 (dd, ³J = 3.7 Hz, ²J_{gem} = 11.2 Hz, 1H, H_{5b}), 3.60 (dd, ³J = 4.0 Hz, ³J = 9.7 Hz, 1H, H₃), 1.58 (s, 3H, C(CH₃)₂), 1.37 (s, 3H, C(CH₃)₂). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)**: δ 134.2 (CH, CH₂=CH-CH₂-O), 117.7 (CH₂, CH₂=CH-CH₂-O), 113.0 (quat C, C(CH₃)₂), 104.2 (CH, C₁), 79.9 (CH, C₂), 77.2 (CH, C₄), 72.7 (CH₂, CH₂=CH-CH₂-O), 67.6 (CH₂, C₅), 60.4 (CH, C₃), 26.4 (2x CH₃, C(CH₃)₂). **HRMS (ESI⁺)** calcd for C₁₁H₁₇N₃NaO₄, 278.1111 [M + Na]⁺; found, 278.1112.

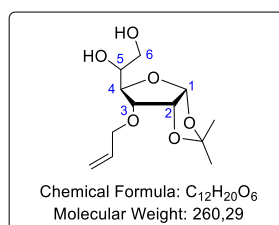
2) Synthesis of precursor (43)

3-O-Allyl-1,2:5,6-bis-O-isopropylidene- α -D-allofuranose (39)



Under a dried and inert atmosphere (argon), a 60% emulsion of sodium hydride (430 mg, 10.75 mmol, 1.4 eq.) in mineral oil was added in three portions to a mixture of 1,2:5,6-Di-O-isopropylidene- α -D-allofuranose (**38**) (2.00 g, 7.68 mmol, 1.0 eq.) in anhydrous THF (40 mL) stirred at 0 °C. After 15 min at this temperature, allyl bromide (1.0 mL, 11.52 mmol, 1.5 eq.) was added dropwise, and the resulting mixture was then stirred at room temperature for 2 hours. The reaction was quenched by adding EtOH (20 mL) and solvents were evaporated to give a grey viscous oil which was diluted in EtOAc. After an aqueous workup with sat. aq. NaHCO₃, the organic layer was dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure. A viscous oil was obtained and purified by flash-column chromatography (silica gel, PE/EtOAc, 4:1), to afford (**39**) as a colourless oil (2.24 g, 7.45 mmol) in 97% yield. *R*_f = 0.22 (silica, PE/EtOAc, 4:1). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ 5.96 (ddt, ³*J* = 5.9 Hz, ³*J*_{cis} = 10.3 Hz, ³*J*_{trans} = 17.2 Hz, 1H, CH₂=CH-CH₂-O), 5.78 (d, ³*J* = 4.0 Hz, 1H, H₁), 5.34 (ddd, ⁴*J* = 1.6 Hz, *J*_{gem} = 3.0 Hz, ³*J*_{trans} = 17.2 Hz, 1H, CH₂=CH-CH₂-O), 5.26 (ddd, ⁴*J* = 1.6 Hz, *J*_{gem} = 3.0 Hz, ³*J*_{cis} = 10.3 Hz, 1H, CH₂=CH-CH₂-O), 4.62 (t, ³*J* = 4.1 Hz, 1H, H₂), 4.39 (td, ³*J* = 3.1 Hz, ³*J* = 7.0 Hz, 1H, H₅), 4.23 (ddd, ⁴*J* = 1.4 Hz, ³*J* = 5.9 Hz, ²*J*_{gem} = 12.3 Hz, 1H, CH₂=CH-CH₂-O), 4.09 (ddd, ⁴*J* = 1.4 Hz, ³*J* = 5.9 Hz, ²*J*_{gem} = 12.3 Hz, 1H, CH₂=CH-CH₂-O; dd, ³*J* = 3.1 Hz, ³*J* = 8.7 Hz, 1H, H₄), 4.01 (d, ³*J* = 7.0 Hz, 2H, H_{6,6'}), 3.88 (dd, ³*J* = 4.5 Hz, ³*J* = 8.7 Hz, 1H, H₃), 1.58, 1.45, 1.38, 1.35 (4x s, 12H, 2x C(CH₃)₂). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃):** δ 134.6 (CH, CH₂=CH-CH₂-O), 118.0 (CH₂, CH₂=CH-CH₂-O), 112.9 (*quat* C, C(CH₃)₂), 109.7 (*quat* C, C(CH₃)₂), 103.8 (CH, C₁), 78.0 (CH, C₂), 77.8 (CH, C₄), 77.6 (CH, C₃), 74.8 (CH, C₅), 71.6 (CH₂, CH₂=CH-CH₂-O), 65.0 (CH₂, C₆), 26.8, 26.6, 26.2, 25.1 (4x CH₃, C(CH₃)₂). **HRMS (ESI⁺)** calcd for C₁₅H₂₈NO₆, 318.1911 [M + NH₄]⁺; found, 318.1912. The spectroscopic data are in accordance with those reported in literature (CAS # 33746-39-3).

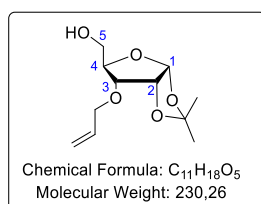
3-O-Allyl-1,2-O-isopropylidene- α -D-allofuranose (40)



Diacetonide (**39**) (6.79 g, 22.6 mmol, 1.0 eq.) was diluted in a mixture of acetic acid/formic acid/water (24:10:12 v/v/v) and the resulted mixture was stirred at room temperature for 1.5 hours. The reaction mixture was then concentrated and the colourless oil was diluted in EtOAc. After an aqueous workup with sat. aq. NaHCO₃, the resulting organic layer was dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure. A colourless oil was obtained and purified by flash-column chromatography (silica gel, PE/EtOAc, 1:4) to afford

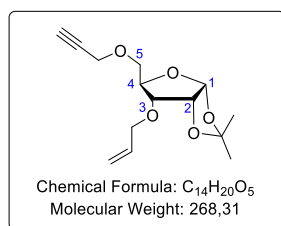
the diol (**40**) as a colourless oil (5.47 g, 21.02 mmol) in 93% yield. **Rf**= 0.20 (silica, PE/EtOAc, 1:4). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)**: δ 5.96 (ddt, ³*J*= 5.9 Hz, ³*J*_{cis}= 10.3 Hz, ³*J*_{trans}= 17.2 Hz, 1H, CH₂=CH-CH₂-O), 5.78 (d, ³*J*= 4.0 Hz, 1H, H₁), 5.34 (ddd, ⁴*J*= 1.6 Hz, *J*_{gem}= 3.0 Hz, ³*J*_{trans}= 17.2 Hz, 1H, CH₂=CH-CH₂-O), 5.26 (ddd, ⁴*J*= 1.6 Hz, *J*_{gem}= 3.0 Hz, ³*J*_{cis}= 10.3 Hz, 1H, CH₂=CH-CH₂-O), 4.65 (t, ³*J*= 4.0 Hz, 1H, H₂), 4.26 (ddd, ⁴*J*= 1.4 Hz, ³*J*= 5.6 Hz, ²*J*_{gem}= 12.3 Hz, 1H, CH₂=CH-CH₂-O), 4.07 (m, 3H, H₄, H₅ CH₂=CH-CH₂-O), 3.92 (dd, ³*J*= 4.0 Hz, ³*J*= 8.6 Hz 1H, H₃), 3.73 (m, 2H, H_{6-6'}), 2.48 (d, ³*J*= 3.7 Hz, 1H, C₅-OH), 2.43 (dd, ³*J*= 5.8 Hz, ³*J*= 7.8 Hz, 1H, C₆-OH), 1.59 (s, 3H, C(CH₃)₂), 1.36 (s, 3H, C(CH₃)₂). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)**: δ 133.6 (CH, CH₂=CH-CH₂-O), 118.9 (CH₂, CH₂=CH-CH₂-O), 113.3 (*quat* C, C(CH₃)₂), 104.1 (CH, C₁), 79.0 (CH, C₄), 77.3 (CH, C₂), 76.8 (CH, C₃), 71.3 (CH, CH₂=CH-CH₂-O), 70.8 (CH, C₅), 63.1 (CH₂, C₆), 26.8, 26.5 (2x CH₃, C(CH₃)₂). **HRMS (ESI⁺)** calcd for C₁₂H₂₁NO₆, 261.1333 [M +H]⁺; found, 261.1334. The spectroscopic data are in accordance with those reported in literature (**CAS # 156742-37-9**).

3-*O*-Allyl-1,2-*O*-isopropylidene- α -D-ribofuranose (**41**)



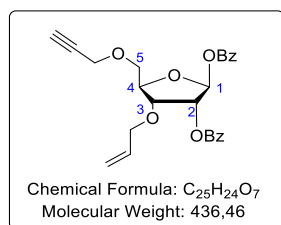
NaIO₄ (495 mg, 2.30 mmol, 1.2 eq.) in water (3.2 mL) was added to a solution of the diol compound (**40**) (500 mg, 1.92 mmol, 1.0 eq.) in ethanol (8 mL) cooled at 0 °C. The reaction was let to stir at room temperature for 1 hour; a white solid precipitated. The mixture was filtered on Celite® and the white solid rinsed with ethanol. The resulting organic layer was concentrated under reduced pressure and the residue (yellowish oil) was then diluted in ethanol (12 mL). NaBH₄ (81 mg, 2.11 mmol, 1.1 eq.) was added portionwise to the mixture cooled at 0 °C and the reaction was stirred at room temperature for 30 minutes. The solvents were evaporated under reduced pressure and the residue was diluted in EtOAc. After an aqueous workup with sat. aq. NaHCO₃, the organic layer was dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure. The crude oil was purified by flash-column chromatography (silica gel, CH₂Cl₂ 100% → CH₂Cl₂/MeOH, 98:2) to afford (**41**) (375 mg, 1.63 mmol) as a colourless oil in 85% yield. **Rf**= 0.32 (silica, CH₂Cl₂/MeOH, 98:2). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)**: δ 5.95 (ddt, ³*J*= 5.9 Hz, ³*J*_{cis}= 10.3 Hz, ³*J*_{trans}= 17.2 Hz, 1H, CH₂=CH-CH₂-O), 5.75 (d, ³*J*= 4.0 Hz, 1H, H₁), 5.32 (ddd, ⁴*J*= 1.6 Hz, ²*J*_{gem}= 3.2 Hz, ³*J*_{trans}= 17.2 Hz, 1H, CH₂=CH-CH₂-O), 5.23 (ddd, ⁴*J*= 1.6 Hz, ²*J*_{gem}= 3.2 Hz, ³*J*_{cis}= 10.3 Hz, 1H, CH₂=CH-CH₂-O), 4.62 (d, ³*J*= 4.0 Hz, 1H, H₂), 4.20 (ddd, ⁴*J*= 1.6 Hz, ³*J*= 5.8 Hz, ²*J*_{gem}= 12.7 Hz, 1H, CH₂=CH-CH₂-O), 4.09 (ddd, ³*J*= 2.3 Hz, ³*J*= 3.8 Hz, ³*J*= 9.0 Hz, 1H, H₄), 4.09 (ddd, ⁴*J*= 1.6 Hz, ³*J*= 5.8 Hz, ²*J*_{gem}= 12.7 Hz, 1H, CH₂=CH-CH₂-O), 3.95 (dd, ³*J*= 2.5 Hz, ³*J*= 4.0 Hz, ²*J*_{gem}= 12.7 Hz, 1H, H_{5a}), 3.84 (dd, ³*J*= 4.0 Hz, ³*J*= 9.1 Hz, 1H, H₃), 3.68 (dd, ³*J*= 3.1 Hz, ³*J*= 9.0 Hz, ²*J*_{gem}= 12.7 Hz, 1H, H_{5b}), 1.81 (dd, ³*J*= 4.0 Hz, ³*J*= 9.0 Hz, 1H, -OH), 1.57 (s, 3H, -CH₃), 1.35 (s, 3H, -CH₃). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)**: δ 134.4 (CH, CH₂=CH-CH₂-O), 118.1 (CH₂, CH₂=CH-CH₂-O), 113.1 (*quat* C, C(CH₃)₂), 104.0 (CH, C₁), 78.7 (CH, C₄), 77.8 (CH, C₂), 76.8 (CH, C₃), 71.7 (CH₂, CH₂=CH-CH₂-O), 60.6 (CH₂, C₅), 26.8, 26.5 (2x CH₃, C(CH₃)₂). **HRMS (ESI⁺)** calcd for C₁₁H₂₂NO₅, 248.1492 [M +NH₄]⁺; found, 248.1495. The spectroscopic data are in accordance with those reported in literature (**CAS # 158895-35-3**).

1,2-*O*-isopropylidene-5-*O*-2-propynyl-3-*O*-2-propen-1-yl- α -*D*-ribofuranose (**42**)



Under a dried and inert atmosphere (argon), a 60% emulsion of sodium hydride (275 mg, 6.88 mmol, 1.4 eq.) in mineral oil was added in three portions to a mixture of (**41**) (1.13 g, 4.90 mmol, 1.0 eq.) in anhydrous THF (25 mL) stirred at 0 °C. After 15 min at this temperature, propargyl bromide (0.8 mL, 7.4 mmol, 1.5 eq.) was added dropwise, and the resulting mixture was then stirred at room temperature for 3 hours. The reaction was quenched by adding EtOH (20 mL) and solvents were evaporated to give a grey viscous oil which was diluted in CH₂Cl₂. After an aqueous workup with sat. aqueous NaHCO₃, the organic layer was dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure. A viscous oil was obtained and purified by flash-column chromatography (silica gel, CH₂Cl₂ 100% → CH₂Cl₂/MeOH 98:2 → CH₂Cl₂/MeOH 95:5), to afford (**42**) as a yellowish oil (1.10 g, 4.12 mmol) in 84% yield. **R_f** = 0.78 (silica, CH₂Cl₂/MeOH, 95:5). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)**: δ 5.94 (ddt, ³*J* = 5.9 Hz, ³*J*_{cis} = 10.3 Hz, ³*J*_{trans} = 17.2 Hz, 1H, CH₂=CH-CH₂-O), 5.76 (d, ³*J* = 4.0 Hz, 1H, H₁), 5.32 (ddd, ⁴*J* = 1.6 Hz, ²*J*_{gem} = 3.2 Hz, ³*J*_{trans} = 17.2 Hz, 1H, CH₂=CH-CH₂-O), 5.22 (ddd, ⁴*J* = 1.6 Hz, ²*J*_{gem} = 3.2 Hz, ³*J*_{cis} = 10.3 Hz, 1H, CH₂=CH-CH₂-O), 4.59 (d, ³*J* = 4.0 Hz, 1H, H₂), 4.26 (dd, ⁴*J* = 2.4 Hz, ²*J*_{gem} = 15.9 Hz, 1H, HCC-CH₂-O), 4.19 (ddd, ⁴*J* = 1.6 Hz, ³*J* = 5.9 Hz, ²*J*_{gem} = 12.8 Hz, 1H, CH₂=CH-CH₂-O), 4.17 (dd, ⁴*J* = 2.4 Hz, ²*J*_{gem} = 15.9 Hz, 1H, HCC-CH₂-O), 4.13 (ddd, ³*J* = 2.3 Hz, ³*J* = 3.8 Hz, ³*J* = 9.0 Hz, 1H, H₄), 4.10 (ddd, ⁴*J* = 1.6 Hz, ³*J* = 5.9 Hz, ²*J*_{gem} = 12.8 Hz, 1H, CH₂=CH-CH₂-O), 3.85 (dd, ³*J* = 4.0 Hz, ³*J* = 9.0 Hz, 1H, H₃), 3.83 (dd, ³*J* = 2.3 Hz, ²*J*_{gem} = 11.2 Hz, 1H, H_{5a}), 3.71 (dd, ³*J* = 3.8 Hz, ²*J*_{gem} = 11.2 Hz, 1H, H_{5b}), 2.44 (t, ⁴*J* = 2.4 Hz, 1H, HCC-CH₂-O), 1.57 (s, 3H, C(CH₃)₂), 1.35 (s, 3H, C(CH₃)₂). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)**: δ 134.1 (CH, CH₂=CH-CH₂-O), 118.1 (CH₂, CH₂=CH-CH₂-O), 112.9 (*quat* C, C(CH₃)₂), 104.4 (CH, C₁), 79.4 (*quat* C, HCC-CH₂-O), 77.6 (CH, C₄), 77.5 (CH, C₂), 77.2 (CH, C₃), 74.7 (CH, HCC-CH₂-O), 71.7 (CH₂, CH₂=CH-CH₂-O), 67.6 (CH₂, C₅), 58.7 (CH₂, HCC-CH₂-O), 26.8, 26.5 (2x CH₃, C(CH₃)₂). **HRMS (ESI⁺)** calcd for C₁₄H₂₄NO₅, 286.1649 [M + NH₄]⁺; found, 286.1649.

5-*O*-2-propynyl-3-*O*-2-propen-1-yl-1,2-dibenzoate- α/β -*D*-ribofuranose (**43**)

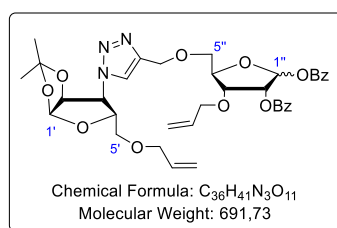


According to **procedure A**, the derivative (**42**) (2.0 g, 7.45 mmol, 1.0 eq.) was deprotected under acidic conditions (formic ac., 34 mL + H₂O, 6 mL) and subsequently protected into benzoates under basic conditions: CH₂Cl₂ (50 mL), pyridine (2.4 mL, 30 mmol, 4.0 eq.), DMAP (5 mol%) and benzoyl chloride (2.2 mL, 18.63 mmol, 2.5 eq.). The title compound (**43**) was obtained after purification by flash-column chromatography (silica gel, PE/EtOAc, 4:1) as a yellowish oil (1.98 g, 4.54 mmol) in 61% yield (over the two steps). α/β = 1:1. β anomer could be isolated for analysis. **R_f** = 0.3 (silica, PE/EtOAc, 4:1). **Major β anomer**: **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)**: δ

8.08 (m, 4H, *o*-Ph), 7.60 (m, 2H, *p*-Ph), 7.46 (m, 4H, *m*-Ph), 6.54 (s, 1H, H₁), 5.83 (ddt, ³*J* = 5.7 Hz, ³*J*_{cis} = 10.3 Hz, ³*J*_{trans} = 17.2 Hz, 1H, CH₂=CH-CH₂-O), 5.68 (d, ³*J* = 4.3 Hz, 1H, H₂), 5.26 (ddd, ⁴*J* = 1.6 Hz, ²*J*_{gem} = 3.2 Hz, ³*J*_{trans} = 17.2 Hz, 1H, CH₂=CH-CH₂-O), 5.15 (ddd, ⁴*J* = 1.6 Hz, ²*J*_{gem} = 3.2 Hz, ³*J*_{cis} = 10.3 Hz, 1H, CH₂=CH-CH₂-O), 4.46 (dd, ³*J*_{cis} = 4.3 Hz, ³*J* = 7.7 Hz, 1H, H₃), 4.38 (ddd, ³*J* = 3.2 Hz, ³*J* = 4.2 Hz, ³*J* = 7.7 Hz, 1H, H₄), 4.18 (dd, ⁴*J* = 2.4 Hz, ²*J*_{gem} = 15.9 Hz, 1H, HCC-CH₂-O), 4.16 (ddd, ⁴*J* = 1.6 Hz, ³*J* = 5.7 Hz, ²*J*_{gem} = 12.5 Hz, 1H, CH₂=CH-CH₂-O), 4.13 (dd, ⁴*J* = 2.4 Hz, ²*J*_{gem} = 15.9 Hz, 1H, HCC-CH₂-O), 4.07 (ddd, ⁴*J* = 1.6 Hz, ³*J* = 5.7 Hz, ²*J*_{gem} = 12.5 Hz, 1H, CH₂=CH-CH₂-O), 3.82 (dd, ³*J* = 3.2 Hz, ²*J*_{gem} = 11.0 Hz, 1H, H_{5a}), 3.77 (dd, ³*J* = 4.2 Hz, ²*J*_{gem} = 11.0 Hz, 1H, H_{5b}), 2.35 (t, ⁴*J* = 2.4 Hz, 1H, HCC-CH₂-O). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)**: δ 165.4 (*quat* C, Ph-CO), 164.7 (*quat* C, Ph-CO), 133.9 (CH, CH₂=CH-CH₂-O), 133.5 (CH, Ph-CO), 133.4 (CH, Ph-CO), 130.0 (2x CH, Ph-CO), 129.9 (2x CH, Ph-CO), 129.6 (*quat* C, Ph-CO), 129.4 (*quat* C, Ph-CO), 128.5 (2x CH, Ph-CO), 128.4 (2x CH, Ph-CO), 117.9 (CH₂, CH₂=CH-CH₂-O), 99.2 (CH, C₁), 81.6 (CH, C₄), 79.4 (*quat* C, HCC-CH₂-O), 76.7 (CH, C₃), 74.6 (CH, HCC-CH₂-O), 74.1 (CH, C₂), 72.2 (CH₂, CH₂=CH-CH₂-O), 68.9 (CH₂, C₅), 58.7 (CH₂, HCC-CH₂-O). **HRMS (ESI⁺)** calcd for C₂₅H₂₈NO₇, 454.1860 [M + NH₄]⁺; found, 454.1862.

3) Synthesis of macrocycle (45)

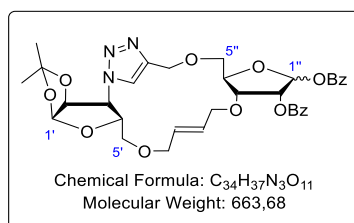
[4α-allyloxy-5β-[[1-[(3αα,5β,6α,6α)-5-(allyloxymethyl)-2,2-dimethyl-3a,5,6,6a-tetrahydrofuro[2,3-d][1,3]dioxol-6-yl]triazol-4-yl]methoxymethyl]-2α/β-benzoyloxy-tetrahydrofuran-3α-yl]benzoate (44)



The azido derivative (**37**) (500 mg, 1.96 mmol, 1.0 eq.) and the α/β mixture of analogue **43** (1.03 g, 2.35 mmol, 1.2 eq.) were dissolved in *t*BuOH/H₂O (2:1, 20 mL) under nitrogen at room temperature. Subsequently, a solution of sodium ascorbate (154 mg, 0.78 mmol, 0.40 eq.) in water (2 mL) and a solution of copper(II) sulfate pentahydrate (50 mg, 0.20 mmol, 0.10 eq.) in water (2 mL) was added. The reaction mixture was stirred at 40 °C for 3 hours. Volatiles were evaporated and the residue was purified by flash-column chromatography (silica gel, PE/EtOAc, 4:1 → PE/EtOAc, 1:1) to provide (**44**) as a colourless oil (892 mg, 1.29 mmol) in 66% yield. α/β = 1:1. **Rf** (α anomer) = 0.44 (silica, CH₂Cl₂/MeOH = 100:5). **Rf** (β anomer) = 0.4 (silica, PE/EtOAc, 1:1). β anomer could be partially isolated for analysis. **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)**: δ 8.08 (d, ³*J* = 7.6 Hz, 2H, *o*-Ph), 8.01 (d, ³*J* = 7.6 Hz, 2H, *o*-Ph), 7.72 (s, 1H, =CH-N), 7.59 (m, 2H, *p*-Ph), 7.46 (m, 4H, *m*-Ph), 6.53 (s, 1H, H_{1''}), 5.96 (d, ³*J* = 3.8 Hz, 1H, H_{1'}), 5.83 (m, 2H, CH₂=CH-CH₂-O), 5.27 (d, ³*J* = 3.0 Hz, 1H, H_{2''}), 5.22-5.10 (m, 5H, CH₂=CH-CH₂-O, H_{3'}), 4.72 (t, ³*J* = 3.0 Hz, 1H, H_{2'}), 4.70 (s, 2H, O-CH₂-triazolyl), 4.51 (dt, ³*J* = 3.0 Hz, ³*J* = 10.0 Hz, 1H, H_{4'}), 4.40 (m, 2H, H_{3''}, H_{4''}), 4.14 (dd, ³*J* = 5.5 Hz, ²*J*_{gem} = 12.5 Hz, 1H, CH₂=CH-CH₂-O), 4.04 (dd, ³*J* = 5.5 Hz, ²*J*_{gem} = 12.5 Hz, 1H, CH₂=CH-CH₂-O), 3.99 (d, ³*J* = 5.5 Hz, 1H, CH₂=CH-CH₂-O), 3.86 (dd, ³*J* = 1.7 Hz, ²*J*_{gem} = 11.2 Hz, 1H, H_{5'a}), 3.75 (dd, ³*J* = 3.9 Hz, ²*J*_{gem} = 11.2 Hz, 1H, H_{5'b}), 3.70 (dd, ³*J* = 2.4 Hz, ²*J*_{gem} = 11.5 Hz, 1H, H_{5'a}), 3.46 (dd, ³*J* = 3.8 Hz, ²*J*_{gem} = 11.5 Hz, 1H, H_{5'b}), 1.58 (s, 3H, -CH₃), 1.32 (s, 3H, -CH₃). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)**: δ 165.4 (*quat* C, Ph-CO), 164.7 (*quat* C, Ph-CO), 144.8 (*quat* C, N-C=CH-N), 134.1 (CH, CH₂=CH-CH₂-O), 133.8 (CH, CH₂=CH-CH₂-O), 133.5 (CH, Ph-CO), 133.4 (CH, Ph-CO), 130.0 (2x CH, Ph-CO), 129.9 (2x CH, Ph-CO), 129.6 (*quat* C, Ph-CO), 129.4 (*quat* C, Ph-CO), 128.5 (2x CH, Ph-CO), 128.4 (2x CH, Ph-CO), 123.0 (CH, N-C=CH-N), 117.9 (CH₂, CH₂=CH-CH₂-O), 117.6 (CH₂, CH₂=CH-CH₂-O), 113.6 (*quat* C, C(CH₃)₂), 104.4 (CH, C_{1'}), 99.3 (CH, C_{1''}), 81.7

(CH, C_{4''}), 78.7 (CH, C_{2'}), 77.9 (CH, C_{4'}), 76.9 (CH, C_{3''}), 74.1 (CH, C_{2''}), 72.7 (CH₂, CH₂=CH-CH₂-O), 72.1 (CH₂, CH₂=CH-CH₂-O), 70.3 (CH₂, C_{5''}), 67.0 (CH₂, C_{5'}), 64.9 (CH₂, O-CH₂-triazolyl), 61.1 (CH, C_{3'}), 26.6, 26.3 (2x CH₃, C(CH₃)₂). HRMS (ESI⁺) calcd for C₃₆H₄₂N₃O₁₁, 692.2814 [M + H]⁺; found, 692.2815.

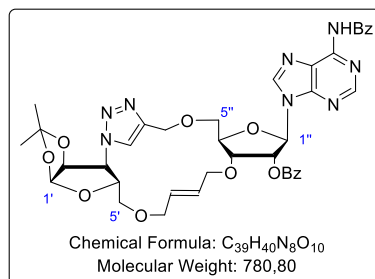
(2 α ,3 α ,7 α ,9 β ,17 α ,18 α ,19 α / β ,21 β)-[[(13*E*)-19-benzoyloxy-5,5-dimethyl-4,6,8,11,16,20,23-heptaoxa-1,26,27-triazapentacyclo[23.2.1.02,9.03,7.017,21] octacosa-13,25(28),26-trien-18-yl] benzoate (45)



To a stirred solution of derivative (**44**) (500 mg, 0.72 mmol, 1.00 equiv.) in dry CH₂Cl₂ (120 mL) was added dropwise a solution of Grubbs II catalyst (68 mg, 0.08 mmol, 5 mol%) in dry CH₂Cl₂ (2 mL) at 35 °C under argon over 2 hours. The mixture was then stirred for additional 30 minutes at this temperature and then concentrated under reduced pressure. The dark residue was washed through a pad of silica with CH₂Cl₂ and then filtered by PE/EtOAc, 1:1. Volatiles were evaporated, and the greenish residue was filtered through a plug of activated charcoal with EtOAc to give crude macrocycle compound (**45**) as a white foam (325 mg) which was used in the next step without further purification. α/β = 1:1. β anomer could be partially isolated for analysis. **R_f** = 0.2 (silica, PE/EtOAc, 1:1). **¹H NMR (700 MHz, CDCl₃)**: δ 8.12 (dd, ⁴*J* = 1.1 Hz, ³*J* = 8.1 Hz, 2H, *o*-Ph), 8.06 (dd, ⁴*J* = 1.1 Hz, ³*J* = 8.1 Hz, 2H, *o*-Ph), 7.73 (s, 1H, =CH-N), 7.60 (m, 2H, *p*-Ph), 7.50 (t, ³*J* = 7.8 Hz, 2H, *m*-Ph), 7.45 (t, ³*J* = 7.8 Hz, 2H, *m*-Ph), 6.54 (s, 1H, H_{1'}), 5.98 (d, ³*J* = 3.9 Hz, 1H, H_{1'}), 5.60 (d, ³*J* = 4.4 Hz, 1H, H_{2''}), 5.47 (ddd, ³*J* = 4.3 Hz, ³*J* = 6.8 Hz, ³*J*_{trans} = 15.5 Hz, 1H, CH'₂-CH'=CH''-CH''₂), 5.37 (ddd, ³*J* = 4.3 Hz, ³*J* = 7.1 Hz, ³*J*_{trans} = 15.5 Hz, 1H, -CH'₂-CH'=CH''-CH''₂), 5.23 (dd, ³*J* = 3.9 Hz, ³*J* = 10.2 Hz, 1H, H_{3'}), 4.84 (t, ³*J* = 3.9 Hz, 1H, H_{2'}), 4.75 (d, ²*J*_{gem} = 12.8 Hz, 1H, O-CH₂-triazolyl), 4.52 (d, ²*J*_{gem} = 12.8 Hz, 1H, O-CH₂-triazolyl), 4.47 (ddd, ³*J* = 3.4 Hz, ³*J* = 4.4 Hz, ³*J* = 10.2 Hz, 1H, H_{4'}), 4.40 (dd, ³*J* = 4.4 Hz, ³*J* = 8.0 Hz, 1H, H_{3''}), 4.22 (ddd, ³*J* = 3.6 Hz, ³*J* = 4.2 Hz, ³*J* = 8.0 Hz, 1H, H_{4''}), 4.18 (dd, ³*J* = 4.3 Hz, ³*J*_{gem} = 12.0 Hz, 1H, -CH'₂-CH'=CH''-CH''₂), 4.04 (dd, ³*J* = 4.3 Hz, ³*J*_{gem} = 13.1 Hz, 1H, -CH'₂-CH'=CH''-CH''₂), 3.77 (dd, ³*J* = 7.1 Hz, ³*J*_{gem} = 12.0 Hz, 1H, -CH'₂-CH'=CH''-CH''₂), 3.72 (dd, ³*J* = 6.8 Hz, ³*J*_{gem} = 13.1 Hz, 1H, -CH'₂-CH'=CH''-CH''₂), 3.71 (dd, ³*J* = 4.2 Hz, ²*J*_{gem} = 10.0 Hz, 1H, H_{5''}), 3.57 (dd, ³*J* = 4.4 Hz, ²*J*_{gem} = 10.8 Hz, 1H, H_{5'}), 3.57 (dd, ³*J* = 3.6 Hz, ²*J*_{gem} = 10.0 Hz, 1H, H_{5''}), 3.50 (dd, ³*J* = 3.4 Hz, ²*J*_{gem} = 10.8 Hz, 1H, H_{5'}), 1.65 (s, 3H, -CH₃), 1.35 (s, 3H, -CH₃). **¹³C NMR (175 MHz, CDCl₃)**: δ 165.3 (*quat* C, Ph-CO), 164.9 (*quat* C, Ph-CO), 144.0 (*quat* C, N-C=CH-N), 133.5 (CH, Ph-CO), 133.4 (CH, Ph-CO), 130.3 (CH, CH'₂-CH'=CH''-CH''₂), 130.1 (2x CH, Ph-CO), 129.9 (2x CH, Ph-CO), 129.5 (*quat* C, Ph-CO), 129.4 (*quat* C, Ph-CO), 128.6 (CH, CH'₂-CH'=CH''-CH''₂), 128.5 (2x CH, Ph-CO), 128.5 (2x CH, Ph-CO), 123.4 (CH, N-C=CH-N), 113.6 (*quat* C, C(CH₃)₂), 104.3 (CH, C_{1'}), 99.2 (CH, C_{1''}), 80.9 (CH, C_{4''}), 78.6 (2x CH, C_{2'}, C_{3''}), 76.7 (CH, C_{4'}), 74.2 (CH, C_{2''}), 72.0 (CH₂, -CH'₂-CH'=CH''-CH''₂), 70.3 (CH₂, -CH'₂-CH'=CH''-CH''₂), 67.7 (CH₂, C_{5''}), 65.6 (CH₂, C_{5'}), 63.3 (CH₂, O-CH₂-triazolyl), 62.5 (CH, C_{3'}), 26.5, 26.2 (2x CH₃, C(CH₃)₂). **HRMS (ESI⁺)** calcd for C₃₄H₃₈N₃O₁₁, 664.2501 [M + H]⁺; found, 664.2505.

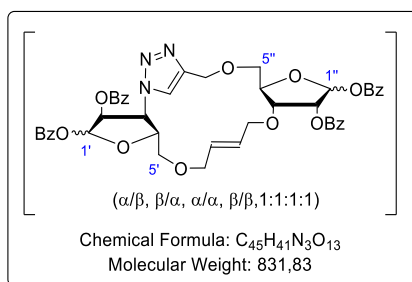
4) Synthesis of 3',3'-CDN

(2 α ,3 α ,7 α ,9 β ,17 α ,18 α ,19 α/β ,21 β)-[(13*E*)-19-((*N*6-benzoyl)adenin-9-yl)-5,5-dimethyl-4,6,8,11,16,20,23-hepta-oxa-1,26,27-triazapentacyclo[23.21.02,9.03,7.017,21]octacos-13,25(28),26-trien-18-yl]benzoate (46)



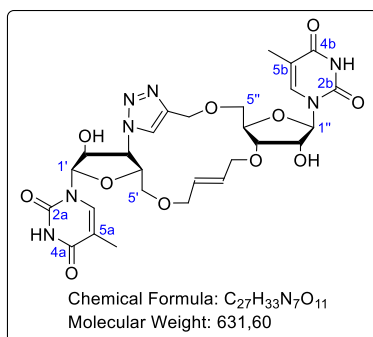
A solution of *N,O*-Bis(trimethylsilyl)acetamide (1M) in dry MeCN (0.36 mL, 0.36 mmol, 4.0 eq.) was added under argon to a stirred suspension of *N*⁶-benzoyladenine (43 mg, 0.18 mmol, 2.0 eq.) in dry MeCN (2 mL) and heated to 80 °C for 30 minutes until a clear solution was obtained. A solution of intermediates mixture (45) (60 mg, 0.09 mmol, 1.0 eq.) in MeCN (2 mL) was added and the resulted mixture was let stirred at 80 °C for additional 30 minutes. The reaction mixture was brought to room temperature and treated with a solution of trimethylsilyl triflate (1M) in dry ACN (0.22 mL, 0.22 mmol, 2.5 eq.). The dark red solution was stirred at 80 °C for 2 hours. The reaction was quenched with sat. aq. NaHCO₃ and extracted with EtOAc. The organic layers were dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash-column chromatography (CH₂Cl₂ 100% → CH₂Cl₂/MeOH, 97:3) to provide the nucleoside (46) as a white solid (24 mg, 0.031 mmol) in 34% yield, in 90% purity. **R_f** = 0.7 (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1). **¹H NMR (700 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 11.26 (br s, 1H, -NHBz), 8.75 (s, 1H, H₂), 8.73 (s, 1H, H₈), 8.28 (s, 1H, =CH-N), 8.06 (d, ³J = 7.3 Hz, 2H, *o*-Ph), 8.01 (d, ³J = 7.3 Hz, 2H, *o*-Ph), 7.70 (t, ³J = 7.3 Hz, 1H, *p*-Ph), 7.65 (t, ³J = 7.3 Hz, 1H, *p*-Ph), 7.56 (m, 4H, *m*-Ph), 6.47 (d, ³J = 3.0 Hz, 1H, H_{1''}), 5.99 (dd, ³J = 3.0 Hz, ³J = 5.3 Hz, 1H, H_{2''}), 5.93 (d, ³J = 3.6 Hz, 1H, H_{1'}), 5.39 (dt, ³J = 5.0 Hz, ³J_{trans} = 15.5 Hz, 1H, CH'₂-CH' = CH''-CH''₂), 5.33 (dt, ³J = 5.0 Hz, ³J_{trans} = 15.5 Hz, 1H, CH'₂-CH' = CH''-CH''₂), 5.15 (dd, ³J = 4.7 Hz, ³J = 10.2 Hz, 1H, H_{3'}), 4.86 (t, ³J = 4.2 Hz, 1H, H_{2'}), 4.75 (d, ²J_{gem} = 13.0 Hz, 1H, O-CH₂-triazolyl), 4.69 (ddd, ³J = 4.2 Hz, ³J = 5.0 Hz, ³J = 10.2 Hz, 1H, H_{4'}), 4.53 (d, ²J_{gem} = 13.0 Hz, 1H, O-CH₂-triazolyl), 4.38 (dd, ³J = 5.3 Hz, ³J = 7.0 Hz, 1H, H_{3''}), 4.22 (ddd, ³J = 3.3 Hz, ³J = 3.8 Hz, ³J = 7.0 Hz, 1H, H_{4''}), 4.04 (dd, ³J = 5.0 Hz, ²J_{gem} = 13.3 Hz, 1H, CH'₂-CH' = CH''-CH''₂), 3.96 (dd, ³J = 5.0 Hz, ²J_{gem} = 13.2 Hz, 1H, CH'₂-CH' = CH''-CH''₂), 3.77 (m, 3H, CH'₂-CH' = CH''-CH''₂, CH'₂-CH' = CH''-CH''₂, H_{5''}), 3.54 (dd, ³J = 3.3 Hz, ²J_{gem} = 11.0 Hz, 1H, H_{5''}), 3.51 (dd, ³J = 4.6 Hz, ²J_{gem} = 10.8 Hz, 1H, H_{5'}), 3.47 (dd, ³J = 3.7 Hz, ²J_{gem} = 10.8 Hz, 1H, H_{5'}), 1.54 (s, 3H, -CH₃), 1.25 (s, 3H, -CH₃). **¹³C NMR (175 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 165.1 (2x *quat* C, Ph-CO), 152.3 (*quat* C, C₆), 152.2 (CH, C₂), 150.9 (*quat* C, C₄), 143.1 (*quat* C, N-C=CH-N, CH, C₈), 134.3 (CH, Ph-CO), 133.0 (CH, Ph-CO), 129.9 (2x CH, Ph-CO), 129.6 (CH, CH'₂-CH' = CH''-CH''₂), 129.5 (CH, CH'₂-CH' = CH''-CH''₂), 129.4 (2x CH, Ph-CO), 129.0 (*quat* C, 2x CH, Ph-CO), 129.0 (*quat* C, 2x CH, Ph-CO), 126.2 (*quat* C, C₅), 125.5 (CH, N-C=CH-N), 112.9 (*quat* C, C(CH₃)₂), 104.6 (CH, C_{1'}), 87.0 (CH, C_{1''}), 81.3 (CH, C_{4''}), 78.6 (CH, C_{2'}), 76.5 (CH, C_{3''}), 75.8 (CH, C_{4'}), 74.9 (CH, C_{2''}), 71.1 (CH₂, -CH'₂-CH' = CH''-CH''₂), 69.7 (CH₂, -CH'₂-CH' = CH''-CH''₂), 67.0 (CH₂, C_{5'}), 66.8 (CH₂, C_{5''}), 62.9 (CH₂, O-CH₂-triazolyl), 62.5 (CH, C_{3'}), 26.7, 26.7 (2x CH₃, C(CH₃)₂). **HRMS (ESI⁺)** calcd for C₃₉H₄₁N₈O₁₀, 781.2940 [M + H]⁺; found, 781.2942.

(2 α ,3 α ,7 α ,9 β ,17 α ,18 α ,19 α / β ,21 β)-[(10*Z*)-4,15,16-tribenzoyloxy-5,8,13,17,20-pentaoxa-1,23,24-triazatetracyclo[20.2.1.02,6.014,18]pentacosa-10,22(25),23-trien-3-yl]benzoate (49)



According to **procedure A**, the derivative **(49)** (600 mg, 0.90 mmol, 1.0 eq.) was deprotected under acidic conditions (formic ac., 5.5 mL + H₂O, 1 mL) and subsequently protected into benzoates under basic conditions: CH₂Cl₂ (10 mL), pyridine (0.3 mL, 3.60 mmol, 4.0 eq.), DMAP (5 mol%) and benzoyl chloride (0.26 mL, 2.25 mmol, 2.5 eq.). After the successive aqueous work-ups, volatile materials were removed under reduced pressure, the obtained residue was filtered through silica (silica gel, PE/EtOAc, 1:1 -> PE/EtOAc, 1:4) and isolated as a white foam (416 mg) used in the next step without further purification. α-α/α-β/β-α/β-β = 0.25:0.25:0.25:0.25 (inseparable mixture by flash column chromatography). **R_f** = 0.5 (silica, PE/EtOAc, 1:4). **HRMS (ESI⁺)** calcd for C₃₈H₃₆N₃O₁₁, 710.2344 [M - OBz]⁺; found, 710.2343.

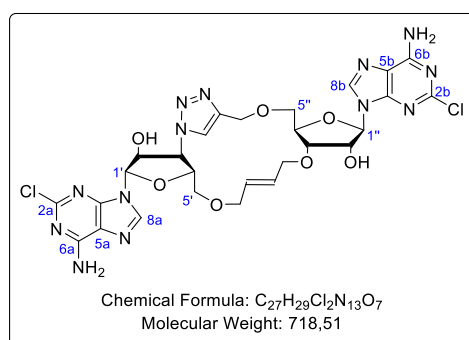
3',3'-Thymine-CDN or (2 α ,3 α ,7 α ,9 β ,17 α ,18 α ,19 α / β ,21 β)-(10*E*)-5,8,13,17,20-pentaoxa-4,16-di-thymin-1-yl-1,23,24-triazatetracyclo[20.2.1.02,6.014,18] pentacosa-10,22(25),23-triene-3,15-diol (50a)



The title compound **50a** was prepared according to **procedure B**, starting from thymine (180 mg, 1.43 mmol, 6.0 eq.) as nucleobase. After aqueous treatments and filtration over silica, the crude dibenzoate intermediate CDN was isolated as a whitish foam (143 mg) - **R_f** = 0.5 (silica, CH₂Cl₂/MeOH, 95:5) - and was directly engaged under the basic deprotection conditions. After the completion of the reaction, all volatiles were evaporated under reduced pressure and the residue was purified by flash-column chromatography (silica gel, CH₂Cl₂ 100% -> CH₂Cl₂/MeOH, 98:2 -> CH₂Cl₂/MeOH, 95:5) to provide the final 3',3'-thymine-CDN compound **50a** as a white foam (24 mg, 0.039 mmol) in 39% yield. **R_f** = 0.39 (silica, CH₂Cl₂/MeOH, 9:1). **¹H NMR (700 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 11.40 (s, 1H, -NH), 11.32 (s, 1H, -NH), 8.26 (s, 1H, =CH-N), 7.77 (d, ⁴J = 1.0 Hz, 1H, H_{6a}), 7.74 (d, ⁴J = 1.0 Hz, 1H, H_{6b}), 6.18 (d, ³J = 5.4 Hz, 1H, -OH'), 5.83 (d, ³J = 2.0 Hz, 1H, H_{1'}), 5.73 (d, ³J = 5.0 Hz, 1H, H_{1''}), 5.48 (ddd, ³J = 4.8 Hz, ³J = 5.9 Hz, ³J_{trans} = 15.4 Hz, 1H, CH'₂-CH'=CH''-CH''₂), 5.42 (m, 3H, -CH'₂-CH'=CH''-CH''₂, H_{3'}, -OH''), 4.81 (d, ²J_{gem} = 13.0 Hz, 1H, O-CH₂-triazolyl), 4.72 (dt, ³J = 4.3 Hz, ³J = 9.7 Hz, 1H, H_{4'}), 4.45 (d, ²J_{gem} = 13.0 Hz, 1H, O-CH₂-triazolyl), 4.44 (td, ³J = 2.0 Hz, ³J = 5.7 Hz, 1H, H_{2'}), 4.11 (dd, ³J = 5.0 Hz, ³J = 10.7 Hz, 1H,

H_{2''}), 4.08 (dd, ³J = 4.8 Hz, ²J_{gem} = 13.7 Hz, 1H, CH'₂-CH'=CH''-CH''₂), 4.00 (dd, ³J = 5.3 Hz, ²J_{gem} = 12.9 Hz, 1H, CH'₂-CH'=CH''-CH''₂), 3.94 (dt, ³J = 2.5 Hz, ³J = 4.8 Hz, 1H, H_{4''}), 3.86 (dd, ³J = 6.0 Hz, ²J_{gem} = 12.9 Hz, 1H, CH'₂-CH'=CH''-CH''₂), 3.78 (dd, ³J = 5.9 Hz, ²J_{gem} = 13.7 Hz, 1H, CH'₂-CH'=CH''-CH''₂), 3.65 (dd, ³J = 2.8 Hz, ²J_{gem} = 11.0 Hz, 1H, H_{5''}), 3.63 (dd, ³J = 4.7 Hz, ²J_{gem} = 10.8 Hz, 1H, H_{5'}), 3.54 (dd, ³J = 3.8 Hz, ²J_{gem} = 10.8 Hz, 1H, H_{5'}), 3.49 (dd, ³J = 5.0 Hz, ³J = 9.7 Hz, 1H, H_{3''}), 3.33 (dd, ³J = 2.2 Hz, ²J_{gem} = 11.0 Hz, 1H, H_{5''}), 1.83 (d, ⁴J = 1.0 Hz, 3H, -CH_{3b}), 1.81 (d, ⁴J = 1.0 Hz, 3H, -CH_{3a}). **¹³C NMR (175 MHz, CDCl₃):** δ 164.3-164.2 (2x *quat* C, C_{4a-b}), 151.1 (*quat* C, C_{2b}), 150.8 (*quat* C, C_{2a}), 142.7 (*quat* C, N-C=CH-N), 137.2 (CH, C_{6a}), 136.3 (CH, C_{6b}), 130.8 (CH, CH'₂-CH'=CH''-CH''₂), 128.7 (CH, CH'₂-CH'=CH''-CH''₂), 126.1 (CH, N-C=CH-N), 109.9 (*quat* C, C_{5a}), 109.6 (*quat* C, C_{5b}), 91.9 (CH, C_{1'}), 88.7 (CH, C_{1''}), 81.3 (CH, C_{4''}), 78.5 (CH, C_{4'}), 76.7 (CH, C_{3''}), 73.4 (CH, C_{2'}), 72.9 (CH, C_{2''}), 70.2 (CH₂, CH'₂-CH'=CH''-CH''₂), 69.5 (CH₂, CH'₂-CH'=CH''-CH''₂), 67.3 (CH₂, C_{5'}), 66.6 (CH₂, C_{5''}), 62.6 (CH₂, O-CH₂-triazolyl), 61.3 (CH, C_{3'}), 13.0 (CH₃, CH_{3b}), 12.7 (CH₃, CH_{3a}). **HRMS (ESI⁺)** calcd for C₂₇H₃₄N₇O₁₁, 632.2311 [M + H]⁺; found, 632.2308. **HPLC** (isocratic, 80% water-20% MeCN, 20 min): t_R=4.006 min (97% purity).

3',3'-(2-Chloro-6-aminopurine)-CDN or (2α,3α,7α,9β,17α,18α,19α/β,21β)-(10E)-5,8,13,17,20-pentaoxa-4,16-(2-chloro-6-aminopurin-9-yl)-1,23,24-triazatetracyclo[20.2.1.02,6.014,18]pentacosa-10,22(25),23-triene-3,15-diol (50b)

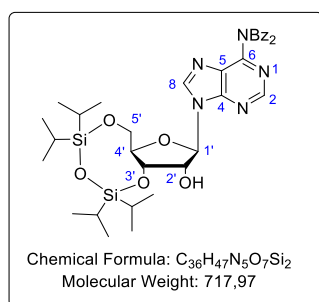


The title compound **50b** was prepared according to **procedure B**, starting from 2,6-dichloropurine (270 mg, 1.43 mmol, 6.0 eq.) as nucleobase. After aqueous treatments and filtration over silica, the crude dibenzoate intermediate CDN was isolated as a whitish foam (181 mg) - R_f = 0.52 (silica, CH₂Cl₂/MeOH, 95:5) - and was directly engaged under the basic deprotection conditions. After the completion of the reaction, all volatiles were evaporated under reduced pressure and the residue was purified by flash-column chromatography (silica gel, CH₂Cl₂ 100% -> CH₂Cl₂/MeOH, 98:2 -> CH₂Cl₂/MeOH, 95:5) to provide the final 3',3'-(2-amino-6-chloropurine) CDN **50b** as a white foam (3.4 mg, 4.8 μmol) in 2% yield. R_f = 0.28 (silica, CH₂Cl₂/MeOH, 9:1). **¹H NMR (700 MHz, DMSO-*d*₆):** δ 8.46 (s, 1H, H_{8a}), 8.36 (s, 1H, H_{8b}), 8.33 (s, 1H, =CH-N), 7.89 (br s, 2H, -NH_{2a}), 7.84 (br s, 2H, -NH_{2b}), 6.37 (br s, 1H, -OH'), 6.09 (d, ³J = 2.0 Hz, 1H, H_{1'}), 5.81 (d, ³J = 5.0 Hz, 1H, H_{1''}), 5.73 (dd, ³J = 6.0 Hz, ³J = 9.5 Hz, 1H, H_{3'}), 5.58 (d, ³J = 5.9 Hz, 1H, -OH''), 5.52 (dt, ³J = 5.0 Hz, ³J_{trans} = 15.4 Hz, 1H, CH'₂-CH'=CH''-CH''₂), 5.48 (dt, ³J = 5.0 Hz, ³J_{trans} = 15.4 Hz, 1H, CH'₂-CH'=CH''-CH''₂), 4.86 (dt, ³J = 5.0 Hz, ³J = 9.7 Hz, 1H, H_{4'}), 4.77 (m, ²J_{gem} = 13.0 Hz, 2H, H_{2'}, O-CH₂-triazolyl), 4.53 (dd, ³J = 5.0 Hz, ³J = 10.4 Hz, 1H, H_{2''}), 4.49 (d, ²J_{gem} = 13.0 Hz, 1H, O-CH₂-triazolyl), 4.12 (dd, ³J = 5.0 Hz, ²J_{gem} = 14.3 Hz, 1H, CH'₂-CH'=CH''-CH''₂), 4.05 (dt, ³J = 3.2 Hz, ³J = 4.8 Hz, 1H, H_{4''}), 3.96 (dd, ³J = 5.0 Hz, ²J_{gem} = 13.0 Hz, 1H, CH'₂-CH'=CH''-CH''₂), 3.89 (dd, ³J = 5.0 Hz, ²J_{gem} = 13.0 Hz, 1H, CH'₂-CH'=CH''-CH''₂), 3.86 (dd, ³J = 5.0 Hz, ²J_{gem} = 14.3 Hz, 1H, CH'₂-CH'=CH''-CH''₂), 3.73 (dd, ³J = 4.8 Hz, 1H, H_{3''}), 3.66 (m, 3H, H_{5'}, H_{5''}-5''), 3.43 (dd, ³J = 3.2 Hz, ²J_{gem} = 10.8 Hz, 1H, H_{5'}). **¹³C NMR (175 MHz, CDCl₃):** δ 157.4-157.3 (2x *quat* C, C_{6a-b}), 153.7 (2x *quat* C, C_{2a-b}), 150.9 (*quat* C, C_{4b}), 150.4 (*quat* C, C_{4a}), 143.0 (*quat* C, N-C=CH-N), 140.4 (CH, C_{8a}), 139.6 (CH, C_{8b}), 130.8 (CH, CH'₂-CH'=CH''-CH''₂), 128.7 (CH, CH'₂-

CH'=CH''-CH''₂), 126.0 (CH, N-C=CH-N), 118.7 (*quat* C, C_{5a}), 118.4 (*quat* C, C_{5b}), 90.3 (CH, C_{1'}), 88.0 (CH, C_{1''}), 81.7 (CH, C_{4''}), 78.8 (CH, C_{4'}), 77.2 (CH, C_{3''}), 74.0 (CH, C_{2'}), 73.5 (CH, C_{2''}), 70.3 (CH₂, CH'₂-CH'=CH''-CH''₂), 69.6 (CH₂, CH'₂-CH'=CH''-CH''₂), 68.4 (CH₂, C_{5'}), 67.3 (CH₂, C_{5''}), 62.9 (CH₂, O-CH₂-triazolyl), 62.3 (CH, C_{3'}). **HRMS (ESI⁺)** calcd for C₂₇H₃₀Cl₂N₁₃O₇, 718.1763 [M + H]⁺; found, 718.1765. **HPLC** (isocratic, 75% water-25% MeCN, 20 min): t_R=7.224 min (95% purity).

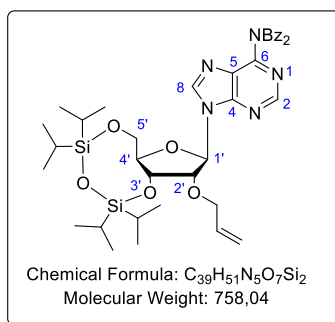
5) Synthesis of precursor (54)

N,N-Dibenzoyl-3',5'-O-[1,1,3,3-tetrakis(1-methylethyl)-1,3-disiloxanediyl]adenosine (51).



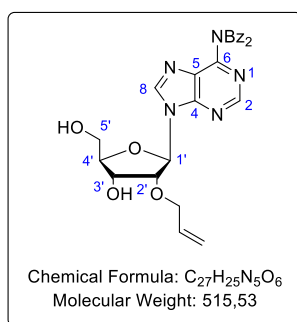
To a suspension of *N,N*-dibenzoyladeniosine (5.45 g, 11.5 mmol, 1.0 eq.) in dry pyridine (70 mL) cooled at 0°C, 1,3-dichloro-1,1,3,3-tetraisopropylidisiloxane (4.4 mL, 13.8 mmol, 1.2 eq.) was added dropwise. The reaction medium was then stirred for 10 hours at room temperature under argon atmosphere. The previous mixture was evaporated to dryness and obtained solid was dissolved in DCM (100 mL), washed with a sat. aq. solution of NaHCO₃ (3 x 20 mL), dried over MgSO₄, filtered, and concentrated *in vacuo*. The crude residue was purified by flash-column chromatography (silica gel, PE → PE/EtOAc, 7:3). After removing of solvents, the product was dried and recrystallized from hexane to give compound **51** (7.84 g, 10.92 mmol) as white foam in 95% yield. **R_f** = 0.44 (silica, PE/EtOAc, 1:1). **¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 8.67 (s, 1H, H₂), 8.53 (s, 1H, H₈), 8.04 (d, ³*J* = 7.6 Hz, 4H, H_{ar}), 7.64 (t, ³*J* = 7.6 Hz, 2H, H_{ar}), 7.55 (t, ³*J* = 7.6 Hz, 4H, H_{ar}), 6.01 (s, 1H, H_{1'}), 5.66 (d, ³*J* = 4.6 Hz, 1H, OH), 4.83 (dd, ³*J* = 5.5 Hz, ³*J* = 8.0 Hz, 1H, H_{3'}), 4.66 (dd, ³*J* = 4.6 Hz, ³*J* = 8.0 Hz, 1H, H_{2'}), 4.10-4.01 (m, 3H, H_{4'}, H_{5'a}, H_{5'b}), 1.11-0.95 (m, 28H, H_{TIPDS}). **¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 172.4 (2x *quat* C, CO), 151.9 (CH, C₂), 151.9 (*quat* C, C₄), 151.0 (*quat* C, C₆), 143.6 (CH, C₈), 133.8 (*quat* C, C_{ar}), 132.9 (2x CH, C_{ar}), 129.0 (4x CH, C_{ar}), 128.9 (4x CH, C_{ar}), 126.4 (*quat* C, C₅), 90.0 (CH, C_{1'}), 81.5 (CH, C_{4'}), 73.9 (CH, C_{2'}), 70.4 (CH, C_{3'}), 61.2 (CH₂, C_{5'}), 17.8 (CH₃), 17.7 (CH₃), 17.6 (CH₃), 17.6 (CH₃), 17.5 (2x CH₃), 17.4 (CH₃), 17.3 (CH₃), 13.2 (CH, C(CH₃)₂), 12.9 (CH, C(CH₃)₂), 12.7 (CH, C(CH₃)₂), 12.6 (CH, C(CH₃)₂). **HRMS (ESI⁺)** calcd for C₃₆H₄₈N₅O₇Si₂, 718,3087 [M + H]⁺; found, 718,3086. The spectroscopic data are in accordance with those reported in literature (**CAS** # 126775-22-2).

2'-O-Allyl-(N,N-dibenzoyl)-3',5'-O-[1,1,3,3-tetrakis(1-methylethyl)-1,3-disiloxanediyl]adenosine (52).



To a suspension of tris(dibenzylideneacetone)dipalladium (0) (60 mg, 0.065 mmol, 1 mol%) and 1,4-bis(diphenylphosphine)butane (106 mg, 0.25 mmol, 4 mol%) in dry THF (50 mL) under argon atmosphere, was added a solution of compound **51** (4.5 g, 6.3 mmol, 1.0 eq.) and allyl ethyl carbonate (1.7 mL, 12.6 mmol, 2.0 eq.) in dry THF (15 mL) and the mixture was heated to reflux for 30 minutes. The reaction mixture was cooled down to room temperature and concentrated in *vacuo*. The crude residue was purified by flash-column chromatography (silica gel, PE/EtOAc, 4:1) to give compound **52** (4.1 g, 5.4 mmol) as a white foam in 86% yield. **R_f** = 0.68 (silica, PE/EtOAc, 1:1). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)**: δ 8.62 (s, 1H, H₂), 8.28 (s, 1H, H₈), 7.85 (d, ³J = 7.6 Hz, 4H, H_{ar}), 7.48 (t, ³J = 7.6 Hz, 2H, H_{ar}), 7.35 (t, ³J = 7.6 Hz, 4H, H_{ar}), 6.05 (s, 1H, H_{1'}), 5.94 (ddt, ³J = 5.5 Hz, ³J_{cis} = 10.3 Hz, ³J_{trans} = 17.2 Hz, 1H, CH₂=CH-CH₂-O), 5.33 (ddd, ⁴J = 1.6 Hz, J_{gem} = 3.0 Hz, ³J_{trans} = 17.2 Hz, 1H, CH₂=CH-CH₂-O), 5.19 (ddd, ⁴J = 1.6 Hz, J_{gem} = 3.0 Hz, ³J_{cis} = 10.3 Hz, 1H, CH₂=CH-CH₂-O), 4.78 (dd, ³J = 4.8 Hz, ³J = 9.2 Hz, 1H, H_{3'}), 4.48 (dd, ³J = 5.5 Hz, ²J_{gem} = 13.0 Hz, 1H, CH₂=CH-CH₂-O), 4.34 (dd, ³J = 4.8 Hz, ³J = 8.0 Hz, 1H, H_{2'}), 4.29 (dd, ³J = 5.5 Hz, ²J_{gem} = 13.0 Hz, 1H, CH₂=CH-CH₂-O), 4.22-4.14 (m, 2H, H_{4'}, H_{5'a}), 4.03 (dd, ³J = 2.6 Hz, ²J = 13.5 Hz, 1H, H_{5'b}), 1.12-1.00 (m, 28H, H_{TIPDS}). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)**: δ 172.3 (2x quat C, CO), 152.2 (CH, C₂), 152.2 (quat C, C₄), 151.8 (quat C, C₆), 143.5 (CH, C₈), 134.2 (CH, CH₂=CH-CH₂-O), 134.1 (quat C, C_{ar}), 132.9 (2x CH, C_{ar}), 129.5 (4x CH, C_{ar}), 128.7 (4x CH, C_{ar}), 128.3 (quat C, C₅), 117.6 (CH₂, CH₂=CH-CH₂-O), 89.1 (CH, C_{1'}), 81.6 (CH, C_{4'}), 80.9 (CH, C_{2'}), 72.1 (CH₂, CH₂=CH-CH₂-O), 69.7 (CH, C_{3'}), 59.8 (CH₂, C_{5'}), 17.4 (CH₃), 17.3 (CH₃), 17.3 (2x CH₃), 17.2 (CH₃), 17.1 (CH₃), 17.0 (CH₃), 16.9 (CH₃), 13.4 (CH, C(CH₃)₂), 13.0 (CH, C(CH₃)₂), 12.8 (CH, C(CH₃)₂), 12.7 (CH, C(CH₃)₂). **HRMS (ESI⁺)** calcd for C₃₉H₅₂N₅O₇Si₂, 758,3400 [M + H]⁺; found, 758,3402. The spectroscopic data are in accordance with those reported in literature (**CAS # 126775-28-8**).

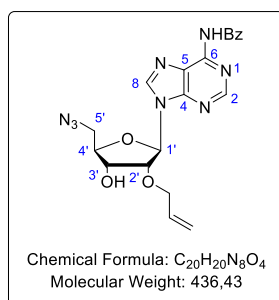
2'-O-Allyl-(N,N-dibenzoyl)-adenosine (53).



To a solution of compound **52** (500 mg, 0.66 mmol, 1.0 eq.) in THF (6 mL, c = 0.13 M) and acetic acid (0.32 mL, 20% volume of the TBAF solution) cooled at 0° C, was added tetrabutylammonium fluoride (1.0 M in THF, 1.6 mL, 1.6 mmol, 2.4 eq.). The resulting mixture was stirred for 2.5 hours at room temperature and

concentrated in *vacuo*. The residue was diluted in EtOAc and the organic layer was washed with a sat. aq. solution of NaHCO₃ and brine. The organic phase was dried over MgSO₄, and volatiles were evaporated under reduced pressure. The crude residue was then purified by flash-column chromatography (silica gel, PE/EtOAc, 1:9) to give compound **53** (221 mg, 0.43 mmol) as a white foam in 65% yield. *R*_f = 0.68 (silica, PE/EtOAc, 1:1). **¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 8.86 (s, 1H, H₈), 8.72 (s, 1H, H₂), 7.79 (d, ³*J* = 7.9 Hz, 4H, H_{ar}), 7.60 (t, ³*J* = 7.9 Hz, 2H, H_{ar}), 7.47 (t, ³*J* = 7.9 Hz, 4H, H_{ar}), 6.16 (s, 1H, H_{1'}), 5.75 (ddt, ³*J* = 5.5 Hz, ³*J*_{cis} = 10.3 Hz, ³*J*_{trans} = 17.2 Hz, 1H, CH₂=CH-CH₂-O), 5.32 (d, ³*J* = 5.3 Hz, 1H, C_{3'}-OH), 5.10 (t, ³*J* = 5.2 Hz, 1H, C_{5'}-OH), 5.06 (ddd, ⁴*J* = 1.6 Hz, *J*_{gem} = 3.0 Hz, ³*J*_{trans} = 17.2 Hz, 1H, CH₂=CH-CH₂-O), 4.98 (ddd, ⁴*J* = 1.6 Hz, *J*_{gem} = 3.0 Hz, ³*J*_{cis} = 10.3 Hz, 1H, CH₂=CH-CH₂-O), 4.53 (t, ³*J* = 5.2 Hz, 1H, H_{2'}), 4.34 (dd, ³*J* = 5.3 Hz, ³*J* = 9.2 Hz, 1H, H_{3'}), 4.14 (ddt, ⁴*J* = 1.6 Hz, ³*J* = 5.5 Hz, ²*J*_{gem} = 13.0 Hz, 1H, CH₂=CH-CH₂-O), 4.04-3.97 (m, 2H, H_{4'}, CH₂=CH-CH₂-O), 3.69 (ddd, 1H, ³*J* = 4.4 Hz, ³*J* = 5.2 Hz, ²*J* = 12.0 Hz, H_{5'a}), 3.69 (ddd, 1H, ³*J* = 4.4 Hz, ³*J* = 5.2 Hz, ²*J* = 12.0 Hz, H_{5'b}). **¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 172.5 (2x quat C, CO), 153.1 (quat C, C₄), 152.4 (CH, C₂), 151.5 (quat C, C₆), 145.9 (CH, C₈), 135.1 (CH, CH₂=CH-CH₂-O), 133.9 (quat C, C_{ar}), 133.9 (2x CH, C_{ar}), 129.5 (4x CH, C_{ar}), 129.5 (4x CH, C_{ar}), 127.7 (quat C, C₅), 117.3 (CH₂, CH₂=CH-CH₂-O), 86.8 (CH, C_{1'}), 86.6 (CH, C_{4'}), 81.0 (CH, C_{2'}), 70.8 (CH₂, CH₂=CH-CH₂-O), 69.3 (CH, C_{3'}), 61.5 (CH₂, C_{5'}). HRMS (ESI⁺) calcd for C₂₇H₂₆N₅O₆, 516,1878 [M + H]⁺; found, 516,1879. The spectroscopic data are in accordance with those reported in literature (CAS # 649719-89-1).

2'-*O*-Allyl-5'-azido-5'-deoxy-(*N*-benzoyl)-adenosine (**54**).



Procedure I - leading to the 2'-allyl-5'-azido-5'-deoxy-(*N,N*-dibenzoyl)-adenosine :

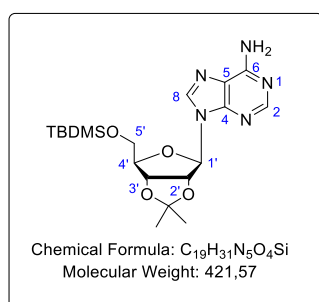
To a solution of compound **53** (300 mg, 0.58 mmol, 1.0 eq.) in dry pyridine (5 mL) at 0°C, under argon atmosphere, TsCl (122 mg, 0.64 mmol, 1.1 eq) was added. The reaction was stirred at room temperature for 10 h. After total conversion of starting material, the reaction mixture was stopped and concentrated to dryness *in vacuo* with co-evaporation with toluene and once with cyclohexane. The resulting residue was directly engaged in the substitution step : DMF (5 mL) was added under inert atmosphere, followed by TBAI (8.6 mg, 0.023 mmol, 4 mol%) and sodium azide (151 mg, 2.32 mmol, 4.0 eq.). The obtained suspension was heated at 80 °C for 1 hour. Reaction was quenched by the addition of a sat. aq. solution of NaHCO₃ (10 mL). Aqueous layer was extracted with EtOAc, washed two times with water (5 mL) and brine. Organic layer was dried over MgSO₄ and then concentrated under reduced. The obtained crude material was purified by flash-column chromatography (silica gel, PE/EtOAc, 9:1) to give the desired compound (172 mg, 0.32 mmol) as a white foam in 55% yield, over the two steps. *R*_f = 0.40 (silica, PE/EtOAc, 9:1). NMR spectra are close to those of compound **54** (see below).

Procedure II - leading to the 2'-allyl-5'-azido-5'-deoxy-(N-benzoyl)-adenosine (53) :

To a solution of compound **53** (600 mg, 1.16 mmol, 1.0 eq.) in dry DMF (5 mL), were added triphenylphosphine (435 mg, 1.66 mmol, 1.43 eq.), carbon tetrabromide (577 mg, 1.74 mmol, 1.5 eq.) and sodium azide (226 mg, 3.48 mmol, 3.0 eq.). The resulting mixture was stirred for 3 hours at room temperature and concentrated in *vacuo*. The residue was diluted in EtOAc (25 mL), washed with water (3x 5 mL), dried over MgSO₄, filtered, and concentrated in *vacuo*. The crude residue was purified by flash-column chromatography (silica gel, CH₂Cl₂/MeOH, 98:2) to give compound **53** (345 mg, 1.16 mmol) as a white foam in 68% yield. **R_f**= 0.31 (silica, CH₂Cl₂/MeOH, 95:5). **IR (cm⁻¹)**: 3455 (νOH), 2095 (νN₃), 1645 (νCO). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)**: δ 9.30 (s, 1H, NH), 8.77 (s, 1H, H₂), 8.29 (s, 1H, H₈), 8.01 (d, ³J = 7.5 Hz, 2H, H_{ar}), 7.58 (t, ³J = 7.5 Hz, 1H, H_{ar}), 7.49 (t, ³J = 7.5 Hz, 2H, H_{ar}), 6.16 (d, ³J = 3.2 Hz, 1H, H_{1'}), 5.81 (ddt, ³J = 5.5 Hz, ³J_{cis} = 10.4 Hz, ³J_{trans} = 17.2 Hz, 1H, CH₂=CH-CH₂-O), 5.25 (ddd, ⁴J = 1.1 Hz, J_{gem} = 2.5 Hz, ³J_{trans} = 17.2 Hz, 1H, CH₂=CH-CH₂-O), 5.20 (ddd, ⁴J = 1.1 Hz, J_{gem} = 2.5 Hz, ³J_{cis} = 10.4 Hz, 1H, CH₂=CH-CH₂-O), 4.54 (dd, ³J = 3.2 Hz, ³J = 5.8 Hz, 1H, H_{2'}), 4.42 (q, ³J = 5.8 Hz, ³J = 9.2 Hz, 1H, H_{3'}), 4.31-4.15 (m, 3H, CH₂=CH-CH₂-O, H_{4'}), 3.77 (dd, 1H, ³J = 3.5 Hz, ²J = 13.3 Hz, H_{5'a}), 3.69 (dd, 1H, ³J = 4.4 Hz, ²J = 13.3 Hz, H_{5'b}). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)**: δ 164.8 (C, CO), 152.8 (CH, C₂), 151.3 (quat C, C₄), 149.7 (quat C, C₆), 141.6 (CH, C₈), 133.6 (quat C, C_{ar}), 133.0 (CH, CH₂=CH-CH₂-O), 132.8 (CH, C_{ar}), 128.8 (2x CH, C_{ar}), 127.9 (2x CH, C_{ar}), 123.6 (quat C, C₅), 119.2 (CH₂, CH₂=CH-CH₂-O), 87.6 (CH, C_{1'}), 82.9 (CH, C_{4'}), 80.5 (CH, C_{2'}), 72.1 (CH₂, CH₂=CH-CH₂-O), 70.0 (CH, C_{3'}), 51.6 (CH₂, C_{5'}). **HRMS (ESI⁺)** calcd for C₂₀H₂₁N₅O₄, 437,1680 [M + H]⁺; found, 437,1680.

6) Synthesis of precursor (63)

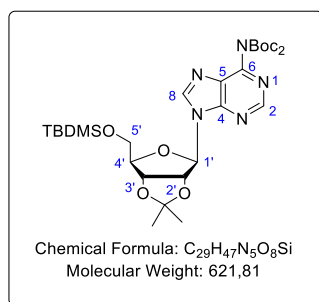
5'-O-(tert-Butyldimethylsilyl)-2',3'-O-isopropylidene adenosine (55).



To a suspension of adenosine (5.0 g, 18.7 mmol, 1.0 eq.) in dry acetone (1 L) with ethyl orthoformate (19.4 mL, 116.64 mmol, 6.2 eq.) was added p-TsOH monohydrate (35.6 g, 187.0 mmol, 10.0 eq.) in one portion. The mixture was stirred under an atmosphere of N₂ and turned to a yellow solution upon dissolution. After 8 hours at room temperature, sat. aq. NaHCO₃ solution (500 mL) was added to the above mixture with stirring over 5 minutes. The volatiles were removed under reduced pressure and the residue was dried. The resulting solid was dissolved in acetone, stirred for 1 hour, and filtered. The volatiles were removed, and the crude product was purified through a plug of silica (EtOAc 100%). After dried under high vacuum, a white solid (5.6 g, 18.33 mmol) was obtained in a quantitative yield. The obtained product was solubilized in anhydrous pyridine (90 mL) under an inert and dried atmosphere. After cooling at 0 °C, *tert*-butyldimethylsilyl chloride (3.31 g, 22.0 mmol, 1.2 eq.) was added portionwise. This resulting mixture was allowed to stir for 4 hours at room temperature. Then solvent was removed under reduced pressure and the residue was diluted in EtOAc (200 mL). The organic layer was washed

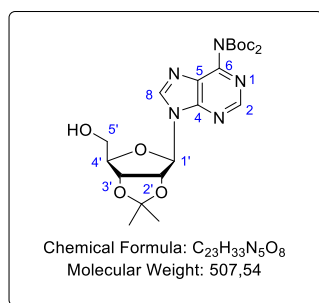
two times with aq. HCl (1 M) and water, dried over MgSO_4 , and evaporated under reduced pressure. The crude material was purified by flash-column chromatography (silica gel, PE/EtOAc, 1:9). Pure product **55** was recovered as a white solid in 95% yield (7.5 g, 17.76 mmol). **Rf** = 0.18 (silica, PE/EtOAc, 1:9). **^1H NMR (400 MHz, CDCl_3)**: δ 8.36 (s, 1H, H_2), 8.16 (s, 1H, H_8), 6.16 (d, $^3J = 2.5$ Hz, 1H, $\text{H}_{1'}$), 5.62 (br s, 1H, NH), 5.20 (dd, $^3J = 2.5$ Hz, $^3J = 6.1$ Hz, 1H, $\text{H}_{2'}$), 4.91 (dd, $^3J = 2.2$ Hz, $^3J = 6.1$ Hz, 1H, $\text{H}_{3'}$), 4.46 (dd, $^3J = 3.5$ Hz, $^3J = 6.1$ Hz, 1H, $\text{H}_{4'}$), 3.89 (dd, $^3J = 3.5$ Hz, $^2J = 11.4$ Hz, 1H, $\text{H}_{5'a}$), 3.77 (dd, $^3J = 3.5$ Hz, $^2J = 11.4$ Hz, 1H, $\text{H}_{5'b}$), 1.62 (s, 3H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 1.40 (s, 3H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 0.81 (s, 9H, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 0.03 (s, 6H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$). **^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3)**: δ 159.2 (quat C, C_6), 154.9 (CH, C_2), 154.5 (quat C, C_4), 145.9 (CH, C_8), 125.3 (quat C, C_5), 119.7 (quat C, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 90.8 (CH, $\text{C}_{1'}$), 87.05 (CH, $\text{C}_{4'}$), 84.0 (CH, $\text{C}_{2'}$), 69.2 (CH, $\text{C}_{3'}$), 62.2 (CH_2 , $\text{C}_{5'}$), 31.4 (3x CH_3 , $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 25.9 (CH_3 , $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 23.9 (CH_3 , $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 18.3 (quat C, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 0.04 (2x CH_3 , $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$). **LC-MS (ESI $^+$)** m/z = 422.6 $[\text{M}+\text{H}]^+$. The spectroscopic data are in accordance with those reported in literature (CAS # 139301-93-2).

***N,N*-Bis[(1,1-dimethylethoxy)carbonyl]-5'-*O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-2',3'-*O*-isopropylidene adenosine (**56**).**



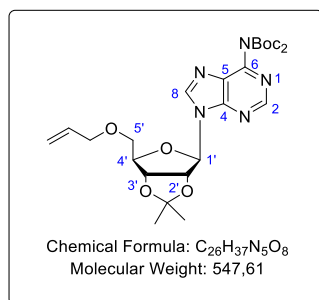
To a solution of **55** (2.5 g, 5.93 mmol, 1.0 eq.) in dry DMF (40 mL) at 0 °C, was added a 60% emulsion of sodium hydride (593 mg, 14.82 mmol, 2.5 eq.) in mineral oil and mixture was stirred for 10 min. Di-*tert*-butyldicarbonate (3.88 g, 17.79 mmol, 3.0 eq.) was then added and mixture was stirred for 10 hours at room temperature. After concentration under high vacuum, the orange oil was diluted in EtOAc and washed four times with sat. aq. NaHCO_3 (20 mL) and brine. Organic layer was dried over MgSO_4 and concentrated under reduced pressure. Crude was purified by flash chromatography (silica gel, CH_2Cl_2 , 100% $\rightarrow$ $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 98:2) to afford compound **56** (3.61 g, 5.81 mmol) as a yellowish oil in 98% yield. **Rf** = 0.55 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 95:5). **^1H NMR (400 MHz, CDCl_3)**: δ 8.84 (s, 1H, H_2), 8.31 (s, 1H, H_8), 6.23 (d, $^3J = 2.5$ Hz, 1H, $\text{H}_{1'}$), 5.20 (dd, $^3J = 2.5$ Hz, $^3J = 6.1$ Hz, 1H, $\text{H}_{2'}$), 4.92 (dd, $^3J = 2.2$ Hz, $^3J = 6.1$ Hz, 1H, $\text{H}_{3'}$), 4.42 (dd, $^3J = 3.7$ Hz, $^3J = 6.3$ Hz, 1H, $\text{H}_{4'}$), 3.87 (dd, $^3J = 3.7$ Hz, $^2J = 11.3$ Hz, 1H, $\text{H}_{5'a}$), 3.76 (dd, $^3J = 3.7$ Hz, $^2J = 11.3$ Hz, 1H, $\text{H}_{5'b}$), 1.62 (s, 3H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 1.41 (s, 18H, $\text{CH}_3\text{-Boc}$), 1.39 (s, 3H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 0.96 (s, 9H, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 0.12 (s, 6H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$). **^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3)**: δ 158.1 (2x quat C, CO), 157.7 (CH, C_2), 155.8 (quat C, C_4), 151.8 (quat C, C_6), 148.8 (CH, C_8), 134.9 (quat C, C_5), 119.8 (quat C, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 89.8 (CH, $\text{C}_{1'}$), 87.02 (CH, $\text{C}_{4'}$), 83.8 (CH, $\text{C}_{2'}$), 81.2 (2x quat C, $\text{C}(\text{CH}_3)_3\text{-Boc}$), 68.8 (CH, $\text{C}_{3'}$), 61.8 (CH_2 , $\text{C}_{5'}$), 33.2 (3x CH_3 , Boc), 32.9 (3x CH_3 , Boc), 31.4 (CH_3 , $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 30.9 (CH_3 , $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 23.9 (CH_3 , $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 19.1 (quat C, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), -5.3 (2x CH_3 , $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$). **LC-MS (ESI $^+$)** m/z = 622.7 $[\text{M}+\text{H}]^+$. The spectroscopic data are in accordance with those reported in literature (CAS # 873556-60-6).

***N,N*-Bis(*tert*-butoxycarbonyl)-2',3'-*O*-isopropylidene adenosine (**57**).**



To a solution of **56** (6.53 g, 10.5 mmol, 1.0 eq.) in THF (80 mL) was added TBAF (1.0 M solution in THF, 12.6 mL, 12.7 mmol, 1.2 eq.) at 0 °C. The resulting mixture was stirred at room temperature for 3 hours before being evaporated to give an orange oil, which was purified by flash-column chromatography (silica gel, CH₂Cl₂ 100% → CH₂Cl₂, MeOH 98:2) to give **57** (4.05 g, 7.98 mmol) as a yellow oil in 76% yield. **R_f** = 0.10 (silica, CH₂Cl₂, MeOH 98:2). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)**: δ 8.84 (s, 1H, H₂), 8.12 (s, 1H, H₈), 6.96 (d, ³*J* = 2.5 Hz, 1H, H_{1'}), 5.20 (dd, ³*J* = 2.5 Hz, ³*J* = 6.1 Hz, 1H, H_{2'}), 5.11 (dd, ³*J* = 2.2 Hz, ³*J* = 6.1 Hz, 1H, H_{3'}), 4.53 (s, 1H, OH), 3.97 (dd, ³*J* = 3.7 Hz, ³*J* = 6.3 Hz, 1H, H_{4'}), 3.97 (dd, ³*J* = 3.7 Hz, ²*J* = 11.3 Hz, 1H, H_{5'a}), 3.80 (dd, ³*J* = 3.7 Hz, ²*J* = 11.3 Hz, 1H_{5'b}), 1.64 (s, 3H, C(CH₃)₂), 1.46 (s, 18H, CH₃-Boc), 1.38 (s, 3H, C(CH₃)₂). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)**: δ 158.1 (2x quat C, CO), 157.7 (CH, C₂), 155.8 (quat C, C₄), 151.8 (quat C, C₆), 148.8 (CH, C₈), 134.9 (quat C, C₅), 119.8 (quat C, C(CH₃)₂), 89.8 (CH, C_{1'}), 87.0 (CH, C_{4'}), 83.8 (CH, C_{2'}), 81.2 (2x quat C, C(CH₃)₃-Boc), 69.0 (CH, C_{3'}), 62.5 (CH₂, C_{5'}), 28.0 (6x CH₃, Boc), 27.8 (CH₃, C(CH₃)₂), 25.4 (CH₃, C(CH₃)₂). **LC-MS (ESI⁺)** *m/z* = 509.5 [M+H]⁺. The spectroscopic data are in accordance with those reported in literature (**CAS #** 1152172-19-4).

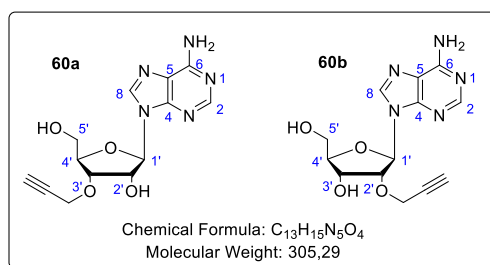
5'-*O*-Allyl-*N,N*-bis(*tert*-butoxycarbonyl)-2',3'-*O*-isopropylidene adenosine (58**).**



Under a dried and inert atmosphere (argon), a 60% emulsion of sodium hydride (485 mg, 12.12 mmol, 1.5 eq.) in mineral oil was added in three portions to a mixture of compound **57** (4.10 g, 8.08 mmol, 1.0 eq.) in anhydrous THF (120 mL) stirred at 0 °C. After 15 min at this temperature, allyl bromide (1.0 mL, 11.49 mmol, 1.4 eq.) was added dropwise, and the resulting mixture was then stirred at room temperature for 4 hours. The reaction was quenched by adding EtOH (5 mL) and solvents were evaporated to give a grey viscous oil which was then diluted in EtOAc. After an aqueous workup with sat. aq. NaHCO₃, the organic layer was dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure, a yellow sirup was obtained and purified by flash-column chromatography (silica gel, PE/EtOAc, 1:1) to afford **58** as a yellowish oil (4.01 g, 7.32 mmol) in 91% yield. **R_f** = 0.70 (silica, EP/EtOAc, 9:1). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)**: δ 8.71 (s, 1H, H₂), 8.15 (s, 1H, H₈), 6.20 (d, ³*J* = 2.5 Hz, 1H, H_{1'}), 5.94 (ddt, ³*J* = 5.5 Hz, ³*J*_{cis} = 10.4 Hz, ³*J*_{trans} = 17.2 Hz, 1H, CH₂=CH-CH₂-O), 5.35 (dd, ³*J* = 2.5 Hz, ³*J* = 6.1 Hz, 1H, H_{2'}), 5.25 (ddd, ⁴*J* = 1.1 Hz, *J*_{gem} = 2.5 Hz, ³*J*_{trans} = 17.2 Hz, 1H, CH₂=CH-CH₂-O), 5.20 (ddd, ⁴*J* = 1.1

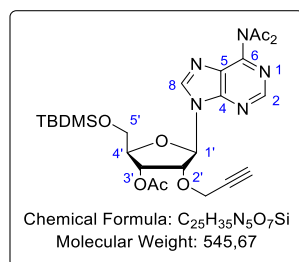
Hz, $J_{\text{gem}} = 2.5$ Hz, $^3J_{\text{cis}} = 10.4$ Hz, 1H, $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{O}$), 4.65-4.45 (m, 3H, $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{O}$, $\text{H}_{3'}$), 4.31 (dd, $^3J = 3.7$ Hz, $^2J = 11.3$ Hz, 1H, $\text{H}_{5'a}$), 4.20 (dd, $^3J = 3.7$ Hz, $^2J = 11.3$ Hz, 1H, $\text{H}_{5'b}$), 1.64 (s, 3H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 1.46 (s, 18H, CH_3-Boc), 1.38 (s, 3H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$). **^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3):** δ 162.1 (2x quat C, CO), 157.5 (CH, C_2), 155.5 (quat C, C_4), 151.8 (quat C, C_6), 148.8 (CH, C_8), 134.9 (quat C, C_5), 133.0 (CH, $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{O}$), 119.2 (CH_2 , $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{O}$), 119.8 (quat C, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 89.8 (CH, $\text{C}_{1'}$), 87.5 (CH, $\text{C}_{4'}$), 84.1 (CH, $\text{C}_{2'}$), 81.2 (2x quat C, $\text{C}(\text{CH}_3)_3-\text{Boc}$), 72.1 (CH_2 , $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{O}$), 69.01 (CH, $\text{C}_{3'}$), 62.5 (CH_2 , $\text{C}_{5'}$), 28.0 (6x CH_3 , Boc), 29.0 (CH_3 , $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 25.2 (CH_3 , $\text{C}(\text{CH}_3)_2$). **HRMS (ESI⁺)** calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{38}\text{N}_5\text{O}_8$, 548,2715 $[\text{M} + \text{H}]^+$; found, 548,2715.

3'-O-(1-Propyn-3-yl)adenosine (60a) & 2'-O-(1-propyn-3-yl)adenosine (60b).



Adenosine (5.0 g, 18.72 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in hot (60 °C) anhydrous DMF (200 mL) under an inert atmosphere. The solution was cooled down to 0 °C, and NaH (60% dispersion in mineral oil, 1.0 g, 25.0 mmol, 1.3 eq.) was added in three portions, followed by the addition of TBAI (1.5 g, 4.06 mmol, 0.22 eq.) and propargyl bromide (2.12 mL, 20.92 mmol, 1.1 eq.). The reaction mixture was allowed to stir for two days at 55 °C, and absorbed on silica gel. Flash-chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 93:7), gave an inseparable mixture of 2'-O- and 3'-O-propargylated products (in a 1:1 ratio) as a pale solid (4.74 g, 15.54 mmol) in 83% yield. **Rf** = 0.14 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 9:1). **(60a) :** **^1H NMR (250 MHz, $\text{DMSO}-d_6$):** δ 8.36 (s, 1H, H_2), 8.13 (s, 1H, H_8), 7.35 (br s, 2H, NH_2), 6.02 (d, $^3J = 6.4$ Hz, $\text{H}_{1'}$), 5.52-5.48 (m, 1H, $\text{H}_{3'}$), 5.12 (d, $^3J = 4.8$ Hz, 1H, OH), 4.71-4.68 (m, 1H, $\text{H}_{2'}$), 4.38-4.35 (m, 1H, $\text{H}_{3'}$), 4.28-4.22 (m, 2H, $\text{HCC}-\text{CH}_2-\text{O}$), 4.06-4.01 (m, 1H, $\text{H}_{4'}$), 3.69-3.52 (m, 2H, $\text{H}_{5'a}-\text{H}_{5'b}$), 3.32 (t, $^3J = 2.4$ Hz, 1H, $\text{HCC}-\text{CH}_2-\text{O}$). **(60b) :** **^1H NMR (250 MHz, $\text{DMSO}-d_6$):** δ 8.36 (s, 1H, H_2), 8.13 (s, 1H, H_8), 7.35 (br s, 2H, NH_2), 6.02 (d, $^3J = 6.4$ Hz, $\text{H}_{1'}$), 5.52-5.48 (m, 1H, $\text{H}_{3'}$), 5.34 (d, $^3J = 4.8$ Hz, 1H, OH), 4.71-4.68 (m, 1H, $\text{H}_{2'}$), 4.38-4.35 (m, 1H, $\text{H}_{3'}$), 4.28-4.22 (m, 2H, $\text{HCC}-\text{CH}_2-\text{O}$), 4.06-4.01 (m, 1H, $\text{H}_{4'}$), 3.69-3.52 (m, 2H, $\text{H}_{5'a}-\text{H}_{5'b}$), 3.32 (t, $^3J = 2.4$ Hz, 1H, $\text{HCC}-\text{CH}_2-\text{O}$). **HRMS (ESI⁺)** calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_4$, 306.1202 $[\text{M} + \text{H}]^+$; found, 306.1198. The spectroscopic data are in accordance with those reported in literature (CAS # 151390-97-5).

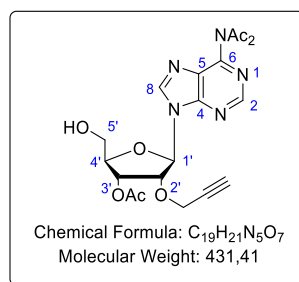
N,N-Diacetyl-3'-O-acetyl-5'-O-(tert-butyldimethylsilyl)-2'-O-(1-propyn-3-yl)-adenosine (61)



Mixture of compound **60a-b** (1.3 g, 4.26 mmol, 1.0 eq.) was solubilized in pyridine (20 mL) under an inert atmosphere at 0 °C, and *tert*-butyldimethylsilyl chloride (963 mg, 0.639 mmol, 1.5 eq.) was added. This was stirred at room temperature for 4 hours and volatiles were removed under reduced pressure. The residue was purified by flash-column chromatography (silica gel, PE/EtOAc, 1:1, then gradient to PE/EtOAc, 1:4). Each isomer was separated and the 2'-*O*-propargylated (785 mg, 1.87 mmol, 44% yield) was directly engaged in the acetylation step.

This intermediate (500 mg, 1.19 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in DCM (6 mL) and pyridine (1.2 mL, 14.87 mmol, 12.5 eq.) under an inert atmosphere and cooled at 0 °C. Acetyl chloride (0.51 mL, 7.14 mmol, 6.0 equiv) was slowly added, and the mixture was stirred for 6 hours at room temperature. EtOAc (10 mL) was added to the reaction mixture cooled at 0 °C, followed by water (10 mL). Aqueous phase was extracted 3 times with EtOAc, combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO₄, and concentrated under reduced pressure. The crude orange oil was purified by flash-column chromatography (silica gel, PE/EtOAc, 7:3) to give compound **61** (487 mg, 0.89 mmol) as a white foam in 75% yield (and 33% yield over the two steps). *R*_f = 0.46 (silica, PE/EtOAc, 1:1). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)**: δ 8.98 (s, 1H, H₂), 8.53 (s, 1H, H₈), 6.31 (d, ³*J* = 7.0 Hz, 1H, H_{1'}), 5.46 (dd, ³*J* = 1.8 Hz, ³*J* = 5.1 Hz, 1H, H_{3'}), 4.81 (dd, ³*J* = 5.1 Hz, ³*J* = 7.0 Hz, 1H, H_{2'}), 4.37 (q, ³*J* = 2.0 Hz, 1H, H_{4'}), 4.19 (dd, ³*J* = 2.4 Hz, ²*J* = 16.3 Hz, 1H, HCC-CH₂-O-), 4.12 (dd, ³*J* = 2.4 Hz, ²*J* = 16.3 Hz, 1H, HCC-CH₂-O), 3.97 (dd, ³*J* = 2.6 Hz, ²*J* = 11.5 Hz, 1H, H_{5'a}), 3.88 (dd, ³*J* = 2.6 Hz, ²*J* = 11.5 Hz, 1H, H_{5'b}), 2.35 (s, 6H, NAc₂), 2.19 (s, 4H, OAc, HCC-CH₂-O), 0.95 (s, 9H, Si(CH₃)₃), 0.16 (s, 6H, Si(CH₃)₂). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)**: δ 171.8 (2x quat C, CO), 170.2 (quat C, CO), 154.1 (quat C, C₄), 152.9 (CH, C₂), 150.7 (quat C, C₆), 144.1 (CH, C₈), 130.6 (quat C, C₅), 86.0 (CH, C_{1'}), 84.3 (CH, C_{4'}), 80.3 (CH, C_{2'}), 78.2 (quat C, HCC-CH₂), 75.8 (CH, HCC-CH₂), 71.4 (CH, C_{3'}), 63.3 (CH₂, C_{5'}), 58.6 (CH₂, HCC-CH₂), 26.4 (2x CH₃, NAc₂), 26.0 (3x CH₃, Si(CH₃)₃), 20.9 (CH₃, OAc), 18.4 (quat C, Si(CH₃)₃), -5.3 (CH₃, Si(CH₃)₂), -5.5 (CH₃, Si(CH₃)₂). **HRMS (ESI⁺)** calcd for C₂₅H₃₆N₅O₇Si, 546,2379 [M + H]⁺; found, 546,2376.

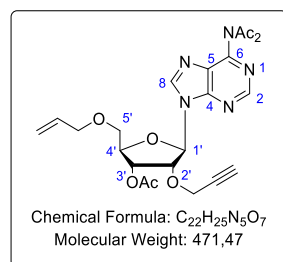
***N,N*-Diacetyl-3'-*O*-acetyl-2'-*O*-(1-propyn-3-yl)-adenosine (**62**)**



To a solution of compound **61** (597 mg, 1.09 mmol, 1.0 eq.) in THF (4 mL, c = 0.27 M) and acetic acid (0.34 mL, 20% volume of the TBAF solution) cooled at 0 °C, was added tetrabutylammonium fluoride (1.0 M in THF, 1.7 mL, 1.7 mmol, 1.5 eq.). The resulting mixture was stirred for 1.5 hours at room temperature and concentrated in *vacuo*. The residue was diluted in EtOAc and the organic layer was washed with a sat. aq. solution of NaHCO₃ and brine. The organic phase was dried over MgSO₄, and volatiles were evaporated under reduced pressure. The crude residue was then purified by flash-column chromatography (silica gel, CH₂Cl₂/MeOH, 98:2) to give compound **62** (334 mg, 0.77 mmol) as a yellow viscous oil in 71% yield. *R*_f = 0.24 (silica, CH₂Cl₂/MeOH, 95:5). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)**: δ 8.98 (s, 1H, H₂), 8.20 (s, 1H, H₈), 5.93 (d, ³*J* = 8.0 Hz, 1H, H_{1'}), 5.71 (dd, ³*J* = 2.2 Hz, ³*J* = 11.8 Hz, 1H, OH), 5.64 (d, ³*J* = 5.2 Hz, 1H, H_{3'}), 5.04 (dd, ³*J* = 5.2 Hz, ³*J* = 8.0

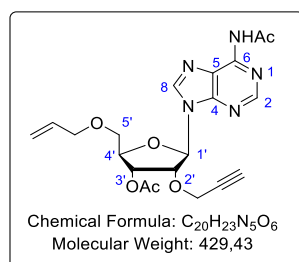
Hz, 1H, H_{2'}), 4.44 (q, ³J = 1.7 Hz, 1H, H_{4'}), 4.09 (dd, ³J = 3.6 Hz, ²J = 17.4 Hz, 1H, HCC-CH₂-O-), 4.05-4.00 (m, 2H, H_{5'a}, HCC-CH₂-O), 3.95 (dd, ³J = 2.2 Hz, ²J = 11.8 Hz, 1H, H_{5'a}), 2.37 (s, 6H, NAc₂), 2.19 (s, 4H, OAc), 1.96 (t, ³J = 2.3 Hz, HCC-CH₂-O). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)**: δ 171.7 (2x quat C, CO), 170.0 (quat C, CO), 152.9 (quat C, C₄), 152.1 (CH, C₂), 151.8 (quat C, C₆), 146.0 (CH, C₈), 132.2 (quat C, C₅), 89.7 (CH, C_{1'}), 86.4 (CH, C_{4'}), 78.5 (CH, C_{2'}), 77.9 (quat C, HCC-CH₂), 75.5 (CH, HCC-CH₂), 72.1 (CH, C_{3'}), 63.0 (CH₂, C_{5'}), 59.1 (CH₂, HCC-CH₂), 26.3 (2x CH₃, NAc₂), 20.8 (CH₃, OAc). **HRMS (ESI⁺)** calcd for C₁₉H₂₂N₅O₇, 432,1514 [M + H]⁺; found, 432,1510.

***N,N*-Diacetyl-3'-*O*-acetyl-5'-*O*-allyl-2'-*O*-(1-propyn-3-yl)-adenosine (63)**



To a suspension of tris(dibenzylideneacetone)dipalladium(0) (7 mg, 7.5 μmol, 1 mol%) and 1,4-bis(diphenylphosphine)butane (13 mg, 0.03 mmol, 4 mol%) in dry THF (5 mL) under argon atmosphere, was added a solution of compound **62** (323 mg, 0.75 mmol, 1.0 eq.) and allyl ethyl carbonate (0.2 mL, 1.5 mmol, 2.0 eq.) in dry THF (2.5 mL) and the mixture was heated at 70 °C for 1 hour. The reaction mixture was cooled down to room temperature and concentrated in *vacuo*. The crude residue was purified by flash-column chromatography (silica gel, PE/EtOAc, 4:1 → PE/EtOAc, 1:4) to give compound **63** (127 mg, 0.27 mmol) as a white foam in 36% yield. **R_f** = 0.22 (silica, PE/EtOAc, 1:1). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)**: δ 8.79 (s, 1H, H₂), 8.22 (s, 1H, H₈), 6.17 (d, ³J = 5.3 Hz, 1H, H_{1'}), 5.88 (ddt, ³J = 5.2 Hz, ³J_{cis} = 11.0 Hz, ³J_{trans} = 17.4 Hz, 1H, CH₂=CH-CH₂-O), 5.43 (t, ³J = 5.3 Hz, 1H, H_{3'}), 5.16 (dd, ³J = 1.0 Hz, ³J_{trans} = 17.4 Hz, 1H, CH₂=CH-CH₂-O), 5.07 (t, ³J = 5.3 Hz, 1H, H_{2'}), 5.03 (dd, ³J = 1.0 Hz, ³J_{trans} = 11.0 Hz, 1H, CH₂=CH-CH₂-O), 4.88 (d, ³J_{trans} = 5.2 Hz, 1H, CH₂=CH-CH₂-O), 4.51-4.42 (m, 2H, H_{4'}, H_{5'a}), 4.38 (dd, ³J = 3.8 Hz, ²J = 11.5 Hz, 1H, H_{5'b}), 4.25 (dd, ³J = 2.2 Hz, ²J = 16.2 Hz, 1H, HCC-CH₂), 4.20 (dd, ³J = 2.2 Hz, ²J = 16.2 Hz, 1H, HCC-CH₂), 2.31 (s, 3H, Ac), 2.24 (t, ³J = 2.2 Hz, HCC-CH₂-O), 2.19 (s, 3H, Ac), 2.14 (s, 3H, Ac). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)**: δ 171.2 (quat C, CO), 170.3 (quat C, CO), 170.1 (quat C, CO), 153.5 (quat C, C₆), 152.8 (quat C, C₄), 152.2 (CH, C₂), 142.3 (CH, C₈), 133.3 (CH, CH₂=CH-CH₂-O), 127.5 (quat C, C₅), 116.9 (CH₂, CH₂=CH-CH₂-O), 87.2 (CH, C_{1'}), 80.5 (CH, C_{4'}), 78.4 (CH, C_{2'}), 77.2 (quat C, HCC-CH₂), 75.7 (CH, HCC-CH₂), 70.7 (CH, C_{3'}), 63.2 (CH₂, C_{5'}), 58.8 (CH₂, HCC-CH₂), 49.3 (CH₂, CH₂=CH-CH₂-O), 24.2 (CH₃, OAc), 20.8 (CH₃, NAc), 20.7 (CH₃, NAc). **HRMS (ESI⁺)** calcd for C₂₂H₂₆N₅O₇, 472,1827 [M + H]⁺; found, 472,1829.

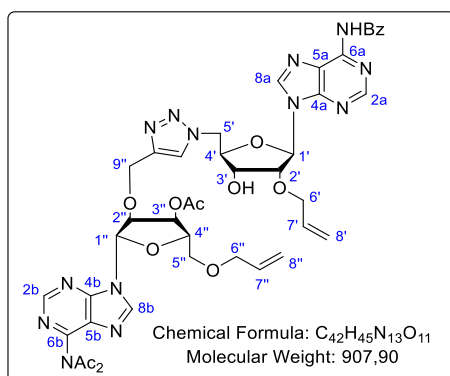
***N*-Acetyl-3'-*O*-acetyl-5'-*O*-allyl-2'-*O*-(1-propyn-3-yl)-adenosine (64)**



The byproduct **64** was obtained from the previous procedure as a white foam (52 mg, 0.12 mmol) in 16% yield. **R_f** = 0.10 (silica, PE/EtOAc, 1:1). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)**: δ 8.76 (s, 1H, H₂), 8.10 (s, 1H, H₈), 6.02–5.83 (m, 3H, H_{1'}, NH, CH₂=CH-CH₂-O), 5.63 (t, ³J = 5.3 Hz, 1H, H_{3'}), 5.15 (dd, ³J = 1.0 Hz, ³J_{trans} = 17.4 Hz, 1H, CH₂=CH-CH₂-O), 5.07 (t, ³J = 5.3 Hz, 1H, H_{2'}), 5.02 (dd, ³J = 1.0 Hz, ³J_{trans} = 11.0 Hz, 1H, CH₂=CH-CH₂-O), 4.91 (t, ³J_{trans} = 8.0 Hz, 2H, CH₂=CH-CH₂-O), 4.40 (m, 1H, H_{4'}), 4.10 (dd, ³J = 2.2 Hz, ²J = 16.2 Hz, 1H, HCC-CH₂), 4.04 (dd, ³J = 2.2 Hz, ²J = 16.2 Hz, 1H, HCC-CH₂), 3.99 (dd, ³J = 3.8 Hz, ²J = 11.5 Hz, 1H, H_{5'b}), 3.82 (dd, ³J = 3.8 Hz, ²J = 11.5 Hz, 1H, H_{5'b}), 2.33 (s, 3H, Ac), 2.19 (s, 3H, Ac), 1.87 (t, ³J = 2.2 Hz, HCC-CH₂-O). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)**: δ 171.3 (quat C, CO), 170.0 (quat C, CO), 154.1 (quat C, C₆), 151.8 (quat C, C₄), 151.3 (CH, C₂), 143.8 (CH, C₈), 133.3 (CH, CH₂=CH-CH₂-O), 128.4 (quat C, C₅), 116.9 (CH₂, CH₂=CH-CH₂-O), 89.5 (CH, C_{1'}), 86.3 (CH, C_{4'}), 78.4 (CH, C_{2'}), 77.2 (quat C, HCC-CH₂), 74.9 (CH, HCC-CH₂), 72.1 (CH, C_{3'}), 63.0 (CH₂, C_{5'}), 58.9 (CH₂, HCC-CH₂), 49.2 (CH₂, CH₂=CH-CH₂-O), 24.3 (CH₃, OAc), 20.9 (CH₃, NAc). **HRMS (ESI⁺)** calcd for C₂₀H₂₄N₅O₆, 430,4410 [M + H]⁺; found, 430,4411.

7) Synthesis of macrocycle intermediate (65)

(2R,3R,4R,5R)-5-(6-(N-acetylacetamido)-9H-purin-9-yl)-4-((1-(((2R,3R,4R,5R)-4-(allyloxy)-5-(6-benzamido-9H-purin-9-yl)-3-hydroxytetrahydrofuran-2-yl)methyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)-2-(allyloxy)methyl)tetrahydrofuran-3-yl acetate (65a)



The azido derivative **54** (144 mg, 0.28 mmol, 1.05 eq.) and the analogue **33** (114 mg, 0.27 mmol, 1.0 eq.) were suspended in EtOH/H₂O (1:1, 3.0 mL) under nitrogen at room temperature. Subsequently, sodium ascorbate (32 mg, 0.16 mmol, 0.60 eq.) and a solution of copper(II) sulfate pentahydrate (20 mg, 0.08 mmol, 0.30 eq.) in water (0.5 mL) was added. The reaction mixture was stirred at 80 °C for 4 minutes under microwave radiation (60 W). Volatiles were evaporated and the residue was purified by flash-column chromatography (silica gel, CH₂Cl₂/MeOH, 98:2) to provide **65** as a foam (201 mg, 0.22 mmol) in 82% yield. **R_f** = 0.35 (silica, CH₂Cl₂/MeOH = 95:5). **¹H NMR (700 MHz, CDCl₃)**: δ 9.23 (br s, 1H, NH), 8.74 (s, 1H, H_{2a}), 8.73 (s, 1H, H_{2b}), 8.15 (s, 1H, H_{8b}), 8.06 (d, ³J = 7.5 Hz, 2H, H_{ar}), 7.92 (s, 1H, H_{8a}), 7.61 (t, ³J = 7.5 Hz, 1H, H_{ar}), 7.53 (t, ³J = 7.5 Hz, 2H, H_{ar}), 7.36 (s, 1H, H_{triazole}), 6.19 (d, ³J = 3.2 Hz, 1H, H_{1''}), 6.07 (d, ³J = 3.6 Hz, 1H, H_{1'}), 5.88 (ddt, ³J = 5.2 Hz, ³J_{cis} = 11.0 Hz, ³J_{trans} = 17.3 Hz, 1H, H_{7''}), 5.78 (ddt, ³J = 5.5 Hz, ³J_{cis} = 10.4 Hz, ³J_{trans} = 17.2 Hz, 1H, H_{7'}), 5.36 (t, ³J = 4.8 Hz, 1H, H_{3''}), 5.17 (ddd, ⁴J = 1.1 Hz, ²J = 3.0 Hz, ³J_{trans} = 17.4 Hz, 2H, H_{8a''}, H_{8a'}), 5.13 (ddd, ⁴J = 1.1 Hz, ²J = 2.5 Hz, ³J_{cis} = 10.4 Hz, 1H, H_{8b'}), 5.06–5.03 (m, 2H, H_{2''}, H_{8b''}), 4.81 (dd, ³J = 0.8 Hz, ²J = 5.3 Hz, 2H, H_{6''}), 4.78 (dd, ³J = 3.6 Hz, ²J = 14.6 Hz, 1H, H_{5a'}), 4.73 (dd, ³J = 6.2 Hz, ²J = 14.6 Hz, 1H, H_{5b'}), 4.66 (s, 2H, H_{9''}), 4.54 (dd, ³J = 3.6 Hz, ²J = 5.5 Hz, 1H, H_{2'}), 4.50 (t, ³J = 5.5 Hz, 1H, H_{3'}), 4.43 (dd, ³J = 4.1 Hz, ²J = 8.0 Hz, 1H, H_{4''}), 4.39 (dd, ³J = 3.6 Hz, ²J = 12.4 Hz, 1H, H_{5a''}), 4.36 (m, 1H, H_{4'}), 4.33 (dd, ³J = 4.5 Hz, ²J = 12.4 Hz, 1H, H_{5b''}), 4.16 (dt, ³J = 1.1 Hz, ²J = 5.8 Hz, 2H, H_{6'}), 3.21 (br s, 1H, OH), 2.30 (s, 3H, Ac), 2.11 (s, 3H, Ac), 2.08 (s, 3H, Ac). **¹³C NMR (175 MHz,**

CDCl₃: δ 171.5 (quat C, CO_{Ac}), 170.5 (quat C, CO_{Ac}), 170.2 (quat C, CO_{Ac}), 164.8 (C, CO_{Bz}), 153.3 (quat C, C_{6b}), 152.8 (CH, C_{2a}), 152.6 (quat C, C_{4b}), 152.0 (CH, C_{2b}), 151.3 (quat C, C_{4a}), 149.9 (quat C, C_{6a}), 143.6 (quat C, C_{triazole}), 142.5 (CH, C_{8b}), 142.0 (CH, C_{8a}), 133.4 (quat C, C_{ar}), 133.2 (CH, C_{7''}), 133.0 (CH, C_{ar}), 132.9 (CH, C_{7'}), 128.9 (2x CH, C_{ar}), 128.0 (2x CH, C_{ar}), 127.6 (quat C, C_{5b}), 124.6 (CH, C_{triazole}), 123.8 (quat C, C_{5a}), 119.2 (CH₂, C_{8'}), 117.1 (CH₂, C_{8''}), 88.2 (CH, C_{1'}), 87.3 (CH, C_{1''}), 82.4 (CH, C_{4'}), 80.3 (CH, C_{4''}), 79.5 (CH, C_{2'}), 78.1 (CH, C_{2''}), 72.3 (CH₂, C_{6'}), 70.9 (CH, C_{3''}), 70.3 (CH, C_{3'}), 63.9 (CH₂, C_{9''}), 63.2 (CH₂, C_{5''}), 51.0 (CH₂, C_{5'}), 49.6 (CH₂, C_{6''}), 24.1 (CH₃, OAc), 20.8 (CH₃, NAc), 20.7 (CH₃, NAc). **HRMS (ESI⁺)** calcd for C₄₂H₄₆N₁₃O₁₁, 908,3434 [M + H]⁺; found, 908,3431.

Biological activity

1) Primary macrophage cultures. Murine bone marrow cells were isolated from femurs and cultivated (10⁶/mL) for 7 days in Dulbecco's minimal essential medium (DMEM) supplemented with 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (Gibco, Australia), 2 mM L-glutamine, 25mM Hepes (Gibco, Australia), 20% horse serum and 30% L929 cell-conditioned medium as source of M-CSF. After further three days in fresh medium, the bone marrow-derived macrophages (BMDM; 10⁵ cells/well) in DMEM supplemented with 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin, 2 mM L-glutamine, 25mM Hepes and 0.1% FCS were incubated with the compounds. The lyophilised compounds were solubilised in DMSO and used at a non-cytotoxic, 0.3% DMSO final concentration in DMEM supplemented with 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin, 2 mM L-glutamine, 25mM Hepes. Absence of cytotoxicity was controlled using MTT incorporation. The compounds were tested as agonists at concentrations of 1, 3, 10 or 14µM, as compared with reference STING agonist cGAMP (1-14 µM, InvivoGen, San Diego, CA, USA) or DMSO vehicle controls. For testing their potential antagonist activity, the compounds were tested at 1, 3, or 10uM, and compared with reference STING antagonist H151 (3 - 14µM, InvivoGen, San Diego, CA, USA) or DMSO vehicle controls, added 3 hr prior to the STING stimuli cGAMP (at 14uM). Cell culture supernatants were harvested after 18h and the concentration of CXCL10 (IP-10) in the supernatant measured by ELISA (R&D System, Minneapolis, USA).

2) Differential Scanning Fluorimetry (DSF) assay : Measurements were performed with wt hSTING as described earlier.^[53] Briefly, the reactions were performed in 384-well q-PCR white plates (Roche) in reaction buffer (50 mM TrisHCl [pH 7.4], 150 mM NaCl). The reactions contained 5 µM wt hSTING, 100 µM compound and 1:5000 (v/v) SYPRO Orange (Thermo Fisher Scientific, USA) in final volume of 10 µl. The negative control contained only the solvent (1% DMSO), the positive control contained 100 µM 3'3'-cGAMP. Samples were analyzed in a LightCycler 480 II (Roche) system. The first derivative of the fluorescence intensity associated with thermal denaturation of the protein was evaluated and then calculated as the melting temperature (T_m).

Chapitre IV] Synthèses de composés hétérocycliques dérivés du benzimidazole et de l'oxazolo[5,4-d]pyrimidine

Introduction

Outre les dinucléotides cycliques et leurs analogues, de petites molécules de nature hétérocyclique sont en mesure d'activer la protéine STING en tant qu'agonistes, ou de la désactiver en tant qu'antagonistes. Ces structures moléculaires présentent l'avantage d'avoir des propriétés « drug-like » plus avantageuses que les CDNs dont une meilleure perméabilité membranaire, une stabilité face aux hydrolases et une charge globale neutre. Certaines molécules ont une activité anticancéreuse ou antivirale connue, comme le FAA (1), le DMXAA (2), le CMA (3) ou l' α -mangostin (4), et ont été identifiées par la suite comme agoniste de STING. Sinon, leur identification s'est faite à partir d'un criblage biologique de milliers de composés (« high-throughput screening ») permettant de sélectionner les meilleurs candidats agonistes.

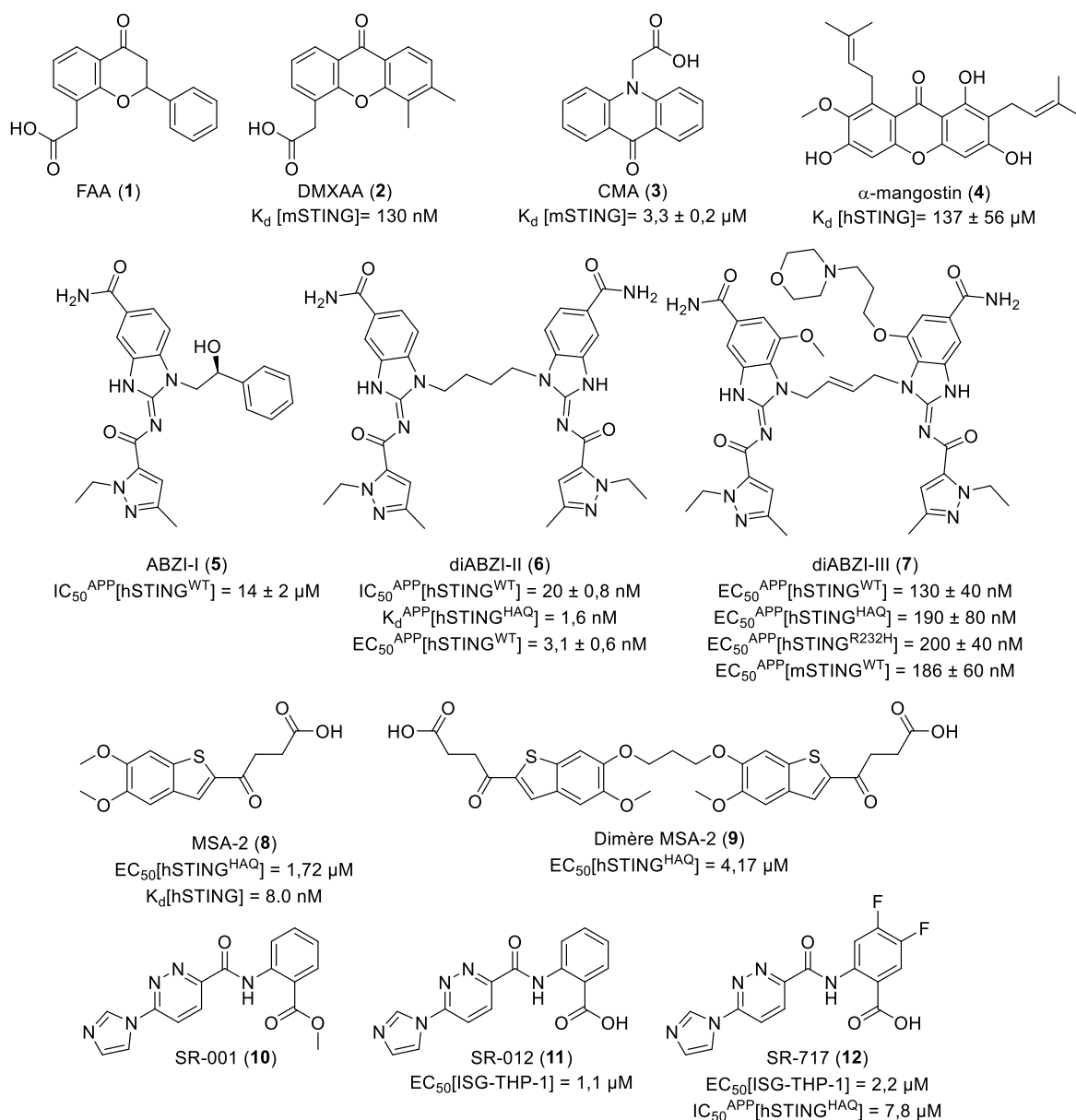


Figure 51. Agonistes non-nucléotidiques de STING

Parmi ces agonistes de STING, le plus prometteur est le composé diABZI-III (**7**) (Figure 51), issu de la famille des amidobenzimidazoles (ABZI-I (**5**), diABZI-II (**6**)), décrite par Ramanjulu *et al.* en 2018. Il a été constaté, lors d'études cristallographiques, que deux molécules d'ABZI-I se complexent au site de liaison du 2',3'-cGAMP au sein de hSTING. Cette découverte a mené à la synthèse du dimère diABZI-II, qui a montré une meilleure affinité vis-à-vis de la protéine que l'ABZI-I. Le « hit » ainsi trouvé a été, par la suite, optimisé par pharmaco-modulations, aboutissant au composé diABZI-III (**7**), dont l' $EC_{50}^{app} = 53,9 \pm 5 \mu M$ sur hSTING, est supérieur à celui du 2',3'-cGAMP ($EC_{50}^{app} = 190 \text{ nM}$). Ce composé est actuellement l'agoniste de nature non nucléosidique le plus efficace sur la protéine murine et humaine (et sur l'ensemble de ses variants), sans pour autant induire de repliement lorsqu'il se complexe à cette dernière : la protéine reste sous une conformation ouverte (Figure 52).

Sa découverte a inspiré d'autres groupes pharmaceutiques à procéder de manière similaire, afin de trouver de nouveaux agonistes de STING : le MSA-2 (**8**) par Pan *et al.* sur un criblage de 2,4 millions de composés, et le composé SR-001 (**10**), issu d'un criblage de 100 000 molécules et rapporté par Chin et ses associés. Ces deux molécules, tout comme le ABZI-I (**5**), se complexent à la protéine sous la forme de dimères (d'après les structures cristallographiques), et induisent l'activité biologique de cette dernière en promouvant cette fois-ci la conformation fermée de STING. Ils ont d'ailleurs l'avantage d'être actifs sur le STING murin et l'ensemble des variants de hSTING. La tentative de jonction de deux motifs MSA-2 par une chaîne propane, en remplaçant les deux groupes 5-méthoxy, jugés non prépondérants dans les interactions avec le site actif, abouti à la formation du dimère MSA-2 (**9**) ; ce dernier ne présente toutefois pas de meilleure activité agoniste par rapport au MSA-2 comme dans l'exemple du diABZI. Par ailleurs, le SR-001 (**10**) n'est pas le composé dit actif mais plutôt une prodrogue, l'acide carboxylique correspondant SR-012 (**11**) étant la substance agissant réellement sur STING. Le travail d'optimisation dans le cas du SR-012 par Chin *et al.* a été d'améliorer la perméabilité du SR-012 qui est initialement trop hydrophile. En substituant deux protons du système aniline par deux atomes de fluor, ils ont obtenu le SR-717 (**12**) qui est un agoniste très prometteur pour le développement de nouveaux traitements d'immunothérapie.

De manière générale, ces ligands interagissent principalement par liaisons hydrogène et interactions hydrophobes avec les différents résidus d'acide aminé du domaine C-terminal de la protéine STING (Figure 52). Ces résidus ne sont pas forcément ceux mis en jeu dans l'interaction 2',3'-cGAMP/STING (Arg238 et Tyr167). Cela montre que la complexation au site principal de la protéine STING reste complexe et laisse encore beaucoup de possibilité exploratoire dans la conception de nouveaux ligands de faible poids moléculaire.

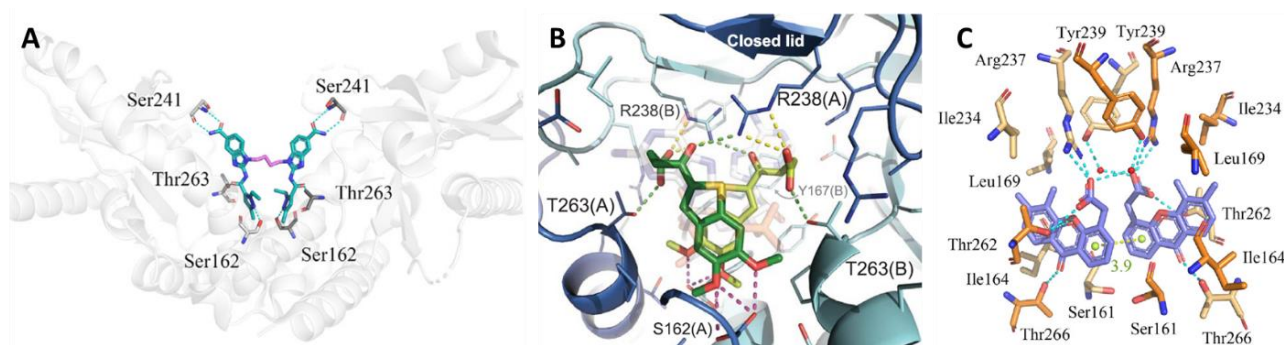


Figure 52. Structures co-cristallisées de hSTING avec le diABZI (A), hSTING-MSA-2 (B) et mSTING-DMXAA (C)

Dans le cadre de cette thèse, l'élaboration de nouveaux ligands agonistes, de nature aromatique, ciblant la protéine STING, est un second objectif permettant de compléter le précédent travail portant sur les CDNs. L'exploration se fait autour de petites molécules partant de deux squelettes hétérocycliques afin d'accéder, de manière convergente, à une diversité moléculaire permettant la constitution de petites chimiothèques (travail de type DOS). Les molécules synthétisées seront systématiquement évaluées biologiquement *in vitro*.

Les squelettes explorés sont le 1*H*-benzimidazole et l'oxazolo[5,4-*d*]pyrimidine. Outre le fait d'être connues dans le domaine de la chimie médicinale, en tant que substrat de nombreuses substances médicamenteuses,^{205,206,207,208,209} ces deux charpentes ont aussi été étudiées au sein de l'équipe depuis plusieurs années pour leur activité antivirale.^{210,211,212} Le benzimidazole a d'ailleurs montré son intérêt dans la constitution de ligands agonistes visant STING (série diABZY).²¹³ Pour rappel, ce bicycle aromatique est issu de la fusion entre une imidazole et un cycle benzène, et possède un centre donneur et deux centres accepteurs de liaison hydrogène. Sans substituant porté en *N*-1 ou *N*-3, le 1*H*-benzimidazole existe sous la forme d'un mélange de deux formes tautomériques. L'oxazolopyrimidine, quant à lui, est un bicycle formé d'un noyau oxazole fusionné à un noyau pyrimidine et possède 4 centres accepteurs de liaison hydrogène (Figure 53). Ces deux hétérocycles sont aussi capables d'interactions de type π -stacking, qui peuvent s'avérer intéressantes par la présence de résidus tyrosine (*i.e.* Tyr167) dans le site actif de la protéine STING. Il est avéré dans la littérature que ces noyaux peuvent être vus comme mime de l'un et l'autre, avec des propriétés chimiques similaires.²¹⁴ Ces deux charpentes hétérocycliques ont été étudiées dans un but de créer de la diversité moléculaire.

²⁰⁵ (a) Kedar, M. S.; Dighe, N. S.; Pattan, S. R.; Musmade, D. S.; Thakur, D.; Bhosale, M.; Gaware, V. M. Benzimidazole in medicinal chemistry: an overview. *Pharma Chem.* **2010**, 2, 249-256; (b) Walia, R.; Hedaitullah, M.; Naaz, S. F.; Iqbal, K.; Lamba, H. S. Benzimidazole derivatives – an overview. *Int. J. Res. Pharm. Chem.* **2011**, 1, 565-574.

²⁰⁶ Khokra, S. L.; Choudhary, D. Benzimidazole an important scaffold in drug discovery. *Asian J. Biochem. Pharm. Res.* **2011**, 1, 476-486.

²⁰⁷ (a) Mieczkowski, A.; Bieszczad, B. Recent advances in the synthesis and applications of oxazolo[5,4-*d*]pyrimidines (microreview). *Chem. Heterocycl. Comp.* **2016**, 52, 782-784; (b) De Coen, L. M.; Roman, B. I.; Movsisyan, M.; Heugebaert, T. S. A.; Stevens, C. V. Synthesis and biological activity of oxazolopyrimidines: synthesis and biological activity of oxazolopyrimidines. *Eur. J. Org. Chem.* **2018**, 19, 2148-2166.

²⁰⁸ Zhirnov, V. V.; Velihina, Y. S.; Mitiukhin, O. P.; Brovarets, V. S. Intrinsic drug potential of oxazolo[5,4-*d*]pyrimidines and oxazolo[4,5-*d*]pyrimidines. *Chem. Biol. Drug. Des.* **2021**, 98, 561-581.

²⁰⁹ Sochacka-Ćwikła, A.; Mączyński, M.; Czyżnikowska, Ż.; Wiatrak, B.; Jęskowiak, I.; Czerski, A.; Regiec, A. New oxazolo[5,4-*d*]pyrimidines as potential anticancer agents: their design, synthesis, and in vitro biological activity research. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, 23, 11694-11725.

²¹⁰ Agrofoglio, L.; Roy, V.; Plebanek, E.; Bessieres, M. Preparation of benzimidazole derivatives for the treatment of filovirus and other infectious diseases. **2018**, WO2018050771.

²¹¹ Bessièrès, M.; Plebanek, E.; Chatterjee, P.; Shrivastava-Ranjan, P.; Flint, M.; F. Spiropoulou, C. F.; Warszycki, D.; Bojarski, A. J.; Roy, V.; Agrofoglio, L. A. Design, synthesis and biological evaluation of 2-substituted-6-[(4-substituted-1-piperidyl)methyl]-1*H*-benzimidazoles as inhibitors of ebola virus infection, *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, 214, 113211-113229.

²¹² Travaux internes au laboratoire du Dr. Franck Amblard et Dr. Ugo Pradère (non publiés).

²¹³ Xi, Q.; Wang, M.; Jia, W.; Yang, M.; Hu, J.; Jin, J.; Chen, X.; Yin, D.; Wang, X. Design, synthesis, and biological evaluation of amidobenzimidazole derivatives as stimulator of interferon genes (STING) receptor agonists. *J. Med. Chem.* **2020**, 63, 260-282.

²¹⁴ Tuo, W.; Bollier, M.; Leleu-Chavain, N.; Lemaire, L.; Barczyk, A.; Dezitter, X.; Klupsch, F.; Szczepanski, F.; Spencer, J.; Chavatte, P.; Millet, R. Development of novel oxazolo[5,4-*d*]pyrimidines as competitive CB2 neutral antagonists based on scaffold hopping. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, 146, 68-78.

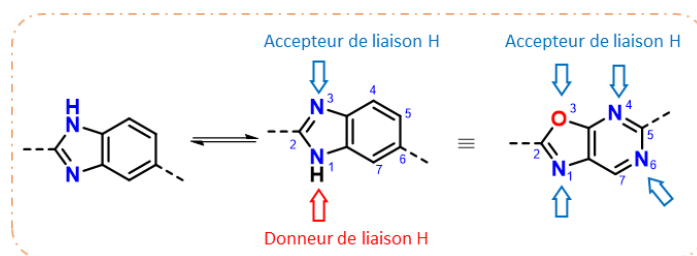


Figure 53. Noyaux benzimidazole et oxazolopyrimidine

La mise en avant de ces structures par une évaluation biologique va permettre de synthétiser ultérieurement des dimères à partir des unités monomériques les plus prometteuses ; cette démarche étant inspirée de celles décrites dans la littérature rapportant la découverte de ligands agonistes de STING.

I) Composés portant un squelette 1H-benzimidazole

I.1) Criblage *in vitro* d'une chimiothèque de composés dérivés du noyau benzimidazole

L'exploration autour du 1H-benzimidazole commence par un criblage biologique de structures originales, synthétisées autour de ce noyau au sein de l'équipe. Initialement conçus comme inhibiteurs des filovirus, divers analogues de benzimidazole produits présentent une forte activité anti-EBOV (virus Ebola) en ciblant la protéine Niemann-Pick type C1 (NPC1).^{210,211} Une partie de cette chimiothèque (36 molécules ; Figure 54) a donc été reprise et criblée biologiquement par l'équipe du Pr. Valérie QUESNIAUX (INEM UMR CNRS 7355), afin de mesurer l'activité agoniste, ou antagoniste, de ces composés sur la voie cGAS-STING et aider à établir une relation structure activité (SAR).

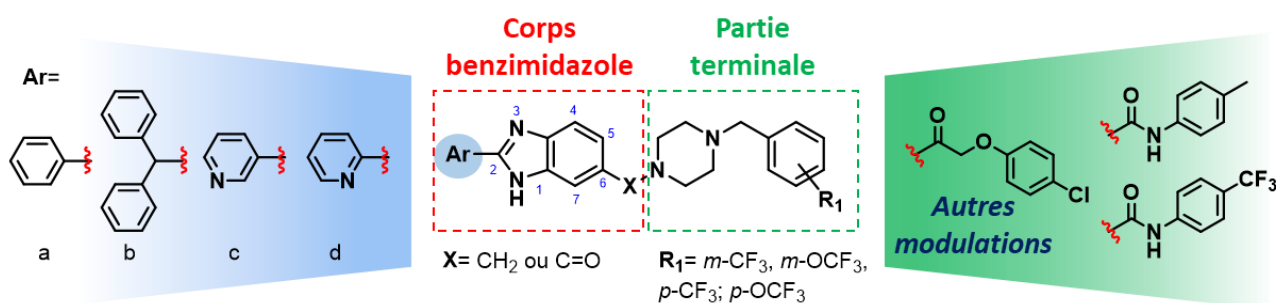
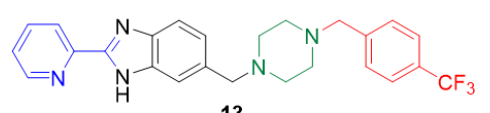


Figure 54. Chimiothèque de dérivés benzimidazoles criblée

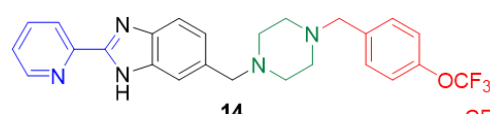
Cette chimiothèque de dérivés du benzimidazole a été construite de la manière suivante :

- La position C-2 du corps benzimidazole est substituée par diverses « têtes » aromatiques, allant du (a) phényle, (b) benzhydryle, (c) pyridin-3-yl et (d) pyridin-2-yl. Ces motifs sont capables d'interactions π -stacking, les noyaux pyridine, bien que déficitaires en densité électronique, présentent un donneur de liaison hydrogène supplémentaire.
- La position benzylique en C-6 du squelette est reliée à un motif pipérazine (par une liaison peptidique, où X = C=O), soit à un motif benzylpipérazine (par une liaison C-N, où X = CH₂).
- La partie terminale est constituée de dérivés de pipérazine liée par liaison C-N en position benzylique de motifs benzéniques. D'autres modulations passent par une liaison peptidique ou de type urée reliant le motif pipérazine avec un aryle terminal. Ce dernier est substitué par des groupements à caractère lipophile tels que le trifluorométhyle (-CF₃) ou le trifluorométhoxy (-OCF₃) favorisant des interactions de type hydrophobes.

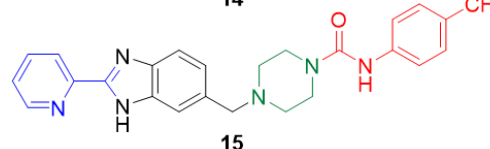
Le criblage a été effectué sur des macrophages de souris (BMDMs) : trois composés ont montré une activité biologique antagoniste, dose-dépendante, sur la voie de signalisation étudiée (Figure 55) ; l'activité mesurée est de l'ordre de celle de l'inhibiteur de référence H-151, utilisé comme témoin lors de ces tests.



13



14



15

Composé	Inhibition sécrétion IP-10 (%)		
	10 μ M	3 μ M	1 μ M
13	31 $\pm$ 3	68 $\pm$ 1	21 $\pm$ 12
14	31 $\pm$ 3	72 $\pm$ 1	11 $\pm$ 0,1
15	91 $\pm$ 1	74 $\pm$ 10	23 $\pm$ 4

Figure 55. Composés actifs lors des premiers tests in vitro

Les tests biologiques effectués permettent hypothétiquement de penser que la protéine STING est ciblée par ces composés (aspect discuté dans la partie biologie), même si d'autres évaluations complémentaires seront nécessaires pour valider cette hypothèse. Les résultats obtenus ont cependant servi de base pour l'exploration d'une nouvelle série de dérivés benzimidazoles, dont la synthèse a été guidée par les activités biologiques. Une relation structure activité plus précise a pu être établie à terme.

Après analyse des trois structures actives, les éléments suivants semblent déterminants pour l'activité biologique de ces structures :

- Le motif pyridin-2-yl en position de « tête ».
- La jonction entre le benzimidazole et la pipérazine par un méthyle en place d'un carbonyle, montrant ainsi le besoin de flexibilité de la structure.
- La position *para*- du substituant lipophile sur le phényle terminal.
- Le composé **15** ayant montré les meilleurs résultats biologiques, la liaison urée semble prépondérante par rapport à la liaison C-N benzylique. Par ailleurs, cette fonction permet au composé **15** d'être plus hydrophile que les composés **13** et **14**, les log(P) calculés étant respectivement de 3,41 (**15**), 4,30 (**13**) et 4,91 (**14**). Ce paramètre est important puisque les composés sont testés sur des cultures cellulaires dont le milieu est principalement aqueux. Les molécules doivent donc présenter un profil hydrosoluble sinon des problèmes de solubilité sont observés lors de la préparation des échantillons pour les évaluations biologiques.

Le travail suivant consiste donc en une pharmaco-modulation de la partie terminale du composé **15**.

I.2) Stratégie de synthèse

La pharmaco-modulation autour de la structure **15** va porter, dans un premier temps, sur l'insertion de divers substituants en position *meta*- et *para*-, de nature autre que le -CF₃ sur l'aryle terminal (Figure 56). Dans un second temps, les modifications porteront sur le motif central pipérazine, tout en conservant le motif aryle terminal présentant les meilleurs résultats biologiques.

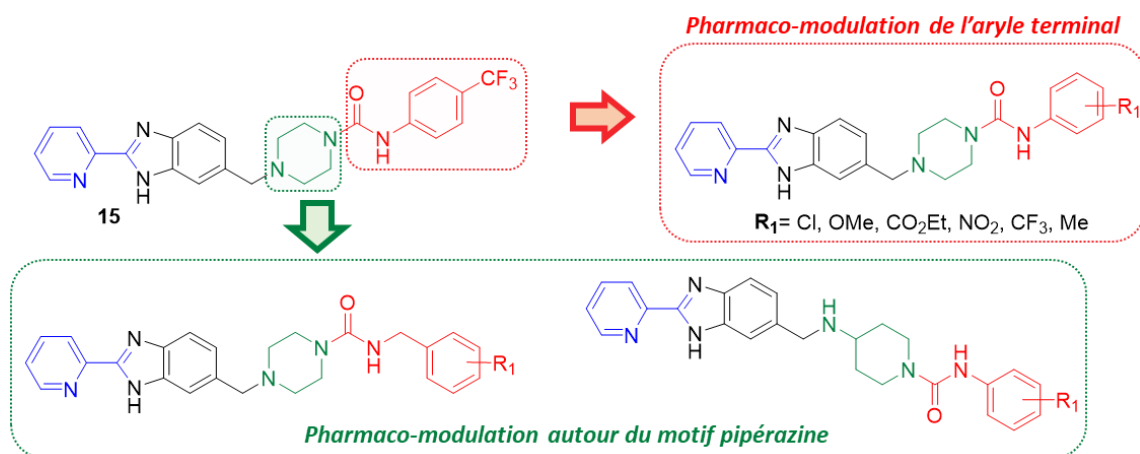


Figure 56. Modifications explorées autour du composé **3**

L'analyse de rétrosynthèse montre que ces analogues peuvent être obtenus par le couplage d'un fragment benzimidazole (**A**) et d'un fragment pipérazine (**B**) *via* une S_N2 (Schéma 40).

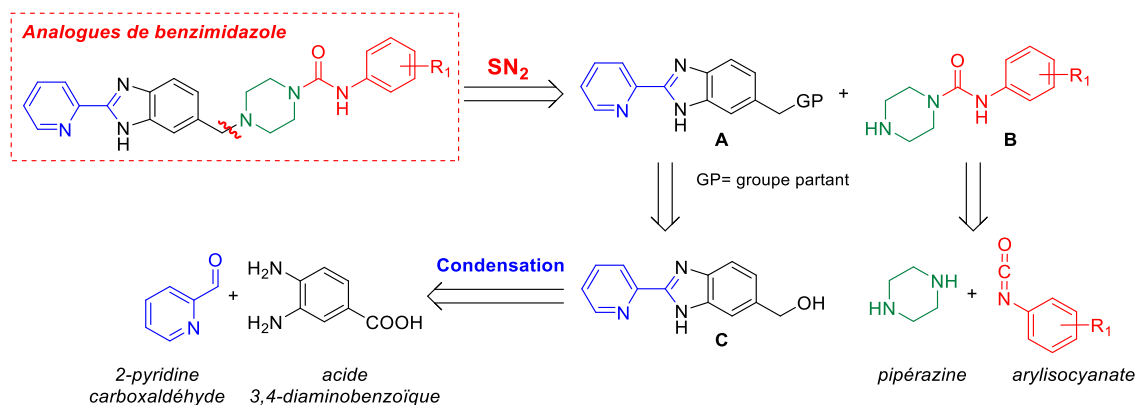


Schéma 40. Rétrosynthèse des analogues de benzimidazole

Le fragment **A** provient d'une activation en groupement nucléofuge de l'alcool benzylique porté en position C-6. Le noyau benzimidazole **C** peut être formé à partir de la condensation entre le 2-pyridine carboxaldéhyde et l'acide 3,4-diaminobenzoïque. Le fragment **B** peut être synthétisé à partir de la pipérazine et d'arylisocyanates. La formation des analogues dérivés du benzimidazole repose sur une synthèse convergente permettant d'utiliser le précurseur **B** comme substrat principal. Ceci est plus avantageux qu'une synthèse linéaire de nos composés, où l'accès à la diversité se ferait en étape de fin par addition de divers arylisocyanates sur le 6-(piperazin-1-ylmethyl)-2-(pyridin-2-yl)-1*H*-benzo[d]imidazole (**16**). Mis en présence de ces espèces électrophiles, l'intermédiaire **16** peut se condenser à la fois par l'amine du motif pipérazine, mais aussi par les azotes *N*-1 et *N*-3 du noyau benzimidazole, même si ces derniers ont un caractère

nucléophile amoindri par la délocalisation de la liaison imide (Schéma 41). La formation de nombreux sous-produits est alors évitée en suivant la première stratégie décrite.

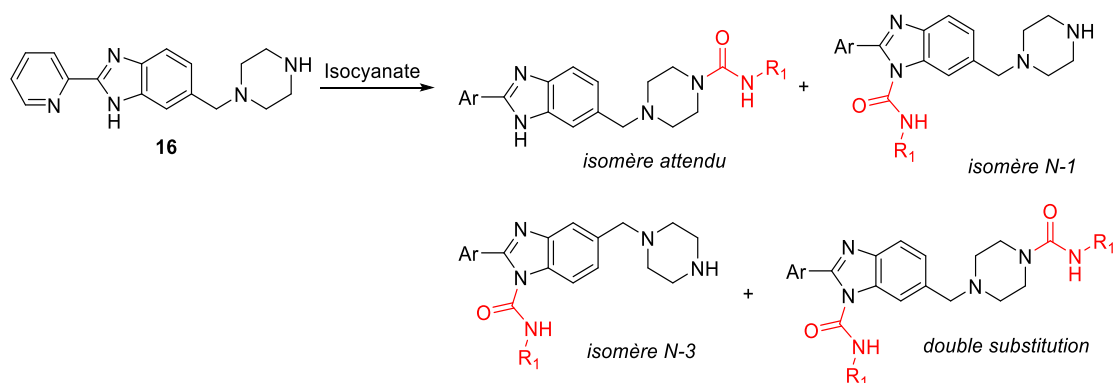


Schéma 41. Réaction de l'arylisocyanate sur le benzimidazole **16**

Comme nous l'avons mentionné, le squelette benzimidazole est largement utilisé en chimie médicinale, puisqu'on le retrouve dans la structure de nombreuses substance thérapeutiques.^{205,206} La formation de ce noyau est fonction des substituants que doit porter l'hétérocycle, mais provient généralement d'une condensation d'un aldéhyde sur un dérivé diaminobenzène : différentes méthodes d'obtention sont décrites dans la littérature.²¹⁵ Le dérivé que nous devons synthétiser lors de ce projet peut être synthétisé à partir du 2-pyridine carboxaldéhyde et de l'acide 3,4-diaminobenzoïque, soit de l'ester de méthyle correspondant. Ces réactifs sont commercialisés.

²¹⁵ Faheem, M.; Rathaur, A.; Pandey, A.; Singh, V. K.; Tiwari, A. K. A review on the modern synthetic approach of benzimidazole candidate. *ChemistrySelect*. **2020**, 5, 3981-3994.

I.3) Résultats et discussion

I.3-1) Travail de pharmaco-modulation sur la partie aryle du composé 15

a) Synthèse du noyau benzimidazole

La synthèse commence par l'introduction de la pyridin-2-yl en position C-2 du benzimidazole par condensation du 2-pyridine carboxaldéhyde **17** avec l'acide 3,4-diaminobenzoïque **18**, ou le méthyl 3,4-diaminobenzoate **19**. Initialement utilisées pour la formation des dérivés de type 2-arylbenzimidazole,^{210,211} les conditions utilisant le bisulfite de sodium NaHSO₃ aq. (40%) comme oxydant dans l'EtOH, ne permettent pas la formation des composés attendus **20** et **21**. Des mélanges complexes sont obtenus et un des produits majoritaires semble être le produit 1,2-disubstitué **22a-b** d'après les analyses LC-MS (Schéma 42).

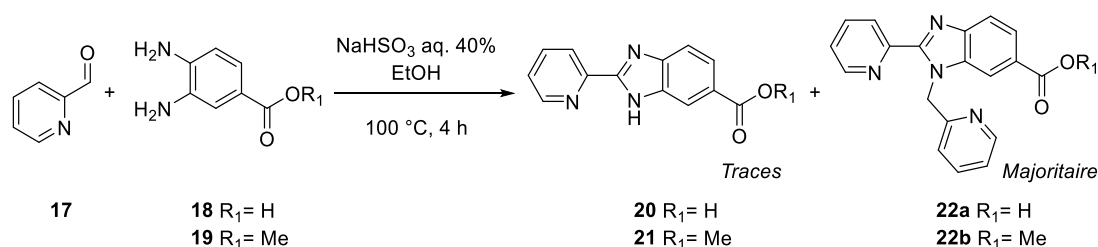


Schéma 42. Réaction entre 5 et 6/7 en présence de NaHSO₃ aq. Dans l'EtOH

L'utilisation de 1,4-benzoquinone comme oxydant dans le dioxane pour la formation de l'ester **21** à partir de **17** et **19**, comme décrit par Wubulikasimu,²¹⁶ n'est pas reproductible et le produit désiré n'a pas pu être obtenu. L'acide **20** a été synthétisé au sein de notre équipe²¹⁷ à partir de l'aldéhyde **17** et la diamine **19** sous les conditions de Pakal'nis,²¹⁸ utilisant de l'acétate de cuivre Cu(OAc)₂ et du sulfure de sodium Na₂S. Après saponification par le NaOH puis acidification, le produit désiré est isolé avec 46% de rendement. L'utilisation de Na₂S et d'espèces basiques, puis acides fortes pour les traitements, rendent ces conditions beaucoup moins attrayantes pour la synthèse de **21** en grande quantité. Ce sont finalement les conditions proposées par Ho,²¹⁹ qui présentent la meilleure alternative pour synthétiser l'acide **20** à l'échelle de 5 grammes : la condensation se déroule dans l'acide acétique glacial à reflux durant 8 heures, l'oxygène de l'air jouant le rôle d'oxydant. Le composé désiré est obtenu avec 80% de rendement par simple filtration. Cet acide est ensuite converti en méthylbenzoate **21** par estérification avec le SOCl₂, dans le méthanol (Schéma 43), avec un rendement de 95%.

²¹⁶ Wubulikasimu, R.; Yang, Y.; Xue, F.; Luo, X.; Shao, D.; Li, Y.; Gao, R.; Ye, W. Synthesis and biological evaluation of novel Benzimidazole derivatives bearing a heterocyclic ring at 4/5 position. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2013**, *34*, 2297-2304.

²¹⁷ Travaux du Dr. Elzbieta Niemiec-Plebanek.

²¹⁸ Pakal'nis, V.; Borovtiov, M.; Balova, I.; Tunik, S.; Ivanova, N.; Sivoza, O. Heteroligand bipyridyl-pyridylbenzimidazole Ru(II) complexes. Synthesis, structural characterization, and investigation of electronic structure. *Russ. J. Gen. Chem.* **2008**, *78*, 1594-1605.

²¹⁹ Ho, T.-Y.; Huang, S.-M.; Wu, J.-Y.; Hsu, K.-C.; Lu, K.-L. Direct guest exchange induced single-crystal to single-crystal transformation accompanying irreversible crystal expansion in soft porous coordination polymers. *Cryst. Growth Des.* **2015**, *15*, 4266-4271.

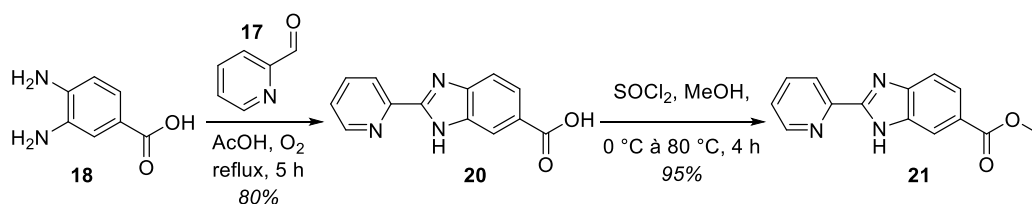


Schéma 43. Synthèse retenue du dérivé ester **21**

Appliquées au méthyl 3,4-diaminobenzoate (**19**), ces conditions permettent également d'obtenir le dérivé **21** avec un rendement plus faible de 53%.

L'acide benzoïque **20** peut être réduit en alcool benzylique **23** par le LiAlH_4 . Néanmoins, le passage par le méthyl ester **21** se justifie par une volonté d'obtenir un composé facilement isolable (l'ester étant obtenu par simple filtration sur gel de silice), avec une pureté supérieure à 98%, sans traces d'acidités résiduelles comme il en est parfois le cas lors de l'isolement de **20**. L'ester de méthyle **21** est ensuite réduit en alcool par des sels d'hydrures dans le THF (Schéma 44) :

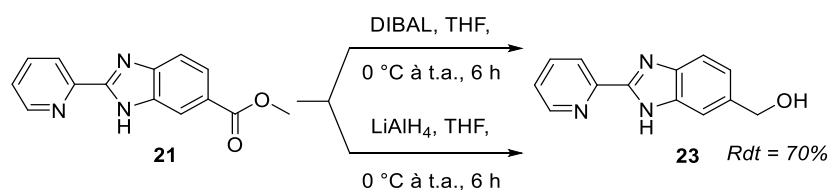


Schéma 44. Premières tentatives de réduction de l'ester **21**

Si l'utilisation de 2,5 eq. d'hydrure de diisobutylaluminium (DIBAL) mène à l'alcool **23**, la conversion de l'ester **21** après 4 heures de réaction à température ambiante n'est pas complète et la présence d'autres sous-produits (l'intermédiaire aldéhyde principalement) est observée. L'ajout de 1,5 eq. supplémentaires de DIBAL a été nécessaire pour convertir entièrement le substrat en alcool, après 2 heures à température ambiante (Tableau 18, entrée 1), permettant d'isoler l'alcool avec un rendement inférieur à 70%. En présence de LiAlH_4 (2,0 eq. ; entrée 2), dans les mêmes conditions, la formation de sous-produits n'est pas observée. Toutefois, la conversion de l'ester demeure aussi incomplète après 4 heures de réaction à température ambiante. Un ajout de LiAlH_4 (1,0 eq.) est alors nécessaire à une conversion totale après 2 heures de réaction, le rendement obtenu en alcool étant proche de 70%. Le LiAlH_4 étant utilisé sous forme solide (poudre), une suspension est obtenue lors de son ajout dans le THF : ceci peut expliquer la difficulté à convertir l'ester en alcool malgré le large excès de ce réducteur introduit. Mener la réaction à 50 °C (entrée 3) a permis d'améliorer ces résultats : en seulement 3 heures de réaction avec 2,0 eq. de réducteur, l'ester **21** est entièrement converti en alcool **23**, avec un rendement de 85%.

Entrée	Réducteur	Quantité	Température	Temps	Rendement
1	DIBAL	4,0 eq.	t.a.	6 h	68%
2	LiAlH_4	3,0 eq.	t.a.	6 h	71%
3	LiAlH_4	2,0 eq.	50 °C	3 h	85%

Tableau 18. Conditions de réduction testées

Ces dernières conditions (Schéma 45) ont été retenues pour la synthèse du précurseur benzimidazole **23** sur des quantités de l'ordre du gramme. Le rendement global étant de 65% sur les trois étapes.

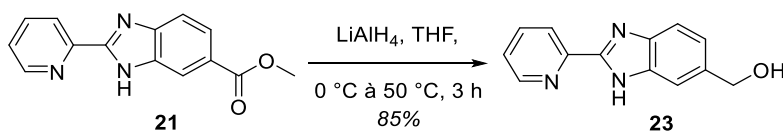


Schéma 45. Conditions opératoires retenues pour l'obtention de l'alcool **23**

b) Synthèse des motifs pipérazine

La partie terminale est synthétisée séparément du corps benzimidazole à partir d'une pipérazine substituée par différents motifs *N*-arylurées. La *N*-Boc-pipérazine **24** est utilisée à la place de la pipérazine afin d'éviter tout risque de di-substitution sur le motif pipérazine. Cette dernière est agitée à température ambiante durant 2 heures avec un arylisocyanate, dans le CH_2Cl_2 anhydre, pour donner les analogues de pipérazine **25a** à **25i**, avec des rendements quantitatifs. Le groupement Boc est ensuite clivé en présence de TFA pour donner les composés *N*-arylpipérazine-1-carboxamides attendus **26a-i** avec de bons rendements.

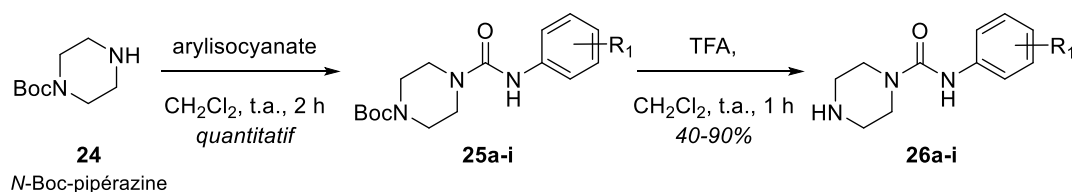


Schéma 46. Synthèse des premiers analogues de pipérazine

L'ensemble de ces analogues de pipérazine obtenus sont rapportés dans le Tableau 19.

Des analogues présentant une courte chaîne aliphatique **28a-c** ont également été synthétisés à partir des isocyanates correspondants, en suivant le même protocole, de manière à proposer une variation possible non aromatique (Schéma 47) :

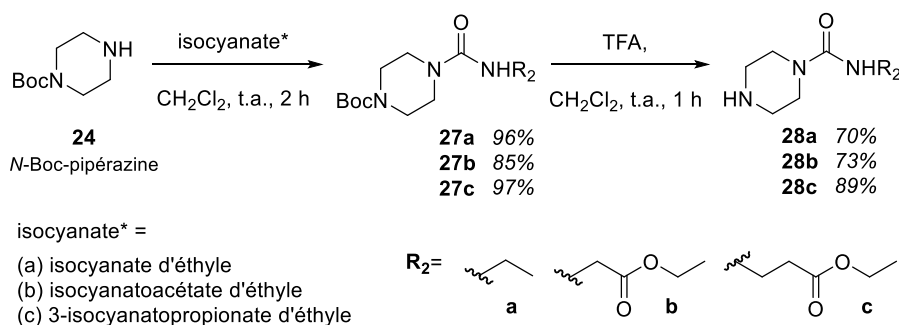


Schéma 47. Formation des analogues de pipérazine **28a-c**

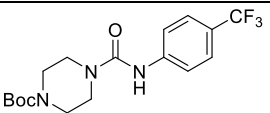
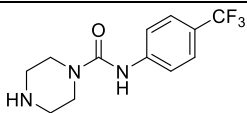
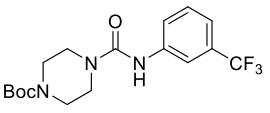
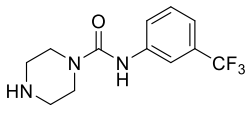
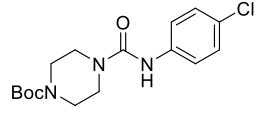
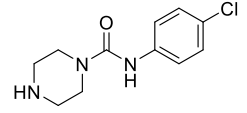
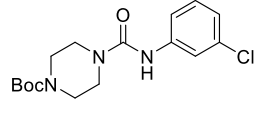
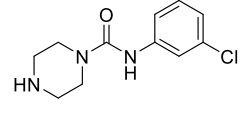
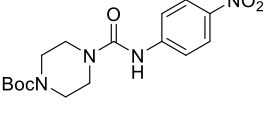
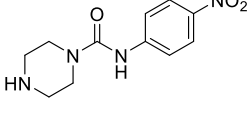
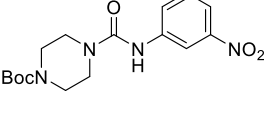
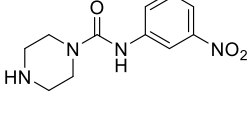
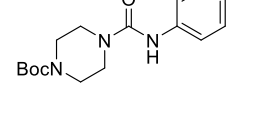
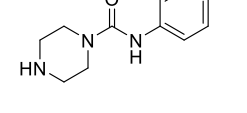
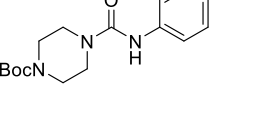
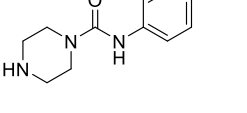
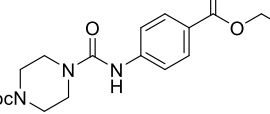
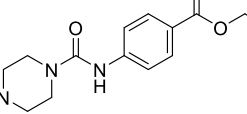
Composé	Structure	Rdt.	Composé	Structure	Rdt.
25a		>95%	26a		87%
25b		>95%	26b		85%
25c		>95%	26c		90%
25d		>95%	26d		71%
25e		>95%	26e		65%
25f		>95%	26f		63%
25g		>95%	26g		86%
25h		>95%	26h		64%
25i		>95%	26i		42%

Tableau 19. Dérivés de N-arylpiperazine-1-carboxamide synthétisés

c) Synthèse des composés finaux

Une fois les divers précurseurs en main (le benzimidazole et les analogues de pipérazine), ces derniers sont couplés pour accéder aux composés désirés. Une étude préliminaire sur le choix de l'activation de la fonction alcool benzylique a montré que la conversion en chlorure, mène à de meilleurs rendements, par rapport à l'activation *via* un mésylate (Schéma 48) : ^{198b}

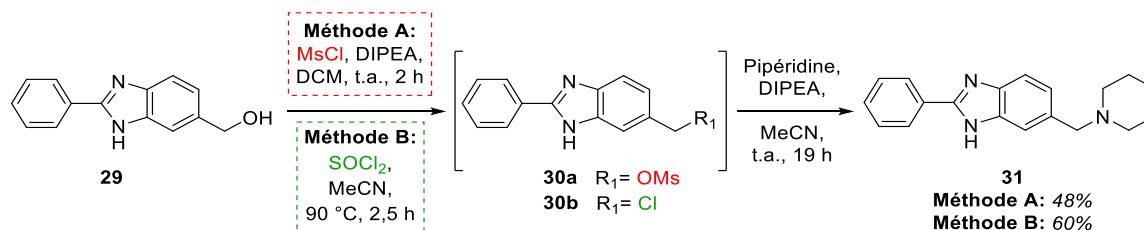


Schéma 48. Essais préliminaires sur les conditions opératoires du couplage

L'introduction de ces groupements nucléofuges se déroule de manière classique. Les espèces **30a** et **30b** ne sont pas isolées mais engagées directement dans l'étape de substitution, en présence de pipéridine et de DIPEA. Le rendement global pour le composé **31** est alors de 48% par la méthode A et de 60% par la méthode B. Cette différence proviendrait de l'instabilité plus prononcée de l'intermédiaire **30a** par rapport à l'intermédiaire **30b** : le mésylate étant un bien meilleur groupe partant que le chlorure. Cela mène à une dégradation précoce de l'intermédiaire **30a** *via* une élimination du groupe nucléofuge favorisée par l'effet électrodonneur de l'amine *N*-1 (Schéma 49).

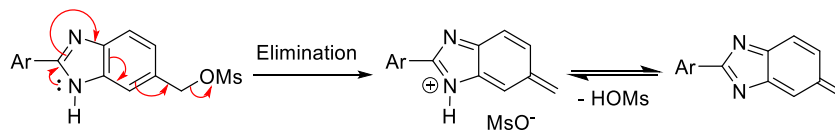


Schéma 49. Mécanisme de dégradation du substrat benzimidazole

L'alcool **23** est converti en chlorure de benzyle en présence de SOCl_2 pour être engagé dans une réaction de substitution nucléophile en *méso* avec les pipérazines **26a-i**, **28a-c**, et la DIPEA comme base (Schéma 50). Les composés attendus **15** et **32a-k** sont isolés avec des rendements allant de 30% à 80% (Figure 57).

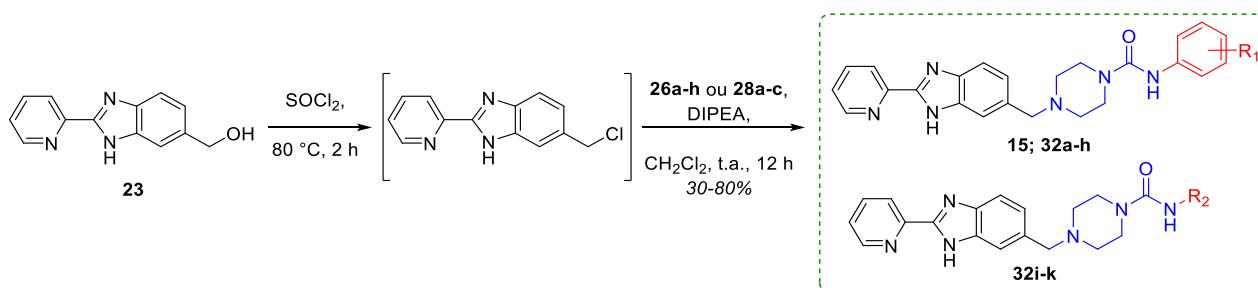


Schéma 50. Couplages entre le benzimidazole **23** et les analogues pipérazine menant aux composés **15** et **32a-k**

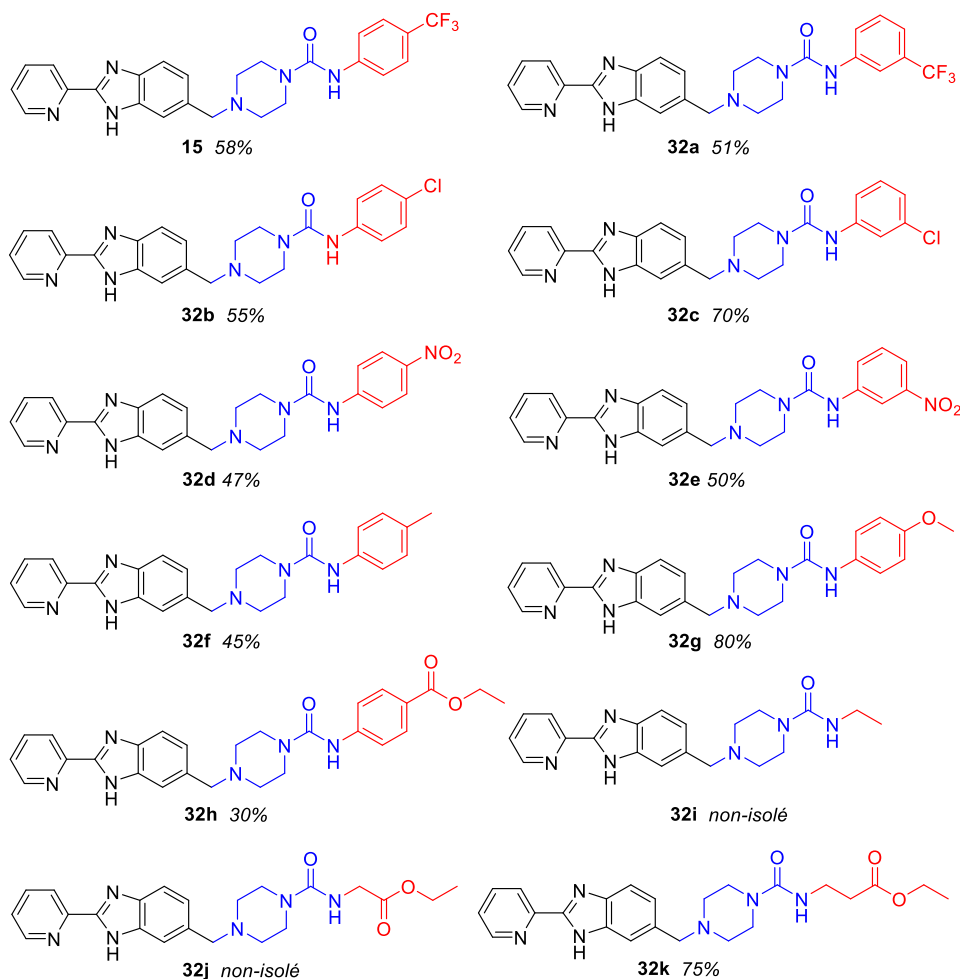


Figure 57. Composés finaux obtenus pour cette série

La formation de produits secondaires, en plus ou moins grande proportion lors de la réaction de couplage, a été observée en analyse LC-MS. Ceux-ci sont d'abord issus de la compétition entre l'amine secondaire du benzimidazole, et celle du motif pipérazine pour l'attaque nucléophile sur l'intermédiaire chloré (Sous-produit 1). Les seconds sous-produits sont alors formés par substitution du sous-produit 1 chloré par le motif pipérazine (Schéma 51).

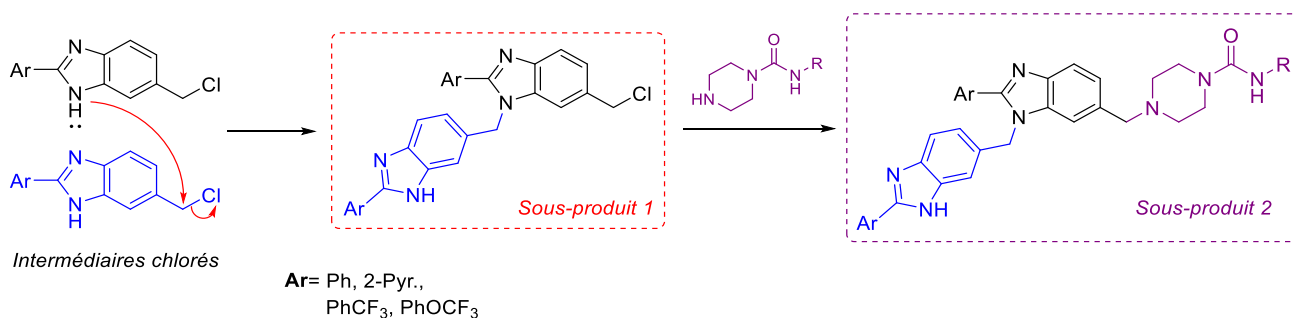


Schéma 51. Formation des sous-produits 1 et 2

Ayant une polarité proche des produits synthétisés, ces produits secondaires rendent difficile, dans certains cas, la purification des produits souhaités. Cela explique en partie l'obtention de rendements inférieurs à 50%, comme pour les composés **32i** et **32j**, qui nécessitent une purification par HPLC semi-préparative. Une fois isolé, les composés nitro- **32d** et **32e** sont engagés dans une étape d'hydrogénation (H₂,

Pd/C) (Schéma 52), pour obtenir l'amine primaire en position *para* et *mé*ta du motif aryle. La série est ainsi complétée par un substituant polaire donneur et accepteur de liaison hydrogène.

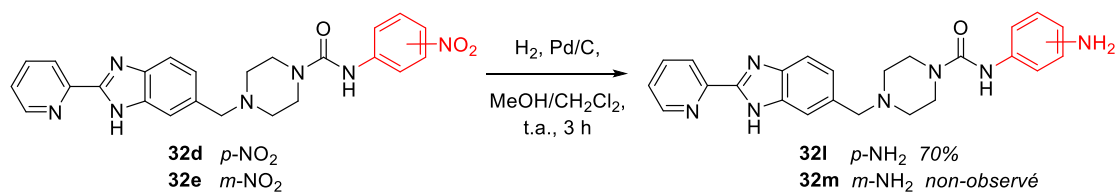


Schéma 52. Réduction du substituant nitro en amine

Si le dérivé 4-nitrophényle **32d** est correctement réduit en 4-phénylamine **32l** après 3 heures de réaction dans ces conditions avec 70% de rendement, la réduction du dérivé 3-nitrophényle **32e** semble s'arrêter à l'intermédiaire 3-nitrosophényle sous le même temps réactionnel. Le prolongement de la réaction ne mène pas à l'obtention de la 3-phénylamine **32m**. D'autres conditions réductrices restent donc à explorer. En conclusion de ce travail, **une série de 11 analogues portant un squelette 1H-benzimidazole** a été obtenue et évaluée biologiquement ; chaque composé a été synthétisé sur des échelles de l'ordre de 200 mg. Les résultats biologiques indiquent que cinq composés (le **15** avec le **32a-d**) présentent des activités antagonistes intéressantes. Toutefois, le composé **15** reste le plus actif ($\text{IC}_{50} = 1.23 \mu\text{M}$), contre le **32c** ($\text{IC}_{50} = 1.69 \mu\text{M}$) et les autres composés ($\text{IC}_{50}(\text{32a}) = 2.83 \mu\text{M}$, $\text{IC}_{50}(\text{32b}) = 2.61 \mu\text{M}$ et $\text{IC}_{50}(\text{32d}) = 2.23 \mu\text{M}$).

1.3-2) Travail de pharmaco-modulation autour du motif pipérazine

Le criblage de la série précédente par les tests biologiques a permis d'identifier plusieurs composés aux activités antagonistes intéressantes dont le composé **15**. Celui-ci présente encore la meilleure activité antagoniste de toute la série, avec un IC_{50} = 1.23 μ M sur macrophages de souris B6. Son homologue *m*-trifluorométhylphényle **32a** affiche de son côté un IC_{50} = 2.83 μ M, indiquant que le motif *p*-trifluorométhylphényle semble important pour une activité biologique. Un second travail de pharmaco-modulation est proposé autour du motif pipérazine à partir de ces résultats encourageants.

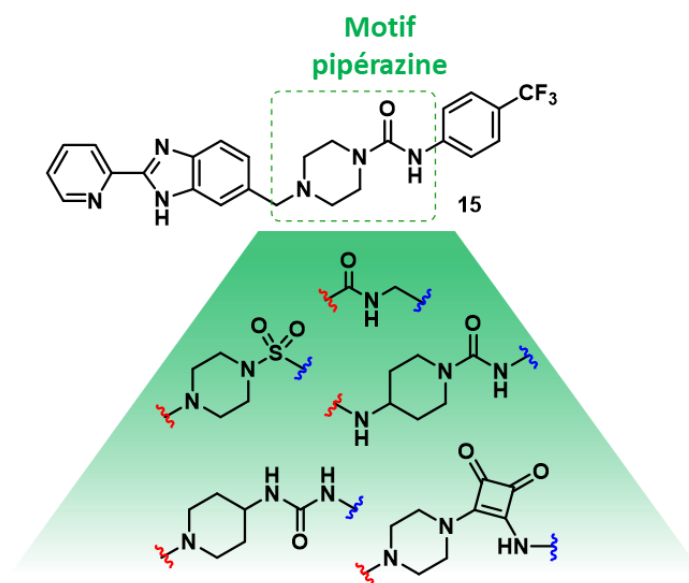


Schéma 53. Modifications envisagées portant sur la partie centrale

Le motif pipérazine peut être vu comme un espaceur entre le squelette benzimidazole et le motif arylique (Schéma 53). Ce petit éventail de modifications consiste en l'élongation de l'espaceur par ajout d'un chaînon méthyle, soit par l'insertion d'un motif aminopipéridine. Le remplacement de la liaison urée par des fonctions isostères (*i.e.* sulfonamide, squaramide, amide) est aussi envisagé.²²⁰ En effet, une modulation autour de cette fonction est pertinente pour comprendre si celle-ci est cruciale pour l'activité biologique de la molécule. Par ailleurs, le motif 4-aminopipéridine est également intéressant car il permet l'insertion d'une amine supplémentaire qui devrait améliorer le caractère hydrophile de la molécule. Une stratégie de synthèse convergente de ces analogues de pipérazine est suivie, comme précédemment, où les précurseurs benzimidazole et amine sont construits séparément, puis couplés lors de l'étape finale pour donner accès aux produits souhaités.

²²⁰ Kumari, S.; Carmona, A. V.; Tiwari, A. K.; Trippier, P. C. Amide bond bioisosteres: strategies, synthesis, and successes. *J. Med. Chem.* **2020**, 63, 12290-12358.

a) Synthèse des analogues de pipérazine

Les premiers analogues formés proviennent de la pipérazine. En suivant la méthode précédente, la *N*-Boc-pipérazine (**24**) est mise en présence du 1-isocyanatométhyl-4-(trifluorométhyl)benzène (**33**) dans le CH₂Cl₂ pour former de manière quantitative l'analogue **34** désiré. Une déprotection du Boc par le TFA donne accès au dérivé de pipérazine désiré **35** avec un rendement de 54% (Schéma 54).

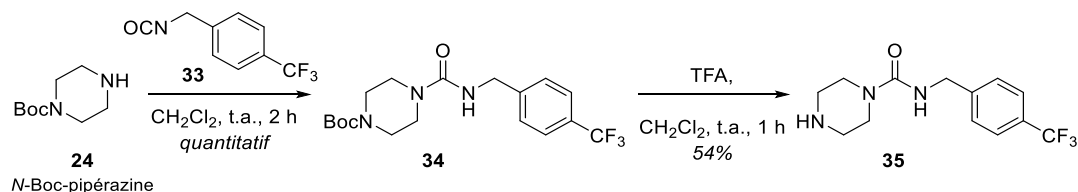


Schéma 54.

Le dérivé sulfonamide est produit par attaque nucléophile de la *N*-Boc-pipérazine **24** sur le chlorure de 4-(trifluorométhyl)benzènesulfonyl (**36**) en présence de NEt₃ comme base. Par simple extraction, le produit **37** est obtenu pur avec un rendement de 96%. Le traitement par le TFA mène, avec 86% de rendement, à l'analogue **38** (Schéma 55).

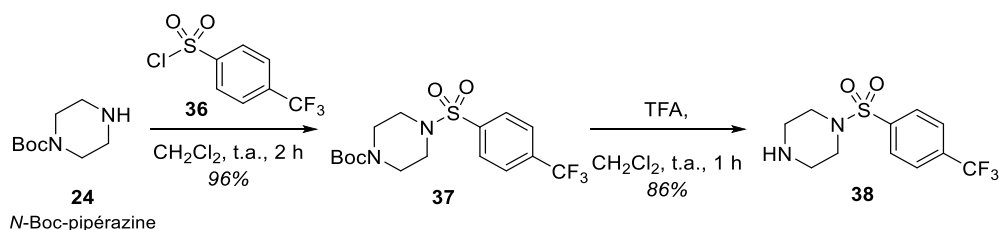


Schéma 55.

Nous nous sommes aussi intéressés au motif squaramide qui est un isostère connu de la fonction urée.²²¹ La synthèse du squaramide ouvre sur la phar-maco-modulation de la fonction urée présente sur nos structures. L'attaque de la *N*-Boc-pipérazine (**24** ; 1,0 eq.) sur le diméthyle squarate (**39** ; 1,5 eq.) dans l'EtOH à reflux forme l'intermédiaire squaramide **40** avec 88% de rendement (Schéma 56). Néanmoins, dans les conditions utilisées, la 4-(trifluorométhyl)aniline (**41** ; 1,2 eq.) n'arrive pas à s'additionner sur l'intermédiaire **40** (1,0 eq.) pour former l'analogue **42**. D'autres conditions expérimentales doivent être explorées.

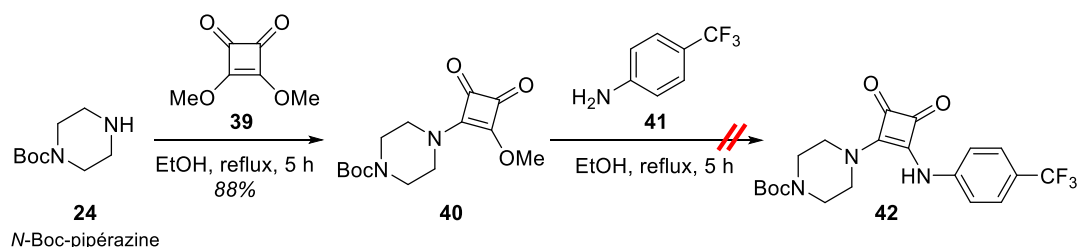


Schéma 56.

²²¹ (a) Marchetti, L. A.; Kumawat, L. K.; Mao, N.; Stephens, J. C.; Elmes, R. B. P. The versatility of squaramides: from supramolecular chemistry to chemical biology. *Chem* **2019**, 5, 1398-1485; (b) Agnew-Francis, K. A.; Williams, C. M. Squaramides as bioisosteres in contemporary drug design. *Chem. Rev.* **2020**, 120, 11616-11650.

Enfin, les analogues de 4-amino-pipéridine sont formés à partir de la 4-(*N*-Boc-amino)pipéridine (**43**), ou de la 4-amino-1-Boc-pipéridine (**44**), par addition de l'isocyanate 4-(trifluorométhyl)phényle (**45**), conduisant respectivement aux dérivés **46** et **48**. Les rendements sont quantitatifs sur ces étapes. Le clivage du groupement Boc par le TFA mène respectivement aux composés **47** et **49** avec des rendements de l'ordre de 70% (Schéma 57).

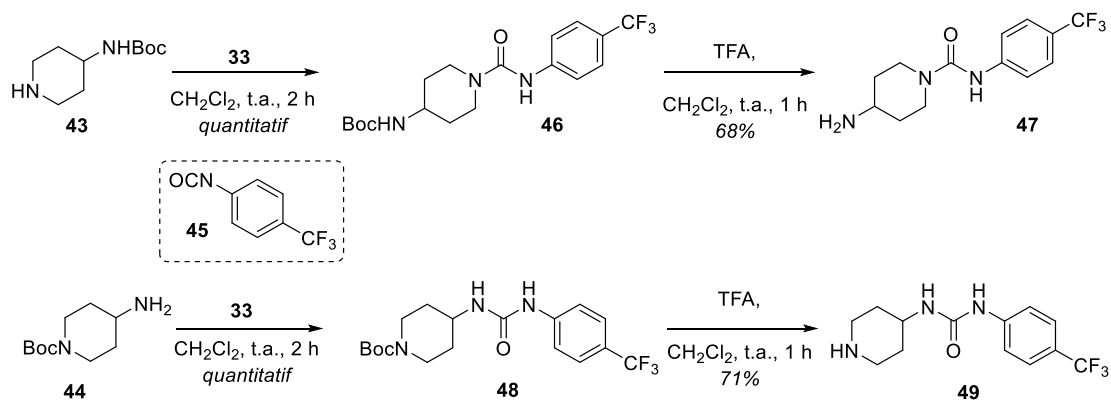


Schéma 57.

b) Synthèse des composés finaux

Une fois isolés, les analogues de pipérazine et 4-aminopipéridine **35**, **38**, **47** et **49** sont engagés dans la réaction de couplage avec l'intermédiaire benzimidazole chloré sous les mêmes conditions opératoires mentionnées précédemment, menant aux composés **50a-d** (Schéma 58).

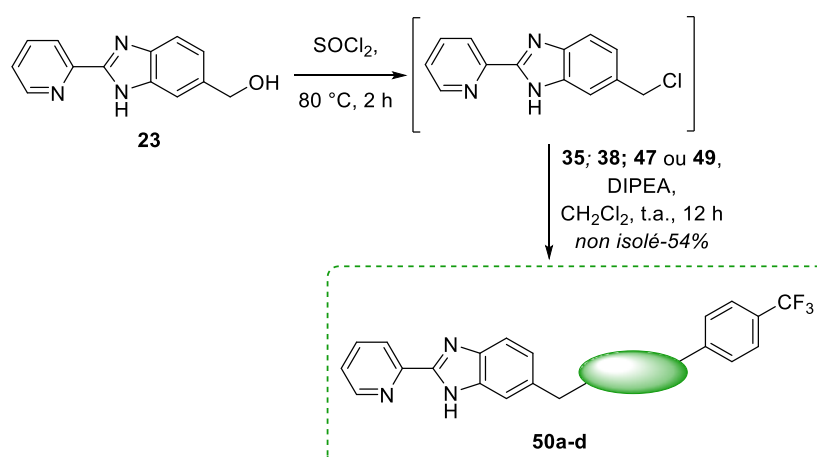


Schéma 58. Formation des analogues 50a-b

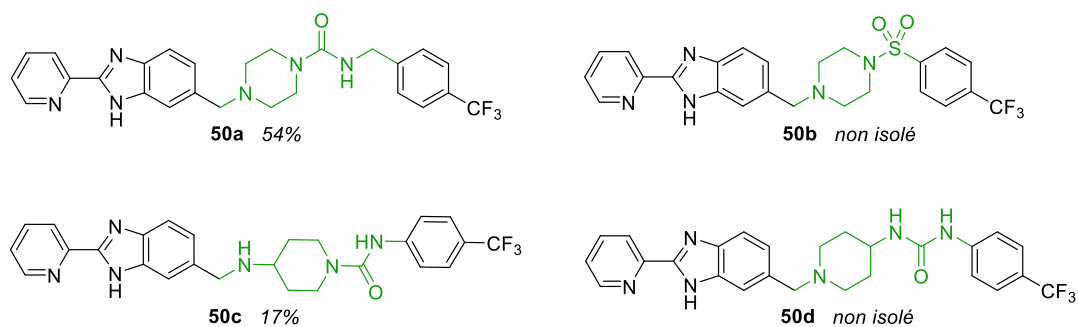


Figure 58. Composés finaux obtenus pour cette série

Sauf pour le composé **50a** qui a été isolé avec un rendement correct de 54%, la purification des autres analogues a été difficile (Figure 58). Ainsi le composé **50c** a été difficilement obtenu avec un rendement de 17%. Les composés **50b** et **50d** ont bien été observés par LC-MS, mais ces derniers requièrent des conditions HPLC pour pouvoir être convenablement purifiés. Les tentatives sur chromatographie flash en phase inverse n'ont pas été concluantes. Par contrainte de temps, ces derniers n'ont pas été isolés, laissant uniquement deux nouveaux analogues compléter la série précédente. Le nombre total de dérivés benzimidazole finaux obtenus par ces travaux s'élève à **13**. Les tests biologiques ont montré que les composés **50a** et **50c** ont également une activité antagoniste intéressante ($IC_{50}(\mathbf{50a}) = 2.36 \mu\text{M}$, $IC_{50}(\mathbf{50c}) = 2.61 \mu\text{M}$), néanmoins inférieures à celle du composé **15** ($IC_{50} = 1.23 \mu\text{M}$). Ce dernier reste le plus actif de toute la série des dérivés de 1*H*-benzimidazole.

I.3-3) Vers la synthèse de dimères

Comme nous l'avons expliqué plus tôt dans ce chapitre, si un motif hétérocyclique est identifié comme biologiquement actif lors des criblages, il est alors intéressant d'explorer la formation de dimères de cette molécule et d'observer l'activité biologique résultante de ces nouvelles structures.²²² Ceci est valable, aussi bien pour une activité agoniste, que pour une activité antagoniste apparente. Nous nous sommes alors intéressés à la synthèse de dimères à partir des analogues synthétisés. L'approche la plus simple à mettre en œuvre consiste à relier deux noyaux benzimidazole *via* leur amine secondaire par une chaîne aliphatique. Cette synthèse peut se faire par une double substitution sur un dihalogénure d'alkyle, en une ou deux étapes.

Un essai de dimérisation de l'ester **21** (2.0 eq.) en présence de 1,3-dibromopropane ou 1,3-DBP (1.0 eq.) et de K₂CO₃, a été mené dans le DMF à température ambiante ou à 50 °C. Néanmoins, aucune conversion de l'ester n'a été observée soit en produit dimérique **51**, soit en un quelconque produit de *N*-alkylation (Schéma 59).

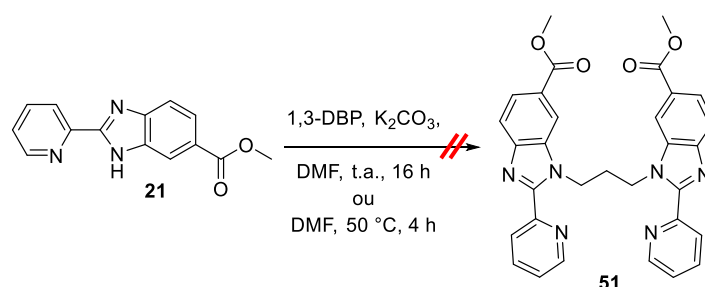


Schéma 59.

Ce test montre ainsi le faible pouvoir nucléophile de l'amine secondaire du benzimidazole.

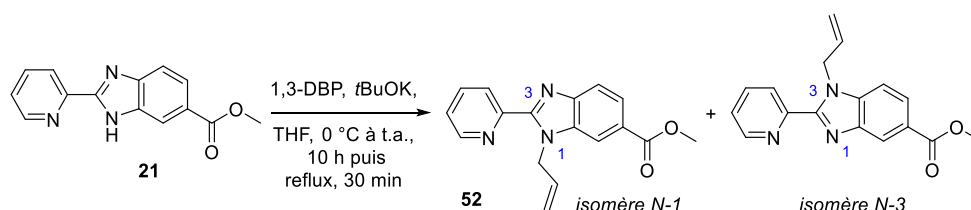


Schéma 60.

Le tBuOK est alors employé pour former l'amidure correspondant, plus réactif, sans saponifier la fonction ester. Sont ajoutés 1,5 eq. de 1,3-DBP à 0 °C puis le milieu est laissé à réagir en revenant lentement à température ambiante sur 10 heures (Schéma 60) ; aucune conversion de l'ester n'est observée. Après un reflux de 30 minutes à 75 °C, le composé **21** est finalement entièrement converti en un mélange inséparable de régioisomères *N*-1 et *N*-3 du *N*-allylbenzimidazole **52**, issus de la substitution puis de l'élimination des atomes de brome de la chaîne propane.

²²² Paquin, A.; Reyes-Moreno, C.; Bérubé, G. Recent advances in the use of the dimerization strategy as a means to increase the biological potential of natural or synthetic molecules. *Molecules* **2021**, 26, 2340-2371.

L'obtention de ce mélange confirme ainsi nos hypothèses, et cette voie n'est pas adaptée à la synthèse d'analogues dimériques à partir de nos composés :

- L'amine portée par le benzimidazole est peu nucléophile du fait de la délocalisation électronique (causée par l'aromaticité du noyau), donc peu réactive vis-à-vis d'un halogénure d'alcane pour une étape de substitution.
- En raison de la délocalisation électronique, le noyau benzimidazole existe sous deux formes tautomères stables. Une réaction de *N*-alkylation mène inévitablement à l'obtention d'un mélange de régioisomères *N*-1 et *N*-3. Transposé au dihalogénure d'alkyle, quatre isomères vont alors être obtenus : le *N*-1-*N*-1, le *N*-1-*N*-3, le *N*-3-*N*-1 et le *N*-3-*N*-3.

Une autre stratégie pourrait consister en l'insertion du lien aliphatique en début de synthèse, avant que le squelette benzimidazole ne soit construit.²¹³

II) Composés portant un squelette d'oxazolo[5,4-*d*]pyrimidine

L'objectif de ce projet étant de proposer une diversité structurale plus large afin de développer les chimiothèques autour de la recherche de ligands agonistes de STING, une seconde structure hétérocyclique est explorée : le noyau oxazolo[5,4-*d*]pyrimidine. Ce motif est connu pour être un mime du noyau benzimidazole. Des travaux préliminaires au sein du laboratoire²¹² et dans la littérature,²⁰⁷⁻²⁰⁹ ont mis en évidence le potentiel thérapeutique de cette charpente qui tend à être de plus en plus explorée. Les séries produites ont alors leur propre rationnel, puisque leur synthèse est concomitante à celle des analogues de benzimidazole précédents.

II.1) Stratégie de synthèse

Il est envisagé dans un premier temps de développer une série de composés basés sur le squelette 5-chloro-2-aryloxazolo[5,4-*d*]pyrimidine **A** développé au sein du laboratoire (Schéma 61).

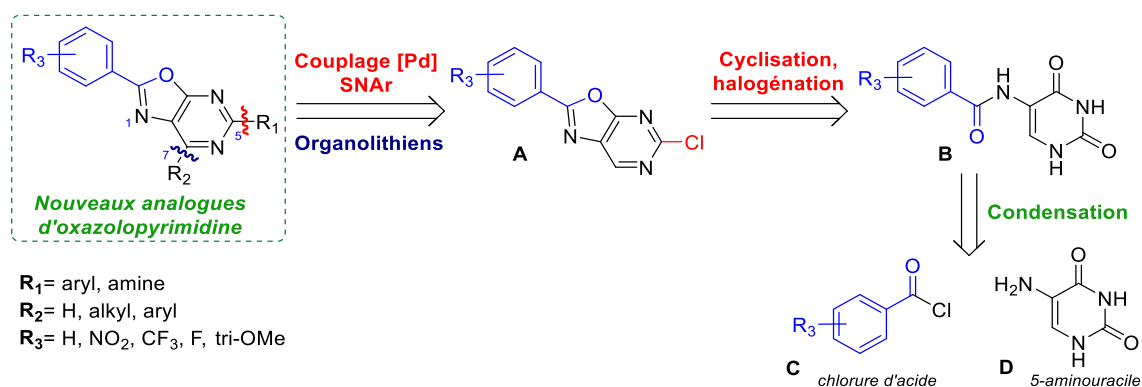


Schéma 61. Rétrosynthèse des dérivés d'oxazolopyrimidine

Les analogues peuvent alors être issus de la fonctionnalisation en position 5 par couplage palladé ou SNAr du 5-chloro-2-aryloxazolo[5,4-*d*]pyrimidine **A**, ou bien par addition d'organolithiens en position 7. Le précurseur **A** est obtenu à partir d'une cyclisation et halogénéation du synthon **B**, formé à partir de la condensation entre un chlorure d'acide **C** et la 5-aminouracile **D**.

II.2) Résultats et discussion

Dans un premier temps, nous avons développé une première série de composés portant un squelette 2-phényloxazolopyrimidine. La variation des groupements aromatiques en position C-2 sera envisagée ultérieurement lors de ce projet. Parmi les nombreuses méthodes décrites pour synthétiser un noyau oxazolopyrimidine,²⁰⁷⁻²⁰⁹ celle partant du chlorure de benzoyle (**53**) et la 5-aminouracile (**54**), a été suivie. Le produit de condensation du chlorure d'acide sur l'amine est obtenu, selon une procédure décrite par Gruenwald en 1899,²²³ par addition du chlorure de benzoyle à une suspension de 5-aminouracile en solution aqueuse de NaOH (pH= 10) à 0 °C (Schéma 62). L'intermédiaire amide **55** est alors obtenu de manière quantitative. Ce dernier est engagé dans une étape de cyclisation et d'halogénéation dans l'oxychlorure de phosphore (POCl₃) à reflux (120 °C), durant 4 heures, suivant les conditions d'Elion *et al.*²²⁴ Le composé cyclique halogéné **56** est alors synthétisé avec 60% de rendement.

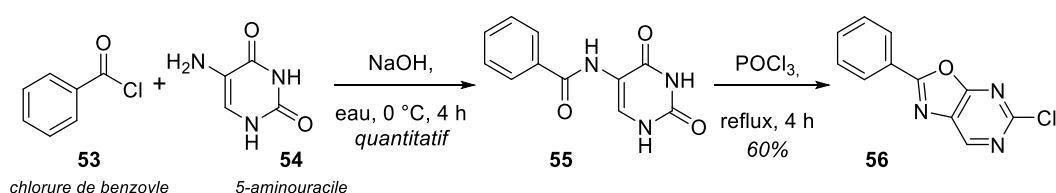


Schéma 62. Formation du 5-chloro-2-phényloxazo[5,4-d]pyrimidine d'après Gruenwald et Elion

Le 5-chloro-2-phényloxazo[5,4-d]pyrimidine **56** est ensuite fonctionnalisé en position C-7 à l'aide du méthyle lithium, conduisant au 7-méthyl-2-phényloxazolopyrimidine **58** en deux étapes (Schéma 63). L'addition de l'organolithien se fait de manière régiosélective en position C-7, en passant par un intermédiaire réduit **47**, qui peut être isolé sous la forme d'un mélange racémique. La ré-aromatisation du cycle se déroule avec du MnO₂ à reflux dans le CH₂Cl₂. Le dérivé aromatique **58** est alors obtenu avec un rendement de 64% sur les deux étapes.

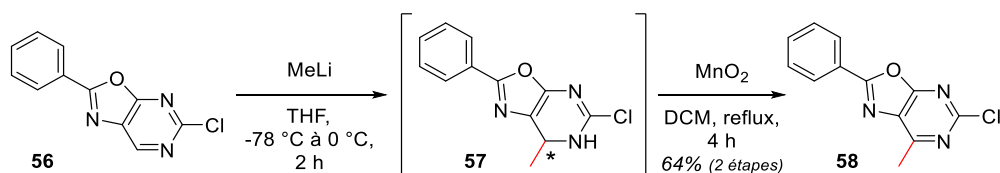


Schéma 63. Réactivité du 5-chloro-2-phényloxazo[5,4-d]pyrimidine vis-à-vis d'un organolithien

Les deux intermédiaires chlorés **56** et **58** ont été, par la suite, engagés dans des couplages palladés de type Suzuki-Miyaura et Stille, pour être substitués par des groupements de type aryle en position C-5.

II.2-1) Insertion de motifs aromatiques par couplages palladés de type Suzuki-Miyaura et Stille

²²³ Behrend, R.; Gruenwald, M. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1899**, 309, 259.

²²⁴ Falco, E. A.; Elion, G. B.; Burgi, E.; Hitchings, G.H. Studies on condensed pyridine systems. Some 1,3-oxazo(5,4-d)pyrimidines. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, 74, 4897-4902.

Le substrat chloré **56** est initialement engagé dans une réaction de couplage de type Suzuki-Miyaura, en présence d'acide phénylboronique, sous des conditions classiques (Schéma 64).²²⁵ Un court travail de mise au point sur les conditions réactionnelles a été mené (Tableau 20).

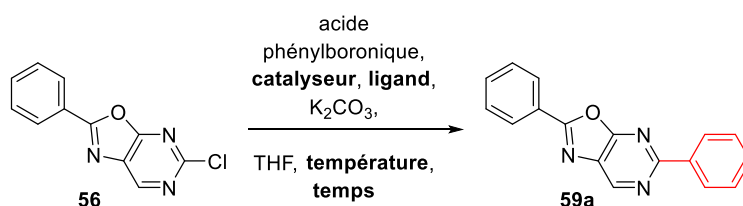


Schéma 64.

Entrée	Catalyseur (quantité)	Ligand (quantité)	Température	Temps	Rendement 47a
1	Pd(OAc) ₂ (10 mol%)	PPh ₃ (20 mol%)	70 °C	10 h	25%
2	Pd(PPh ₃) ₄ (10 mol%)	-	70 °C	10 h	48%
3	Pd(PPh ₃) ₄ (10 mol%)	AsPh ₃ (20 mol%)	70 °C	6 h	88%
4	Pd(PPh ₃) ₄ (5 mol%)	AsPh ₃ (20 mol%)	70 °C	6 h	94%
5	Pd(PPh ₃) ₄ (5 mol%)	AsPh ₃ (20 mol%)	90 °C (micro-onde ; 26 W)	1 h	63%

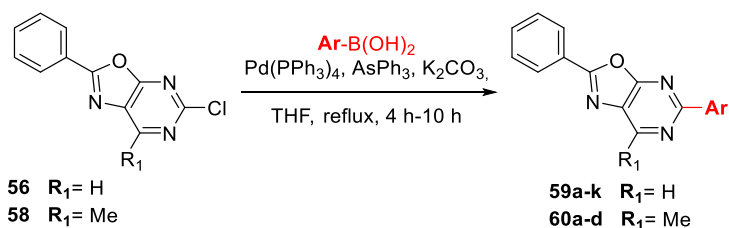
Tableau 20. Conditions de couplage de Suzuki testées sur le dérivé **56**

Nous avons tout d'abord utilisé le Pd(OAc)₂ comme pré-catalyseur en présence de triphénylphosphine (entrée 1), puis le Pd(Ph₃)₄ (entrée 2). Après un long chauffage de 10 h à 70°C dans le THF, la conversion du dérivé chloré en produit de couplage n'est pas totale, les rendements de produit diphenyle **59a** étant respectivement de 25% et 47%. L'addition de triphénylarsine (entrée 3) permet d'augmenter l'activité et la réactivité du catalyseur. Cela favorise en effet l'insertion du complexe dans la liaison halogène-carbone lors de l'étape d'addition oxydante,²²⁶ puisque le chlorure du dérivé **56** est désactivé dans ce système oxazolopyrimidine. Le composé **59a** est alors obtenu avec 88% de rendement par l'utilisation de ce ligand, après 6 heures de reflux dans le THF. À la suite de ce résultat, un test où la quantité de catalyseur est divisée par deux (entrée 4), permet d'obtenir un résultat similaire où le produit **56** est synthétisé avec 94% de rendement. Un essai à 90 °C, utilisant le chauffage par micro-onde, permet de réduire le temps réactionnel à 1 heure : l'analogue **59a** a été obtenu avec 63% de rendement.

Les conditions opératoires retenues sont celles de l'entrée 4 (Tableau 20), afin d'entreprendre la dérivatisation des composés **56** et **58** par des substituants aromatiques (Schéma 65).

²²⁵ Travaux internes au laboratoire du Dr. Franck Amblard (non publiés)

²²⁶ (a) Farina, V.; Krishnan, B. Large rate accelerations in the Stille reaction with tri-2-furylphosphine and triphenylarsine as palladium ligands: mechanistic and synthetic implications. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 9585-9595; (b) Farina, V. New Perspectives in the cross-coupling reactions of organostannanes. *Pure Appl. Chem.* **1996**, 68, 73-78.

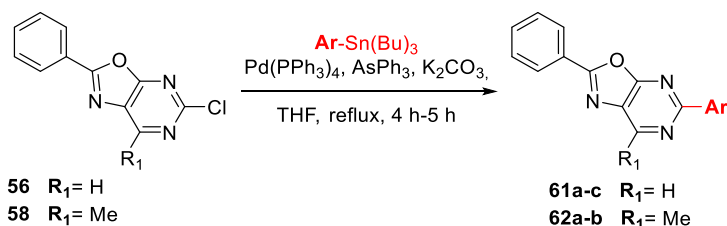


Entrée	Substrat	Aryl	Produit	Observation/Rdt.
1	56		59a	94%
2	56		59b	87%
3	56		59c	86%
4	56		59d	87%
5	56		59e	78%
6	56		59f	89%
7	56		59g	Dégradations Non isolé
8	56		59h	Pas de réactivité
9	56		59i	Pas de réactivité
10	56		59j	Pas de réactivité
11	56		59k	Pas de réactivité
12	58		60a	95%
13	58		60b	85%
14	58		60c	92%
15	58		60d	97%

Schéma 65. Couplages de Suzuki

Malgré ces résultats encourageants, aucune réactivité n'a pu être observée lors de l'utilisation des conditions décrites précédemment avec des acides arylboroniques acétylé (entrée 7), hydroxylé (entrée 8), halogéné (entrée 9), nitré (entrée 10), ou le thiényl-2-acide boronique (entrée 11). L'obtention de dérivés possédant un cycle fonctionnalisé montre le besoin d'une protection de ces fonctions comme le montre l'obtention des composés **59c** et **59d** avec des rendements respectifs de 86% et 87 % (entrées 3 et 4). Ces conditions expérimentales de couplage de Suzuki ont l'avantage d'être transposables au couplage de Stille,

qui rendent possible l'introduction d'hétérocycles fonctionnalisés tels que le thiophène, le furane ou la pyridine (Schéma 66).



Entrée	Substrat	Aryl	Produit	Observation/Rdt.
1	56		61a	Pas de réactivité
2	56		61b	89%
3	56		61c	65%
4	58		62a	92%
5	58		62b	87%

Schéma 66. Couplages de Stille

Dans ces conditions, seuls les aryl-étains électroniquement riches (*i.e.* furane et thiophène) ont conduit aux produits de couplage désirés, avec des rendements allant de 65% à 92% (entrée 2 à 5). Cela indique que la présence d'un groupe électrodonneur favorise l'étape de trans-métallation lors de la réaction, alors qu'un groupe électro-attracteur va plutôt défavoriser cette étape déterminante du cycle catalytique, comme c'est le cas avec la pyridine où aucun couplage n'a été observé.

Ces dérivés de 5-aryl-2-phényloxazo[5,4-*d*]pyrimidine, au nombre de 14, constituent une première chimiothèque d'analogues où la variation des substituants est positionnée en C-5 et C-7. Ces derniers ont tous été testés biologiquement en tant qu'agoniste ou antagoniste, mais aucun d'entre eux ne présente d'activité biologique significative (Voir V.1-1)-b)

*Evaluation biologique de la série de dérivés portant un squelette oxazo[5,4-*d*]pyrimidine*, Figure 68). Par ailleurs, il a été observé que ces composés ont une faible solubilité dans le DMSO et l'eau, : ceci est dû à un caractère hydrophobe plutôt prononcé, dont nous pouvons en avoir une estimation par le calcul des log(P) sur Chemdraw (valeurs supérieures à 4,0 en moyenne, à l'exception du composé **61b**, log(P) = 2.93, et **62a**, log(P)= 3.63). En vue d'augmenter la solubilité aqueuse de nos composés, nous nous sommes tournés vers l'insertion par SNAr de groupements plus hydrophiles, en position C-5. La position C-7 quant à elle n'est favorable qu'à des fonctionnalisations par addition d'organolithiens.

II.2-2) Insertion d'amines par substitution nucléophile aromatique (SNAr)

Le dérivé chloré **56** est engagé en présence de différents dérivés de pipéridine, pipérazine, morpholine et diamine-aliphatique (2,5 eq.) dans une réaction de SNAr afin d'être substitué en position C-5.²¹⁴ Après 10 heures à 110 °C dans le toluène (conditions a), les dérivés 5-amino **63a-k** sont isolés avec des rendements allant de 65% à 99% (Schéma 67). Les couplages de **56** avec la L-proline et la L-alanine (entrées 12 et 13) ont été testés en présence de Cs₂CO₃ comme base, dans le toluène à 110 °C durant 10 heures (conditions b). Néanmoins, seul le dérivé proline **63m** a été obtenu : aucune conversion n'a été observée par CCM lors du couplage avec la L-alanine.

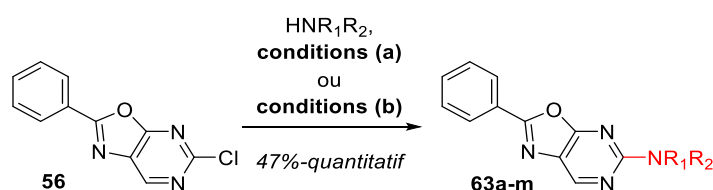


Schéma 67.

Entrée	HR ₁ R ₂	Conditions*	Ar-NR ₁ R ₂	Produit	Rdt.
1	pipéridine	a		63a	65%
2	morpholine	a		63b	82%
3	1-acétylpipérazine	a		63c	75%
4	1-méthylpipérazine	a		63d	73%
5	N-Boc-pipérazine	a		63e	64%
6	4-(N-Boc-amino)pipéridine	a		63f	85%
7	4-amino-1-Boc-pipéridine	a		63g	99%
8	1,3-diaminopropane	a, b		63h	Non isolé
9	1,4-diaminobutane	a, b		63i	Non isolé
10	1-(4-(trifluorométhyl)benzyl)pipérazine	a		63j	67%
11	N-Boc-1,3-diaminopropane	a		63k	92%
12	L-alanine	b		63l	0%
13	L-proline	b		63m	47%

*Conditions : (a) Amine (2,5 eq.), toluène, 110 °C, 10 h ; (b) Amine (2,0 eq.), Cs₂CO₃ (4,0 eq.), toluène, 110 °C, 10 h.

L'utilisation de la 1,3-diaminopropane ou 1,4-diaminobddiaminobutane (entrées 8 et 9) conduit, sous les conditions (a) et (b), à un mélange complexe, observé par LC-MS, du produit désiré de substitution, du produit de dimérisation, et des produits de dégradation. La purification de ces composés étant difficile, nous avons décidé de protéger la diamine avec un Boc (entrée 11). D'autres précurseurs diamines sont protégés par une fonction Boc pour être régiosélectivement additionnés sur le substrat, et former la liaison C-N désirée (*i.e.* 4-(*N*-Boc-amino)pipéridine et 4-amino-1-Boc-pipéridine, entrées 6 et 7). Le groupement Boc des produits **63e**, **63f**, **63g** et **63k** est alors clivé en présence de TFA et permet l'obtention des dérivés amino correspondants **63h** et **64a-c** avec des rendements supérieurs à 80% (Schéma 68).

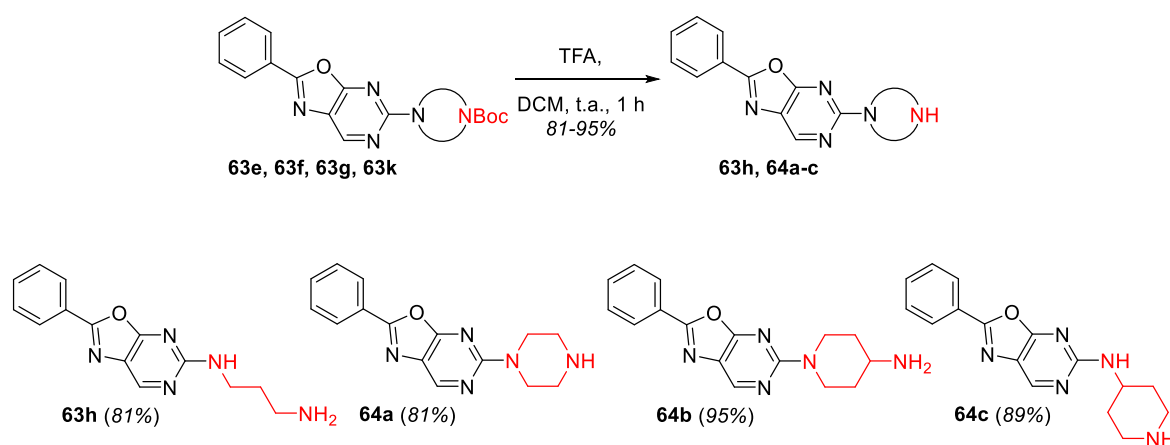


Schéma 68.

En vue de proposer une diversité moléculaire plus variée, une partie des produits issus de ce travail ont été engagés dans une post-fonctionnalisation de leur fonction amine primaire ou secondaire. Le groupement choisi est celui qui a montré la meilleure activité biologique en série 1*H*-benzimidazole, c'est-à-dire le motif *N*-(4-(trifluorométhyl)phényl)carboxamide. Les précurseurs amino **63g** et **64a-d** ont alors été mis à réagir sur l'isocyanate 4-(trifluorométhyl)phényle **33** pour fournir les dérivés carboxamides attendus (Schéma 69).

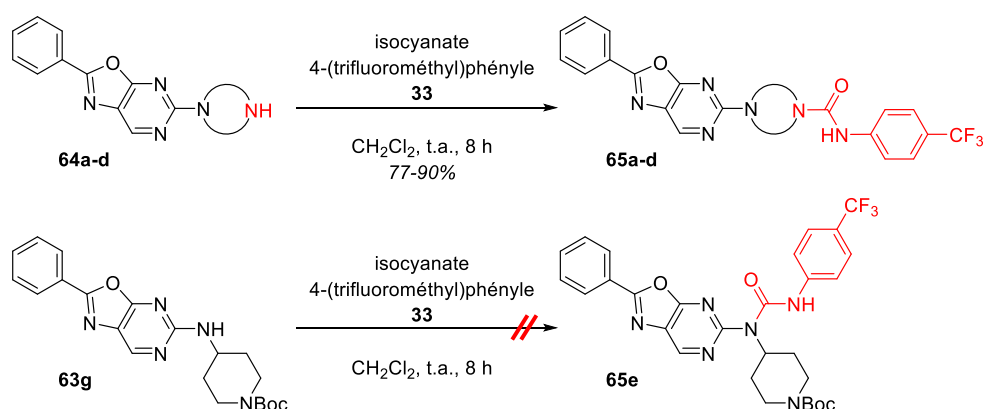
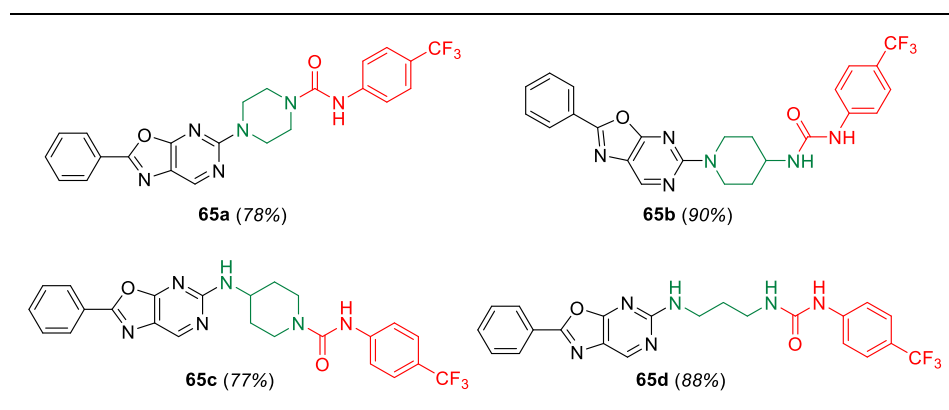


Schéma 69.



Ces analogues d'oxazolo[5,4-*d*]pyrimidine **65a-d** ont été isolés, pour la grande majorité, avec de très bons rendements (78-90%). Seule l'addition de l'isocyanate sur le substrat **63g** s'effectue difficilement sur l'azote en *N*-5 dans ces conditions. La délocalisation de la charge due au motif guanidine explique la faible nucléophilie de cet azote et, par conséquent, son manque de réactivité vis-à-vis d'un fort électrophile comme l'isocyanate. Ces essais de pharmaco-modulation par SNAr autour du squelette oxazolopyrimidine a permis de constituer **une chimiothèque de 18 composés originaux**.

II.2-3) Formation de précurseurs *N*-(2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-5-yl)arylamide

Parmi les structures synthétisées d'amino-oxazolopyrimidine, l'analogue **65c** présente une structure assez proche des composés benzimidazole **15** et **50c** (Figure 59). Cependant, il apparaît nécessaire d'insérer un motif pyridin-2-yl en position C-2 du motif oxazolopyrimidine pour pouvoir parfaitement comparer l'influence de ce squelette vis-à-vis du noyau 1*H*-benzimidazole, même si la pyridin-2-yl est un isostère du phényle.²²⁷

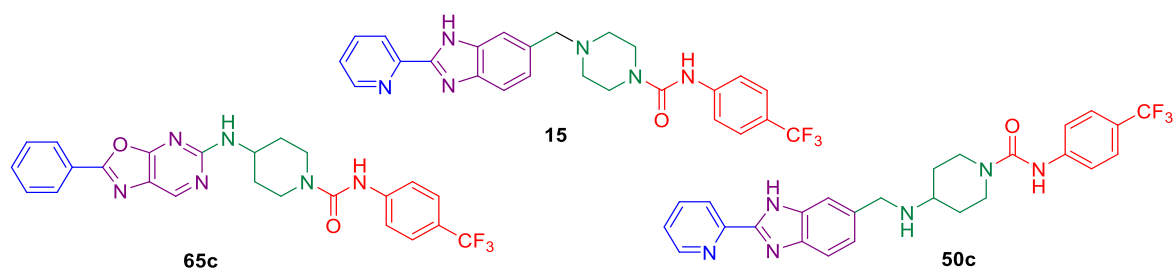


Figure 59. Analogues d'oxazolopyrimidine et benzimidazole structurellement proches

Nous avons donc envisagé d'apporter de la diversité structurale en position C-2 du squelette oxazolopyrimidine par l'insertion d'autres groupements aromatiques en partant de la 5-aminouracile. L'intérêt est de synthétiser des précurseurs *N*-(2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-5-yl)arylamide originaux, qui peuvent présenter des structures intéressantes pour l'exploration de ligands agonistes de

²²⁷ Subbaiah, M. A. M.; Meanwell, N. A. Bioisosteres of the phenyl ring: recent strategic applications in lead optimization and drug design. *J. Med. Chem.* **2021**, 64, 14046-14128.

STING, ainsi que proposer de nouvelles substitutions au squelette une fois l'étape de cyclisation/halogénéation réalisée. Il existe toutefois deux problèmes majeurs :

- La 5-aminouracile est un réactif uniquement soluble dans des solutions aqueuses acides ou basiques,²²⁸ ce qui rend son utilisation dans les solvants organiques usuels plus délicate.
- La solution de NaOH, utilisée comme solvant de réaction, n'est pas compatible avec l'ensemble des chlorures d'acide, notamment ceux étant sous forme solide, comme le chlorure de 4-nitrobenzoyl **66**. Dans ces conditions, les chlorures de benzoyl vont s'hydrolyser plus rapidement en acide benzoïque, que réagir avec le sel de 5-aminouracile, menant à l'obtention des amides intermédiaires en faible quantité (Schéma 70).

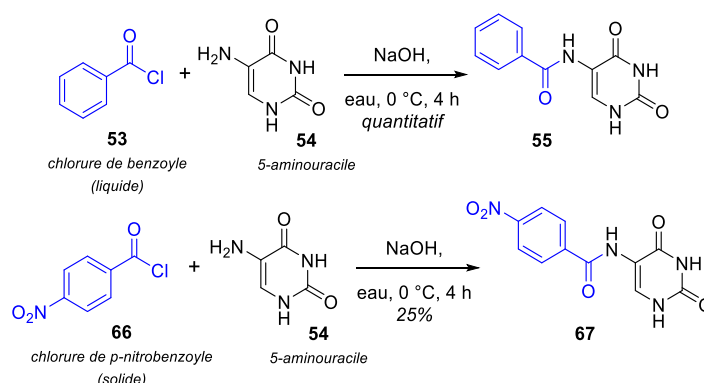


Schéma 70. Réactivité de différents chlorures de benzoyl

L'utilisation de la pyridine comme solvant,²²⁹ à température ambiante, ne permet pas d'accéder aux amides **55** et **67** après 8 heures de réaction. Un chauffage à reflux de 6 heures n'a pas permis une meilleure conversion de la 5-aminouracile en l'amide désiré (Schéma 71).

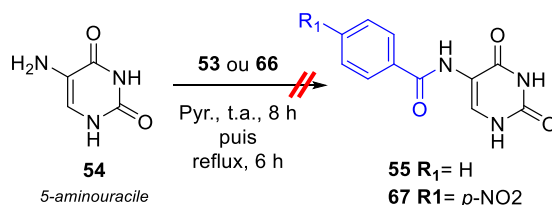


Schéma 71.

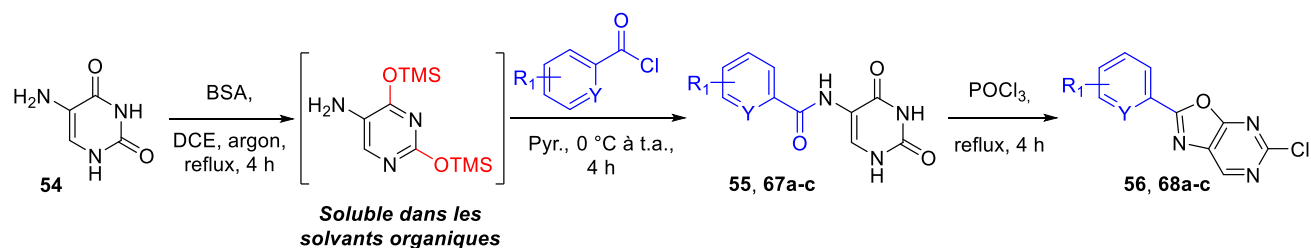
Pour contourner ce problème de solubilité, nous nous sommes intéressés aux conditions décrites par Kumar *et al.*²³⁰ La 5-aminouracile est préalablement silylée avec le BSA dans le DCE anhydre (Schéma 72). L'intermédiaire silylé **68** est alors entièrement soluble dans le solvant organique après 4 heures de reflux à 100 °C. Le milieu réactionnel est alors refroidi à température ambiante, puis le chlorure de benzoyl est ajouté

²²⁸ (a) Lide, D. R.; Baysinger, G.; Chemistry, S.; Berger, L. I.; Goldberg, R. N.; Kehiaian, H. V. CRC Handbook of chemistry and physics **2007**, 87th Edition; (b) Shaker, R. M.; Elrady, M. A.; Sadek, K. U. Synthesis, reactivity, and biological activity of 5-aminouracil and its derivatives. *Mol. Divers.* **2016**, 20, 153-183.

²²⁹ Roblin, R. O. Jr.; Winneck, P. S.; English, J. P. Studies in chemotherapy. IV. Sulfanilamidopyrimidines. *J. Am. Chem. Soc.* **1942**, 64, 567-570.

²³⁰ (a) Semaine, W.; Johar, M.; Tyrrell, D. L.; Kumar, R.; Agrawal, B. Inhibition of hepatitis B virus (HBV) replication by pyrimidines bearing an acyclic moiety: effect on wild-type and mutant HBV. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 2049-2054; (b) Srivastav, N. C.; Manning, T.; Kunimoto, D. Y.; Kumar, R. Studies on acyclic pyrimidines as inhibitors of mycobacteria. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, 15, 2045-2053.

en présence de l'intermédiaire **68** et de pyridine, pour former les dérivés amide **67a-d** avec des rendements supérieurs à 65%.



Entrée	Aryle	Intermédiaire amide	Rdt.	Produit de cyclisation	Rdt.
1		55	98%	56	69%
2		67a	85%	68a	65%
3		67b	91%	68b	74%
4		67c	69%	68c	0%

Schéma 72.

Une fois les dérivés *N*-(2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-5-yl)arylamide isolés, ces derniers sont engagés dans la réaction de cyclisation/halogénéation sous reflux de POCl₃. Le produit cyclique a été obtenu avec de bons rendements dans le cas du 2-phényloxazolopyrimidine **68a** (montrant la fiabilité de cette nouvelle voie synthétique, par rapport à celle suivie précédemment), du 2-(4-nitrophényl)oxazolopyrimidine **68b** et du 2-(3,4,5-triméthoxyphényl)oxazolopyrimidine **68c**. Engagé sous un reflux de POCl₃, l'intermédiaire amide **67d** semble se dégrader, car ni le 2-(pyridin-2-yl)oxazolopyrimidine **68d**, ni un autre produit n'a été isolé.

Pour vérifier que le motif pyridin-2-yl empoisonne la réaction, un dernier test a été réalisé sous les conditions décrites par Hurst (Schéma 73).²³¹

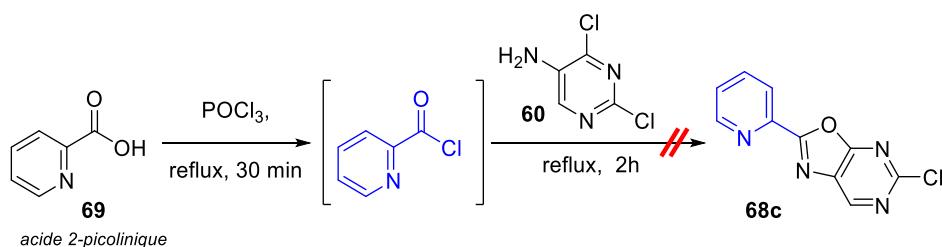


Schéma 73. Essai de cyclisation entre l'acide 2-picolinique **57** et la 2,6-dichloro-5-aminopyrimidine **58**

²³¹ (a) Hurst, D. T.; Atcha, S.; Marshall, K. L. The synthesis of some thiazolo- and oxazolo-[5,4-d]pyrimidines and pyrimidinylureas. II. *Aust. J. Chem.* **1991**, 44, 129-134; (b) Roth, G. J.; Fleck, M.; Lehmann-Lintz, T.; Neubauer, H.; Nosse, B. Piperidine derivatives and their use for the treatment of metabolic disorders. **2012**, WO/2012/001107.

Lors de cet essai, la formation du produit **68c** n'a pas été observée, ni celle d'un intermédiaire amide. L'état du produit obtenu suggère également qu'une réaction de dégradation a eu lieu au cours de la réaction (solide noir), ou lors des traitements d'hydrolyse du milieu : aucune espèce n'a pu être clairement identifiée. Il est possible d'envisager une réaction de déshydratation de la fonction amide, due à la présence du motif pyridine dans le POCl₃, qui empêche alors la cyclisation de l'amide intermédiaire par formation d'une imine. D'autres conditions de cyclisation doivent donc être explorées afin de synthétiser un oxazolopyrimidine portant en C-2 un motif pyridin-2-yl.²⁰⁷ Ce travail de diversification en position C-2 a permis, pour l'instant, d'obtenir deux autres squelettes oxazolopyrimidine d'intérêt, que sont les composés **68b** et **68c**. L'exploration autour de cette position doit être poursuivie afin d'offrir une plus grande variété de substrats aromatiques.

Nous avons alors introduit quelques modulations à partir du composé 5-chloro-2-(*para*-nitrophényl)oxazo[5,4-*d*]pyrimidine **68b**. Placé dans les conditions de couplage de Suzuki-Miyaura développées précédemment, le substrat **68b** n'est pas couplé à l'acide phényle boronique. Cependant, après un chauffage plus intense à 95 °C durant 2 heures, **68b** est totalement converti, mais le composé réduit est obtenu à la place du produit de couplage **71a** (Schéma 74). Le constat reste le même avec le tributyl-(2-thiényl)étain : le produit de couplage **71b** n'a pas été observé. Par ailleurs, le couplage de **68b** avec la *N*-Boc-pipérazine et la 1-(4-(trifluorométhyl)benzyl)pipérazine dans le toluène à reflux permet d'accéder aux dérivés **72a** et **72b** avec un rendement respectif de 52% et 41%. Néanmoins, il a été observé la formation de nombreux sous-produits à la suite de ces réactions, surtout en comparaison de celles utilisant le 5-chloro-2-phényloxazolopyrimidine **56** comme substrat.

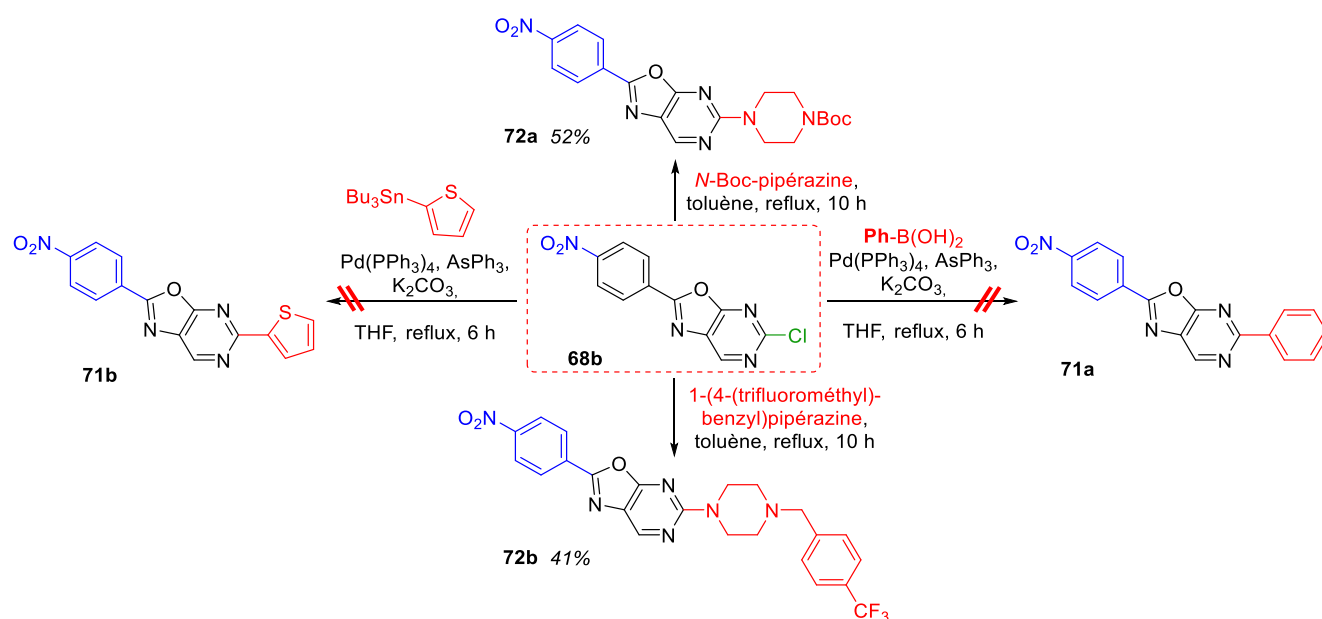


Schéma 74. Premiers essais de réactivité sur le dérivé **56b**

Ce travail préliminaire révèle ainsi un changement de réactivité lors des réactions de couplage, lorsque l'on passe d'un substituant phényle à un *p*-nitrophényle en position C-2 du squelette oxazolopyrimidine, ce qui était attendu. Il semblerait que l'introduction du groupement 4-phénylnitro désactive davantage le caractère nucléofuge du chlore par effet mésomère attracteur. Concernant les réactions de SNAr, si les rendements des produits obtenus restent corrects, un travail d'optimisation est encore à faire. Il est alors possible de se demander si l'effet mésomère attracteur du groupe nitro ne polarise

pas plus la liaison O-C-3a. Le carbone C-3a devient alors plus électrophile, et donc plus facilement sujet aux attaques nucléophiles qui mènent à l'ouverture du cycle oxazole (Schéma 75).²³²

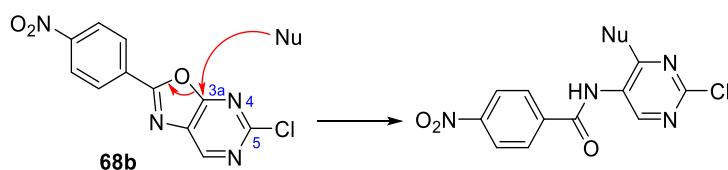


Schéma 75. Ouverture du cycle oxazolopyrimidine par attaque d'un nucléophile

Pour conclure, la méthodologie explorée a permis la formation de **3 dérivés originaux de N-(2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-5-yl)arylamide**. Si les dérivés *p*-nitrophényle et 3,4,5-triméthoxyphényle cyclisent sous reflux de POCl₃, le dérivé pyridin-2-yl, lui, se dégrade. D'autres stratégies de synthèse doivent donc être explorée pour former l'espèce 5-chloro-2-(pyridin-2-yl)oxazolo[5,4-*d*]pyrimidine, proche structurellement de la charpente 1H-benzimidazole explorée en première partie. De plus, la réactivité du squelette 5-chloro-2-(*para*-nitrophényl)oxazolo[5,4-*d*]pyrimidine a rapidement été explorée : **2 composés non-décrits** ont été obtenus par réactions de S_NAr ; les conditions de couplage de Suzuki-Miyaura et Stille mises au point plus tôt lors de ce projet, n'ont pas rendu possible la substitution du chlore en C-5 par des aromatiques simples. D'autres conditions de couplage restent donc à explorer.

²³² Khachatryan, T. A.; Mirzoyan, V. S.; Arsenyan, F. G. New method for the synthesis of some polyfunctional 5-aminopyrimidines. *Chem. Heterocycl. Compd.* **1983**, 19, 100-103.

II.2-4) Synthèse de dimères

Nous nous sommes intéressés à la synthèse de dimères à partir des analogues d'oxazolopyrimidine avant l'obtention des résultats issus du criblage biologique. Nous nous sommes basés ici sur une modélisation *in silico* pour sélectionner, parmi les structures synthétisées ou envisagées, celles potentiellement affines avec le site actif de STING. L'élaboration de ce modèle reste identique à celle suivie dans le chapitre III pour les CDNs. Par ce modèle, chaque composé se voit attribuer un Gscore et un score étoile. Ces valeurs indiquent, respectivement, si la complexation à la cible est favorable, ou non, ainsi que le nombre d'interactions favorables avec les résidus d'acides aminés retenus comme prépondérants dans les interactions avec les ligands connus. Pour les composés hétérocycliques, il est recommandé d'avoir un Gscore inférieur à -3.6 et un score étoile supérieur ou égale à 3. Parmi les structures analysées, voici celles ayant montré le meilleur potentiel (Figure 60) :

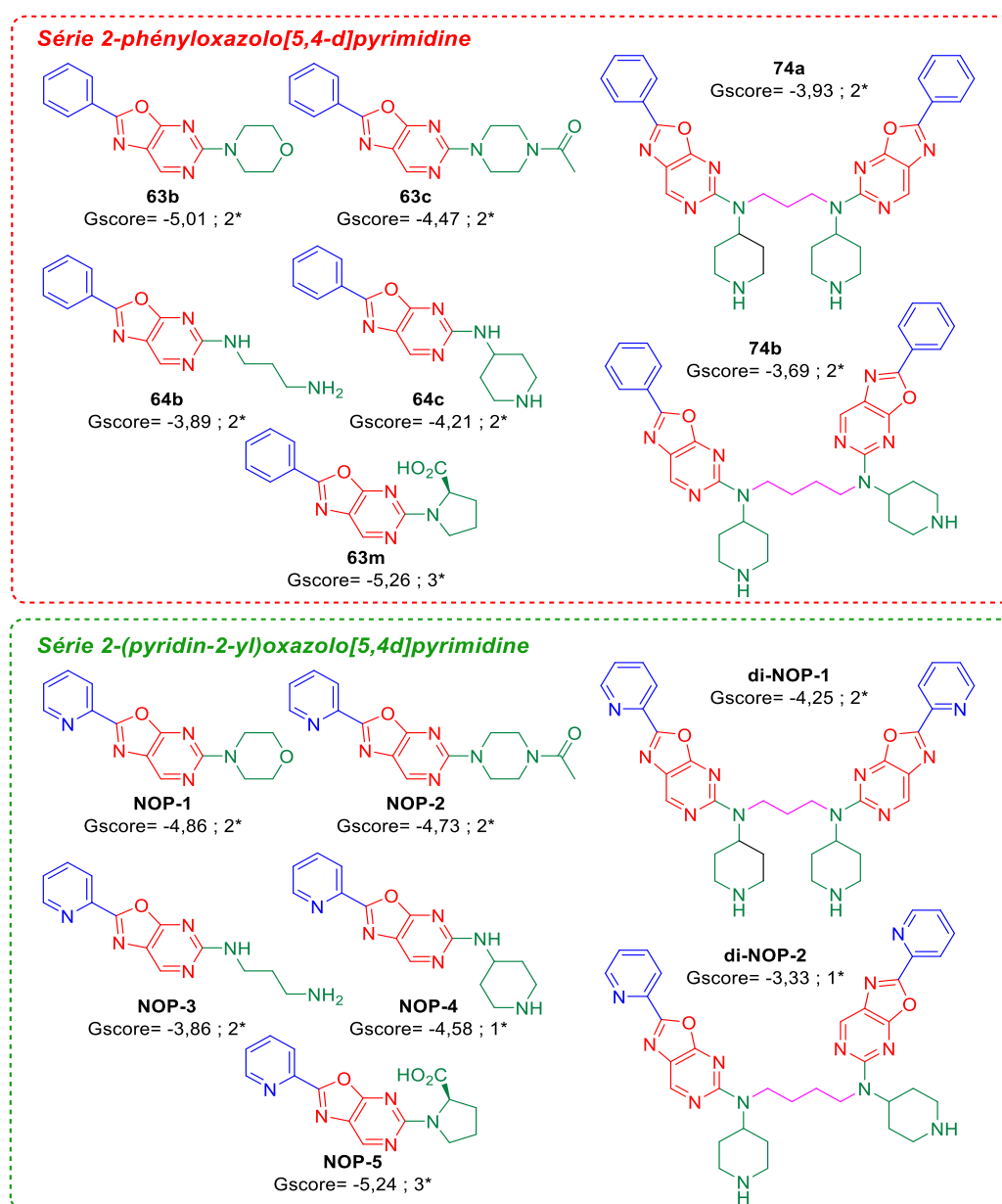


Figure 60. Résultats de modélisation *in silico* sur les dérivés de 2-phényl- et 2-(pyridin-2-yl)-oxazolo[5,4d]pyrimidine

L'approche également mise en œuvre ici, est de relier deux motifs oxazolopyrimidine, en particulier le dérivé **64C**, avec une chaîne alkyle. Cette synthèse peut alors se dérouler *via* une double substitution sur un dihalogénure d'alkyle de l'analogue **63g**, soit de manière simultanée, soit de manière différée. Néanmoins, il a été préalablement observé la faible réactivité du motif aryl-guanidine vis-à-vis d'électrophiles tels l'isocyanate ; réactivité qui peut constituer un verrou majeur à la formation de dimère lors de cette étude. De fait, l'activation par un chauffage intense ou par formation de l'amidure à l'aide d'une base forte seront sûrement requises pour convertir le substrat **63g** en produit de substitution. Les conditions opératoires suivantes sont alors testées dans le but de former en « one-pot » le composé dimérique **73** (Schéma 76).

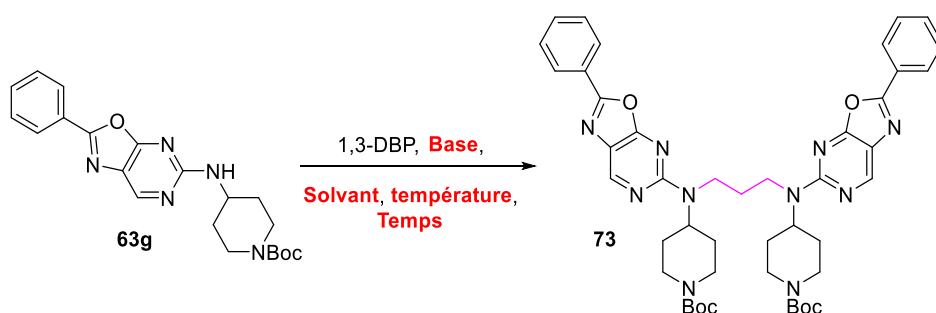


Schéma 76.

Entrée	Base	Solvant	Température	Temps	Conversion de 51g*	Rdt. (73)
1	K ₂ CO ₃ (2,5 eq.)	DMF	t.a.	10 h	Aucune	-
2	K ₂ CO ₃ (2,5 eq.)	DMF	50 °C	10 h	Estimée à 20%	-
3	K ₂ CO ₃ (2,5 eq.)	DMF	70 °C	10 h	Estimée à 40 %	-
4	K ₂ CO ₃ (2,5 eq.)	MeCN	50 °C	10 h	Estimée à 5%	-
5	NaH (2,2 eq.) + TBAI (0,4 mol%)	DMF	0 °C à t.a.	8 h	Aucune	-
6	NaH (2,2 eq.) + TBAI (0,4 mol%)	THF	0 °C à t.a.	8 h	Estimée à 50%	-

Tableau 21. Conditions de double substitution sur le 1,3-DBP (1,0 eq.) en présence de l'intermédiaire **63g** (2,1 eq.) ; observation par CCM et LC-MS*

À température ambiante dans le DMF, et en présence de K₂CO₃, aucune conversion du substrat **63g** n'a été observée après plus de 10 heures de réaction (Tableau 21, entrée 1). C'est à partir de 50 °C, dans les mêmes conditions, qu'un début de conversion a pu être constaté (entrée 2). À 70 °C, une conversion estimée à 40% du substrat est obtenue (entrée 3), toutefois, le produit formé n'est pas le dimère attendu **73** mais le produit de *N*-alkylation, suivi de l'élimination du brome menant au dérivé *N*-allyle **75**. En passant dans un autre solvant comme l'acétonitrile à 50 °C (entrée 4), la conversion du substrat **63g** reste très faible (environ 5%). Il est alors décidé d'activer la guanidine **63g** en formant l'amidure par une base forte : le NaH. Cependant, à 0 °C dans le DMF (entrée 5), le substrat déprotoné n'est pas soluble dans le milieu ; afin de mieux solubiliser les espèces ioniques, du TBAI est ajouté. Après un lent retour à température ambiante (8 heures), la conversion de **63g** n'est pas visible. De manière étonnante, le passage du DMF au THF permet une meilleure dissolution de l'intermédiaire déprotoné. Après 8 heures de réaction avec un lent retour à température ambiante, la conversion du substrat **63g** est estimée à 50% et un produit majoritaire est isolé : ce dernier correspond au produit *N*-allyle **75**, issu de l'élimination du second brome de la chaîne aliphatique. Dans ces conditions, le produit de *N*-allylation est obtenu avec 46% de rendement par rapport au substrat **63g**, mais de manière quantitative vis-à-vis du 1,3-DPB. Le dérivé **75**, dilué dans un mélange TFA/CH₂Cl₂ permet d'obtenir l'amine libre **76** avec 85% de rendement (Schéma 77).

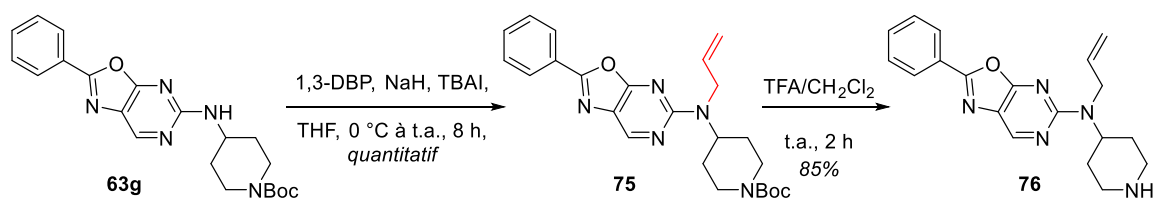


Schéma 77.

Dans l'optique de contourner cette réaction de double substitution sur le dihalogénure d'alkyle par le dérivé **63g**, nous nous sommes intéressés à la formation du di-tert-butyl 4,4'-(propane-1,3-diylbis(azanediy))bis(pipéridine-1-carboxylate) **77** par double addition de la 4-amino-1-Boc-pipéridine **44** sur le 1,3-DBP. Une fois la diamine **77** formée, celle-ci est mise à réagir avec le 5-chloro-2-phényloxazolo[5,4-*d*]pyrimidine **56** pour accéder via une double SNAr à l'analogue dimérique **73** (Schéma 78).

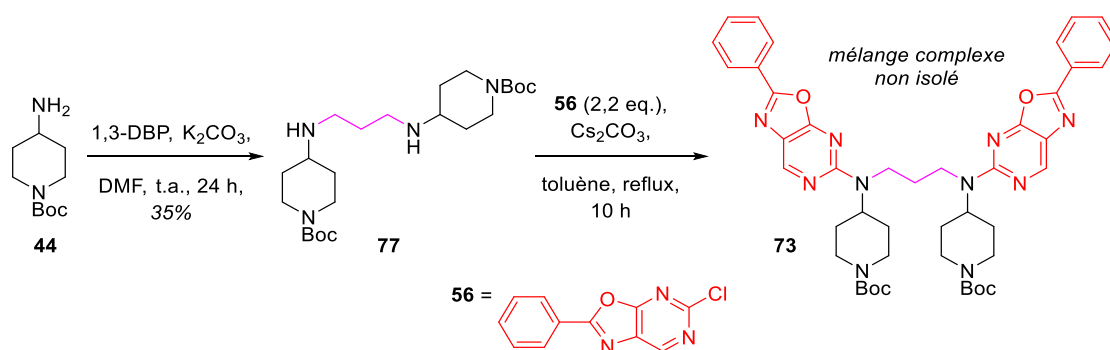


Schéma 78. Seconde stratégie de synthèse du dimère **73**

Si l'aminopipéridine **44** réagit plus facilement à température ambiante dans le DMF en présence de K_2CO_3 , la synthèse de **77** n'est pas plus efficace. Le produit désiré est accompagné d'autres sous-produits, rendant sa purification difficile, aboutissant à un faible rendement de 35%. Ce dernier est ensuite engagé dans la réaction de SNAr avec **56** et le Cs_2CO_3 , dans le toluène à reflux (méthode b explorée dans le paragraphe 2-2). Après 10 h de réaction, le substrat **77** est consommé à hauteur de 90% d'après le suivi LC-MS. Un mélange complexe de produits, dont le **73** fait partie, est malheureusement obtenu. Ce dernier n'a pu être convenablement isolé dans des conditions usuelles de purification. Ces réactions tests menées sur des échelles de l'ordre de la centaine de milligramme, soulignent la difficulté d'accès aux dérivés dimériques *via* ces conditions opératoires. D'autres conditions et stratégies doivent être explorées : une réaction de métathèse croisée entre deux motifs **75** peut être tentée. Cela donnerait accès à la synthèse de dimères reliés entre eux par un lien de type chaîne carbonée insaturée.

En conclusion de cette partie, la modification du squelette 2-phényloxazolo[5,4-*d*]pyrimidine a été explorée autour de la réactivité de ce dernier vis-à-vis de réactions de couplage palladé de type Suzuki-Miyaura et Stille, d'attaque nucléophile par les organolithiens et substitutions nucléophiles aromatiques. Un travail de diversité autour de la position C-2 a permis l'obtention de deux nouveaux squelettes : le 2-(*para*-nitrophényl)oxazolo[5,4-*d*]pyrimidine et le 2-(3,4,5-triméthoxyphényl)oxazolo[5,4-*d*]pyrimidine, qui doivent être explorés à leur tour. Concernant les essais de dimérisation, ceux-ci ont été peu fructueux car de nombreux verrous ont été soulevés et restent à enlever pour accéder à ces molécules. **Un total de 39 molécules finales et originales a été obtenu à l'issu de ce travail.**

III) Modélisation et criblage *in silico*

Cette modélisation *in silico* a été établie afin de cribler les structures hétérocycliques dérivées de benzimidazole et d'oxazolo[5,4d]pyrimidine synthétisées et anticiper ainsi leur potentielle affinité avec le site actif principal de la protéine STING. Cet outil a également été utilisé en amont de la synthèse des analogues dimériques de ces différentes catégories de molécules afin d'identifier des cibles d'intérêt pour de nouvelles synthèses. Ce travail a été réalisé par Dawid Warszycki et Andrzej J. Bojarski de la Polish Academy of Sciences.

III.1) Élaboration du modèle

Ce modèle a été élaboré à partir des structures de HDAC stockées dans la banque de structures PDB récemment décrites par Smola *et al.* (PDBids : 6Z15, 6YDZ, 6S86, 6YDB, 6Z0Z, 6YEA, 6XNP)⁸⁵ et trois complexes non chimériques de STING, co-cristallisés avec un seul ligand, avec la meilleure résolution (PDBids : 4KSY, 4LOI et 4QXO). Ces structures co-cristallisées sont préparées avec les paramètres par défaut de l'assistant de préparation des protéines (c'est-à-dire centrées sur le ligand sans contraintes).²³³ Pour chaque structure cristalline, deux grilles ont été générées : une avec maintien des molécules d'eau à l'intérieur la poche, et une autre sans molécules d'eau. Par la suite, le logiciel Glide a été utilisé pour ancrer virtuellement chaque structure de la banque PDB sur les différentes structures cristallines de la protéine STING.²³⁴ Chacune des poses d'un composé, au sein de la protéine, se voit attribuer un score d'amarrage, qui permet de les classer en fonction de cette valeur (de la plus basse à la meilleure) ; la pose la mieux notée de chaque composé par grille est alors choisie pour une analyse plus approfondie. Cette dernière consiste à sélectionner les meilleures poses (tout ligand confondu) à travers les différentes grilles générées ; le paramètre AUC ROC est calculé par intégration de la courbe caractéristique de fonctionnement du récepteur pour chaque complexe ligand-protéine. Ce paramètre indique alors la qualité d'un complexe ligand-protéine virtuellement généré. Ainsi, les grilles générées sur les structures cristallines 6XNP (grille sans eau) et 6S86 (grille avec eau conservée) ont obtenu les valeurs d'AUC ROC les plus élevées (0,751 et 0,744 respectivement). La première grille est alors plus adaptée aux ligands de type hétérocycliques, alors que la seconde est plus adaptée pour les ligands de type CDN.

Une fois les grilles d'analyse établies, d'autres ligands connus de la protéine STING ont été extraits de la base de données ChEMBL,²³⁵ ces ligands sont classés en fonction de leur activité en deux ensembles : l'ensemble des structures actives (*K_i* ou équivalent inférieur à 100 nM) et l'ensemble des structures inactives

²³³ (a) Madhavi Sastry, G.; Adzhigirey, M.; Day, T.; Annabhimoju, R.; Sherman, W. Protein and ligand preparation: Parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **2013**, 27, 221-234; (b) Schrödinger Release 2021-3: Protein preparation wizard; Epik, Schrödinger, LLC, New York, NY, **2021**; Impact, Schrödinger, LLC, New York, NY; Prime, Schrödinger, LLC, New York, NY, **2021**.

²³⁴ (a) Shelley, J. C. *et al.* Epik: a software program for pK_a prediction and protonation state generation for drug-like molecules. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **2007**, 21, 681-691 ; (b) Friesner, R. A. *et al.* Glide: A new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 1739-1749; (c) Halgren, T. A. *et al.* Glide: A new approach for rapid, accurate docking and scoring. 2. Enrichment factors in database screening. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 1750-1759; (d) Friesner, R. A. *et al.* Extra precision Glide: docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein-ligand complexes. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 6177-6196.

²³⁵ (a) Gaulton, A. *et al.* The ChEMBL database in 2017. *Nucleic Acids Res.* **2017**, 45, D945–D954; (b) Mendez, D. *et al.* ChEMBL: towards direct deposition of bioassay data. *Nucleic Acids Res.* **2019**, 47, D930–D940.

(K_i ou équivalent supérieur à 1000 nM).²³⁶ Le premier comporte respectivement 34 composés alors que le second en comporte 32. Cette base de données de composés de référence est gérée *via* le logiciel Instant JChem.²³⁷ Chaque ensemble est alors constitué de molécules de type dinucléotide cyclique (CDN, masse moléculaire haute) et de molécules de nature hétérocyclique (masse moléculaire basse). Pour chacun de ces ligands, ont été générés une structure tridimensionnelle, une conformation, et les états de protonation *via* les logiciels LigPrep (à pH 7,4) et Epik.²³⁸

Sont alors analysés les modes de liaison au sein de la grille 6XNP ou 6S86 entre la protéine et les ligands actifs et inactifs. Ce travail permet d'isoler les résidus d'acide aminé prépondérants dans les interactions ligand-protéine, ces derniers étant : S162, G166, Y167, R232, R238, E260 et T263. Un profil type d'interaction entre ligand et site actif de la protéine STING est alors établi. Par la suite, nos composés hétérocycliques ou CDNs sont criblés à travers ce filtre par ancrage virtuel avec le site actif de la protéine. Chaque composé se voit attribuer un Gscore et un score étoile ; ces valeurs indiquent respectivement si la complexation à la cible est favorable (ou non) et le nombre d'interactions favorables avec les résidus d'acides aminés retenus comme prépondérants dans les interactions avec les ligands. Ainsi, sont déterminés les composés les plus prometteurs à synthétiser, bien entendu en fonction de la faisabilité de la synthèse.

III.1-1) Préparation des composés à modéliser

Pour tous les composés analysés dans cette étude, les états d'ionisation ont été générés à pH = 7,4 à l'aide du logiciel Epik. La génération des structures 3D s'est faite avec le logiciel Ligprep, avec les paramètres par défaut : génération d'une seule conformation de plus faible énergie par ligand, rétention des chiralités spécifiées, et champ de force utilisé OPLS2005.

III.1-2) Protocole d'amarrage (ou docking)

Tous les récepteurs ont été centrés sur le résidu R238 situé à l'intérieur de la poche de liaison. Le volume de la grille a été défini sur 25x25x25 Å. Tous les calculs d'amarrage ont été exécutés dans le logiciel Glide au niveau SP sous les paramètres par défaut (optimisation post-amarrage, jusqu'à 100 étapes pendant la minimisation de l'énergie, pénalisation de la conformation non-planaire des amides, échantillonnage des conformations en macrocycle avec une fenêtre d'énergie égale à 2,5 kcal/mol et prélèvement d'inversion d'azote). L'amarrage s'est effectué sans aucune contrainte.

²³⁶ Warszycki, D. *et al.* A linear combination of pharmacophore hypotheses as a new tool in search of new active compounds--an application for 5-HT1A receptor ligands. *PLoS One* **2013**, 8, e84510.

²³⁷ Instant JChem was used for structure database management, search and prediction, Instant JChem 21.4.1, 2021, C. (<http://www.chemaxon.com>). No Title.

²³⁸ Greenwood, J. R.; Calkins, D.; Sullivan, A. P.; Shelley, J. C. Towards the comprehensive, rapid, and accurate prediction of the favorable tautomeric states of drug-like molecules in aqueous solution. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **2010**, 24, 591-604.

IV) Molécules criblées et résultats

Dans un premier temps, les composés de la série benzimidazole sont criblés par ce modèle (grille 6XNP) afin de calculer l'affinité entre le site actif de la protéine et les composés synthétisés ainsi que des structures envisageables de nouveaux analogues (Figure 61). Ce criblage en amont des tests biologiques a permis d'identifier quelques substituants clés qui pourraient améliorer l'affinité du ligand vis-à-vis de la protéine, et ainsi prioriser la synthèse de certains analogues par rapport à d'autres.

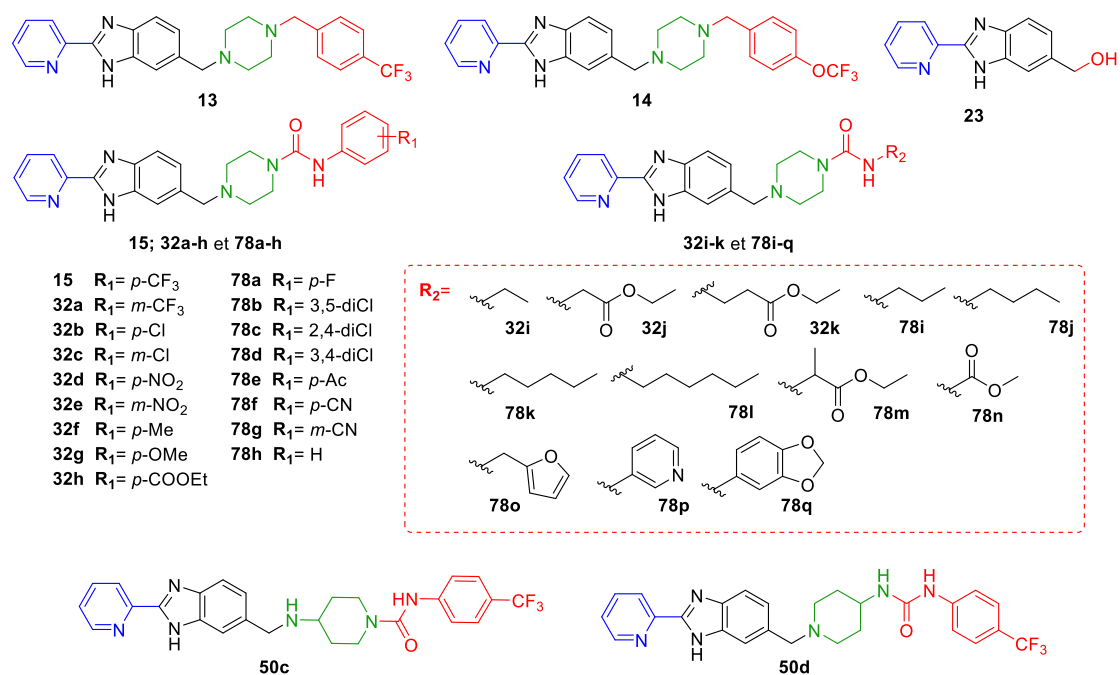


Figure 61. Structures de ligands benzimidazole criblés par modélisation in silico

Les critères de sélection d'un composé pertinent sont d'avoir un Gscore inférieur à -3,60, avoir 3 interactions minimum (ou un Score* ≥ 3) et notamment avec les résidus Y167, R232 et R238 (Tableau 22).

Structure	G-Score	Résidus d'acides aminés retenus																		Score*
		S162	G16	Y167	D21	N21	K224	R232	R238	V23	Y240	S241	S243	Y245	L259	E260	Y261	T263	Q26	
78n	-5,49			1											1	1				3
78j	-5,26			1										1		1				3
78k	-5,21			1										1		1				3
78o	-5,07			1										1		1	1			4
32j	-4,96			1										1		1				3
13	-4,69								1							1				2
78c	-4,83								1		1									2
32i	-4,78			1										1		1				3
78p	-4,89										1									1
50c	-4,88			1																1
23	-4,68			1												1				2
32k	-4,48			1										1		1	1			4
78q	-4,41								1											1
50d	-4,29			1																1
78l	-4,27								1					1		1				3
32e	-4,08			1				1	1							1				4
78h	-4,06			1								1								2
78m	-4,00			1										1		1				3
78b	-3,92			1										1		1				3
78i	-3,90								1			1								2
32c	-3,83			1								1						1		3
78d	-3,80			1												1				2
78a	-3,77								1			1								2
32b	-3,76			1												1				2
78g	-3,47															1				1
32f	-3,21			1												1				2
32d	-2,99			1	1														1	3
32h	-2,75			1										1		1				3
78f	-2,74															1				1
15	-2,74			1					1							1				3
14	-2,73			1												1				2
78e	-2,66			1																1

Tableau 22. G-Score, interactions avec les principaux résidus d'A.A. et Score* des structures benzimidazole criblées in silico

Parmi les structures criblées, celle qui a retenu notre attention est la **32e**, car, en plus d'avoir un Gscore de -4,08, son Score* = 4 et les principales interactions de ce ligand avec la protéine incluent les résidus Y167, E260, R232 et R238 (Figure 62). Or, nous avons vu précédemment que les résidus d'arginine sont les plus importants lors de la ligation de composés agonistes au site actif principal.

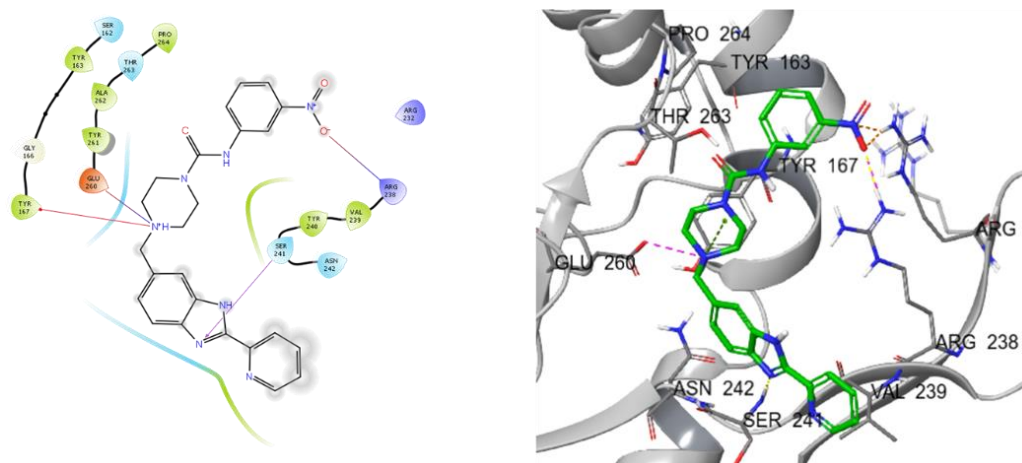


Figure 62. Structure **32e** complexée virtuellement à la protéine STING (grille 6XNP) et mise en avant des interactions principales

A contrario, nous remarquons que les composés **13** (Gscore= -4,69 ; Score*= 2), **14** (Gscore= -2,73 ; Score*= 2) et **15** (Gscore= -2,74 ; Score*= 3) ne semblent pas affins du site actif principal de la protéine du fait de leur Gscore > -3,60 ou le manque d'interactions significatives. Ce travail de criblage par docking *in silico* (grille 6XNP) a également été réalisé sur les structures dérivées d'oxazolo[5,4-*d*]pyrimidine, afin de sélectionner de potentielles structures dimériques à synthétiser, en anticipation des tests biologiques menés sur la série 2-phényloxazolo[5,4-*d*]pyrimidine (Tableau 23). Nous avons également inclus une série prévisionnelle de structures 2-(pyridin-2-yl)oxazolo[5,4-*d*]pyrimidine à ce test.

Structure	Gscore	Résidus d'acides aminés retenus																		Score*	
		S16	G16	Y16	D21	N21	K22	R23	R23	V23	Y24	S24	S24	Y24	L25	E26	Y26	T26	E26		T26
63b	-5,01			1								1									2
NOP-1	-4,86			1								1									2
NOP-2	-4,73	1		1																	2
63c	-4,47			1								1									2
63d	-4,40			1																	1
63a	-4,26			1																	1
NOP-5	-4,07			1																	1
63h	-3,89														1		1				2
NOP-3	-3,88			1				1	1						1						4
64a	-3,79								1						1						2
NOP-7	-3,72								1						1						2
64c	-3,45														1						1
NOP-4	-3,42			1											1						2
NOP-6	-3,38							1	1						1						3

Tableau 23. G-Score, interactions avec les principaux résidus d'A.A. et Score* des structures oxazolopyrimidine criblées *in silico*

Les structures 2-(pyridin-2-yl)oxazolo[5,4-d]pyrimidine envisagées sont les suivantes (**Figure 63**) :

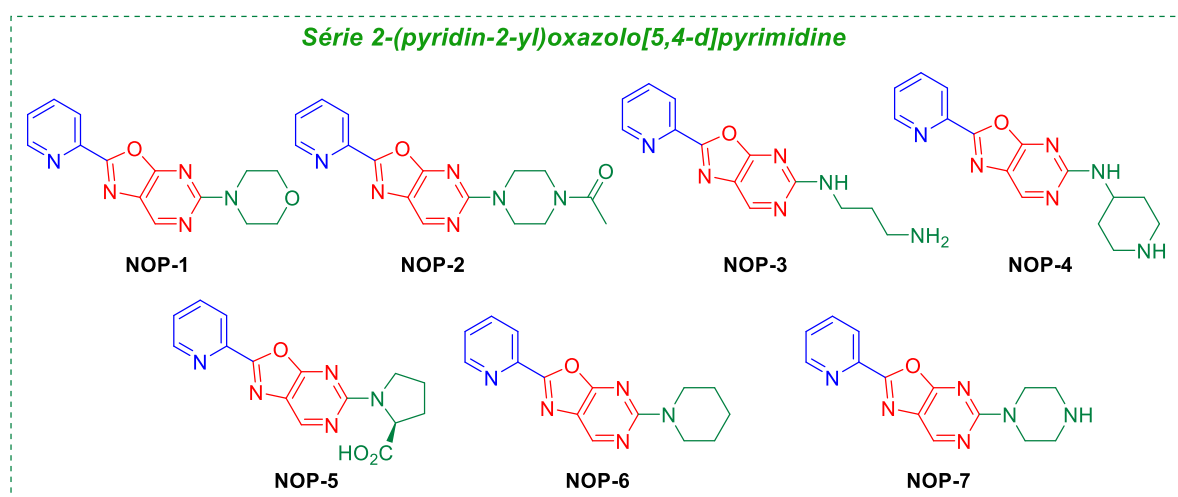


Figure 63. Dérivés de 2-(pyridin-2-yl)oxazolo[5,4-d]pyrimidine criblés

Les résultats obtenus à travers ce criblage montrent que plusieurs composés, malgré un Gscore < -3,60, ont un Score* < 3 ; ces derniers favorisent peu d'interactions avec les résidus d'A.A. prépondérants de la complexation à STING. De plus, le changement du phényle par la pyridin-2-yl ne semble pas ajouter d'interactions supplémentaires favorables à la complexation. De plus, quatre formes dimériques ont été éprouvées à travers cette étude de docking afin de voir leur potentiel vis-à-vis de la cible (Figure 64). Les résultats n'indiquent pas de nette amélioration de ligation des divers dimères par rapport à leur substrat monomérique initial.

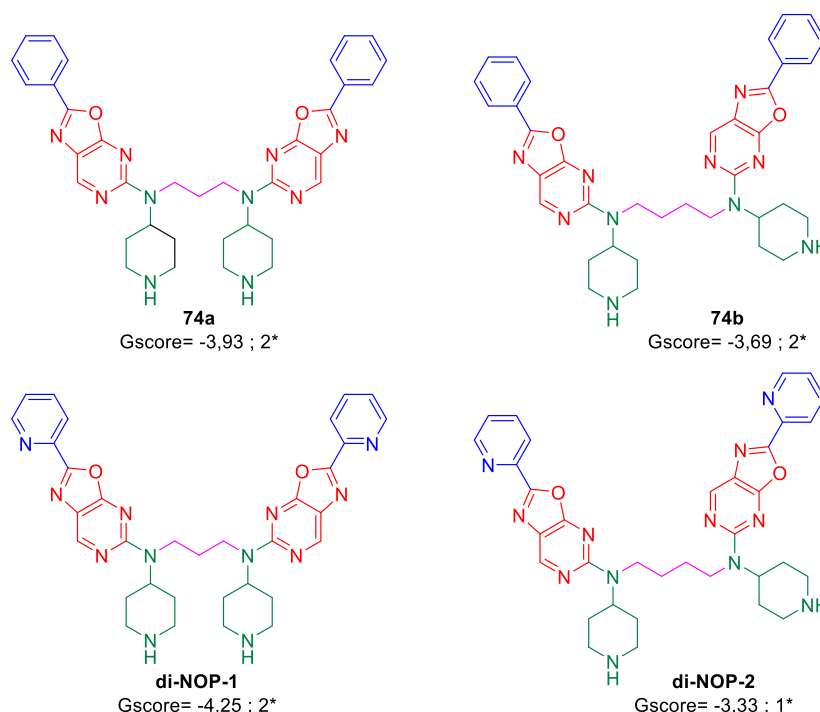


Figure 64. Structures dimériques testées sur le modèle 6XNP

Ce modèle de docking *in silico* a permis une présélection de structures à synthétiser mais également à engager dans la synthèse d'homodimères, cela à la fois sur la famille des dérivés de benzimidazole et des

oxazolopyrimidines. Néanmoins, ces résultats sont à confronter avec ceux des autres tests portant directement sur la cible (tests biologiques et de DSF). De plus, ce modèle ne se base que sur les interactions d'une molécule avec un monomère de STING et non la protéine en entier ; ce qui est sa principale limite. Les résultats obtenus pour des structures dimériques (ou de CDNs) sont par conséquent à relativiser. Réaliser une modélisation sur l'ensemble de la poche de complexation a été tentée. Malheureusement, l'élaboration d'un tel modèle requiert trop de ressources, ainsi que des outils informatiques plus performants et spécifiques. Les tentatives menées n'ont pas pu aboutir. À l'aide des résultats biologiques et de DSF collectés, le modèle établi pourra ultérieurement être mis à jour et perfectionné, dans le but de rendre plus robuste sa prédictivité.

V) Evaluation biologique

V.1) Tests cellulaires *in vitro*

V.1-1) Evaluation biologique sur des macrophages (BMDM) de souris

Les composés ont été évalués biologiquement sur des macrophages de souris type BMDMs exprimant mSTING, par l'équipe du Dr. Valérie QUESNIAUX au laboratoire INEM.

Mesure d'activité agoniste : les macrophages sont incubés pendant 18 h avec les différents composés à des concentrations de 10, 3 et 1 μ M. Deux contrôles sont effectués en parallèle :

- ✓ Le contrôle sans stimulation, où les macrophages sont uniquement mis en présence du milieu de culture.
- ✓ Le contrôle positif, dans lequel les macrophages sont mis en présence du 2',3'-cGAMP à différentes concentrations (14, 10, 3 et 1 μ M), la sécrétion de CXCL10 passant par STING étant induite par le cGAMP.

On mesure alors le taux de sécrétion de CXCL10 des différents tests par dosage ELISA. Les taux issus des molécules testées sont ensuite comparés à ceux du contrôle positif.

Mesure d'activité antagoniste : les macrophages sont incubés pendant 3 h avec les différents composés à des concentrations de 10, 3 et 1 μ M, puis sont stimulés avec le 2',3'-cGAMP (14 μ M) pendant 18 h. Deux contrôles sont effectués en parallèle :

- ✓ Le contrôle sans stimulation, au cours duquel les macrophages sont uniquement mis en présence du milieu de culture.
- ✓ Le contrôle positif, où les macrophages sont mis en présence d'un inhibiteur commercial de STING (le H-151 ou SN-011), à différentes concentrations (14, 10, 3 et 1 μ M), durant 3 h, puis stimulés avec 14 μ M de 2',3'-cGAMP pendant 18 h.

On mesure également le taux de sécrétion de CXCL10 des différents tests par dosage ELISA, qui peut, dans le cas présent, aussi être exprimé en un taux d'inhibition de sécrétion. Les taux issus des molécules testées sont ensuite comparés à ceux du contrôle positif. La cytotoxicité des composés est évaluée par test de MTT.

a) Evaluation biologique de la série de dérivés portant un squelette 1H-benzimidazole

Les composés de cette série à avoir été évalués biologiquement sont les suivants (Figure 65) :

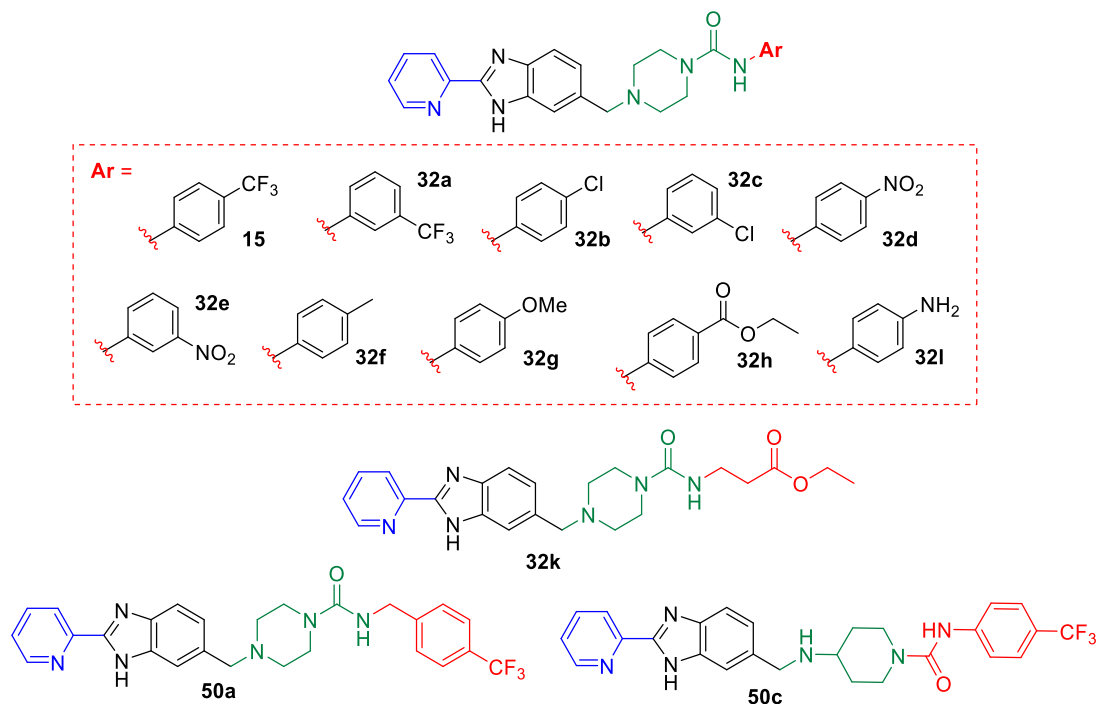


Figure 65. Structures portant un squelette benzimidazole synthétisées et évaluées biologiquement

Mesure d'activité agoniste :

D'après ces mesures (Figure 66), les composés de la série benzimidazole ne présentent pas d'activité agoniste lorsque ces derniers sont mis en présence de macrophages de souris B6 (BMDM).

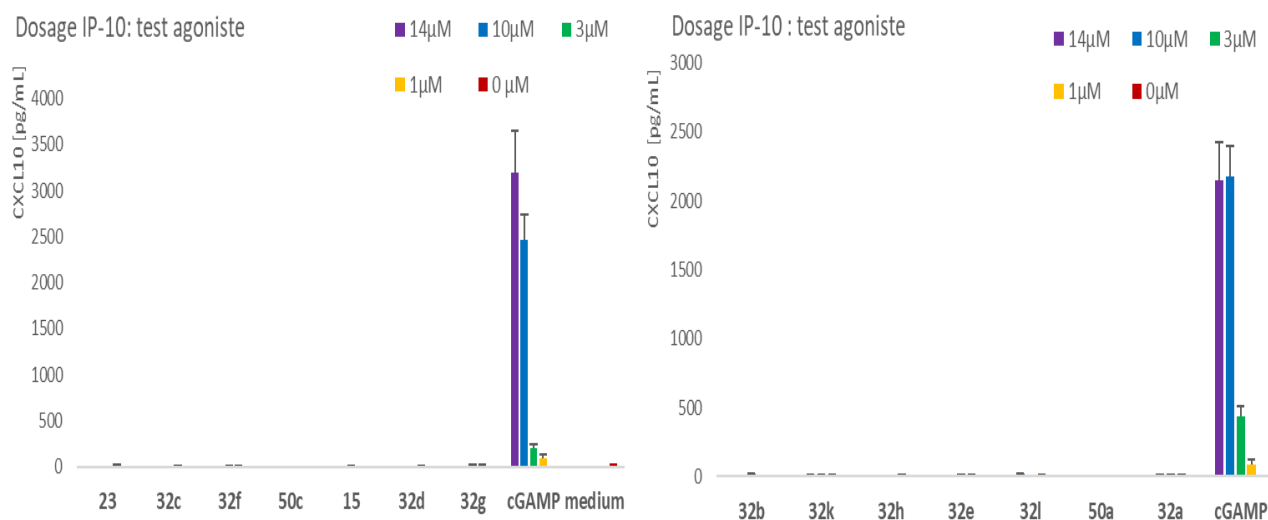


Figure 66.

Mesure d'activité antagoniste :

D'après les mesures effectuées (Figure 67), plusieurs de nos composés synthétisés présentent une activité antagoniste de la voie cGAS-STING comparable aux produits commerciaux H-151 et SN-011 sur les souches de macrophages B6. Parmi eux, les produits **15**, **50c** et **32a** ont une activité inhibitrice de production de CXCL10 la plus importante.

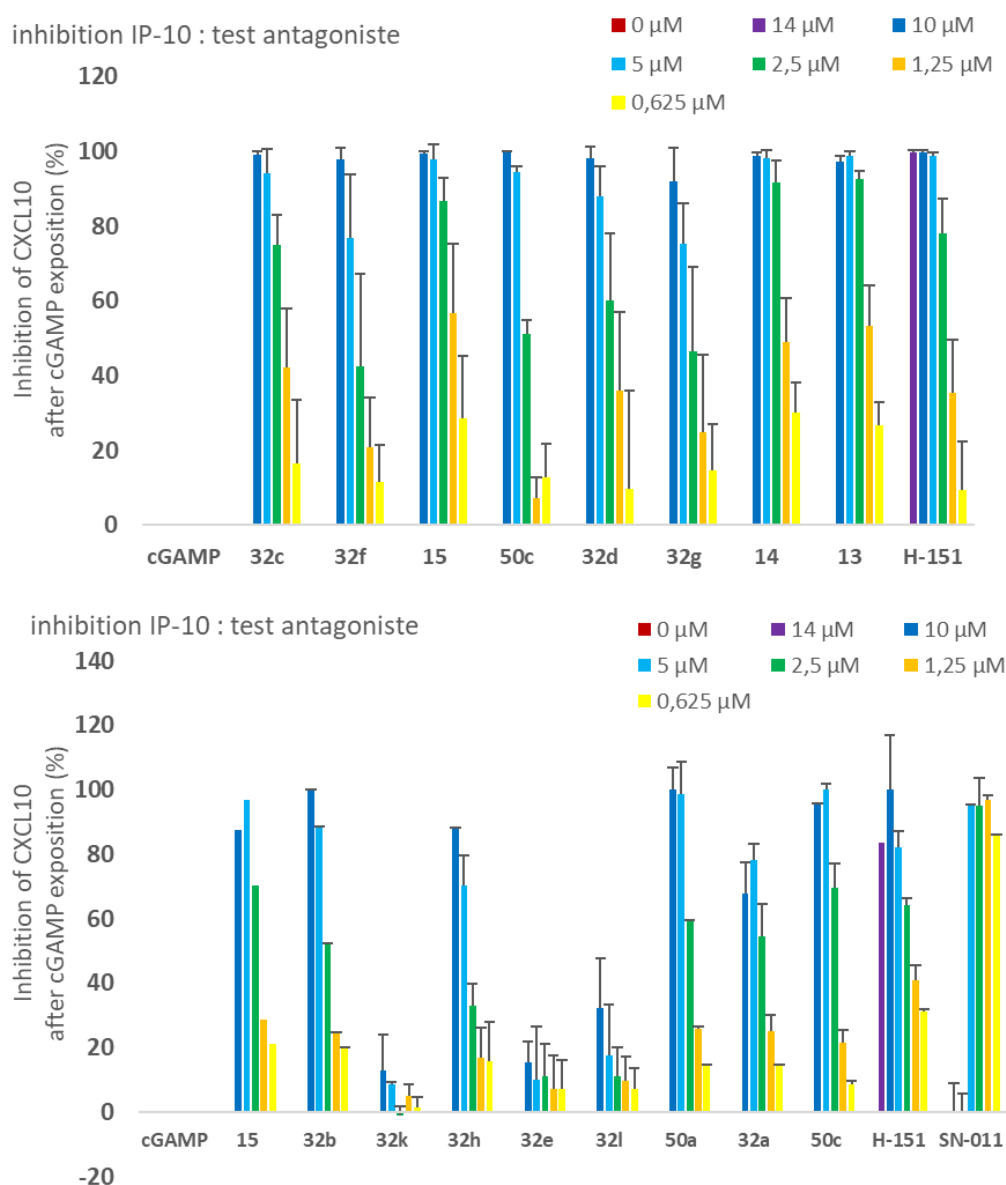


Figure 67.

Les IC₅₀ sont calculées pour ces tests d'inhibition de la production d'IP-10 par les macrophages de souris (Tableau 24). Trois autres tests cellulaires, que nous allons détailler, sont également menés afin de déterminer si la cible biologique de nos composés est la protéine STING ou non.

IC ₅₀ (en μ M)				
Composé	B6 & cGAMP	B6 & Poly I:C	mSTING KO & Poly I:C	hSTING KI & cGAMP
IC50 H-151	1,67 $\pm$ 0,16	8,03 $\pm$ 0,72	6,31 $\pm$ 0,40	5,51 $\pm$ 0,87
SN-011	1,20 $\pm$ 0,11	pas encore testé	pas encore testé	pas encore testé
13	1,22 $\pm$ 0,08	5,84 $\pm$ 0,3	3,32 $\pm$ 1,74	pas encore testé
14	1,22 $\pm$ 0,13	6,34 $\pm$ 0	1,81 $\pm$ 0,48	pas encore testé
15	1,23 $\pm$ 0,1	5,65 $\pm$ 0,31	4,49 $\pm$ 0,18	0,90 $\pm$ 0,18
32a	2,83 $\pm$ 0,11	pas encore testé	pas encore testé	pas encore testé
32b	2,61 $\pm$ 0,67	pas encore testé	pas encore testé	pas encore testé
32c	1,69 $\pm$ 0,29	6,81 $\pm$ 0,36	7,68 $\pm$ 0,67	1,51 $\pm$ 0,17
32d	2,23 $\pm$ 0,55	>10 μ M	8,91 $\pm$ 0,95	2,12 $\pm$ 0,08
32e	>10 μ M	pas testé	pas testé	pas testé
32f	3,26 $\pm$ 0,76	>10 μ M	>10 μ M	2,61 $\pm$ 0,1
32g	3,21 $\pm$ 0,94	>10 μ M	>10 μ M	2,79 $\pm$ 0,4
32h	3,64 $\pm$ 0,97	pas testé	pas testé	pas testé
32k	>10 μ M	pas testé	pas testé	pas testé
32l	>10 μ M	pas testé	pas testé	pas testé
50a	2,36 $\pm$ 0,11	pas encore testé	pas encore testé	pas encore testé
50c	1,97 $\pm$ 0,17	pas encore testé	pas encore testé	pas encore testé

Tableau 24. Valeurs d'IC₅₀ des composés de la série benzimidazole

Test B6 & Poly I:C : ce test évalue la spécificité du caractère antagoniste de nos composés pour STING : les macrophages de souris, exprimant mSTING, sont stimulés avec le Poly I:C, à la place du 2',3'-cGAMP, pour induire une sécrétion d'interféron par une voie de signalisation différente de cGAS-STING : la voie du TLR3.²³⁹ Pour rappel, ces deux voies sont prépondérantes dans l'induction de la sécrétion d'IFN-I. Ce test permet de discriminer la voie de signalisation ciblée par nos composés actifs : si le composé présente une valeur d'IC₅₀ similaire à celle mesurée sur le test B6 & cGAMP, le composé n'est pas spécifique de la voie cGAS-STING. Au contraire, si le composé présente une valeur d'IC₅₀ significativement supérieure sur TLR3/Poly I:C, à la précédente (B6 & cGAMP), nous pouvons en déduire que nos composés agissent préférentiellement sur la voie cGAS-STING.

Sont alors évaluées les molécules ayant des activités antagonistes significatives (**Tableau 24 ; 13, 14, 15, 32c**) sur le test B6 & cGAMP ; les valeurs d'IC₅₀ mesurées sur B6 & Poly I:C sont deux à trois fois supérieures aux précédentes. Cela indique que nos composés interagissent préférentiellement au niveau de la voie de signalisation de cGAS-STING, par rapport à la voie TLR3/Poly I:C. Cependant, avec le test utilisant le 2',3'-cGAMP, nous pouvons penser que nos composés agissent dans un intervalle de la cascade de signalisation, allant de STING aux éléments en aval de cette protéine.

Test mSTING KO & Poly I:C : ce test évalue aussi la spécificité du caractère antagoniste de nos composés, en les testant sous stimulation de Poly I:C dans des macrophages de souris n'exprimant pas mSTING. Ce test est complémentaire au précédent, il permet également de discriminer la voie de signalisation que le composé inhibe. Les valeurs d'IC₅₀ mesurées étant similaires aux valeurs du test B6 & Poly I:C, c'est-à-dire deux à trois fois supérieures aux IC₅₀ sur B6 & cGAMP, cela confirme que nos composés ciblent la protéine STING ou en aval de la cascade de signalisation. *A contrario*, le composé **14** présente une IC₅₀ = 1,81 μ M, indiquant que son

²³⁹ Li, K.; Chen, Z.; Kato, N.; Gale, M. Jr.; Lemon, S. M. Distinct poly(I-C) and virus-activated signaling pathways leading to interferon-beta production in hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 16739-16747.

activité antagoniste est préservée malgré le mSTING KO. Cela signifie que le composé en question inhibe une cible protéique incluse dans la voie TLR3/Poly I:C, donc hors de la voie de signalisation cGAS-STING.

Test hSTING KI & cGAMP : les macrophages souris de ce test expriment le hSTING au lieu du mSTING. Le composé peut ici interagir directement avec la protéine humaine. Les IC₅₀ mesurées étant de l'ordre de celles obtenues lors du premier test (B6 & cGAMP) sur le mSTING endogène, nous pouvons en conclure que les composés évalués inhibent la protéine hSTING, ou plus loin dans la cascade de signalisation.

En conclusion de ces tests, nous avons trois composés (**15**, **32c** et **50c**) qui présentent des activités inhibitrices de la voie cGAS-STING très prometteuses. Les différents tests effectués permettent d'affirmer que nos composés ciblent la protéine STING (murine et humaine) ou des éléments en aval de la voie de signalisation. D'autres études complémentaires sont à mener pour comprendre, et valider, le mode d'action de ces antagonistes originaux. De plus, ces composés ne présentent pas de cytotoxicité d'après les tests MTT réalisés.

b) Evaluation biologique de la série de dérivés portant un squelette oxazolo[5,4-d]pyrimidine

Les composés de cette série à avoir été testés sont les suivants :

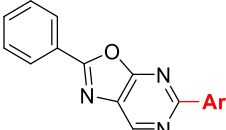
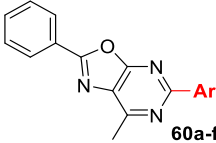
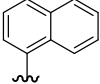
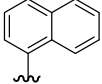
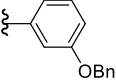
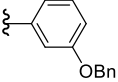
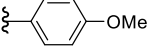
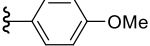
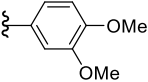
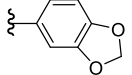
 59a-f; 61b-c			 60a-f; 62a-b		
Ar	Produit	Log (P) Calculé par Chemdraw	Ar	Composé	Log (P) Calculé par Chemdraw
	59a	4,31		60a	5,02
	59b	5,31		60b	6,01
	59c	5,92		60c	6,62
	59d	4,19		60d	4,89
	59e	4,06		62a	3,63
	59f	4,09		62b	5,0
	61b	2,93			
	61c	4,29			

Tableau 25. Composés issus des couplages palladés

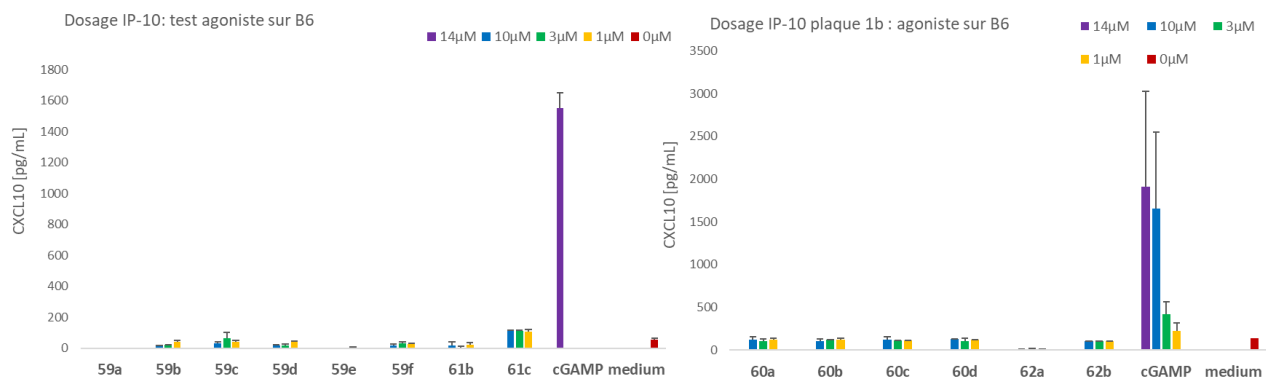


Figure 68. Activités agonistes des composés 59a-f ; 61b-c ; 60a-d et 62a-b

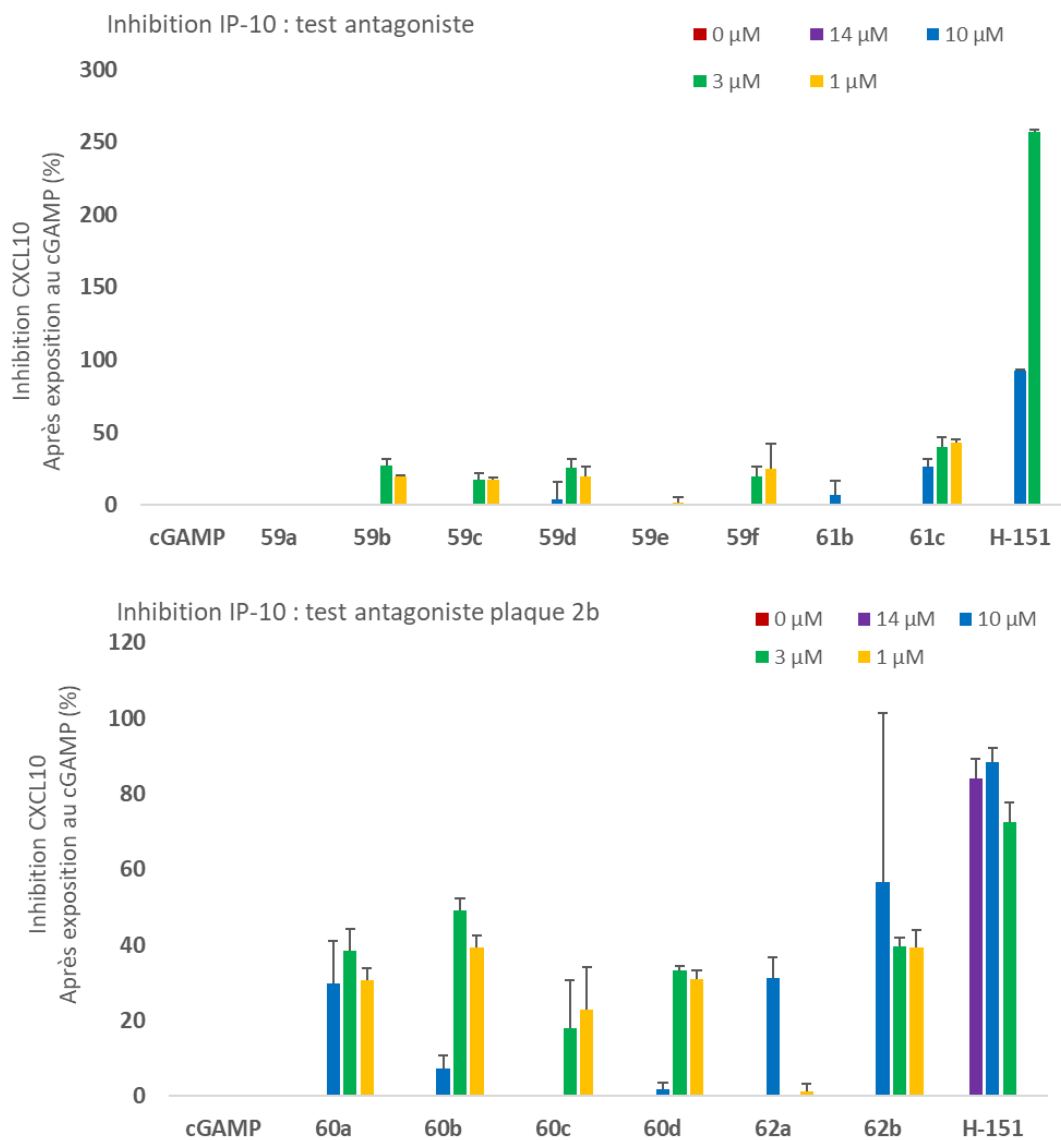


Figure 69. Activités antagonistes des composés 59a-f ; 61b-c ; 60a-d et 62a-b

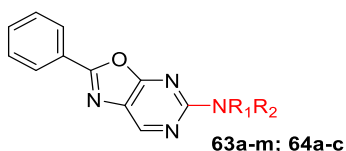
Mesure d'activité agoniste :

D'après les mesures effectuées sur les macrophages B6 (Figure 68), les composés **59a-f** ; **61b-c** ; **60a-d** et **62a-b** ne présentent pas d'activité agoniste.

Mesure d'activité antagoniste :

D'après les mesures effectuées sur les macrophages B6 (Figure 69), les composés **59a-f** ; **61b-c** ne présentent pas d'activité antagoniste significative ; les composés **60a-d** et **62a-b** présentent une faible activité antagoniste.

De manière globale, ces composés ne présentent pas de cytotoxicité d'après les tests MTT. En revanche, il a été observé que ces derniers précipitent lorsqu'ils sont injectés dans le milieu de culture (de nature aqueuse), malgré leur solubilité initiale dans le DMSO. Ces composés semblent donc être trop apolaires.



Ar-NR ₁ R ₂	Produit	Log (P) Calculé par Chemdraw	Ar-NR ₁ R ₂	Produit	Log (P) Calculé par Chemdraw
	63a	3,27		63k	2,35
	63b	2,14		63j	4,95
	63c	1,57		63m	2,28
	63d	2,3		64a	1,92
	63e	3,03		64b	1,59
	63f	2,98		64c	1,32
	63g	2,43		76	2,8
	63h	0,96			

Tableau 26. Composés issus des SNAr

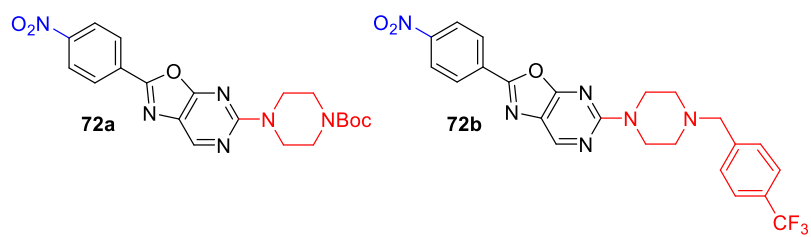


Figure 70. Structures de **72a** et **72b**, log (P) indéterminés par Chemdraw

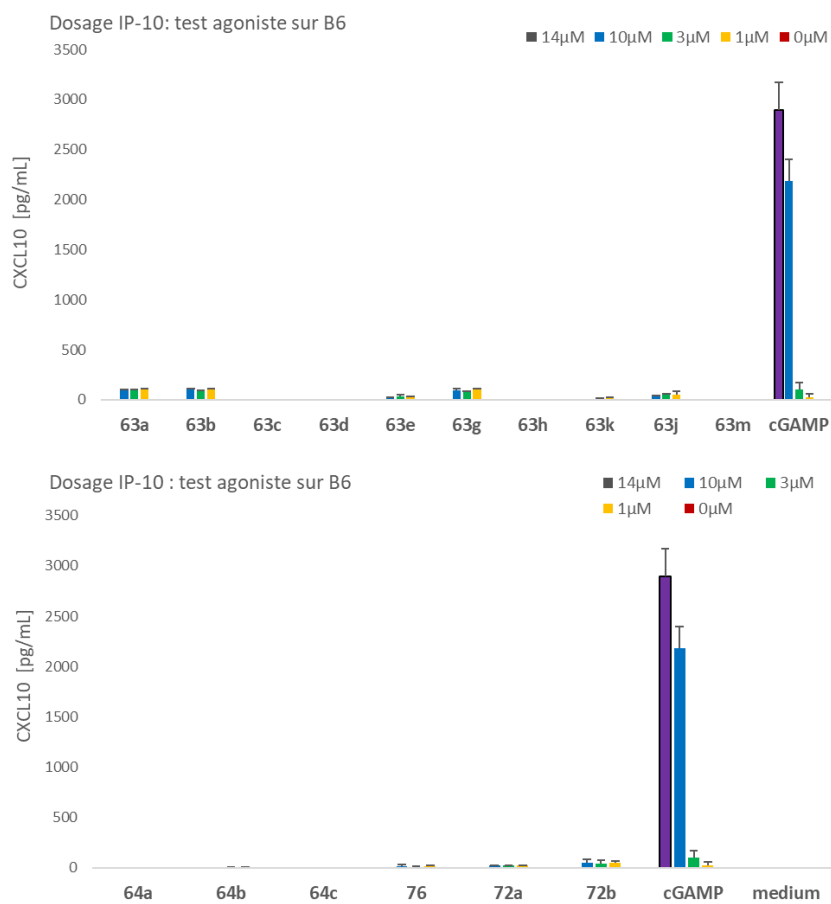


Figure 71. Activités agonistes des composés **63a-m** ; **64a-c** ; **76** et **72a-b**

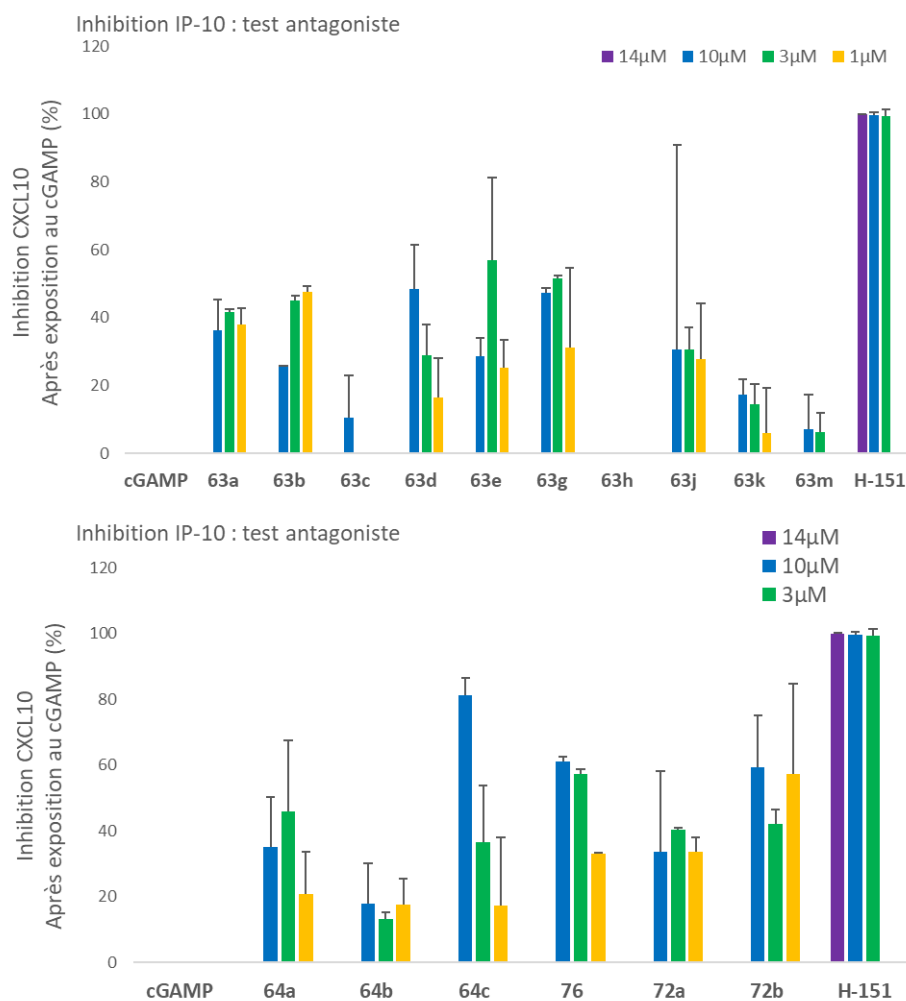


Figure 72. Activités antagonistes des composés **63a-m** ; **64a-c** ; **76** et **72a-b**

Mesure d'activité agoniste :

D'après les mesures effectuées sur les macrophages B6 (Figure 71), les composés **63a-m** ; **64a-c** ; **76** et **72a-b** ne présentent pas d'activité agoniste.

Mesure d'activité antagoniste :

D'après les mesures effectuées sur les macrophages B6 (Figure 72), les composés **63a-m** ; **64a-c** ; **76** et **72a-b** présentent une faible activité antagoniste.

De manière globale, ces composés ne présentent pas de cytotoxicité d'après les tests MTT.

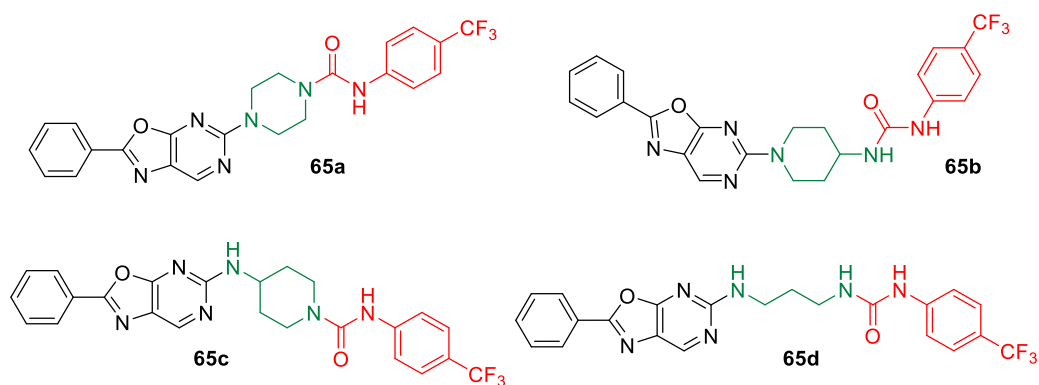


Figure 73. Composés **65a-d** : $\log(P)_{65a} = 4,06$; $\log(P)_{65b} = 4,02$; $\log(P)_{65c} = 3,46$; $\log(P)_{65d} = 3,39$

55; 67a-c

Ar	Produit	Log (P) Calculé par Chemdraw	Ar	Composé	Log (P) Calculé par Chemdraw
	55	-0.66		67b	-1.04
	67a	indéterminé		67c	-1.57

Tableau 27. Log (P) des composés **55** ; **67a-c**

Les composés **55** ; **67a-c**, ayant des $\log(P)$ calculés négatifs, sont des composés de nature très polaire et donc plutôt hydrophiles, ce qui, en termes de perméabilité cellulaire, n'est pas bénéfique.

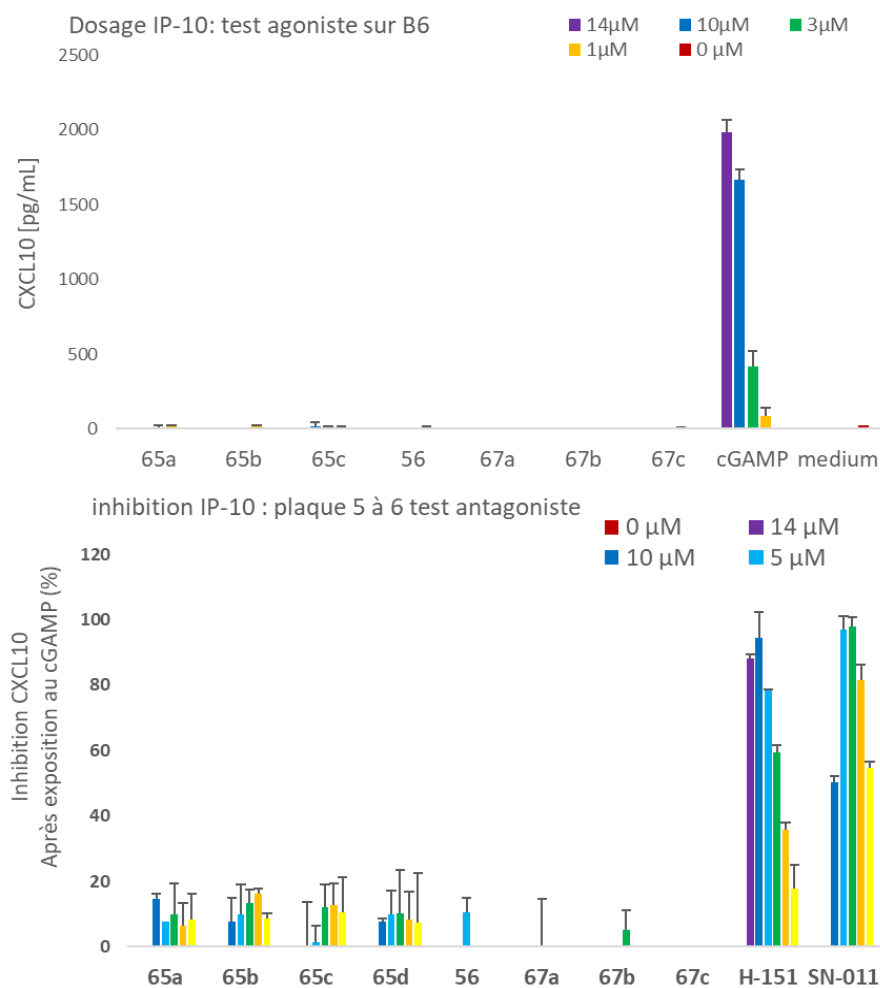


Figure 74. Activités biologiques (agoniste en haut, antagoniste en bas) des composés **65a-d** ; **56** et **68a-c**

Mesure d'activité agoniste :

D'après les mesures effectuées sur les macrophages B6 (Figure 74), les composés **65a-d** ; **56** et **68a-c** ne présentent pas d'activité agoniste.

Mesure d'activité antagoniste :

D'après les mesures effectuées sur les macrophages B6 (Figure 74), les composés **65a-d** ; **56** et **68a-c** ne présentent pas d'activité antagoniste.

D'après les tests MTT, les composés **56** et **68a-c** ne présentent pas d'effet cytotoxique, contrairement aux composés **65a-d** où cet effet est notoire.

V.1-2) Evaluation biologique sur des macrophages de poulet

Pour l'instant, seuls les composés **15**, **32c**, **32d**, **32f**, **32g** et **64a** (Figure 75) ont été évalués sur des macrophages de poulet (cSTING) par le Dr. Rodrigo GUABIRATA-BRITO au laboratoire INRAE. D'autres composés sont en cours d'évaluation. Les composés n'ont pas d'effets significatifs sur la viabilité cellulaire.

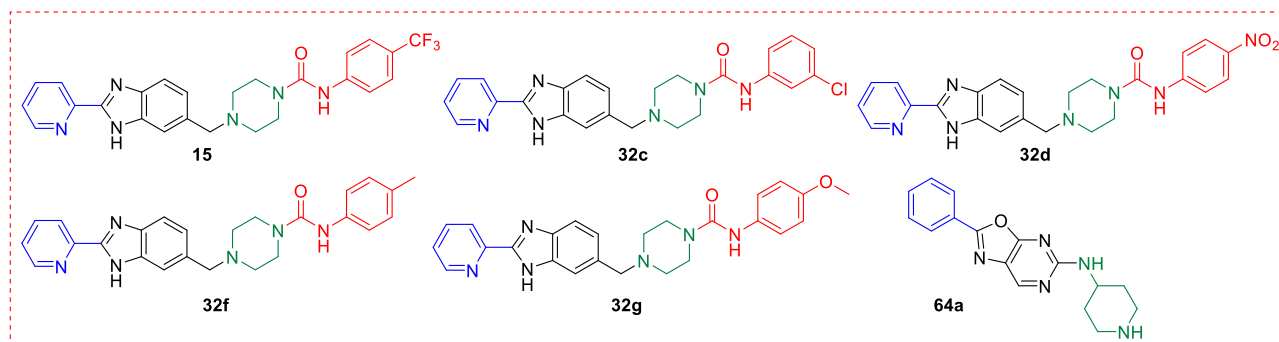


Figure 75. Composés évalués sur les macrophages de poulet

Ces composés ont été évalués après le premier criblage réalisé par Valérie QUESNIAUX, leur caractère antagoniste a donc été directement mesuré. Le modèle cellulaire est ici différent : ce sont des macrophages de poulet, où le STING poulet (cSTING) induit l'activité de l'IRF-7 (au lieu de l'IRF-3 chez la souris et l'humain). La technique utilisée permet de quantifier l'expression génique des gènes responsables de l'immunité innée chez le poulet (IFNB, ISG12.2, IL1B, IL8L2 et CCL4). L'agoniste utilisé est de l'ADN de thymus de veau (CT DNA). Dans un premier temps, on mesure le taux l'expression des gènes, dû à la stimulation par le CT DNA seul, sans inhibiteur. Ce taux est calculé par rapport à un test sans aucune stimulation (qui sert de zéro). Ainsi, ce niveau d'expression, mesuré pour chaque gène, sert de contrôle sans inhibiteur.

Pour l'évaluation du caractère antagoniste des composés : chaque molécule à tester est mise en incubation durant 1 heure avec les macrophages, puis le CT DNA (5 µg/puits) est ajouté et incubé avec le système durant 6 heures. On mesure alors l'expression génique des gènes cités précédemment (Figure 76), et celle-ci est comparée au contrôle et au zéro : on peut dans ce cas observer si les gènes ont été induits (niveau d'expression identique au contrôle), ou non (niveau d'expression inférieur au contrôle).

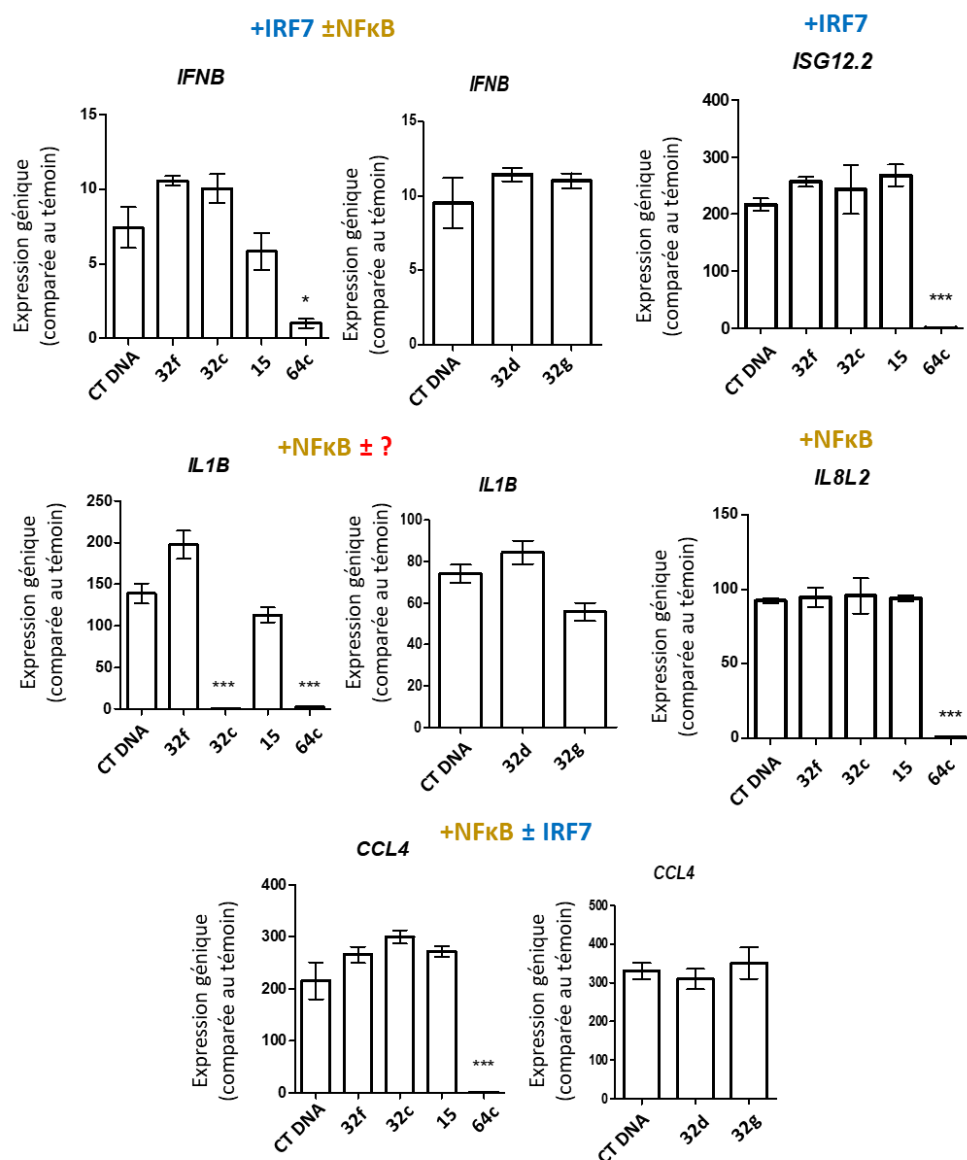


Figure 76. Mesures d'expressions géniques sur les macrophages de poulet mis en présence des composés testés

On constate que le composé **64c** (Figure 77) a un fort potentiel inhibiteur en aval de cSTING, ou sur la protéine, car de nombreux gènes impliqués dans la voie n'ont pas été traduits. D'autres expériences sont néanmoins nécessaires pour confirmer la cible et le mécanisme d'inhibition composé **64c**. Des tests utilisant STING K.O. sont notamment envisagés. De plus, d'autres structures d'oxazolo[5,4-d]pyrimidine doivent être évaluées pour pouvoir déterminer une relation structure activité.

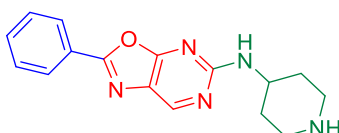


Figure 77. Structure de la molécule **64c**

V.1-3) Mesure de l'affinité ligand/protéine par test de DSF

Les tests de fluorimétrie différentielle à balayage (DSF) ont été effectués par le Dr. Dominika Chalupska de l'Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Czech Academy of Sciences. Les molécules sont mises en présence du hSTING dans le DMSO et on relève la température de transition (T_m) de la protéine (Tableau 28).

Solvant	T_m (°C)	Molécule	T_m (°C)	Molécule	T_m (°C)	Molécule	T_m (°C)
DMSO	51,87	3',3'-cGAMP	55,59	59a dans l'EtOAc	51,49	63a	50,79
EtOAc	51,95	3',3'-c-diGMP	53,34	59a dans le CHCl ₃	51,49	63b	51,64
CHCl ₃	51,57	15	51,81	59b	51,57	63c	51,99
H ₂ O	51,35	32b	52,21	59c	50,87	63d	51,35
		32c	51,63	59d	50,79	63e	51,57
		32d	52,60	59e	51,88	63g	51,49
		32e	51,78	59f	51,81	63h	51,74
		32f	51,42	61b	51,41	63j	51,64
		32g	51,38	61c	51,26	63m	51,60
		32h	51,42			64a	51,42
		32k	51,42	56	52,17	64c	51,92
		32l	51,20	68a	51,85	76	50,30
		50a	51,31	68b	51,85	72a	50,79
						72b	51,26

Tableau 28. Valeurs des T_m mesurées lors des tests de DSF

D'après ces données, aucun composé, que ce soit sur la série des dérivés de benzimidazole (**15**, **32b-l**, **50**), ou des dérivés d'oxazolopyrimidine, ne semble stabiliser la protéine hSTING comme le 3',3'-cGAMP ($T_m=55,59$ °C), ou le 3',3'-c-diGMP ($T_m=53,34$ °C). En effet, l'ensemble des valeurs mesurées sont de l'ordre de celle obtenue lorsque le test est effectué avec la protéine seule dans le DMSO. Cela suggère que nos composés ne sont pas affins du site principal de ligation de hSTING. Ces résultats semblent attester des faibles valeurs prédictives observées lors du criblage *in silico* réalisé précédemment : ces deux analyses montrent que nos composés n'ont pas d'affinité particulière avec le site principal de ligation de STING.

Par ailleurs, d'autres composés sont en cours d'évaluation.

V.1-4) Relation structure activité (SAR)

Au vu des différents résultats obtenus, nous avons découvert une structure qui présente une activité antagoniste prometteuse sur la voie STING : le composé **15** (Figure 78). Ce dernier présente les meilleures activités inhibitrices de la voie étudiée ($IC_{50,mSTING} = 1.23 \mu M$ et $IC_{50,hSTING} = 1.23 \mu M$) sur divers tests, sans être cytotoxique.

Le premier travail de modulation a permis d'évaluer l'influence du substituant porté par l'aryle terminal, en variant sa nature (lipophile tel que le trifluorométhyle, nitro, chloro, méthyl, ou hydrophile, comme le groupe amino), ainsi que son positionnement sur le phényle (*para*- ou *meta*-). Nous avons également comparé le remplacement de ce système aromatique par une chaîne aliphatique. Le second travail de modulation, quant à lui, a porté sur le motif urée-pipérazine, tout en conservant le *para*-trifluorophényle, ce dernier ayant montré les meilleures activités agonistes. Ce travail a abouti à la formation de deux molécules, dont la structure est allongée, soit par un chaînon méthyle (CH_2), soit par un chaînon amine (NH).

Pour le moment, nous ne pouvons pas affirmer avec exactitude quelle est la cible protéique du composé **15** (le « hit »). Néanmoins, nous pouvons dégager quelques éléments structuraux qui semblent essentiels à l'activité biologique :

- ✓ Un substituant de nature lipophile, porté sur l'aromatique terminal, de préférence en position *para*- (ici le **groupe trifluorométhyle -CF₃**).
- ✓ Le motif **pyridin-2-yl** en position de « tête » sur un squelette **1H-benzimidazole**.
- ✓ La jonction entre le benzimidazole et la pipérazine par un **méthyle**, qui confère à la molécule une certaine flexibilité.
- ✓ La **liaison urée** en α de la pipérazine.
- ✓ Le motif **pipérazine** comme espaceur entre le corps benzimidazole, et la partie terminale arylique.

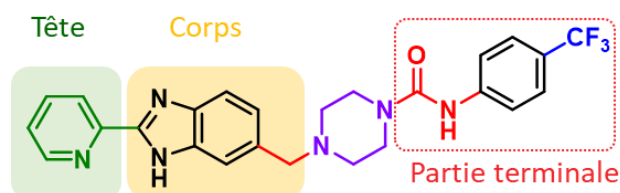


Figure 78. Structure du composé **15**

Il reste néanmoins à savoir si d'autres substituants de nature apolaire sur la partie terminale, comme le trifluorométhoxy, peuvent améliorer ou non, l'activité biologique. De même, est-ce que d'autres substituants peuvent être ajoutés sur cette partie, sur le corps ou la « tête » pour moduler cette activité ? De plus, devons-nous garder l'amine libre, responsable de formes tautomères, sur le squelette 1H-benzimidazole ? Ces interrogations résument les futurs axes de modulations du « hit » actuel.

Par ailleurs, l'activité antagoniste semble assez spécifique de STING, ou d'éléments en aval de la voie de signalisation. Toutefois, nous savons que le site principal de ligation des CDNs n'est pas touché par cette structure (aucune affinité d'après les tests de DSF). Des tests complémentaires sont donc nécessaires pour déterminer le mode d'action de cette molécule. Malgré tout, il est possible d'envisager que cette dernière, à l'image du composé H-151, qui présente également une fonction urée, bloque l'étape de palmylation de STING (à la lumière des tests réalisés). Bien entendu, cela reste à confirmer.

VI) Conclusion et perspectives

En conclusion de ce chapitre, notre travail exploratoire autour des charpentes 1*H*-benzimidazole et oxazolo[5,4-*d*]pyrimidine a rendu possible la formation de 5 chimiothèques de petites molécules originales :

- Une famille de **13 dérivés de benzimidazole**, issue d'un travail de pharmaco-modulation autour du substituant porté par l'aryle terminal, ou du motif pipérazine central (Figure 79). Ce travail est basé sur l'identification préalable d'un « hit », le composé **15**, lors de tests biologiques.

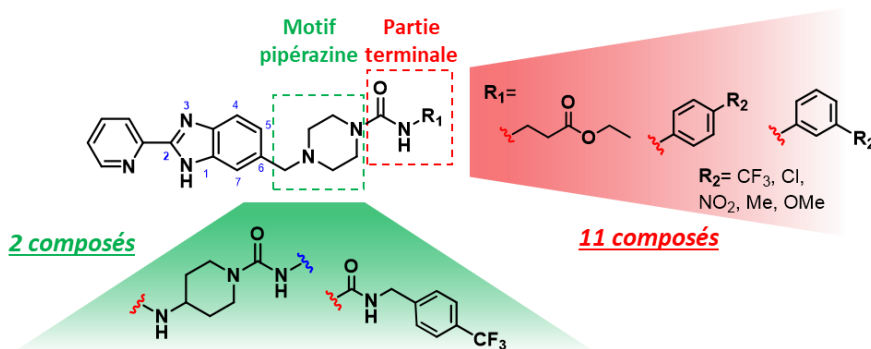


Figure 79. Modulations apportées aux dérivés de 1*H*-benzimidazole

- Une série de **14 dérivés d'oxazolo[5,4-*d*]pyrimidine**, obtenue à partir de couplages palladés de type Suzuki-Miyaura et Stille (Figure 80).
- Une série de **18 composés portant un squelette 2-phényloxazolo[5,4-*d*]pyrimidine**, synthétisée par réactions de SNAr (Figure 80).

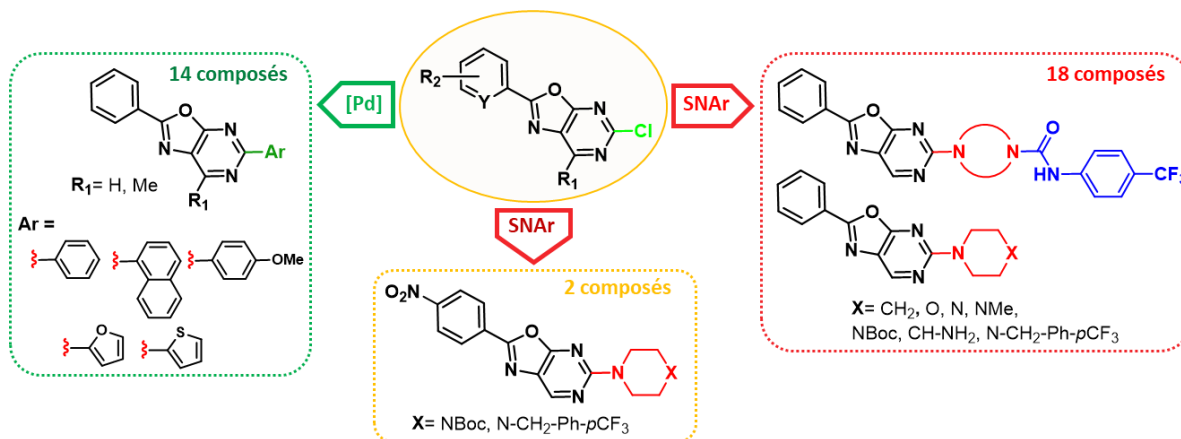


Figure 80. Exploration autour du squelette oxazolo[5,4-*d*]pyrimidine

- **Deux nouveaux composés**, dérivés du 5-chloro-2-(*p*-nitrophényl)oxazolo[5,4-*d*]pyrimidine, qui ouvrent la voie sur l'exploration d'autres structures oxazolo[5,4-*d*]pyrimidines (Figure 80).
- Une famille de **3 dérivés de *N*-(2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-5-yl)arylamide originaux**, obtenue par silylation de la 5-aminouracile, suivi d'une condensation sur un chlorure d'acyle (Figure 81). Ces précurseurs amides ont pu fournir, après cyclisation sous POCl₃, **2 nouvelles charpentes aromatiques** : le 5-chloro-2-(*p*-nitrophényl)oxazolo[5,4-*d*]pyrimidine et le 5-chloro-2-(3,4,5-triméthoxyphényl)oxazolo[5,4-*d*]pyrimidine, dont l'exploration chimique doit être poursuivie après les quelques résultats encourageants obtenus.

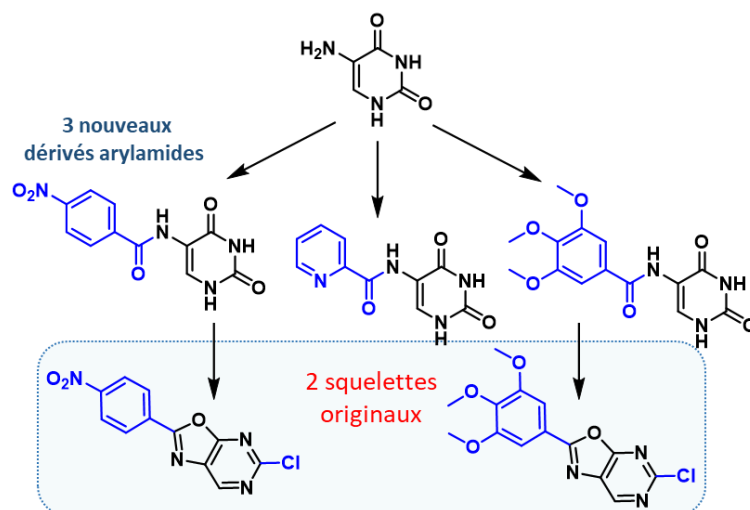


Figure 81. Structures des nouvelles charpentes aromatiques produites

Les synthèses, menées de manière convergente, guidées par les activités biologiques, ainsi qu'un travail de modélisation *in silico*, ont permis l'élaboration de toute cette nouvelle diversité moléculaire à partir des squelettes hétérocycliques mentionnés.

Comme nous l'avons observé, plusieurs composés de type benzimidazole présentent une activité antagoniste spécifique de la voie cGAS-STING (murine et humaine), notamment le composé **15**, qui affiche des activités biologiques de l'ordre de celles de composés commerciaux : le H-151 et le SN-011. De plus, nos composés ne présentent pas de cytotoxicité sur les cultures cellulaires étudiées. Nous avons donc identifié un « hit » prometteur, dont la découverte fait objet d'un dépôt de brevet. Bien entendu, des travaux de pharmaco-modulation, notamment autour de la partie pipérazine centrale, ou encore sur l'addition de substituants sur les parties aromatiques, sont encore à mener en vue d'améliorer encore l'activité inhibitrice de la molécule. Par ailleurs, un travail de compréhension du mode d'action biologique du composé doit être mené, afin de connaître la véritable cible thérapeutique de ce dernier. Ultérieurement, il est possible d'envisager que cette substance puisse servir de traitement contre les maladies auto-immunes, liées à une hyperactivation de STING.

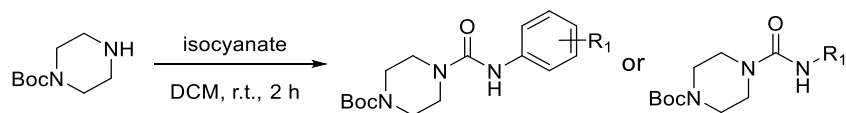
La famille des oxazolo[5,4-*d*]pyrimidines n'est pas en reste, car certains dérivés présentent également une faible activité antagoniste sur cette voie de signalisation (chez la souris). Néanmoins, un travail d'optimisation des structures reste à réaliser pour éventuellement améliorer ces activités biologiques. Cela passe particulièrement par la modulation de la position C-2, ou « tête », qui reste un point peu développé dans le cadre de ce projet. Toutefois, sur le modèle du poulet, le composé **63** a montré une activité inhibitrice sans précédent. Ici également, beaucoup reste à faire pour déterminer la cible biologique de la molécule. En effet, la voie cGAS-STING chez le poulet n'a été que peu étudiée jusqu'à présent. La découverte d'une telle molécule va servir au développement d'outils, qui rendrons possible la compréhension des mécanismes biologiques impliqués dans cette voie.

Par ailleurs, les différentes tentatives de formation de composés homodimères, à partir de nos composés benzimidazole et oxazolo[5,4-*d*]pyrimidine, n'ont pas été concluantes. La stratégie adoptée a consisté en l'insertion de deux motifs hétérocycliques par *S_NAr*, sur le 1,3-dibromopropane. Cependant, dans le cadre des benzimidazoles, la présence de deux formes tautomères sur le squelette induit la formation de

plusieurs régioisomères d'alkyles. De plus, l'amine portée étant peu nucléophile, elle doit être activée en amidure, ce qui conduit inévitablement à la formation d'une chaîne *N*-allyl. On observe ce même phénomène avec le dérivé d'oxazolo[5,4-*d*]pyrimidine sélectionné pour former des dimères. D'autres stratégies de synthèse doivent donc être explorées pour pouvoir accéder à ces dérivés homodimériques, puisque celles-ci ne semblent pas compatibles avec nos systèmes moléculaires.

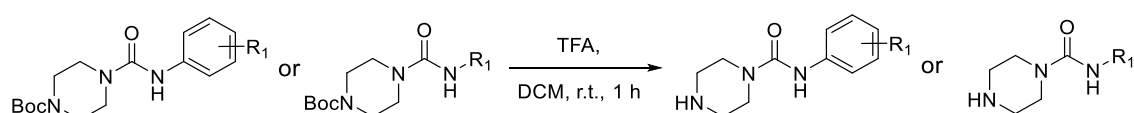
Partie expérimentale

General procedure (A) for the synthesis of piperazine moieties :



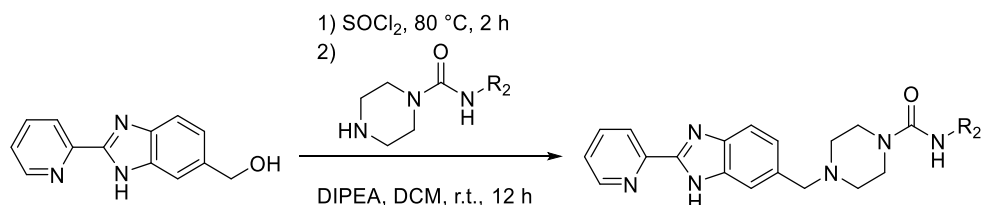
To a solution of Boc-piperazine **24** (1.0 eq.) in CH₂Cl₂ (12 mL) was added isocyanate (1.1 eq.). The reaction mixture was stirred, under argon atmosphere, at room temperature for 2 hours. The resulting mixture was diluted with CH₂Cl₂, the organic layer was washed with water and brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The crude was purified by flash-column chromatography (silica gel, CH₂Cl₂ 100% -> CH₂Cl₂/MeOH, 98:2) to obtain the desired product.

General procedure (B) for Boc- deprotection :



To a solution of the Boc-piperazine derivative (1.0 eq.) in CH₂Cl₂ was added then TFA (16.0 eq.). The reaction mixture was stirred for 1 to 2 hours at room temperature. The resulting mixture was coevaporated with toluene and concentrated under reduced pressure. The residue was then dissolved in EtOAc and sat. aq. NaHCO₃ was added. The aqueous layer was extracted with EtOAc and the combined organic layers were collected, dried over Na₂SO₄, and concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by flash-column chromatography (silica gel, CH₂Cl₂/MeOH, 95:5) to give the desired product.

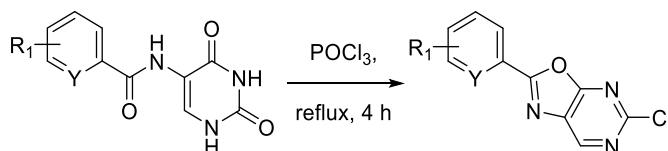
General procedure (C) for the coupling reaction :



To the flask with hydroxymethyl benzimidazole derivative **23** (200 mg, 0.89 mmol, 1.0 eq.) was added SOCl₂ (1.9 mL, 26 mmol, 29.0 eq.) and the resulting mixture was stirred at 80 °C for 2 hours. After cooling to room temperature, the SOCl₂ was evaporated and the obtained residue was diluted with CH₂Cl₂ (15 mL) and cooled to 0 °C. Then, DIPEA (0.9 mL, 5.34 mmol, 6.0 eq.) was added to the reaction mixture, followed by the piperazine derivative (1.0 eq.). The ice bath was removed, and the reaction mixture was stirred for 12 hours at room temperature. Water was added, and the aqueous layer was extracted 4 times with CH₂Cl₂. Combined

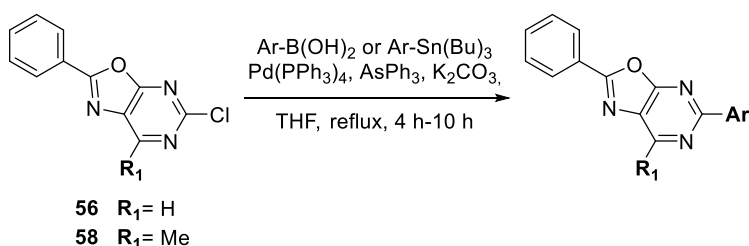
organic layers were rinsed with brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The crude residue was purified by flash-column chromatography (silica gel, CH₂Cl₂/MeOH) to provide the desired product.

General procedure (D) for cyclisation under POCl₃ :



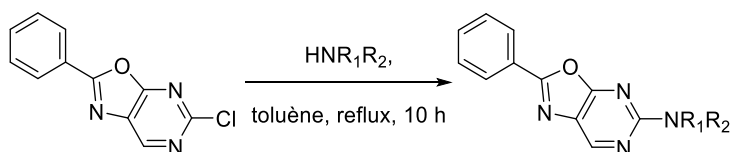
Amide derivative (3.0 g, 13.0 mmol) was suspended in POCl₃ (30 mL) and the mixture was refluxed - 120 °C- for 4 hours. The resulting dark mixture was cooled to 0 °C and gradually poured on ice to obtain a strong acidic yellow aqueous solution. The pH was adjusted to 9 with NaOH pellets at 0 °C – a brownish precipitate was formed, then filtered off and washed with water. This material was diluted in EtOAc, dried over Na₂SO₄ and volatiles were removed under high *vacuum*. The crude solid was purified by flash-column chromatography (silica gel, PE 100%-PE/EtOAc, 9:1) to obtain the cyclised product.

General procedure (E) for Suzuki and Stille coupling :



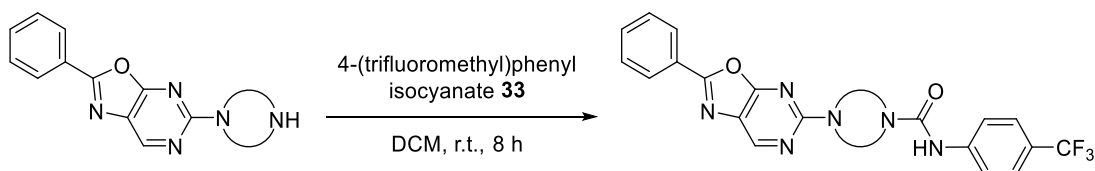
To a solution of **56** (200 mg, 0.86 mmol, 1.0 eq.) or **58** (211 mg, 0.86 mmol, 1.0 eq.) in degassed THF (12 mL) and under argon atmosphere, was added the boronic acid or the aryl-tributylstannyl (3.44 mmol, 4.0 eq.), triphenyl arsenic (53 mg, 0.17 mmol, 20 mol.%), potassium carbonate (775 mg, 7.74 mmol, 9.0 eq.) and Pd(PPh₃)₄ (50 mg, 0.04 mmol, 5 mol.%). The reaction mixture was refluxed under argon for the appropriate time (Table 1). The final solution was filtered on a Celite-pad and then concentrated under reduced pressure. The residue was diluted in CH₂Cl₂, washed with sat. aqueous NH₄Cl, organic layer was dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. Crude material was purified by flash column chromatography (silica gel, PE 100% -> PE/EtOAc, 9:1) to give the desired compound.

General procedure (F) for S_NAr substitutions of oxazolo[5,4-d]pyrimidine :



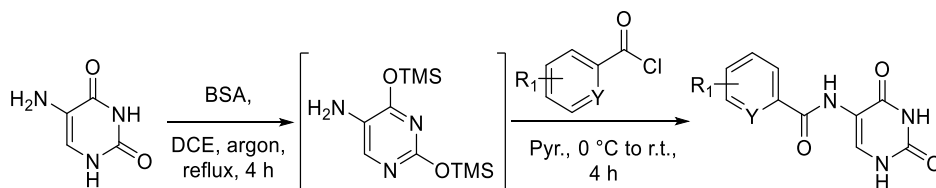
Under a dried and inert atmosphere, **56** (1.0 eq.) and amine (2.5 eq.) were suspended in toluene (4 mL). The mixture was heated at 110 °C for 10 hours. Volatiles were evaporated and the crude material was purified flash-column chromatography (silica gel, PE/EtOAc, 8:2) to obtain the desired product.

General procedure (G): derivatization into N-(4-(trifluoromethyl)phenyl)carboxamide :



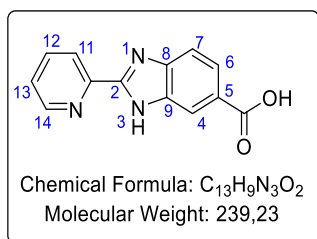
Under a dried and inert atmosphere, amide derivative (1.0 eq.) was suspended in CH₂Cl₂ (6 mL, c = 0.04 mol/L) and the 4-(trifluoromethyl)phenyl isocyanate **33** (1.2 eq.) was added dropwise. The mixture was let at room temperature for 8 hours. The formed precipitate was filtered off and rinse with cold CH₂Cl₂ to get the pure desired product.

General procedure (H): formation of arylamides through silylation of 5-aminouracil :



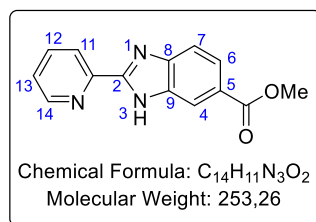
5-aminouracil **54** (1,5 g, 11.8 mmol, 1.0 eq.) was suspended in DCE (90 mL) under a dried and inert atmosphere. BSA (7.3 mL, 29.5 mmol, 2.5 eq.) was slowly added and the resulting mixture was heated at 130 °C (reflux) for 4 hours. The limpid brown solution was cooled to 0 °C. Pyridine (3.8 mL, 47.2 mmol, 4.0 eq.) was added, followed by the acyl chloride (17.7 mmol, 1.5 eq.). The reaction mixture was let to stir at room temperature for 4 hours. After cooling at 0 °C, reaction was quenched with sat. aq. NaHCO₃ and the resulting suspension was let to stir for 30 minutes. The formed precipitate was filtered off and rinse with water. The crude material was then purified by flash-column chromatography (silica gel, CH₂Cl₂/MeOH, 95:5 to CH₂Cl₂/MeOH, 9:1) to get the desired compound.

2-(pyridin-2-yl)-1H-benzo[d]imidazole-5-carboxylic acid (20**)**



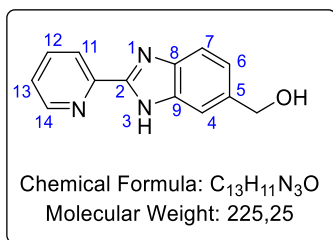
To a solution of 3,4-diaminobenzoic acid (**18**) (2.0 g, 13.1 mmol, 1.0 eq.) in acetic acid (30 mL) was slowly added picolinaldehyde (**17**) (1.25 mL, 13.1 mmol, 1.0 eq.), and the reaction mixture was stirred at 120 °C for 5 hours. The reaction mixture was cooled down to room temperature and half of the solvent was then evaporated under reduced pressure. The obtained solid was filtered, washed with water and dried under *vacuum* to give **20** (2.5 g, 10.5 mmol) as a brown solid in 80% yield. The crude residue was directly used in the next step without further purification. ¹H NMR (250 MHz, MeOD): δ 8.69 (ddd, ⁵J = 1.0 Hz, ⁴J = 1.8 Hz, ⁵J = 4.8 Hz, 1H, H₁₄), 8.32 (dd, ⁵J = 0.7 Hz, ⁴J = 1.6 Hz, 1H, H₄), 8.24 (dt, ⁴J = 1.1 Hz, ³J = 8.0 Hz, 1H, H₁₁), 7.98 – 7.86 (m, 2H, H₆, H₁₂), 7.62 (dd, ⁴J = 0.7 Hz, ³J = 8.6 Hz, 1H, H₇), 7.48 – 7.33 (m, 1H, H₁₃). ¹³C NMR (63 MHz, MeOD) δ 174.4 (quat C, COOH), 152.4 (quat C, C₂), 149.5 (CH, C₁₄), 148.1 (quat C, C₁₀), 140.3 (quat C, C₈), 137.1 (CH, C₁₂), 133.3 (quat C, C₉), 124.6 (2x CH, C₆, C₁₃), 124.5 (quat C, C₅), 121.2 (CH, C₁₁), 116.5 (CH, C₄), 113.9 (CH, C₇). LC-MS (ESI⁺) *m/z* = 240.1 [M+H]⁺. The spectroscopic data are in accordance with those reported in literature (CAS # 669070-64-8).

Methyl 2-(pyridin-2-yl)-1H-benzo[d]imidazole-5-carboxylate (**21**)



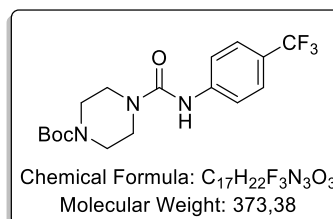
To a solution of compound **20** (1.2 g, 5.02 mmol, 1.0 eq.) in MeOH (12 mL) cooled at 0 °C, was slowly added SOCl₂ (0.8 mL, 11.0 mmol, 2.2 eq.). The reaction mixture was heated at 80 °C for 4 hours. After cooling at room temperature, water was added, and the mixture was concentrated under reduced pressure. The pH was adjusted to 7 with a sat. aq. The aqueous phase was extracted three times with EtOAc. The combined organic layers were dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The crude residue was purified by flash-column chromatography (silica gel, EtOAc, 100%) to give (**21**) (1.14 g, 4.50 mmol) as a beige solid in 95% yield. **Rf** = 0,46 (silica, PE/EtOAc, 9 :1). **Mp** = 192 ± 2 °C. **IR (cm⁻¹)**: 3319, 1696, 1436, 1401, 1324, 1276, 1214, 1114. ¹H NMR (250 MHz, MeOD): δ 8.69 (ddd, ⁵J = 1.0 Hz, ⁴J = 1.8 Hz, ⁵J = 4.8 Hz, 1H, H₁₄), 8.32 (dd, ⁵J = 0.7 Hz, ⁴J = 1.6 Hz, 1H, H₄), 8.24 (dt, ⁴J = 1.1 Hz, ³J = 8.0 Hz, 1H, H₁₁), 7.98 – 7.86 (m, 2H, H₆, H₁₂), 7.62 (dd, ⁴J = 0.7 Hz, ³J = 8.6 Hz, 1H, H₇), 7.48 – 7.33 (m, 1H, H₁₃), 3.91 (s, 3H, CH₃). ¹³C NMR (63 MHz, MeOD): δ 174.4 (quat C, COOH), 152.4 (quat C, C₂), 149.5 (CH, C₁₄), 148.1 (quat C, C₁₀), 140.3 (quat C, C₈), 137.1 (CH, C₁₂), 133.3 (quat C, C₉), 124.6 (2x CH, C₆, C₁₃), 124.5 (quat C, C₅), 121.2 (CH, C₁₁), 116.5 (CH, C₄), 113.9 (CH, C₇), 52.5 (CH₃). **LC-MS (ESI⁺)** *m/z* = 254.2 [M+H]⁺. The spectroscopic data are in accordance with those reported in literature (CAS # 864274-78-2).

(2-(pyridin-2-yl)-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)methanol (**23**)



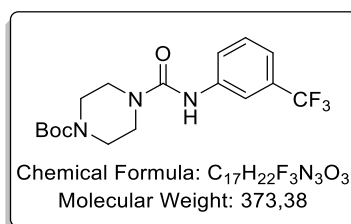
To a solution of compound **21** (2.0 g, 7.90 mmol, 1.0 eq.) in dry THF (100 mL) cooled at 0 °C, was slowly added LiAlH₄ (600 mg, 15.8 mmol, 2.0 eq.) under argon atmosphere. The ice bath was removed, and the reaction was stirred for 3 hours at 50 °C. The reaction mixture was cooled at 0 °C and then quenched with sat. aq. NaHCO₃. The mixture was concentrated under reduced pressure and the resulting aqueous phase was extracted four times with EtOAc. The combined organic layers were dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The crude residue was purified by flash-column chromatography (silica gel, CH₂Cl₂/MeOH, 95:5) to give **23** (1.5 g, 6.71 mmol) as a yellow solid in 85% yield. **R_f**= 0,32 (CH₂Cl₂/MeOH 9 :1). **Mp**= 170 ± 2 °C. **IR (cm⁻¹)**: 3228, 1594, 1567, 1445, 1308, 1223. **¹H NMR (400 MHz, MeOD)**: δ 8.70 (d, ³J = 4.7 Hz, 1H, H₁₄), 8.27 (d, ³J = 7.9 Hz, 1H, H₁₁), 7.93 (td, ⁴J = 1.4 Hz, ³J = 7.9 Hz, 1H, H₁₂), 7.65 (m, 1H, H₄), 7.44 (d, ³J = 8.3 Hz, 1H, H₇), 7.44 (d, ⁴J = 1.4 Hz, ³J = 7.9 Hz, 1H, H₁₃), 7.31 (d, ³J = 8.3 Hz, 1H, H₆), 4.75 (s, 2H, CH₂). **¹³C NMR (101 MHz, Acetone-d₆)**: δ 151.3 (quat C, C₂), 149.4 (quat C, C₅), 149.4 (CH, C₁₄), 148.0 (quat C, C₁₀), 137.1 (CH, C₁₂), 137.1 (quat C, C₉), 136.5 (quat C, C₈), 124.5 (3x CH, C₄, C₇, C₁₃), 122.6 (CH, C₆), 121.1 (CH, C₁₁), 64.2 (CH₂). **LC-MS (ESI⁺)** *m/z* = 226.1 [M+H]⁺. The spectroscopic data are in accordance with those reported in literature (CAS # 308362-15-4).

tert-Butyl 4-((4-(trifluoromethyl)phenyl)carbamoyl)piperazine-1-carboxylate (25a)



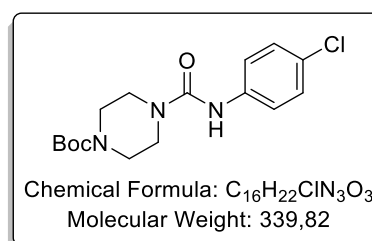
The title compound was prepared from Boc-piperazine **24** (400 mg, 2.15 mmol, 1.0 eq.) and 4-(trifluoromethyl)phenyl isocyanate **45** (0.34 mL, 2.36 mmol, 1.1 eq.) following the **general procedure (A)**. Compound **25a** (780 mg, 2.09 mmol) was obtained as a white solid in 97% yield. **R_f**= 0.5 (CH₂Cl₂/MeOH, 96:4). **¹H NMR (250 MHz, DMSO-d₆)**: δ 8.56 (s, 1H, NH), 7.54 (d, ³J = 8.9 Hz, 2H, H_{ar}), 7.26 (d, ³J = 8.9 Hz, 2H, H_{ar}), 3.60-3.44 (m, 8H, piperazine), 1.51 (s, 9H, -Boc). **LC-MS (ESI⁺)** *m/z* = 374.5 [M+H]⁺. The spectroscopic data are in accordance with those reported in literature (CAS # 651293-08-2).

tert-Butyl 4-((3-(trifluoromethyl)phenyl)carbamoyl)piperazine-1-carboxylate (25b)



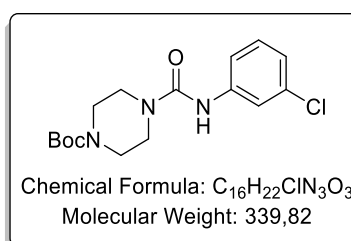
The title compound was prepared from Boc-piperazine **24** (400 mg, 2.15 mmol, 1.0 eq.) and 3-(trifluoromethyl)phenyl isocyanate (0.34 mL, 2.36 mmol, 1.1 eq.) following the **general procedure (A)**. Compound **25b** (763 mg, 2.04 mmol) was obtained as a white solid in 95% yield. *R_f* = 0.5 (CH₂Cl₂/MeOH, 96:4). ¹H NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.85 (s, 1H, NH), 7.86 (s, 1H, H_{ar}), 7.69 (d, ³*J* = 7.7 Hz, 1H, H_{ar}), 7.42 (t, ³*J* = 8.0 Hz, 1H, H_{ar}), 7.22 (dd, ⁴*J* = 1.8 Hz, ³*J* = 7.7 Hz, 1H, H_{ar}), 3.40 (m, 4H, piperazine), 3.28 (m, 4H, piperazine), 1.37 (s, 9H, -Boc). LC-MS (ESI⁺) *m/z* = 374.5 [M+H]⁺. The spectroscopic data are in accordance with those reported in literature (CAS # 1265591-99-8).

tert-Butyl 4-((4-chlorophenyl)carbamoyl)piperazine-1-carboxylate (25c)



The title compound was prepared from Boc-piperazine **24** (400 mg, 2.15 mmol, 1.0 eq.) and 4-chlorophenyl isocyanate (0.30 mL, 2.36 mmol, 1.1 eq.) following the **general procedure (A)**. Compound **25c** (701 mg, 2.06 mmol) was obtained as a white solid in 96% yield. *R_f* = 0.43 (CH₂Cl₂/MeOH, 97:3). ¹H NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.77 (s, 1H, NH), 7.77 (dd, ⁴*J* = 1.5 Hz, ³*J* = 8.1 Hz, 2H, H_{ar}), 7.42 (dd, ⁴*J* = 1.5 Hz, ³*J* = 8.1 Hz, 2H, H_{ar}), 3.60 (m, 4H, piperazine), 2.58 (m, 4H, piperazine), 1.40 (s, 9H, -Boc). LC-MS (ESI⁺) *m/z* = 340.9 [M+H]⁺. The spectroscopic data are in accordance with those reported in literature (CAS # 1315592-03-0).

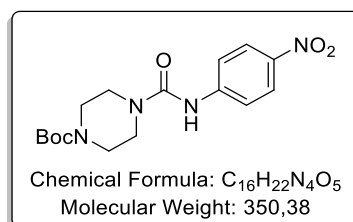
tert-butyl 4-((3-chlorophenyl)carbamoyl)piperazine-1-carboxylate (25d)



The title compound was prepared from Boc-piperazine **24** (400 mg, 2.15 mmol, 1.0 eq.) and 3-chlorophenyl isocyanate (0.29 mL, 2.36 mmol, 1.1 eq.) following the **general procedure (A)**. Compound **25d**

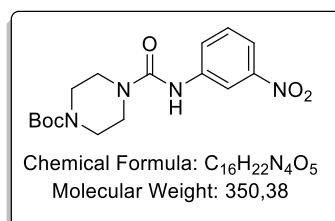
(693 mg, 2.04 mmol) was obtained as a white solid in 95% yield. **Rf**= 0.43 (CH₂Cl₂/MeOH, 97:3). **¹H NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 8.83 (s, 1H, NH), 7.79 (d, ⁴*J* = 1.7 Hz, 1H, H_{ar}), 7.60 (dt, ⁴*J* = 1.7 Hz, ³*J* = 8.2 Hz, 1H, H_{ar}), 7.35 (d, ³*J* = 8.1 Hz, 1H, H_{ar}), 7.16 (dd, ⁴*J* = 1.7 Hz, ³*J* = 8.1 Hz, 1H, H_{ar}), 3.61 (m, 4H, piperazine), 3.58 (m, 4H, piperazine), 1.43 (s, 9H, -Boc). **LC-MS (ESI⁺)** *m/z* = 340.8 [M+H]⁺. The spectroscopic data are in accordance with those reported in literature (**CAS # 1326562-27-9**).

***tert*-Butyl 4-((4-nitrophenyl)carbamoyl)piperazine-1-carboxylate (25e)**



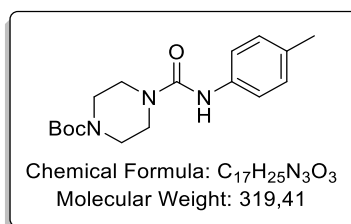
The title compound was prepared from Boc-piperazine **24** (400 mg, 2.15 mmol, 1.0 eq.) and 4-nitrophenyl isocyanate (387 mg, 2.36 mmol, 1.1 eq.) following the **general procedure (A)**. Compound **25e** (715 mg, 2.04 mmol) was obtained as a yellowish solid in 95% yield. **Rf**= 0.51 (CH₂Cl₂/MeOH, 95:5). **¹H NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 8.87 (s, 1H, NH), 8.13 (dd, ⁴*J* = 1.8 Hz, ³*J* = 8.7 Hz, 2H, H_{ar}), 7.36 (dd, ⁴*J* = 2.3 Hz, ³*J* = 8.7 Hz, 2H, H_{ar}), 3.60 (m, 4H, piperazine), 3.58 (m, 4H, piperazine), 1.39 (s, 9H, -Boc). **LC-MS (ESI⁺)** *m/z* = 351.4 [M+H]⁺. The spectroscopic data are in accordance with those reported in literature (**CAS # 1315592-07-4**).

***tert*-butyl 4-((3-nitrophenyl)carbamoyl)piperazine-1-carboxylate (25f)**



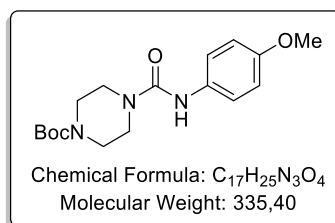
The title compound was prepared from Boc-piperazine **24** (400 mg, 2.15 mmol, 1.0 eq.) and 3-chlorophenyl isocyanate (387 mg, 2.36 mmol, 1.1 eq.) following the **general procedure (A)**. Compound **25f** (715 mg, 2.04 mmol) was obtained as a yellowish solid in 95% yield. **Rf**= 0.68 (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1). **¹H NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 8.83 (s, 1H, NH), 7.89 (dd, ⁴*J* = 1.7 Hz, ⁴*J* = 1.5 Hz, 1H, H_{ar}), 7.49-7.41 (m, 3H, H_{ar}), 7.35 (d, ³*J* = 8.1 Hz, 1H, H_{ar}), 7.16 (dd, ⁴*J* = 1.7 Hz, ³*J* = 8.1 Hz, 1H, H_{ar}), 3.60 (m, 4H, piperazine), 3.58 (m, 4H, piperazine), 1.41 (s, 9H, -Boc). **LC-MS (ESI⁺)** *m/z* = 351.5 [M+H]⁺. The spectroscopic data are in accordance with those reported in literature (**CAS # 1324959-33-2**).

***tert*-butyl 4-(*p*-tolylcarbamoyl)piperazine-1-carboxylate (25g)**



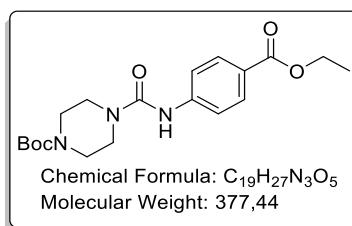
The title compound was prepared from Boc-piperazine **24** (400 mg, 2.15 mmol, 1.0 eq.) and *p*-tolyl isocyanate (0.18 mL, 2.36 mmol, 1.1 eq.) following the **general procedure (A)**. Compound **25g** (677 mg, 2.12 mmol) was obtained as a creamy solid in 98% yield. **R_f**= 0.43 (CH₂Cl₂/MeOH, 96:4). **¹H NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 8.53 (s, 1H, NH), 7.24 (d, ³*J* = 8.2 Hz, 2H, H_{ar}), 7.10 (d, ³*J* = 8.2 Hz, 2H, H_{ar}), 3.60 (m, 4H, piperazine), 3.58 (m, 4H, piperazine), 2.32 (s, 3H, CH₃), 1.42 (s, 9H, -Boc). **LC-MS (ESI⁺)** *m/z* = 320.4 [M+H]⁺. The spectroscopic data are in accordance with those reported in literature (**CAS # 1325444-24-3**).

***tert*-butyl 4-((4-methoxyphenyl)carbamoyl)piperazine-1-carboxylate (25h)**



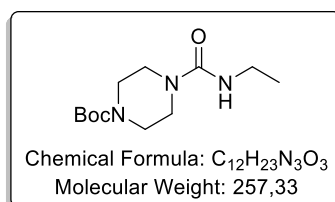
The title compound was prepared from Boc-piperazine **24** (400 mg, 2.15 mmol, 1.0 eq.) and 4-methoxyphenyl isocyanate (0.31 mL, 2.36 mmol, 1.1 eq.) following the **general procedure (A)**. Compound **25h** (711 mg, 2.12 mmol) was obtained as a white solid in 98% yield. **R_f**= 0.67 (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1). **¹H NMR (250 MHz DMSO-*d*₆)**: δ 7.23 (d, ³*J* = 8.7 Hz, 2H, H_{ar}), 6.81 (d, ³*J* = 8.7 Hz, 2H, H_{ar}), 6.72 (s, 1H, NH), 4.20–3.85 (m, 2H, piperazine), 3.77 (s, 3H, OCH₃), 3.73–3.54 (m, 2H, piperazine), 3.53–3.18 (m, 4H, piperazine), 1.42 (s, 9H, -Boc). **LC-MS (ESI⁺)** *m/z* = 336.5 [M+H]⁺. The spectroscopic data are in accordance with those reported in literature (**CAS # 1326394-37-9**).

***tert*-butyl 4-((4-(ethoxycarbonyl)phenyl)carbamoyl)piperazine-1-carboxylate (25i)**



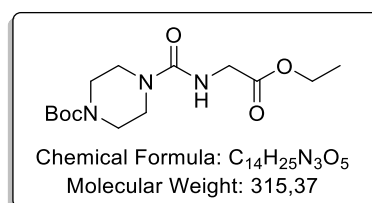
The title compound was prepared from Boc-piperazine **24** (400 mg, 2.15 mmol, 1.0 eq.) and ethyl 4-isocyanatobenzoate (0.40 mL, 2.36 mmol, 1.1 eq.) following the **general procedure (A)**. Compound **25i** (789 mg, 2.09 mmol) was obtained as a white solid in 97% yield. **Rf**= 0.67 ($CH_2Cl_2/MeOH$, 9:1). **1H NMR (250 MHz, $DMSO-d_6$)**: δ 8.05 (d, 3J = 8.5 Hz, 2H, H_{ar}), 7.36 (d, 3J = 8.5 Hz, 2H, H_{ar}), 6.80 (s, 1H, NH), 4.30 (m, 2H, CH_2), 4.20–3.85 (m, 2H, piperazine), 3.73–3.54 (m, 2H, piperazine), 3.53–3.18 (m, 4H, piperazine), 1.42 (s, 9H, -Boc), 1.29 (m, 3H, CH_3). **LC-MS (ESI $^+$)** m/z = 378.5 $[M+H]^+$. The spectroscopic data are in accordance with those reported in literature (**CAS # 1459753-39-9**).

tert-butyl 4-(ethylcarbamoyl)piperazine-1-carboxylate (27a)



The title compound was prepared from Boc-piperazine **24** (400 mg, 2.15 mmol, 1.0 eq.) and ethyl isocyanate (0.19 mL, 2.36 mmol, 1.1 eq.) following the **general procedure (A)**. Compound **27a** (530 mg, 2.06 mmol) was obtained as a white solid in 96% yield. **Rf**= 0.59 ($CH_2Cl_2/MeOH$, 9:1). **1H NMR (250 MHz, $DMSO-d_6$)**: δ 6.80 (s, 1H, NH), 4.30 (m, 2H, CH_2), 4.20–3.85 (m, 2H, piperazine), 3.73–3.54 (m, 2H, piperazine), 3.53–3.18 (m, 4H, piperazine), 3.09 (m, 2H, CH_2), 1.42 (s, 9H, -Boc), 1.23 (m, 3H, CH_3). **LC-MS (ESI $^+$)** m/z = 258.4 $[M+H]^+$. The spectroscopic data are in accordance with those reported in literature (**CAS # 877165-63-4**).

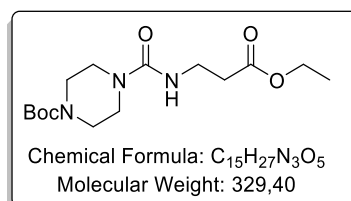
tert-butyl 4-((2-ethoxy-2-oxoethyl)carbamoyl)piperazine-1-carboxylate (27b)



The title compound was prepared from Boc-piperazine **24** (400 mg, 2.15 mmol, 1.0 eq.) and ethyl isocyanatoacetate (0.19 mL, 2.36 mmol, 1.1 eq.) following the **general procedure (A)**. Compound **27b** (576 mg, 1.83 mmol) was obtained as a white solid in 85% yield. **Rf**= 0.76 ($CH_2Cl_2/MeOH$, 9:1). **1H NMR (250 MHz, $DMSO-d_6$)**: δ 6.80 (s, 1H, NH), 4.30 (m, 2H, CH_2), 4.20–3.85 (m, 4H, piperazine, O- CH_2), 3.72 (s, 2H, N- CH_2 -CO), 3.70–3.54 (m, 2H, piperazine), 3.53–3.18 (m, 4H, piperazine), 1.42 (s, 9H, -Boc), 1.15 (m, 3H, CH_3). **LC-MS (ESI $^+$)**

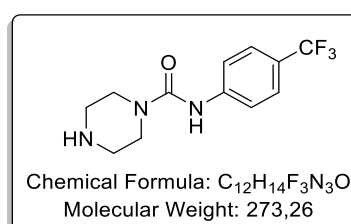
$m/z = 316.5$ $[M+H]^+$. The spectroscopic data are in accordance with those reported in literature (**CAS # 470716-34-8**).

***tert*-butyl 4-((3-ethoxy-3-oxopropyl)carbamoyl)piperazine-1-carboxylate (**27c**)**



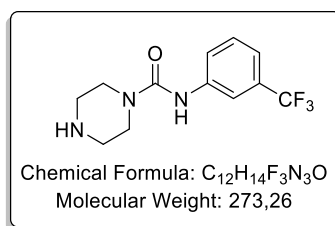
The title compound was prepared from Boc-piperazine **24** (400 mg, 2.15 mmol, 1.0 eq.) and 3-isocyanato-propionic acid ethyl ester (0.31 mL, 2.36 mmol, 1.1 eq.) following the **general procedure (A)**. Compound **27c** (687 mg, 2.09 mmol) was obtained as a white solid in 97% yield. **R_f**= 0.76 ($CH_2Cl_2/MeOH$, 9:1). **¹H NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 6.80 (s, 1H, NH), 4.30 (m, 2H, CH_2), 4.20–3.85 (m, 4H, piperazine, O- CH_2), 3.70–3.54 (m, 2H, piperazine), 3.53–3.18 (m, 8H, piperazine, N- CH_2 , CH_2 -CO), 1.43 (s, 9H, -Boc), 1.15 (m, 3H, CH_3). **LC-MS (ESI⁺)** $m/z = 330.6$ $[M+H]^+$. The spectroscopic data are in accordance with those reported in literature (**CAS # 2207360-04-9**).

***N*-(4-(trifluoromethyl)phenyl)piperazine-1-carboxamide (**26a**)**



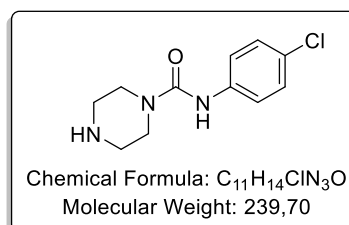
The title compound was prepared from **25a** (261 mg, 0.70 mmol, 1.0 eq.) and TFA (0.86 mL, 11.2 mmol, 16.0 eq.) following the **general procedure (B)**. Compound **26a** (166 mg, 0.61 mmol) was obtained as a white solid in 87% yield. **R_f**= 0.14 ($CH_2Cl_2/MeOH$, 9:1). **¹H NMR (250 MHz, MeOD)**: δ 7.54 (d, $^3J = 8.9$ Hz, 2H, H_{ar}), 7.26 (d, $^3J = 8.9$ Hz, 2H, H_{ar}), 3.60-3.44 (m, 8H, piperazine). **LC-MS (ESI⁺)** $m/z = 274.4$ $[M+H]^+$. The spectroscopic data are in accordance with those reported in literature (**CAS # 651293-08-2**).

***N*-(3-(trifluoromethyl)phenyl)piperazine-1-carboxamide (**26b**)**



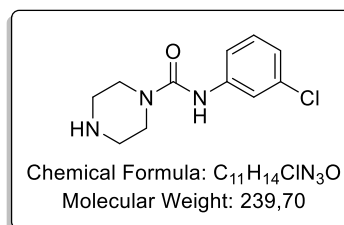
The title compound was prepared from **25b** (261 mg, 0.70 mmol, 1.0 eq.) and TFA (0.86 mL mL, 11.2 mmol, 16.0 eq.) following the **general procedure (B)**. Compound **26b** (164 mg, 0.60 mmol) was obtained as a white solid in 85% yield. **R_f**= 0.14 (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1). **¹H NMR (250 MHz, MeOD):** δ 7.86 (s, 1H, H_{ar}), 7.69 (d, ³*J* = 7.7 Hz, 1H, H_{ar}), 7.42 (t, ³*J* = 8.0 Hz, 1H, H_{ar}), 7.22 (dd, ⁴*J* = 1.8 Hz, ³*J* = 7.7 Hz, 1H, H_{ar}), 3.40 (m, 4H, piperazine), 3.28 (m, 4H, piperazine). **LC-MS (ESI⁺)** *m/z* = 274.4 [M+H]⁺. The spectroscopic data are in accordance with those reported in literature (**CAS # 1225578-90-4**).

***N*-(4-chlorophenyl)piperazine-1-carboxamide (26c)**



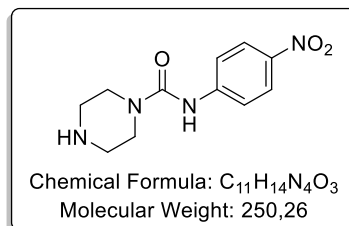
The title compound was prepared from **25c** (238 mg, 0.70 mmol, 1.0 eq.) and TFA (0.86 mL mL, 11.2 mmol, 16.0 eq.) following the **general procedure (B)**. Compound **26c** (151 mg, 0.63 mmol) was obtained as a white solid in 90% yield. **R_f**= 0.14 (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1). **R_f**= 0.34 (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1). **¹H NMR (250 MHz, MeOD):** δ 7.77 (dd, ⁴*J* = 1.5 Hz, ³*J* = 8.1 Hz, 2H, H_{ar}), 7.42 (dd, ⁴*J* = 1.5 Hz, ³*J* = 8.1 Hz, 2H, H_{ar}), 3.60 (m, 4H, piperazine), 3.58 (m, 4H, piperazine). **LC-MS (ESI⁺)** *m/z* = 240.8 [M+H]⁺. The spectroscopic data are in accordance with those reported in literature (**CAS # 923242-63-1**).

***N*-(3-chlorophenyl)piperazine-1-carboxamide (26d)**



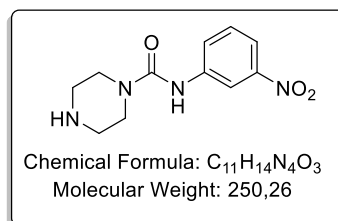
The title compound was prepared from **25d** (238 mg, 0.70 mmol, 1.0 eq.) and TFA (0.86 mL mL, 11.2 mmol, 16.0 eq.) following the **general procedure (B)**. Compound **26d** (119 mg, 0.50 mmol) was obtained as a white solid in 71% yield. **R_f**= 0.23 (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1). **¹H NMR (250 MHz, MeOD):** δ 7.79 (d, ⁴*J* = 1.7 Hz, 1H, H_{ar}), 7.60 (dt, ⁴*J* = 1.7 Hz, ³*J* = 8.2 Hz, 1H, H_{ar}), 7.35 (d, ³*J* = 8.1 Hz, 1H, H_{ar}), 7.16 (dd, ⁴*J* = 1.7 Hz, ³*J* = 8.1 Hz, 1H, H_{ar}), 3.61 (m, 4H, piperazine), 3.58 (m, 4H, piperazine). **LC-MS (ESI⁺)** *m/z* = 240.8 [M+H]⁺. The spectroscopic data are in accordance with those reported in literature (**CAS # 923191-18-8**).

***N*-(4-nitrophenyl)piperazine-1-carboxamide (26e)**



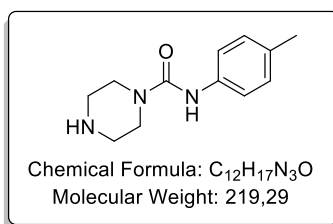
The title compound was prepared from **25e** (245 mg, 0.70 mmol, 1.0 eq.) and TFA (0.86 mL mL, 11.2 mmol, 16.0 eq.) following the **general procedure (B)**. Compound **26e** (114 mg, 0.46 mmol) was obtained as a white solid in 65% yield. **R_f**= 0.11 (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1). **¹H NMR (250 MHz, MeOD):** δ 8.13 (dd, ⁴*J* = 1.8 Hz, ³*J* = 8.7 Hz, 2H, H_{ar}), 7.36 (dd, ⁴*J* = 2.3 Hz, ³*J* = 8.7 Hz, 2H, H_{ar}), 3.60 (m, 4H, piperazine), 3.58 (m, 4H, piperazine). **LC-MS (ESI⁺)** *m/z* = 251.3 [M+H]⁺. The spectroscopic data are in accordance with those reported in literature (**CAS # 1154396-59-4**).

***N*-(3-nitrophenyl)piperazine-1-carboxamide (26f)**



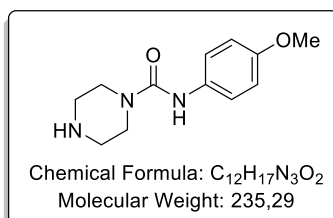
The title compound was prepared from **25f** (245 mg, 0.70 mmol, 1.0 eq.) and TFA (0.86 mL mL, 11.2 mmol, 16.0 eq.) following the **general procedure (B)**. Compound **26f** (110 mg, 0.44 mmol) was obtained as a white solid in 65% yield. **R_f**= 0.11 (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1). **¹H NMR (250 MHz, MeOD):** δ 7.89 (dd, ⁴*J* = 1.7 Hz, ⁴*J* = 1.5 Hz, 1H, H_{ar}), 7.49-7.41 (m, 3H, H_{ar}), 7.35 (d, ³*J* = 8.1 Hz, 1H, H_{ar}), 7.16 (dd, ⁴*J* = 1.7 Hz, ³*J* = 8.1 Hz, 1H, H_{ar}), 3.60 (m, 4H, piperazine), 3.58 (m, 4H, piperazine). **LC-MS (ESI⁺)** *m/z* = 251.3 [M+H]⁺. The spectroscopic data are in accordance with those reported in literature (**CAS # 1041516-73-7**).

***N*-(*p*-tolyl)piperazine-1-carboxamide (26g)**



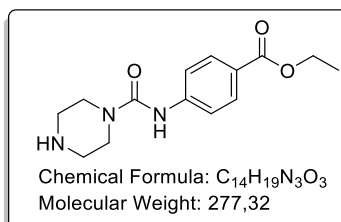
The title compound was prepared from **25g** (224 mg, 0.70 mmol, 1.0 eq.) and TFA (0.86 mL mL, 11.2 mmol, 16.0 eq.) following the **general procedure (B)**. Compound **26g** (132 mg, 0.60 mmol) was obtained as a white solid in 86% yield. **R_f**= 0.22 (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1). **¹H NMR (250 MHz, MeOD):** δ 7.24 (d, ³*J* = 8.2 Hz, 2H, H_{ar}), 7.10 (d, ³*J* = 8.2 Hz, 2H, H_{ar}), 3.60 (m, 4H, piperazine), 3.58 (m, 4H, piperazine), 2.32 (s, 3H, CH₃). **LC-MS (ESI⁺)** *m/z* = 220.4 [M+H]⁺. The spectroscopic data are in accordance with those reported in literature (**CAS #** 242814-90-0).

N-(4-methoxyphenyl)piperazine-1-carboxamide (26h)



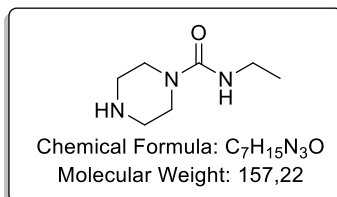
The title compound was prepared from **25h** (235 mg, 0.70 mmol, 1.0 eq.) and TFA (0.86 mL mL, 11.2 mmol, 16.0 eq.) following the **general procedure (B)**. Compound **26h** (105 mg, 0.45 mmol) was obtained as a white solid in 64% yield. **R_f**= 0.23 (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1). **¹H NMR (250 MHz, MeOD):** δ 7.23 (d, ³*J* = 8.7 Hz, 2H, H_{ar}), 6.81 (d, ³*J* = 8.7 Hz, 2H, H_{ar}), 4.20–3.85 (m, 2H, piperazine), 3.77 (s, 3H, OCH₃), 3.73–3.54 (m, 2H, piperazine), 3.53–3.18 (m, 4H, piperazine). **LC-MS (ESI⁺)** *m/z* = 236.4 [M+H]⁺. The spectroscopic data are in accordance with those reported in literature (**CAS #** 79221-45-7).

Ethyl-4-(piperazine-1-carboxamido)benzoate (26i)



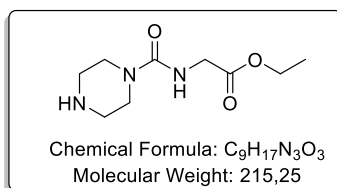
The title compound was prepared from **25i** (264 mg, 0.70 mmol, 1.0 eq.) and TFA (0.86 mL mL, 11.2 mmol, 16.0 eq.) following the **general procedure (B)**. Compound **26i** (82 mg, 0.29 mmol) was obtained as a white solid in 42% yield. **R_f**= 0.08 (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1). **¹H NMR (250 MHz, MeOD):** δ 8.05 (d, ³*J* = 8.5 Hz, 2H, H_{ar}), 7.36 (d, ³*J* = 8.5 Hz, 2H, H_{ar}), 4.30 (m, 2H, CH₂), 4.20–3.85 (m, 2H, piperazine), 3.73–3.54 (m, 2H, piperazine), 3.53–3.18 (m, 4H, piperazine), 1.29 (t, ³*J* = 8.3 Hz, 3H, CH₃). **LC-MS (ESI⁺)** *m/z* = 378.5 [M+H]⁺. The spectroscopic data are in accordance with those reported in literature (**CAS #** 604768-15-2).

N-ethylpiperazine-1-carboxamide (28a)



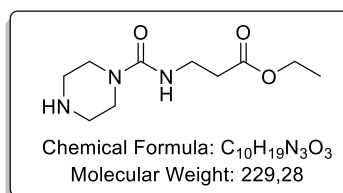
The title compound was prepared from **27a** (180 mg, 0.70 mmol, 1.0 eq.) and TFA (0.86 mL mL, 11.2 mmol, 16.0 eq.) following the **general procedure (B)**. Compound **28a** (77 mg, 0.49 mmol) was obtained as a white solid in 70% yield. **R_f**= 0.11 (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1). **¹H NMR (250 MHz, MeOD):** δ 4.30 (m, 2H, CH₂), 4.20–3.85 (m, 2H, piperazine), 3.73–3.54 (m, 2H, piperazine), 3.53–3.18 (m, 4H, piperazine), 3.09 (m, 2H, CH₂), 1.23 (m, 3H, CH₃). **LC-MS (ESI⁺)** *m/z* = 158.3 [M+H]⁺. The spectroscopic data are in accordance with those reported in literature (**CAS # 75529-72-5**).

Ethyl-(piperazine-1-carbonyl)glycinate (28b)



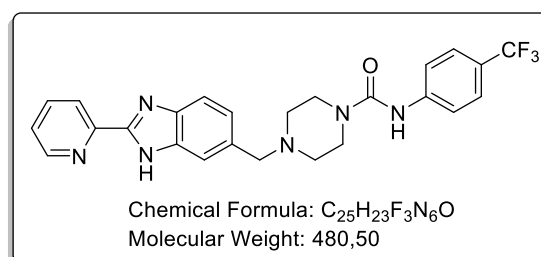
The title compound was prepared from **27b** (221 mg, 0.70 mmol, 1.0 eq.) and TFA (0.86 mL mL, 11.2 mmol, 16.0 eq.) following the **general procedure (B)**. Compound **28b** (110 mg, 0.51 mmol) was obtained as a white solid in 73% yield. **R_f**= 0.11 (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1). **¹H NMR (250 MHz, MeOD):** δ 4.30 (m, 2H, CH₂), 4.20–3.85 (m, 4H, piperazine, O-CH₂), 3.72 (s, 2H, N-CH₂-CO), 3.70–3.54 (m, 2H, piperazine), 3.53–3.18 (m, 4H, piperazine), 1.15 (t, ³*J* = 8.1 Hz, 3H, CH₃). **LC-MS (ESI⁺)** *m/z* = 216.3 [M+H]⁺. The spectroscopic data are in accordance with those reported in literature (**CAS # 1247702-56-2**).

Ethyl-3-(piperazine-1-carboxamido)propanoate (28c)



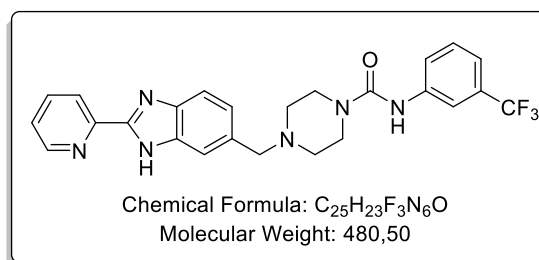
The title compound was prepared from **27c** (231 mg, 0.70 mmol, 1.0 eq.) and TFA (0.86 mL, 11.2 mmol, 16.0 eq.) following the **general procedure (B)**. Compound **28c** (142 mg, 0.62 mmol) was obtained as a white solid in 89% yield. **Rf** = 0.11 ($CH_2Cl_2/MeOH$, 9:1). **1H NMR (250 MHz, MeOD)**: δ 4.30 (m, 2H, CH_2), 4.20–3.85 (m, 4H, piperazine, O- CH_2), 3.70–3.54 (m, 2H, piperazine), 3.53–3.18 (m, 8H, piperazine, N- CH_2 , CH_2 -CO), 1.15 (t, 3J = 8.5 Hz, 3H, CH_3). **LC-MS (ESI⁺)** m/z = 230.3 $[M+H]^+$. The spectroscopic data are in accordance with those reported in literature (**CAS #** 2166682-33-1).

4-((2-(pyridin-2-yl)-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)methyl)-N-(4-(trifluoromethyl)phenyl)piperazine-1-carboxamide (**15**)



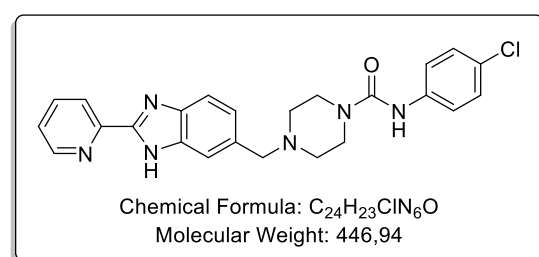
The title compound was prepared from **23** (200 mg, 0.89 mmol, 1.0 eq.) and **26a** (243 mg, 0.89 mmol, 1.0 eq.) following the **general procedure (C)**. Compound **15** (248 mg, 0.51 mmol) was obtained as an orange solid in 58% yield. **Rf** = 0.39 ($CH_2Cl_2/MeOH$, 9:1). **Mp** = 136 ± 2 °C. **IR (cm⁻¹)**: 1647, 1598, 1526, 1446, 1418, 1320, 1244, 1183, 1160, 11100, 1064. **1H NMR (400 MHz, Acetone- d_6)**: δ 12.04 (br s, 1H, -NH_{ar}), 8.62 (d, 3J = 4,6 Hz, 1H, H_{ar}), 8.37 (d, 3J = 7.8 Hz, 1H, H_{ar}), 8.32 (s, 1H, -CONH), 7.93 (td, 4J = 1.8 Hz, 3J = 7.8 Hz, 1H, H_{ar}), 7.71 (d, 3J = 8.6 Hz, 2H, H_{ar}), 7.61 (m, 2H, H_{ar}), 7.51 (d, 3J = 8.6 Hz, 2H, H_{ar}), 7.42 (ddd, 4J = 1.1 Hz, 4J = 4.8 Hz, 3J = 7.8 Hz, 1H, H_{ar}), 7.25 (d, 3J = 8.2 Hz, 1H, H_{ar}), 3.66 (s, 2H, CH_2), 3.55 (m, 4H, CH_2 -piperazine), 2.49 (m, 4H, CH_2 -piperazine). **^{13}C NMR (101 MHz, Acetone- d_6)**: δ 154.9 (quat C), 154.4 (quat C), 151.2 (quat C), 149.8 (quat C, CH), 149.0 (quat C), 144.5 (quat C), 144.4 (quat C), 137.1 (CH, quat C), 125.6 (2x CH), 125.5 (2x CH), 124.4 (CH), 121.3 (CH), 118.8 (2x CH), 118.7 (CH), 62.8 (CH_2), 52.7 (2x CH_2 , C_{piper.}), 44.0 (2x CH_2 , C_{piper.}). **HRMS (ESI⁺)** calcd. for $C_{25}H_{24}F_3N_6O$, 481,1958 $[M+H]^+$; found, 481.1954.

4-((2-(pyridin-2-yl)-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)methyl)-N-(3-(trifluoromethyl)phenyl)piperazine-1-carboxamide (**32a**)



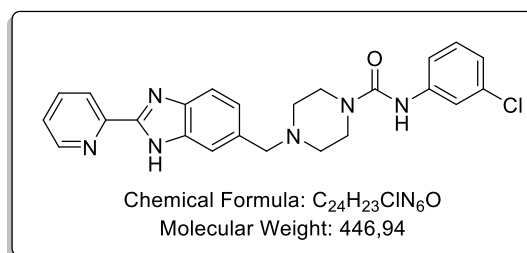
The title compound was prepared from **23** (200 mg, 0.89 mmol, 1.0 eq.) and **26b** (243 mg, 0.89 mmol, 1.0 eq.) following the **general procedure (C)**. Compound **32a** (218 mg, 0.45 mmol) was obtained as an orange solid in 51% yield. **Rf**= 0.40 ($CH_2Cl_2/MeOH$, 9:1). **Mp**= 139 ± 2 °C. **IR (cm⁻¹)**: 1647, 1598, 1526, 1446, 1418, 1320, 1244, 1183, 1160, 11100, 1064. **¹H NMR (400 MHz, MeOD)**: δ 8.69 (d, $^3J = 4.9$ Hz, 1H, H_{ar}), 8.31 – 8.19 (m, 1H, H_{ar}), 7.93 (t, $^3J = 7.8$ Hz, 1H, H_{ar}), 7.74 (m, 1H, H_{ar}), 7.57 (m, 3H, H_{ar}), 7.50 – 7.22 (m, 4H, H_{ar}), 3.68 (s, 2H, CH_2), 3.55 (m, 4H, CH_2 -piperazine), 2.53 (m, 4H, CH_2 -piperazine). **¹³C NMR (101 MHz, MeOD)**: δ 156.0 (2x quat C), 151.5 (quat C), 149.5 (CH), 148.0 (quat C), 140.6 (quat C), 137.1 (CH, quat C), 129.0 (2x CH), 124.5 (CH), 123.3 (CH), 121.1 (CH), 118.6 (2x CH), 116.6 (2x CH), 116.5 (2x CH), 62.7 (CH_2), 52.5 (2x CH_2 , $C_{piper.}$), 43.6 (2x CH_2 , $C_{piper.}$). **HRMS (ESI⁺)** calcd. for $C_{25}H_{24}F_3N_6O$, 481,1958 $[M+H]^+$; found, 481.1952.

N-(4-chlorophenyl)-4-((2-(pyridin-2-yl)-1H-benzo[d]imidazol-6-yl)methyl)piperazine-1-carboxamide (32b)



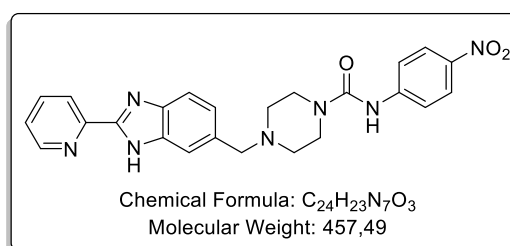
The title compound was prepared from **23** (200 mg, 0.89 mmol, 1.0 eq.) and **26c** (213 mg, 0.89 mmol, 1.0 eq.) following the **general procedure (C)**. Compound **32b** (219 mg, 0.49 mmol) was obtained as an orange solid in 55% yield. **Rf**= 0.45 ($CH_2Cl_2/MeOH$, 9:1). **Mp**= 210 ± 2 °C. **IR (cm⁻¹)**: 1636, 1592, 1530, 1496, 1445, 1424, 1392, 1285, 1247, 1151, 1087. **¹H NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 13.05 (s, 1H, NH_{ar}), 8.73 (d, $^3J = 4.4$ Hz, 1H, H_{ar}), 8.62 (s, 1H, CO-NH), 8.32 (d, $^3J = 7.9$ Hz, 1H, H_{ar}), 8.00 (td, $^4J = 1.4$ Hz, $^3J = 7.7$ Hz, 1H, H_{ar}), 7.64 (m, 1H, H_{ar}), 7.49 (m, 4H, H_{ar}), 7.23 (m, 3H, H_{ar}), 3.61 (s, 2H, CH_2), 3.46 (m, 4H, CH_2 -piperazine), 2.42 (m, 4H, CH_2 -piperazine). **¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 155.2 (quat C), 151.3 (quat C), 149.8 (quat C, CH), 149.0 (quat C), 143.7 (quat C), 140.7 (quat C), 138.0 (CH), 135.5 (quat C), 128.6 (2x CH), 125.7 (quat C), 125.1 (CH), 123.8 (CH), 121.8 (CH), 121.4 (2x CH), 119.3 (CH), 112.1 (CH), 62.9 (CH_2), 53.0 (2x CH_2 , $C_{piper.}$), 44.2 (2x CH_2 , $C_{piper.}$). **HRMS (ESI⁺)** calcd. for $C_{24}H_{24}ClN_6O$, 447.1695 $[M+H]^+$; found, 447.1696.

N-(3-chlorophenyl)-4-((2-(pyridin-2-yl)-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)methyl)piperazine-1-carboxamide (32c)



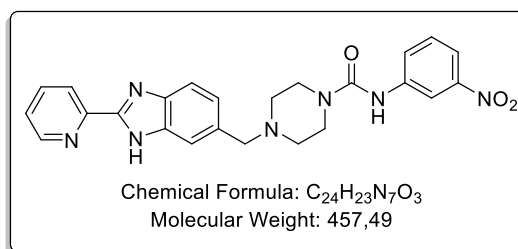
The title compound was prepared from **23** (200 mg, 0.89 mmol, 1.0 eq.) and **26d** (213 mg, 0.89 mmol, 1.0 eq.) following the **general procedure (C)**. Compound **32c** (278 mg, 0.62 mmol) was obtained as an orange solid in 70% yield. **Rf**= 0.24 ($CH_2Cl_2/MeOH$, 9:1). **Mp**= 118 ± 2 °C. **IR (cm⁻¹)**: 1640, 1559, 1527, 1482, 1445, 1425, 1404, 1334, 1302, 1270, 1231, 1146, 1114. **¹H NMR (400 MHz, Acetone-*d*₆)**: δ 12.08 (br s, 1H, NH_{ar}), 8.62 (d, 3J = 4.2 Hz, 1H, H_{ar}), 8.37 (d, 3J = 7.9 Hz, 1H, H_{ar}), 8.16 (s, 1H, NH), 7.92 (td, 4J = 1.7 Hz, 3J = 7.7 Hz, 1H, H_{ar}), 7.73 (s, 1H, H_{ar}), 7.62 (m, 2H, H_{ar}), 7.40 (m, 2H, H_{ar}), 7.25 (m, 1H, H_{ar}), 7.16 (t, 3J = 8.1 Hz, 1H, H_{ar}), 6.90 (dd, 4J = 1.2 Hz, 3J = 7.9 Hz, 1H, H_{ar}), 3.64 (s, 2H, CH_2), 3.54 (m, 4H, CH_2 -piperazine), 2.57 (m, 4H, CH_2 -piperazine). **¹³C NMR (100 MHz, Acetone-*d*₆)**: δ 154.6 (quat C), 154.6 (quat C), 151.2 (quat C), 149.4 (CH, quat C), 149.0 (quat C), 142.4 (quat C), 142.3 (quat C), 137.1 (CH), 133.5 (quat C), 129.7 (CH), 124.4 (CH), 121.4 (2x CH), 121.3 (CH), 119.0 (CH), 118.9 (CH), 117.4 (CH), 117.3 (CH), 62.8 (CH_2), 52.7 (2x CH_2 , $C_{piper.}$), 44.0 (2x CH_2 , $C_{piper.}$). **HRMS (ESI⁺)** calcd. for $C_{24}H_{24}ClN_6O$, 447.1695 [M+H]⁺; found, 447.1695.

***N*-(4-nitrophenyl)-4-((2-(pyridin-2-yl)-1*H*-benzo[d]imidazol-5-yl)methyl)piperazine-1-carboxamide (32d)**



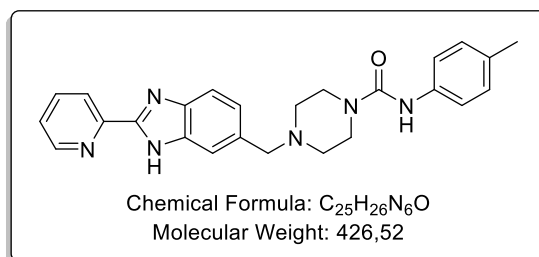
The title compound was prepared from **23** (200 mg, 0.89 mmol, 1.0 eq.) and **26e** (312 mg, 0.89 mmol, 1.0 eq.) following the **general procedure (C)**. Compound **32d** (264 mg, 0.58 mmol) was obtained as an orange solid in 65% yield. **Rf**= 0.41 ($CH_2Cl_2/MeOH$, 9:1). **Mp**= 142 ± 2 °C. **IR (cm⁻¹)**: 1651, 1595, 1541, 1499, 1418, 1326, 1300, 1231, 1178, 1146, 1100. **¹H NMR (400 MHz, Acetone-*d*₆)**: δ 12.06 (br s, 1H, NH), 8.68 (d, 3J = 4.7 Hz, 1H, H_{ar}), 8.62 (s, 1H, CO-NH), 8.42 (d, 3J = 7.9 Hz, 1H, H_{ar}), 8.15 (d, 3J = 8.2 Hz, 2H, H_{ar}), 7.98 (td, 4J = 1.4 Hz, 3J = 7.7 Hz, 1H, H_{ar}), 7.77 (d, 3J = 8.2 Hz, 2H, H_{ar}), 7.64 (m, 2H, H_{ar}), 7.46 (m, 1H, H_{ar}), 7.29 (m, 1H), 3.66 (s, 2H, CH_2), 3.61 (m, 4H, CH_2 -piperazine), 2.52 (m, 4H, CH_2 -piperazine). **¹³C NMR (101 MHz, Acetone-*d*₆)**: δ 154.0 (quat C), 153.9 (quat C), 151.1 (quat C), 149.4 (CH), 149.1 (quat C), 147.4 (quat C), 142.0 (quat C), 144.1 (quat C), 137.1 (CH), 133.7 (quat C), 124.7 (CH), 124.5 (2x CH), 123.4 (CH), 121.2 (CH), 120.0 (CH), 119.27 (CH), 118.2 (2x CH), 62.9 (CH_2), 52.7 (2x CH_2 , $C_{piper.}$), 44.2 (2x CH_2 , $C_{piper.}$). **HRMS (ESI⁺)** calcd. for $C_{24}H_{24}N_7O_3$, 458.1935 [M+H]⁺; found, 458.1933.

***N*-(3-nitrophenyl)-4-((2-(pyridin-2-yl)-1*H*-benzo[d]imidazol-5-yl)methyl)piperazine-1-carboxamide (32e)**



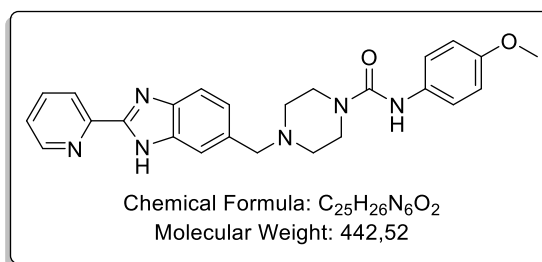
The title compound was prepared from **23** (200 mg, 0.89 mmol, 1.0 eq.) and **26f** (312 mg, 0.89 mmol, 1.0 eq.) following the **general procedure (C)**. Compound **32e** (256 mg, 0.56 mmol) was obtained as an orange solid in 63% yield. **Rf**= 0.41 ($CH_2Cl_2/MeOH$, 9:1). **Mp**= 152 ± 2 °C. **IR (cm⁻¹)**: 1668, 1596, 1526, 1433, 1348, 1300, 1244, 1200, 1178, 1127. **¹H NMR (400 MHz, Acetone-*d*₆)**: δ 12.31 (br s, 1H, NH_{ar}), 8.69 (d, $^3J = 7.5$ Hz, 1H, H_{ar}), 8.53 (m, 2H, CO-NH, H_{ar}), 8.37 (d, $^3J = 7.9$ Hz, 1H, H_{ar}), 7.98-7.87 (m, 2H, H_{ar}), 7.75 (m, 1H, H_{ar}), 7.62 (m, 2H, H_{ar}), 7.49-7.38 (m, 2H, H_{ar}), 7.24 (d, $^3J = 7.7$ Hz, 1H, H_{ar}), 3.64 (s, 2H, CH_2), 3.57 (m, 4H, CH_2 -piperazine), 2.49 (m, 4H, CH_2 -piperazine). **¹³C NMR (101 MHz, Acetone-*d*₆)**: δ 154.2 (quat C), 153.7 (quat C), 150.9 (quat C), 149.2 (CH), 149.1 (quat C), 147.4 (quat C), 142.0 (quat C), 144.1 (quat C), 137.1 (CH), 133.7 (quat C), 124.7 (CH), 124.4 (2x CH), 123.4 (CH), 121.2 (CH), 120.0 (CH), 119.27 (CH), 118.2 (2x CH), 62.9 (CH_2), 52.6 (2x CH_2 , $C_{piper.}$), 44.1 (2x CH_2 , $C_{piper.}$). **HRMS (ESI⁺)** calcd. for $C_{24}H_{24}N_7O_3$, 458.1935 $[M+H]^+$; found, 458.1935.

4-((2-(pyridin-2-yl)-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)methyl)-N-(p-tolyl)piperazine-1-carboxamide (32f)



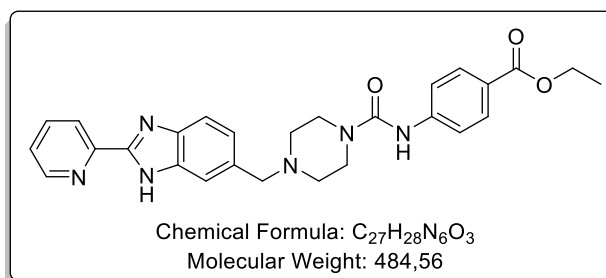
The title compound was prepared from **23** (200 mg, 0.89 mmol, 1.0 eq.) and **26g** (312 mg, 0.89 mmol, 1.0 eq.) following the **general procedure (C)**. Compound **32f** (256 mg, 0.56 mmol) was obtained as an orange solid in 86% yield. **Rf**= 0.40 ($CH_2Cl_2/MeOH$, 9:1). **Mp**= 170 ± 2 °C. **IR (cm⁻¹)**: 1640, 1513, 1445, 1408, 1310, 1299, 1146, 1111, 1001. **¹H NMR (400 MHz, Acetone-*d*₆)**: δ 12.35 (br s, 1H, NH_{ar}), 8.68 (d, $^3J = 4.7$ Hz, 1H, H_{ar}), 8.42 (d, $^3J = 7.9$ Hz, 1H, H_{ar}), 7.98 (t, $^3J = 7.6$ Hz, 1H, H_{ar}), 7.77-7.65 (m, 2H, H_{ar}), 7.47 (m, 1H, H_{ar}), 7.41 (m, 1H, H_{ar}), 7.30 (d, $^3J = 8.0$ Hz, H_{ar}), 7.03 (d, $^3J = 8.3$ Hz, H_{ar}), 3.68 (s, 2H, CH_2), 3.55 (m, 4H, CH_2 -piperazine), 2.50 (m, 4H, CH_2 -piperazine), 2.28 (s, 3H, CH_3). **¹³C NMR (100 MHz, Acetone-*d*₆)**: δ 155.1 (quat C), 155.0 (quat C), 149.4 (CH), 149.1 (quat C), 138.2 (quat C), 138.1 (quat C), 137.1 (quat C), 130.9 (quat C), 130.9 (quat C), 128.7 (4x CH), 124.4 (CH), 121.3 (CH), 119.6 (2x CH), 119.5 (2x CH), 62.9 (CH_2), 52.9 (2x CH_2 , $C_{piper.}$), 44.0 (2x CH_2 , $C_{piper.}$), 19.8 (CH_3). **HRMS (ESI⁺)** calcd. for $C_{25}H_{27}N_7O$, 427.2241 $[M+H]^+$; found, 427.2242.

N-(4-methoxyphenyl)-4-((2-(pyridin-2-yl)-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)methyl)piperazine-1-carboxamide (32g)



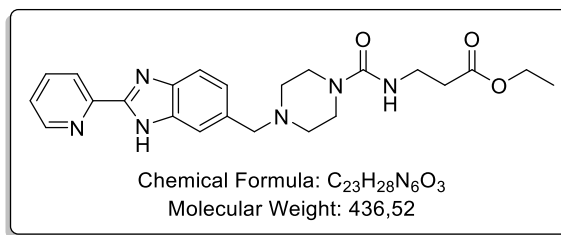
The title compound was prepared from **23** (200 mg, 0.89 mmol, 1.0 eq.) and **26h** (298 mg, 0.89 mmol, 1.0 eq.) following the **general procedure (C)**. Compound **32g** (256 mg, 0.71 mmol) was obtained as an orange solid in 80% yield. **Rf**= 0.43 (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1). **Mp**= 124 ± 2 °C. **IR (cm⁻¹)**: 1632, 1509, 1444, 1417, 1295, 1228, 1178, 1146, 1109, 1033. **¹H NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 13.06 (s, 1H, NH), 8.73 (d, ³*J* = 4.5 Hz, 1H, H_{ar}), 8.32 (m, 2H, CO-NH, H_{ar}), 8.00 (td, ⁴*J* = 1.4 Hz, ³*J* = 7.7 Hz, 1H, H_{ar}), 7.64 (m, 1H, H_{ar}), 7.52 (m, 2H, H_{ar}), 7.34 (d, ³*J* = 9.0 Hz, 2H, H_{ar}), 7.22 (m, 1H, H_{ar}), 6.81 (d, ³*J* = 9.0 Hz, 2H, H_{ar}), 3.70 (s, 3H, OCH₃), 3.63 (s, 2H, CH₂), 3.45 (m, 4H, CH₂-piperazine), 2.43 (m, 4H, CH₂-piperazine). **¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 155.7 (quat C), 154.9 (quat C), 151.4 (quat C), 149.8 (CH), 149.0 (quat C), 144.4 (quat C), 138.0 (quat C), 135.5 (quat C), 133.9 (quat C), 125.1 (CH), 123.9 (CH), 122.0 (CH), 121.8 (CH), 119.3 (CH), 114.0 (CH), 112.1 (CH), 62.9 (CH₂), 55.6 (CH₃), 53.0 (2x CH₂, C_{piper.}), 44.2 (2x CH₂, C_{piper.}). **HRMS (ESI⁺)** calcd. for C₂₅H₂₇N₆O₂, 443.2190 [M+H]⁺; found, 443.2193.

Ethyl-4-((2-(pyridin-2-yl)-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)methyl)piperazine-1-carboxamido)benzoate (**32h**)



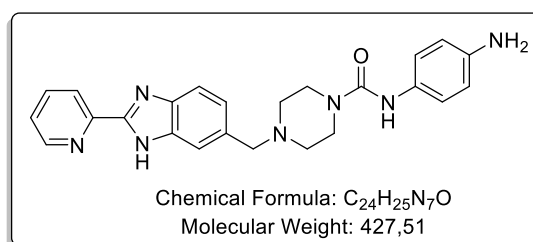
The title compound was prepared from **23** (200 mg, 0.89 mmol, 1.0 eq.) and **26i** (245 mg, 0.89 mmol, 1.0 eq.) following the **general procedure (C)**. Compound **32h** (131 mg, 0.27 mmol) was obtained as an orange solid in 30% yield. **Rf**= 0.43 (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1). **Mp**: 158 ± 2 °C. **IR (cm⁻¹)**: 1705, 1645, 1593, 1516, 1446, 1416, 1366, 1308, 1276, 1240, 1173, 1147, 1103. **¹H NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 13.05 (s, 1H, NH_{ar}), 8.89 (s, 1H, CO-NH), 8.73 (d, ³*J* = 4.6 Hz, 1H, H_{ar}), 8.32 (d, ³*J* = 7.9 Hz, 1H, H_{ar}), 8.00 (td, ³*J* = 1.2 Hz, ³*J* = 7.7 Hz, 1H, H_{ar}), 7.83 (d, ³*J* = 8.7 Hz, 2H, H_{ar}), 7.63 (m, 3H, H_{ar}), 7.51 (m, 2H, H_{ar}), 7.21 (m, 1H, H_{ar}), 4.27 (q, ³*J* = 7.0 Hz, 2H, CH₂), 3.63 (s, 2H, CH₂), 3.49 (m, 4H, CH₂-piperazine), 2.44 (m, 4H, CH₂-piperazine), 1.30 (t, ³*J* = 7.0 Hz, 3H, CH₃). **¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 166.0 (quat C), 154.8 (quat C), 151.3 (2x quat C), 149.8 (CH), 149.0 (quat C), 145.8 (quat C), 144.4 (quat C), 143.7 (quat C), 138.0 (CH), 135.5 (quat C), 130.3 (2x CH), 125.1 (CH), 122.9 (CH), 121.8 (CH), 118.8 (2x CH), 112.7 (CH), 112.1 (CH), 62.9 (CH₂), 60.7 (CH₂), 53.0 (2x CH₂, C_{piper.}), 44.3 (2x CH₂, C_{piper.}), 14.7 (CH₃). **HRMS (ESI⁺)** calcd. for C₂₇H₂₉N₆O₃, 485.2296 [M+H]⁺; found, 485.2296.

Ethyl-3-((2-(pyridin-2-yl)-1H-benzo[d]imidazol-6-yl)methyl)piperazine-1-carboxamido)propanoate (**32k**)



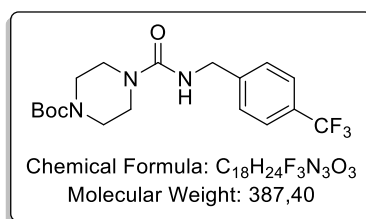
The title compound was prepared from **23** (200 mg, 0.89 mmol, 1.0 eq.) and **28c** (204 mg, 0.89 mmol, 1.0 eq.) following the **general procedure (C)**. Compound **32h** (282 mg, 0.67 mmol) was obtained as an orange solid in 75% yield. **Rf**= 0.43 ($CH_2Cl_2/MeOH$, 9:1). **Mp**= 104 ± 2 °C. **IR (cm⁻¹)**: 1728, 1621, 1540, 1445, 1398, 1372, 1314, 1261, 1182, 1149, 1027. **¹H NMR (400 MHz, Acetone-*d*₆)**: δ 12.10 (s, 1H, NH), 8.66 (d, 3J = 4.6 Hz, 1H, *H*_{ar}), 8.40 (d, 3J = 7.9 Hz, 1H, *H*_{ar}), 7.96 (t, 3J = 7.7, 1H, *H*_{ar}), 7.63 (m, 2H, *H*_{ar}), 7.45 (m, 1H, *H*_{ar}), 7.26 (m, 1H, *H*_{ar}), 6.01 (s, 1H, NH), 4.07 (q, 3J = 7.1 Hz, 2H, CH₂), 3.62 (s, 2H, CH₂), 3.39 (m, 6H, CH₂, CH₂-piperazine), 2.50 (t, 3J = 6.8 Hz, 2H, CH₂), 2.41 (m, 4H, CH₂-piperazine), 1.20 (t, 3J = 7.1 Hz, 3H, CH₃). **¹³C NMR (101 MHz, Acetone-*d*₆)**: δ 171.7 (quat C), 157.5 (quat C), 151.1 (quat C), 149.4 (CH), 149.1 (quat C), 144.1 (quat C), 137.1 (CH), 135.0 (quat C), 133.9 (quat C), 124.3 (CH), 123.4 (CH), 121.3 (CH), 119.2 (CH), 112.0 (CH), 63.0 (CH₂), 59.7 (CH₂), 52.8 (2x CH₂, C_{piper.}), 43.8 (2x CH₂, C_{piper.}), 36.6 (CH₂), 34.8 (CH₂), 13.7 (CH₃). **HRMS (ESI⁺)** calcd. for $C_{23}H_{29}N_6O_3$, 437.2296 [M+H]⁺; found, 437.2296.

***N*-(4-aminophenyl)-4-((2-(pyridin-2-yl)-1*H*-benzo[d]imidazol-5-yl)methyl)piperazine-1-carboxamide (**32l**)**



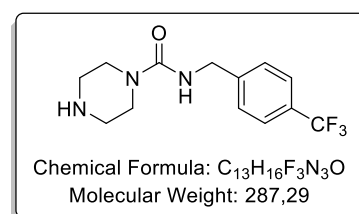
To a solution of compound **32d** (70 mg, 0.15 mmol, 1.0 eq.) in $MeOH/CH_2Cl_2$ (5:1) was added Pd/C 10% (32 mg, 0.03 mmol, 20 mol%). The reaction medium was purged with hydrogen gas and stirred for 3 hours at room temperature under atmospheric pressure. The reaction mixture was filtered over Celite and concentrated *in vacuo*. The crude residue was purified by flash-column chromatography (silica gel, $CH_2Cl_2/MeOH$, 95:5) to give the compound **32l** (43 mg, 0.10 mmol) as a brown solid in 70% yield. **Rf**= 0.12 ($CH_2Cl_2/MeOH$, 9:1). **Mp**= 150 ± 2 °C. **IR (cm⁻¹)**: 3227, 2918, 1704, 1628, 1594, 1514, 1431, 1403, 1363, 1304, 1242, 1145. **¹H NMR (400 MHz, MeOD)**: δ 8.74 (d, 3J =4.5 Hz, 1H, *H*_{ar}), 8.30 (d, 3J =7.9 Hz, 1H, *H*_{ar}), 7.98 (td, 4J = 1.7 Hz, 3J = 7.7 Hz, 1H, *H*_{ar}), 7.66 (m, 2H, *H*_{ar}), 7.49 (m, 1H, *H*_{ar}), 7.34 (d, 3J = 8.2 Hz, 1H, *H*_{ar}), 7.07 (d, 3J = 8.8 Hz, 2H, *H*_{ar}), 6.70 (d, 3J = 8.8 Hz, 2H, *H*_{ar}), 3.72 (s, 2H, CH₂), 3.55 (m, 4H, CH₂-piperazine), 2.55 (m, 4H, CH₂-piperazine). **¹³C NMR (101 MHz, MeOD)**: δ 157.3 (2x quat C), 151.5 (quat C), 149.5 (quat C, CH), 148.0 (quat C), 143.6 (2x quat C), 137.1 (CH), 130.1 (quat C), 124.6 (CH), 123.6 (4x CH), 121.1 (CH), 115.5 (4x CH), 62.7 (CH₂), 52.5 (2x CH₂, C_{piper.}), 43.5 (2x CH₂, C_{piper.}). **HRMS (ESI⁺)** calcd. for $C_{24}H_{26}N_7O$, 428.2193 [M+H]⁺; found, 428.2193.

***tert*-Butyl 4-((4-(trifluoromethyl)benzyl)carbamoyl)piperazine-1-carboxylate (**34**)**



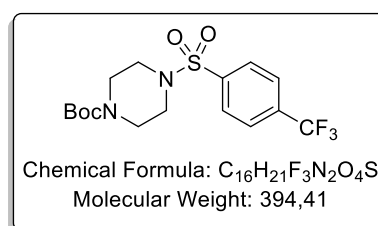
The title compound was prepared from Boc-piperazine **24** (400 mg, 2.15 mmol, 1.0 eq.) and 4-(trifluoromethyl)benzyl isocyanate **33** (0.39 mL, 2.36 mmol, 1.1 eq.) following the **general procedure (A)**. Compound **34** (816 mg, 2.11 mmol) was obtained as a white solid in 98% yield. **Rf**= 0.55 ($CH_2Cl_2/MeOH$, 9:1). **1H NMR (250 MHz, $DMSO-d_6$)**: δ 7.64 (dd, $^4J = 1.9$ Hz, $^3J = 8.5$ Hz, 2H, H_{ar}), 7.54 (dd, $^4J = 1.4$ Hz, $^3J = 8.5$ Hz, 2H, H_{ar}), 6.94 (s, 1H, NH), 4.48 (s, 2H, CH_2), 3.59 (m, 4H, piperazine), 3.37 (m, 4H, piperazine), 1.43 (s, 9H, -Boc). **LC-MS (ESI⁺)** $m/z = 388.4$ $[M+H]^+$.

N-(4-(trifluoromethyl)benzyl)piperazine-1-carboxamide (35)



The title compound was prepared from **34** (271 mg, 0.70 mmol, 1.0 eq.) and TFA (0.86 mL, 11.2 mmol, 16.0 eq.) following the **general procedure (B)**. Compound **35** (108 mg, 0.38 mmol) was obtained as a white solid in 54% yield. **Rf**= 0.15 ($CH_2Cl_2/MeOH$, 9:1). **1H NMR (250 MHz, $DMSO-d_6$)**: δ 7.64 (dd, $^4J = 1.9$ Hz, $^3J = 8.5$ Hz, 2H, H_{ar}), 7.54 (dd, $^4J = 1.4$ Hz, $^3J = 8.5$ Hz, 2H, H_{ar}), 4.48 (s, 2H, CH_2), 3.59 (m, 4H, piperazine), 3.37 (m, 4H, piperazine). **LC-MS (ESI⁺)** $m/z = 288.3$ $[M+H]^+$.

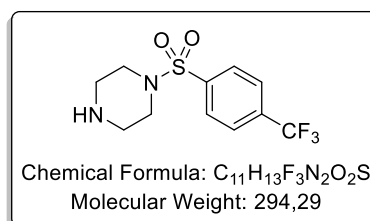
tert-Butyl 4-((4-(trifluoromethyl)phenyl)sulfonyl)piperazine-1-carboxylate (37)



To a mixture of 4-(trifluoromethyl)benzenesulfonyl chloride **36** (200 mg, 0.82 mmol, 1.0 eq.) with NEt_3 (0.14 mL, 0.98 mmol, 1.2 eq.) in CH_2Cl_2 (6 mL) cooled at 0 °C, was slowly added Boc-piperazine **24** (229 mg, 1.23 mmol, 1.5 eq.). After 2 hours at room temperature, the reaction was quenched with sat. aq. $NaHCO_3$. The aqueous layer was extracted 4 times with CH_2Cl_2 . The combined organic layers were washed successively with HCl aq. (10%) and water, and then dried over $MgSO_4$. Solvent were evaporated under reduced pressure and the desired compound **37** (309 mg, 0.78 mmol) was obtained as a pure white solid in 96% yield. **Rf**= 0.69 ($PE/EtOAc$, 1:1). **1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$)**: δ 7.88 (d, $^3J = 8.2$ Hz, 2H, H_{ar}), 7.82 (d, $^3J = 8.2$ Hz, 2H, H_{ar}), 3.52

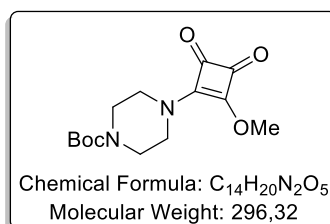
(m, 4H, piperazine), 3.01 (m, 4H, piperazine), 1.41 (s, 9H, -Boc). **LC-MS** (ESI⁺) m/z = 395.4 [M+H]⁺. The spectroscopic data are in accordance with those reported in literature (**CAS #** 1204535-09-0).

1-((4-(trifluoromethyl)phenyl)sulfonyl)piperazine (**38**)



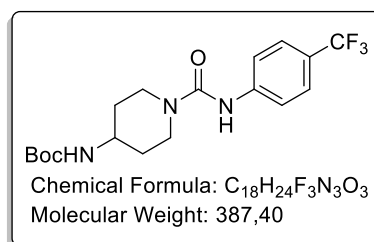
The title compound was prepared from **37** (276 mg, 0.70 mmol, 1.0 eq.) and TFA (0.86 mL, 11.2 mmol, 16.0 eq.) following the **general procedure (B)**. Compound **38** (177 mg, 0.60 mmol) was obtained as a white solid in 86% yield. **R_f** = 0.78 (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1). **¹H NMR (400 MHz, MeOD)**: δ 7.86 (d, ³*J* = 8.2 Hz, 2H, H_{ar}), 7.78 (d, ³*J* = 8.2 Hz, 2H, H_{ar}), 3.49 (m, 4H, piperazine), 3.07 (m, 4H, piperazine). **LC-MS** (ESI⁺) m/z = 295.3 [M+H]⁺. The spectroscopic data are in accordance with those reported in literature (**CAS #** 793679-07-9).

tert-Butyl-4-(2-methoxy-3,4-dioxocyclobut-1-en-1-yl)piperazine-1-carboxylate (**40**)



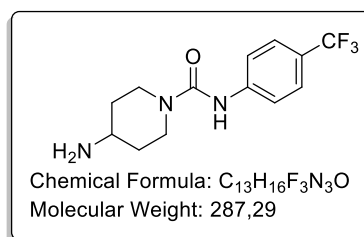
To a solution of Boc-piperazine **24** (200 mg, 1.07 mmol, 1.0 eq.) in EtOH (7 mL), was added dimethyl squarate **39** (230 mg, 1.61 mmol, 1.5 eq.). The reaction mixture was refluxed (85 °C) for 5 hours. Volatiles were evaporated under reduced pressure. The crude residue was purified by flash-column chromatography (silica gel, PE/EtOAc, 6:4) to give the desired compound **40** (280 mg, 0.94 mmol) as a white solid in 88% yield. **R_f** = 0.10 (PE/EtOAc, 1:1). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)**: δ 4.40 (s, 3H, CH₃), 3.86 (m, 2H, piperazine), 3.54 (m, 6H, piperazine), 1.47 (s, 9H, -Boc). **LC-MS** (ESI⁺) m/z = 297.3 [M+H]⁺. The spectroscopic data are in accordance with those reported in literature (**CAS #** 203661-20-5).

tert-Butyl-(1-((4-(trifluoromethyl)phenyl)carbamoyl)piperidin-4-yl)carbamate (**46**)



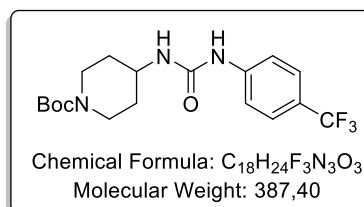
The title compound was prepared from 4-(*N*-Boc-amino)piperidine **43** (431 mg, 2.15 mmol, 1.0 eq.) and 4-(trifluoromethyl)phenyl isocyanate **45** (0.34 mL, 2.36 mmol, 1.1 eq.) following the **general procedure (A)**. Compound **46** (809 mg, 2.09 mmol) was obtained as a white solid in 97% yield. *R_f* = 0.40 ($CH_2Cl_2/MeOH$, 96:4). **¹H NMR (400 MHz, MeOD)**: δ 7.57 (d, 3J = 8.2 Hz, 2H, *H_{ar}*), 7.26 (d, 3J = 8.2 Hz, 2H, *H_{ar}*), 3.94 (m, 1H, CH-piperidine), 3.43-3.27 (m, 4H, CH₂-piperidine), 1.77-1.94 (m, 4H, CH₂-piperidine), 1.43 (s, 9H, -Boc). **LC-MS (ESI⁺)** *m/z* = 388.4 [M+H]⁺. The spectroscopic data are in accordance with those reported in literature (CAS # 1299460-88-0).

4-amino-*N*-(4-(trifluoromethyl)phenyl)piperidine-1-carboxamide (**47**)



The title compound was prepared from **46** (271 mg, 0.70 mmol, 1.0 eq.) and TFA (0.86 mL, 11.2 mmol, 16.0 eq.) following the **general procedure (B)**. Compound **47** (138 mg, 0.48 mmol) was obtained as a white solid in 68% yield. *R_f* = 0.26 ($CH_2Cl_2/MeOH$, 8:2). **¹H NMR (400 MHz, MeOD)**: δ 7.57 (d, 3J = 8.2 Hz, 2H, *H_{ar}*), 7.26 (d, 3J = 8.2 Hz, 2H, *H_{ar}*), 3.94 (m, 1H, CH-piperidine), 3.43-3.27 (m, 4H, CH₂-piperidine), 1.97-1.77 (m, 4H, CH₂-piperidine). **LC-MS (ESI⁺)** *m/z* = 288.3 [M+H]⁺. The spectroscopic data are in accordance with those reported in literature (CAS # 1291448-29-7).

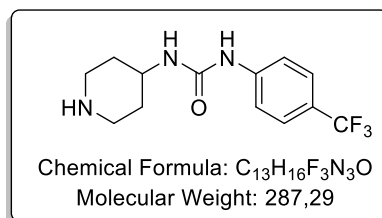
tert-butyl 4-(3-(4-(trifluoromethyl)phenyl)ureido)piperidine-1-carboxylate (**48**)



The title compound was prepared from 4-amino-1-Boc-piperidine **44** (431 mg, 2.15 mmol, 1.0 eq.) and 4-(trifluoromethyl)phenyl isocyanate **45** (0.34 mL, 2.36 mmol, 1.1 eq.) following the **general procedure (A)**. Compound **48** (809 mg, 2.09 mmol) was obtained as a white solid in 97% yield. *R_f* = 0.40 ($CH_2Cl_2/MeOH$, 96:4). **¹H NMR (400 MHz, MeOD)**: δ 7.58 (d, 3J = 8.2 Hz, 2H, *H_{ar}*), 7.29 (d, 3J = 8.2 Hz, 2H, *H_{ar}*), 3.83 (m, 1H, CH-

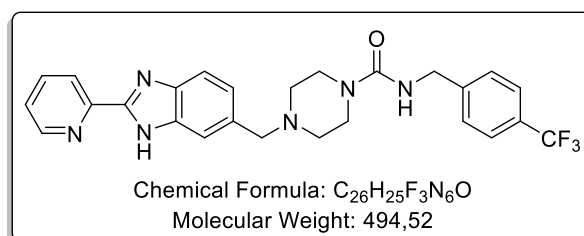
piperidine), 3.43-3.27 (m, 4H, CH₂-piperidine), 1.88-1.71 (m, 4H, CH₂-piperidine), 1.43 (s, 9H, -Boc). **LC-MS (ESI⁺)** *m/z* = 388.5 [M+H]⁺. The spectroscopic data are in accordance with those reported in literature (CAS # 1020266-06-1).

1-(piperidin-4-yl)-3-(4-(trifluoromethyl)phenyl)urea (49)



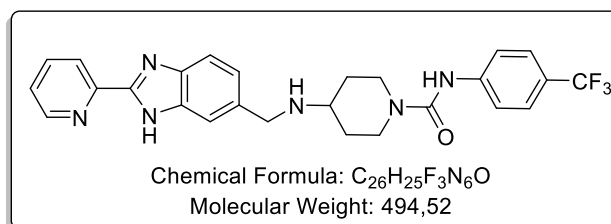
The title compound was prepared from **46** (271 mg, 0.70 mmol, 1.0 eq.) and TFA (0.86 mL mL, 11.2 mmol, 16.0 eq.) following the **general procedure (B)**. Compound **47** (138 mg, 0.48 mmol) was obtained as a white solid in 68% yield. **Rf**= 0.26 (CH₂Cl₂/MeOH, 8:2). **¹H NMR (400 MHz, MeOD)**: δ 7.58 (d, ³*J* = 8.2 Hz, 2H, H_{ar}), 7.29 (d, ³*J* = 8.2 Hz, 2H, H_{ar}), 3.83 (m, 1H, CH-piperidine), 3.43-3.27 (m, 4H, CH₂-piperidine), 1.88-1.71 (m, 4H, CH₂-piperidine). **LC-MS (ESI⁺)** *m/z* = 288.4 [M+H]⁺. The spectroscopic data are in accordance with those reported in literature (CAS # 160431-85-6).

4-((2-(pyridin-2-yl)-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)methyl)-N-(4-(trifluoromethyl)benzyl)piperazine-1-carboxamide (50a)



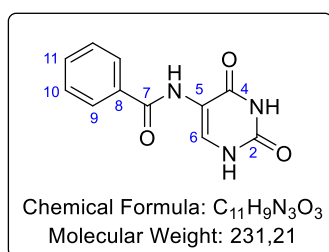
The title compound was prepared from **23** (200 mg, 0.89 mmol, 1.0 eq.) and **35** (256 mg, 0.89 mmol, 1.0 eq.) following the **general procedure (C)**. Compound **50a** (238 mg, 0.48 mmol) was obtained as an orange solid in 54% yield. **Rf**= 0.26 (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1). **Mp**= 122 ± 2 °C. **IR (cm⁻¹)**: 1621, 1533, 1446, 1403, 1324, 1261, 1159, 1109, 1065. **¹H NMR (400 MHz, Acetone-*d*₆)**: δ 12.04 (br s, 1H, NH_{ar}), 8.66 (d, ³*J* = 4.7 Hz, 1H, H_{ar}), 8.39 (d, ³*J* = 7.9 Hz, 1H, H_{ar}), 7.96 (td, ³*J* = 1.6 Hz, ³*J* = 7.7 Hz, 1H, H_{ar}), 7.71-7.56 (m, 4H, H_{ar}), 7.51 (d, ³*J* = 8.0 Hz, 2H, H_{ar}), 7.45 (m, 1H, H_{ar}), 7.26 (m, 1H, H_{ar}), 6.56 (t, ³*J* = 5.6 Hz, 1H, CO-NH), 4.45 (d, ³*J* = 5.6 Hz, 2H, N-CH₂), 3.64 (s, 2H, CH₂), 3.46 (m, 4H, CH₂-piperazine), 2.46 (m, 4H, CH₂-piperazine). **¹³C NMR (100 MHz, Acetone-*d*₆)**: δ 157.5 (quat C), 151.3 (quat C), 149.3 (quat C, CH), 149.1 (quat C), 146.1 (quat C), 137.1 (CH, quat C), 133.7 (quat C), 128.0 (quat C), 127.9 (4x CH), 124.9 (2x CH), 124.7 (CH), 124.4 (CH), 121.2 (CH), 119.2 (CH), 112.0 (CH), 63.0 (CH₂), 52.8 (2x CH₂, C_{piper.}), 43.9 (2x CH₂, C_{piper.}), 43.6 (CH₂). **HRMS (ESI⁺)** calcd. for C₂₆H₂₆F₃N₆O, 495.2115 [M+H]⁺; found, 495.2121.

4-(((2-(pyridin-2-yl)-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)methyl)amino)-N-(4-(trifluoromethyl)phenyl) piperidine-1-carboxamide (50c)



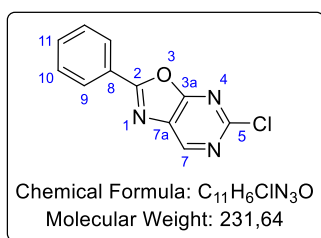
The title compound was prepared from **23** (200 mg, 0.89 mmol, 1.0 eq.) and **47** (256 mg, 0.89 mmol, 1.0 eq.) following the **general procedure (C)**. Compound **50c** (75 mg, 0.15 mmol) was obtained as an orange solid in 17% yield. **R_f**= 0.30 (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1). **Mp**= 161 ± 2 °C. **IR (cm⁻¹)**: 1705, 1645, 1593, 1516, 1446, 1416, 1366, 1308, 1276, 1240, 1173, 1147, 1103. **¹H NMR (400 MHz, MeOD)**: δ 8.75 (d, ³J = 4.8 Hz, 1H, H_{ar}), 8.31 (d, ³J = 7.9 Hz, 1H, H_{ar}), 7.99 (m, 1H, H_{ar}), 7.81 (s, 1H, H_{ar}), 7.72 (d, ³J = 8.4 Hz, 1H, H_{ar}), 7.62-7.48 (m, 5H, H_{ar}), 7.43 (d, ³J = 8.4 Hz, 1H, H_{ar}), 4.27 (s, 2H, CH₂), 3.73 (p, ³J = 6.8 Hz, 1H, CH-piperidine), 3.24 (m, 2H, CH₂- piperidine), 2.99 (m, 2H, CH₂- piperidine), 2.20 (m, 2H, CH₂- piperidine), 1.61 (m, 2H, CH₂- piperidine). **¹³C NMR (101 MHz, Methanol-d₄)**: δ 162.0 (quat C), 161.6 (quat C), 155.6 (quat C), 152.2 (quat C), 149.6 (CH), 147.8 (quat C), 143.5 (quat C), 137.2 (CH), 125.4 (quat C), 125.3 (CH), 124.8 (CH), 121.2 (CH), 119.6 (4x CH), 118.2, 54.4 (CH), 49.2 (2x CH₂, C_{piper.}), 42.6 (2x CH₂, C_{piper.}), 29.5 (CH₂). **HRMS (ESI⁺)** calcd. for C₂₆H₂₅F₃N₆O, 495.2115 [M+H]⁺; found, 495.2111.

N-(2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-5-yl)benzamide (55)



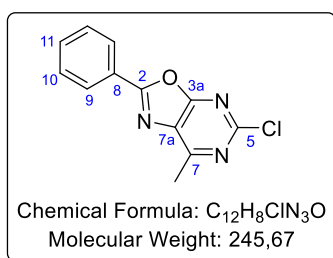
To a slurry of 5-aminouracil **54** (5.0 g, 39.0 mmol, 1.0 eq.) in 125 mL of water cooled at 0 °C was added NaOH (1.87 g, 47.0 mmol, 1.2 eq.); pH~ 9. The mixture was stirred at 0 °C till the obtention of a clear solution and benzoyl chloride **53** (5.5 mL, 47.4 mmol, 1.2 eq.) was added dropwise over 2 hours at 0 °C. The reaction mixture was stirred for 2 hours at 0 °C and a white precipitate was formed. The pH was adjusted to 7 with a 1M NaOH solution. The solid was filtered off, rinse with cold water and dried under *vacuum* to give **55** (8.88 g, 38.2 mmol) as a white solid in 98% yield. **R_f**= 0.54 (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1). **Mp** > 250 °C. **IR (cm⁻¹)**: 3322; 3090, 3027, 1773, 1660, 1246, 803. **¹H NMR (250 MHz, DMSO-d₆)**: δ 11.46 (br s, 1H, NH), 10.83 (br s, 1H, NH), 9.19 (s, 1H, CO-NH), 7.91-7.89 (m, 3H, H₆, H_{ar}), 7.62-7.48 (m, 3H, H_{ar}). **¹³C NMR (63 MHz, DMSO-d₆)**: δ 165.9 (quat C, C₇), 161.7 (quat C, C₄), 150.6 (quat C, C₂), 134.1 (CH, C₆), 134.1 (quat C, C₈), 132.2 (CH, C₁₁), 129.0 (2x CH, C_{10-10'}), 127.9 (2x CH, C_{9-9'}), 112.7 (quat C, C₅). **HRMS (ESI⁺)** *m/z*: calcd. for C₁₁H₁₀N₃O₃, 232.0717 [M+H]⁺; found 232.0718. The spectroscopic data are in accordance with those reported in literature (**CAS # 133030-28-1**).

5-Chloro-2-phenyloxazolo[5,4-*d*]pyrimidine (**56**)



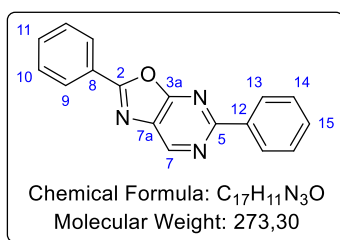
The title compound was prepared according to the **general procedure (D)** from the amide **55** (3.0 g, 13.0 mmol). Compound **56** (1.8 g, 7.8 mmol) was obtained as a white powder in 60% yield. **Rf**= 0.34 (PE/EtOAc, 4:1). **Mp**= 164 ± 2 °C. **IR (cm⁻¹)**: 1602, 1460, 1292, 1032, 928, 705. **¹H NMR (250 MHz, CDCl₃)**: δ 9.24 (s, 1H, H₇), 8.23 (m, 2H, H_{9-9'}), 7.76-7.65 (m, 3H, H_{10-10'}, H₁₁). **¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃)**: δ 166.2 (quat C, C₅), 164.2 (quat C, C₂), 155.5 (quat C, C_{3a}), 149.6 (CH, C₇), 133.5 (CH, C₁₁), 132.3 (quat C, C_{7a}), 129.3 (2x CH, C_{10-10'}), 128.4 (2x CH, C_{9-9'}), 125.1 (quat C, C₈). **HRMS (ESI⁺) *m/z***: calcd. for C₁₁H₇ClN₃O, 232.0272 [M+H]⁺; found 232.0277. The spectroscopic data are in accordance with those reported in literature (**CAS # 118726-33-3**).

5-Chloro-7-methyl-2-phenyloxazolo[5,4-*d*]pyrimidine (**58**)



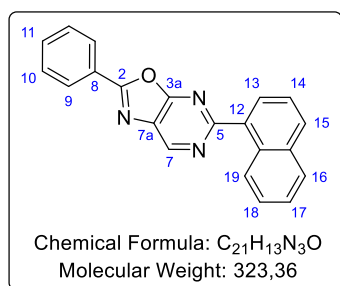
Under a dried and inert atmosphere of argon, a solution of aryl chloride **56** (1.50 g, 6.48 mmol) in THF (60 mL) was cooled to -78 °C. A solution of methyl lithium in THF (3.0 M, 4.0 mL, 12.0 mmol, 2.0 eq.) was added dropwise at -78 °C and the reaction was let stirred for 30 min at this temperature. Then the reaction was brought to 0 °C until full consumption of the starting material (4 hours). The reaction was quenched by addition of sat. aqueous NH₄Cl. The volatiles were evaporated in *vacuo* and the resulting aqueous content was extracted with EtOAc. The organic layer was dried over Na₂SO₄, concentrated and the resulting material was dissolved in CH₂Cl₂ (100 mL). MnO₂ (1.93 g, 22.24 mmol, 4.0 eq.) was added at r.t. and the dark mixture was stirred and refluxed (40 °C) for 4 hours. The organic layer was filtered through a Celite pad, concentrated under high *vacuum* and the obtained material was purified by flash column chromatography (silica gel, PE 100% -> PE/EtOAc, 85:15) to give **58** as a white solid in 64% yield. **Rf**= 0.30 (PE/EtOAc, 85:15). **Mp**= 148 ± 2 °C. **IR (cm⁻¹)**: 33121, 1634, 1596, 1452, 1287, 1034, 921, 708. **¹H NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 8.28-8.23 (m, 2H, 2x *ortho*-H_{ar}), 7.76-7.53 (m, 3H, 2x *meta*-H_{ar}, *para*-H_{ar}), 2.86 (s, 1H, -CH₃). **¹³C NMR (63 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 166.5 (quat C, C₅), 162.8 (quat C, C₂), 161.9 (quat C, C₇), 154.7 (quat C, C_{3a}), 133.1 (CH, C₁₁), 131.0 (quat C, C_{7a}), 129.2 (2x CH, C_{10-10'}), 128.2 (2x CH, C_{9-9'}), 125.4 (quat C, C₈), 19.7 (-CH₃). **HRMS (ESI⁺) *m/z***: calcd. for C₁₂H₉ClN₃O, 246.0429 [M+H]⁺; found 246.0426.

2,5-Diphenyloxazolo[5,4-*d*]pyrimidine (59a)



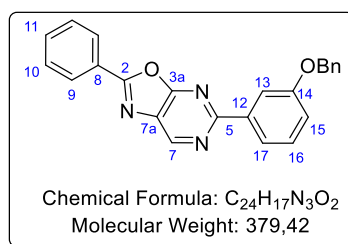
The title compound was prepared according to the **general procedure (E)** with **56** (200 mg, 0.86 mmol, 1.0 eq.) and phenyl boronic acid (4.19 mg, 3.44 mmol, 4.0 eq.), affording after purification the desired compound as a white solid (220 mg, 0.81 mmol) in 94% yield. **R_f**= 0.30 (PE/EtOAc, 4:1). **Mp**= 209 ± 2 °C. **IR** (cm⁻¹): 1624, 1420, 1260, 1052, 875, 705. **¹H NMR (250 MHz, CDCl₃)**: δ 9.18 (s, 1H, H₇), 8.56-8.51 (m, 2H, H_{13-13'}), 8.34-8.29 (m, 2H, H_{9-9'}), 7.64-7.52 (m, 6H, H_{10-10'}, H₁₁, H_{14-14'}, H₁₅). **¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃)**: δ 166.0 (quat C, C₅), 163.4 (quat C, C₂), 161.0 (quat C, C_{3a}), 148.5 (CH, C₇), 136.9 (quat C, C₁₂), 132.9 (CH, C₁₁), 131.2 (quat C, C_{7a}), 130.9 (CH, C₁₅), 129.2 (2x CH, C_{14-14'}), 128.7 (2x CH, C_{10-10'}), 128.5 (2x CH, C_{13-13'}), 128.2 (2x CH, C_{9-9'}), 125.8 (quat C, C₈). **HRMS (ESI⁺)** *m/z*: calcd. for C₁₇H₁₂N₃O, 274.0975 [M+H]⁺; found 274.0977.

5-(Naphthalen-1-yl)-2-phenyloxazolo[5,4-*d*]pyrimidine (59b)



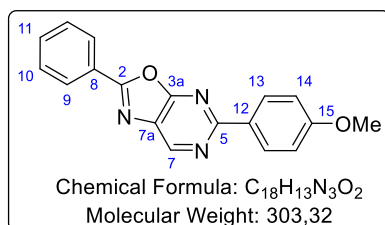
The title compound was prepared according to the **general procedure (E)** with **56** (200 mg, 0.86 mmol, 1.0 eq.) and 1-naphthylboronic acid (592 mg, 3.44 mmol, 4.0 eq.), affording after purification the desired compound as a white solid (178 mg, 0.55 mmol) in 64% yield. **R_f**= 0.16 (PE/EtOAc, 9:1). **Mp**= 145 ± 2 °C. **IR** (cm⁻¹): 1634, 1388, 1278, 1046, 910, 696. **¹H NMR (250 MHz, CDCl₃)**: δ 9.30 (s, 1H, H₇), 8.81 (dd, ⁴*J* = 1.0 Hz, ³*J* = 8.1 Hz, 1H, H₁₉), 8.36-8.31 (m, 2H, H_{9-9'}), 8.20 (dd, ⁴*J* = 1.0 Hz, ³*J* = 7.2 Hz, 1H, H₁₆), 8.02-7.92 (m, 2H, H₁₃, H₁₅), 7.65-7.52 (m, 6H, H_{10-10'}, H₁₁, H₁₄, H₁₇, H₁₈). **¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃)**: δ 165.6 (quat C, C₅), 163.7 (quat C, C₂), 162.9 (quat C, C_{3a}), 148.4 (CH, C₇), 135.0 (quat C, C₁₂), 134.2 (quat C, C_{15a}), 133.0 (CH, C₁₁), 131.0 (quat C, C_{7a}), 131.0 (quat C, C_{19a}), 130.9 (CH, C₁₅), 130.1 (CH, C₁₆), 129.3 (2x CH, C_{10-10'}), 128.6 (CH, C₁₃), 128.3 (2x CH, C_{9-9'}), 127.1 (CH, C₁₈), 126.0 (CH, C₁₇), 125.8 (quat C, C₈), 125.7 (CH, C₁₉), 125.2 (CH, C₁₄). **HRMS (ESI⁺)** *m/z*: calcd. for C₂₁H₁₄N₃O, 324.1131 [M+H]⁺; found 324.1135.

5-(3-(Benzyloxy)phenyl)-2-phenyloxazolo[5,4-*d*]pyrimidine (59c)



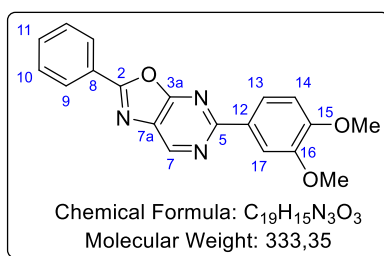
The title compound was prepared according to the **general procedure (E)** with **56** (200 mg, 0.86 mmol, 1.0 eq.) and 3-(benzyloxy)phenylboronic acid (784 mg, 3.44 mmol, 4.0 eq.), affording after purification the desired compound as a white solid (130 mg, 0.34 mmol) in 40% yield. **R_f**= 0.24 (PE/EtOAc, 9:1). **Mp**= 180 ± 2 °C. **IR (cm⁻¹)**: 1596, 1420, 1268, 1052, 854, 722. **¹H NMR (250 MHz, CDCl₃)**: δ 9.15 (s, 1H, H₇), 8.32-8.29 (m, 2H, H_{9-9'}), 8.21-8.19 (m, 1H, H₁₃), 8.15 (dt, ⁴*J* = 1.0 Hz, ³*J* = 7.8 Hz 1H, H₁₇), 7.64-7.55 (m, 3H, H_{10-10'}, H₁₁), 7.51 (m, 2H, 2x *ortho*-H_{ar}), 7.45-7.39 (m, 3H, 2x *meta*-H_{ar}, *para*-H_{ar}), 7.34 (m, 1H, H₁₆), 7.13 (dd, ⁴*J* = 0.8 Hz, ³*J* = 8.2 Hz, 1H, H₁₅), 5.20 (s, 2H, -CH₂). **¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃)**: δ 165.9 (quat C, C₅), 163.4 (quat C, C₂), 160.7 (quat C, C_{3a}), 159.3 (quat C, C₁₄), 148.4 (CH, C₇), 138.4 (quat C, C₁₂), 137.0 (quat C, C_{ar}), 132.9 (CH, C₁₁), 131.3 (quat C, C_{7a}), 129.8 (CH, *para*-C_{ar}), 129.2 (2x CH, C_{10-10'}), 128.6 (2x CH, *meta*-C_{ar}), 128.2 (2x CH, C_{9-9'}), 128.0 (CH, C₁₆), 127.6 (2x CH, *ortho*-C_{ar}), 125.8 (CH, C₈), 121.3 (CH, C₁₇), 118.3 (CH, C₁₅), 114.0 (CH, C₁₃), 70.1 (-CH₂). **HRMS (ESI⁺) *m/z***: calcd. for C₂₄H₁₈N₃O₂, 380.1393 [M+H]⁺; found 380.1396.

5-(4-Methoxyphenyl)-2-phenyloxazolo[5,4-*d*]pyrimidine (59d)



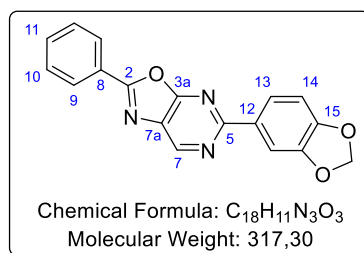
The title compound was prepared according to the **general procedure (E)** with **56** (200 mg, 0.86 mmol, 1.0 eq.) and (4-methoxyphenyl)boronic acid (523 mg, 3.44 mmol, 4.0 eq.), affording after purification the desired compound as a white solid (224 mg, 0.74 mmol) in 86% yield. **R_f**= 0.26 (PE/EtOAc, 4:1). **Mp**= 152 ± 2 °C. **IR (cm⁻¹)**: 1603, 1393, 1260, 1034, 908, 702. **¹H NMR (250 MHz, CDCl₃)**: δ 9.10 (s, 1H, H₇), 8.47 (dt, ⁴*J* = 2,5 Hz, ³*J* = 10 Hz, 2H, H_{13-13'}), 8.30-8.26 (m, 2H, H_{9-9'}), 7.64-7.52 (m, 3H, H_{10-10'}, H₁₁), 7.10 (dt, ⁴*J* = 2.5 Hz, ³*J* = 10 Hz, 2H, H_{14-14'}), 3.88 (s, 3H, -OCH₃). **¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃)**: δ 165.9 (quat C, C₅), 162.9 (quat C, C₂), 162.1 (quat C, C₁₅), 160.9 (quat C, C_{3a}), 148.5 (CH, C₇), 132.7 (CH, C₁₁), 130.6 (quat C, C_{7a}), 130.1 (quat C, C₁₂), 129.6 (2x CH, C_{13-13'}), 129.2 (2x CH, C_{10-10'}), 128.1 (2x CH, C_{9-9'}), 125.9 (quat C, C₈), 114.0 (2x CH, C_{14-14'}), 55.4 (CH₃, -OMe). **HRMS (ESI⁺) *m/z***: calcd. for C₁₈H₁₄N₃O₂, 304.1080 [M+H]⁺; found 304.1078.

5-(3,4-Dimethoxyphenyl)-2-phenyloxazolo[5,4-*d*]pyrimidine (59e)



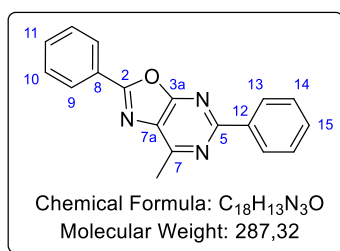
The title compound was prepared according to the **general procedure (E)** with **56** (200 mg, 0.86 mmol, 1.0 eq.) and (3,4-dimethoxyphenyl)boronic acid (626 mg, 3.44 mmol, 4.0 eq.), affording after purification the desired compound as a white solid (224 mg, 0.74 mmol) in 86% yield. **Rf**= 0.16 (PE/EtOAc, 4:1). **Mp**= 159 ± 2 °C. **IR (cm⁻¹)**: 1605, 1391, 1261, 1030, 907, 708. **¹H NMR (250 MHz, CDCl₃)**: δ 9.10 (s, 1H, H₇), 8.47 (dt, ⁴*J* = 2,5 Hz, ³*J* = 10 Hz, 2H, H_{13-13'}), 8.30-8.26 (m, 2H, H_{9-9'}), 7.64-7.52 (m, 3H, H_{10-10'}, H₁₁), 7.10 (dt, ⁴*J* = 2.5 Hz, ³*J* = 10 Hz, 2H, H_{14-14'}), 4.05 (s, 3H, -OCH₃), 3.88 (s, 3H, -OCH₃). **¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃)**: δ 166.0 (quat C, C₅), 163.0 (quat C, C₂), 160.8 (quat C, C_{3a}), 151.6 (quat C, C₁₆), 149.1 (quat C, C₁₅), 148.4 (CH, C₇), 132.8 (CH, C₁₁), 130.7 (quat C, C_{7a}), 129.8 (quat C, C₁₂), 129.2 (2x CH, C_{10-10'}), 128.1 (2x CH, C_{9-9'}), 125.9 (quat C, C₈), 122.0 (CH, C₁₃), 111.0 (2x CH, C₁₄, C₁₇), 55.4 (2x CH₃, -OMe). **HRMS (ESI⁺) *m/z***: calcd. for C₁₉H₁₆N₃O₃, 334.1186 [M+H]⁺; found 334.1185.

5-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-2-phenyloxazolo[5,4-*d*]pyrimidine (59f)



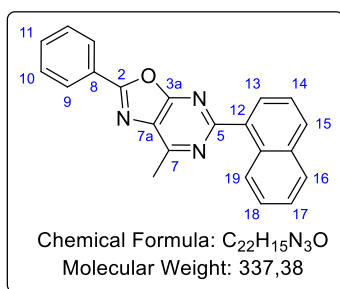
The title compound was prepared according to the **general procedure (E)** with **56** (200 mg, 0.86 mmol, 1.0 eq.) and 3,4-(methylenedioxy)phenylboronic acid (571 mg, 3.44 mmol, 4.0 eq.), affording after purification the desired compound as a white solid (224 mg, 0.74 mmol) in 86% yield. **Rf**= 0.36 (PE/EtOAc, 4:1). **Mp**= 147 ± 2 °C. **IR (cm⁻¹)**: 1606, 1390, 1258, 1032, 910, 701. **¹H NMR (250 MHz, CDCl₃)**: δ 9.10 (s, 1H, H₇), 8.47 (dt, ⁴*J* = 2,5 Hz, ³*J* = 10 Hz, 2H, H_{13-13'}), 8.30-8.26 (m, 2H, H_{9-9'}), 7.64-7.52 (m, 3H, H_{10-10'}, H₁₁), 7.10 (dt, ⁴*J* = 2.5 Hz, ³*J* = 10 Hz, 2H, H_{14-14'}), 3.88 (s, 3H, -OCH₃). **¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃)**: δ 165.9 (quat C, C₅), 163.2 (quat C, C₂), 160.6 (quat C, C_{3a}), 150.2 (quat C, C₁₆), 149.3 (quat C, C₁₅), 149.3 (CH, C₇), 132.8 (CH, C₁₁), 131.3 (quat C, C₁₂), 130.8 (quat C, C_{7a}), 129.2 (2x CH, C_{10-10'}), 128.1 (2x CH, C_{9-9'}), 125.9 (quat C, C₈), 123.6 (CH, C₁₃), 108.6 (2x CH, C₁₄, C₁₇), 101.6 (CH₂). **HRMS (ESI⁺) *m/z***: calcd. for C₁₈H₁₄N₃O₂, 318.0873 [M+H]⁺; found 318.0874.

7-Methyl-2,5-diphenyloxazolo[5,4-*d*]pyrimidine (60a)



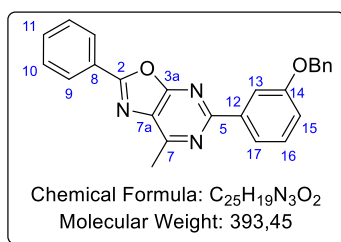
The title compound was prepared according to the **general procedure (E)** with **58** (211 mg, 0.86 mmol, 1.0 eq.) and phenyl boronic acid (4.19 mg, 3.44 mmol, 4.0 eq.), affording after purification the desired compound as a white solid (236 mg, 0.82 mmol) in 95% yield. **R_f**= 0.54 (PE/EtOAc, 4:1). **Mp**= 200 ± 2 °C. **IR (cm⁻¹)**: 1624, 1300, 1100, 812, 702. **¹H NMR (250 MHz, CDCl₃)**: δ 8.55-8.52 (m, 2H, H_{13-13'}), 8.33-8.29 (m, 2H, H_{9-9'}), 7.62-7.49 (m, 6H, H_{10-10'}, H₁₁, H_{14-14'}, H₁₅), 2.93 (s, 3H, -CH₃). **¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃)**: δ 165.4 (quat C, C₅), 162.0 (quat C, C₂), 160.2 (quat C, C_{3a}), 159.6 (quat C, C₇), 137.2 (quat C, C₁₂), 132.5 (CH, C₁₁), 130.7 (CH, C₁₅), 130.0 (quat C, C_{7a}), , 129.1 (2x CH, C_{14-14'}), 128.6 (2x CH, C_{10-10'}), 128.4 (2x CH, C_{13-13'}), 128.0 (2x CH, C_{9-9'}), 126.1 (quat C, C₈), 20.0 (-CH₃). **HRMS (ESI⁺) m/z**: calcd. for C₁₈H₁₄N₃O, 288.1131 [M+H]⁺; found 288.1130.

7-Methyl-5-(naphthalen-1-yl)-2-phenyloxazolo[5,4-*d*]pyrimidine (60b)



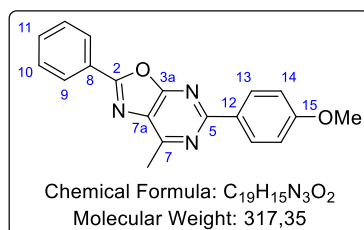
The title compound was prepared according to the **general procedure (E)** with **58** (211 mg, 0.86 mmol, 1.0 eq.) and 1-naphthylboronic acid (592 mg, 3.44 mmol, 4.0 eq.), affording after purification the desired compound as a white solid (267 mg, 0.79 mmol) in 92% yield. **R_f**= 0.42 (PE/EtOAc, 4:1). **Mp**= 156 ± 2 °C. **IR (cm⁻¹)**: 1612, 1392, 1278, 1048, 910, 775, 697. **¹H NMR (250 MHz, CDCl₃)**: δ 8.76-8.72 (m, 1H, H₁₉), 8.37-8.32 (m, 2H, H_{9-9'}), 8.15 (dd, ⁴J= 1.2 Hz, ³J= 7.2 Hz, 1H, H₁₆), 8.00-7.91 (m, 2H, H₁₃, H₁₅), 7.66-7.50 (m, 6H, H_{10-10'}, H₁₁, H₁₄, H₁₇, H₁₈), 3.01 (s, 3H, -CH₃). **¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃)**: δ 165.2 (quat C, C₅), 162.4 (quat C, C₂), 162.3 (quat C, C_{3a}), 159.7 (quat C, C₇), 135.4 (quat C, C₁₂), 134.2 (quat C, C_{15a}), 132.7 (CH, C₁₁), 131.0 (quat C, C_{19a}), 130.6 (CH, C₁₅), 129.8 (quat C, C_{7a}), 129.7 (CH, C₁₆), 129.2 (2x CH, C_{10-10'}), 128.5 (CH, C₁₃), 128.1 (2x CH, C_{9-9'}), 127.0 (CH, C₁₈), 126.1 (quat C, C₈), 125.9 (CH, C₁₇), 125.8 (CH, C₁₉), 125.2 (CH, C₁₄), 20.0 (-CH₃). **HRMS (ESI⁺) m/z**: calcd. for C₂₂H₁₆N₃O, 338.1288 [M+H]⁺; found 338.1287.

5-(3-(Benzyloxy)phenyl)-7-methyl-2-phenyloxazolo[5,4-*d*]pyrimidine (60c)



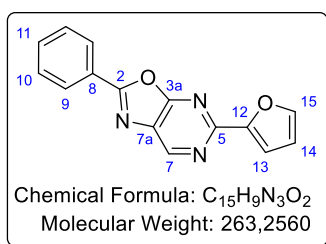
The title compound was prepared according to the general procedure with **58** (211 mg, 0.86 mmol, 1.0 eq.) and 3-(benzyloxy)phenylboronic (784 mg, 3.44 mmol, 4.0 eq.), affording after purification the desired compound as a white solid (327 mg, 0.83 mmol) in 97% yield. **R_f**= 0.30 (PE/EtOAc, 4:1). **Mp**= 171 ± 2 °C. **IR** (cm⁻¹): 1603, 1401, 1265, 1174, 910, 854, 702. **¹H NMR (250 MHz, CDCl₃)**: δ 8.33-8.27 (m, 2H, H_{9-9'}), 8.21-8.19 (m, 1H, H₁₃), 8.15 (dt, ⁴*J* = 1.0 Hz, ³*J* = 7.8 Hz 1H, H₁₇), 7.61-7.34 (m, 9H, H_{10-10'}, H₁₁, H₁₆, 2x *ortho*-H_{ar}, 2x *meta*-H_{ar}, *para*-H_{ar}), 7.13 (dd, ⁴*J* = 0.8 Hz, ³*J* = 8.2 Hz, 1H, H₁₅), 5.20 (s, 2H, -CH₂), 2.92 (s, 3H, -CH₃). **¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃)**: δ 165.4 (quat C, C₅), 162.1 (quat C, C₂), 159.9 (quat C, C_{3a}), 159.6 (quat C, C₇), 159.2 (quat C, C₁₄), 138.7 (quat C, C₁₂), 137.0 (quat C, C_{ar}), 132.5 (CH, C₁₁), 130.1 (quat C, C_{7a}), 129.7 (CH, *para*-C_{ar}), 129.1 (2x CH, C_{10-10'}), 128.6 (2x CH, *meta*-C_{ar}), 128.0 (3x CH, C_{9-9'}, C₁₆), 127.7 (2x CH, *ortho*-C_{ar}), 126.1 (CH, C₈), 121.3 (CH, C₁₇), 117.9 (CH, C₁₅), 114.1 (CH, C₁₃), 70.1 (-CH₂), 20.0 (-CH₃). **HRMS (ESI⁺)** *m/z*: calcd. for C₂₅H₂₀N₃O₂, 394.1550 [M+H]⁺; found 394.1552.

5-(4-Methoxyphenyl)-7-methyl-2-phenyloxazolo[5,4-*d*]pyrimidine (60d)



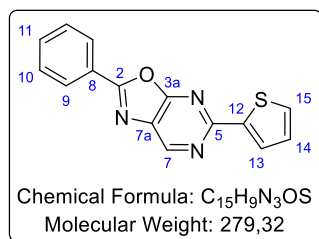
The title compound was prepared according to the **general procedure (E)** with **58** (211 mg, 0.86 mmol, 1.0 eq.) and (4-methoxyphenyl)boronic acid (523 mg, 3.44 mmol, 4.0 eq.), affording after purification the desired compound as a white solid (232 mg, 0.73 mmol) in 85% yield. **R_f**= 0.38 (PE/EtOAc, 4:1). **Mp**= 177 ± 2 °C. **IR** (cm⁻¹): 1610, 1401, 1262, 1175, 1052, 910, 850, 695. **¹H NMR (250 MHz, CDCl₃)**: δ 8.47 (dt, ⁴*J* = 2,5 Hz, ³*J* = 10 Hz, 2H, H_{13-13'}), 8.30-8.24 (m, 2H, H_{9-9'}), 7.61-7.50 (m, 3H, H_{10-10'}, H₁₁), 7.00 (dt, ⁴*J* = 2.5 Hz, ³*J* = 10 Hz, 2H, H_{14-14'}), 3.88 (s, 3H, -OCH₃), 2.88 (s, 3H, -CH₃). **¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃)**: δ 165.4 (quat C, C₅), 161.9 (quat C, C₂), 161.6 (quat C, C₁₅), 160.1 (quat C, C_{3a}), 159.5 (CH, C₇), 132.3 (CH, C₁₁), 130.1 (2x CH, C_{13-13'}), 129.9 (quat C, C₁₂), 129.4 (quat C, C_{7a}), 129.1 (2x CH, C_{10-10'}), 127.9 (2x CH, C_{9-9'}), 126.2 (quat C, C₈), 113.9 (2x CH, C_{14-14'}), 55.4 (CH₃, -OMe), 20.0 (-CH₃). **HRMS (ESI⁺)** *m/z*: calcd. for C₁₉H₁₆N₃O₂, 318.1237 [M+H]⁺; found 318.1242.

5-(Furan-2-yl)-2-phenyloxazolo[5,4-d]pyrimidine (61b)



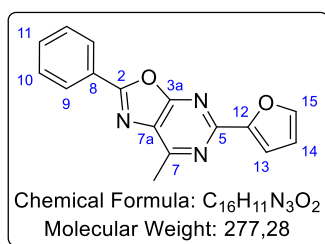
The title compound was prepared according to the **general procedure (E)** with **56** (200 mg, 0.86 mmol, 1.0 eq.) and 2-(tributylstannyl)furan (1.1 mL, 3.44 mmol, 4.1 eq.), affording after purification the desired compound as a white solid (200 mg, 0.76 mmol) in 89% yield. **R_f**= 0.22 (PE/EtOAc, 4:1). **Mp**= 140 ± 2 °C. **IR** (cm⁻¹): 1613, 1490, 1420, 1246, 1026, 710. **¹H NMR (250 MHz, CDCl₃)**: δ 9.13 (s, 1H, H₇), 8.31-8.26 (m, 2H, H_{9-9'}), 7.67 (dd, ⁴J = 0.9 Hz, ³J = 1.7 Hz, 1H, H₁₅), 7.63-7.53 (m, 3H, H_{10-10'}, H₁₁), 7.40 (dd, ⁴J = 0.9 Hz, ³J = 3.5 Hz, 1H, H₁₃), 7.40 (dd, ³J = 1.7 Hz, ³J = 3.5 Hz, 1H, H₁₄). **¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃)**: δ 165.6 (quat C, C₅), 163.3 (quat C, C₂), 153.6 (quat C, C_{3a}), 151.6 (quat C, C₁₂), 148.7 (CH, C₇), 145.4 (CH, C₁₅), 132.9 (CH, C₁₁), 130.9 (quat C, C_{7a}), 129.2 (2x CH, C_{10-10'}), 128.1 (2x CH, C_{9-9'}), 125.6 (quat C, C₈), 114.0 (CH, C₁₃), 112.5 (CH, C₁₄). **HRMS (ESI⁺) m/z**: calcd. for C₁₅H₁₀N₃O₂, 264.0767 [M+H]⁺; found 264.0773.

2-Phenyl-5-(thiophen-2-yl)oxazolo[5,4-d]pyrimidine (61c)



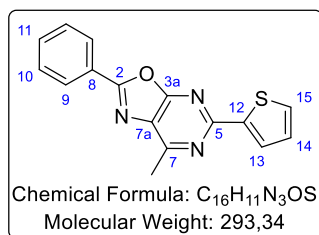
The title compound was prepared according to the **general procedure (E)** with **56** (200 mg, 0.86 mmol, 1.0 eq.) and 2-(tributylstannyl)thiophene (1.1 mL, 3.44 mmol, 4.0 eq.), affording after purification the desired compound as a white solid (178 mg, 0.55 mmol) in 64% yield. **R_f**= 0.40 (PE/EtOAc, 4:1). **Mp**= 153 ± 2 °C. **IR** (cm⁻¹): 1632, 1520, 1426, 1250, 1030, 965, 721. **¹H NMR (250 MHz, CDCl₃)**: δ 9.06 (s, 1H, H₇), 8.31-8.24 (m, 2H, H_{9-9'}), 8.08 (dd, ⁴J_{H13-H15} = 1.2 Hz, ³J_{H13-H14} = 3.7 Hz, 1H, H₁₃), 7.63-7.56 (m, 3H, H_{10-10'}, H₁₁), 7.51 (dd, ⁴J = 1.2 Hz, ³J = 5.1 Hz, 1H, H₁₅), 7.17 (dd, ³J = 3.7 Hz, ³J = 5.1 Hz, 1H, H₁₄). **¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃)**: δ 165.6 (quat C, C₅), 163.2 (quat C, C₂), 157.7 (quat C, C_{3a}), 148.6 (CH, C₇), 142.6 (quat C, C₁₂), 132.9 (CH, C₁₁), 130.8 (quat C, C_{7a}), 130.4 (CH, C₁₅), 129.5 (CH, C₁₃), 129.2 (2x CH, C_{10-10'}), 128.5 (CH, C₁₄), 128.1 (2x CH, C_{9-9'}), 125.7 (quat C, C₈). **HRMS (ESI⁺) m/z**: calcd. for C₁₅H₁₀N₃OS, 280.0539 [M+H]⁺; found 280.0542.

5-(Furan-2-yl)-7-methyl-2-phenyloxazolo[5,4-*d*]pyrimidine (62a)



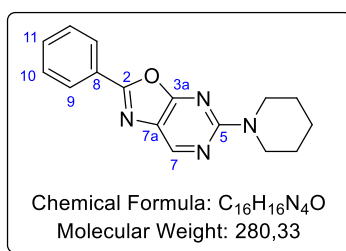
The title compound was prepared according to the **general procedure (E)** with **58** (211 mg, 0.86 mmol, 1.0 eq.) and 2-(tributylstannyl)furan (1.1 mL, 3.44 mmol, 4.1 eq.), affording after purification the desired compound as a white solid (100 mg, 0.36 mmol) in 42% yield. **R_f**= 0.30 (PE/EtOAc, 4:1). **Mp**= 189 ± 2 °C. **IR (cm⁻¹)**: 1612, 1491, 1410, 1235, 1026, 850, 715. **¹H NMR (250 MHz, CDCl₃)**: δ 8.29-8.26 (m, 2H, H_{9-9'}), 7.66 (dd, ⁴*J* = 0.9 Hz, ³*J* = 1.7 Hz, 1H, H₁₅), 7.61-7.55 (m, 3H, H_{10-10'}, H₁₁), 7.39 (dd, ⁴*J* = 0.9 Hz, ³*J* = 3.5 Hz, 1H, H₁₃), 6.60 (dd, ⁴*J* = 1.7 Hz, ³*J* = 3.5 Hz, 1H, H₁₄), 2.92 (s, 3H, -CH₃). **¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃)**: δ 165.0 (quat C, C₅), 162.1 (quat C, C₂), 160.1 (quat C, C_{3a}), 153.0 (quat C, C₇), 151.8 (quat C, C₁₂), , 145.2 (CH, C₁₅), 132.3 (CH, C₁₁), 129.8 (quat C, C_{7a}), 129.1 (2x CH, C_{10-10'}), 128.0 (2x CH, C_{9-9'}), 126.0 (quat C, C₈), 113.7 (CH, C₁₃), 112.4 (CH, C₁₄), 19.9 (-CH₃). **HRMS (ESI⁺) *m/z***: calcd. for C₁₆H₁₂N₃O₂, 278.0924 [M+H]⁺; found 278.0928.

7-Methyl-2-phenyl-5-(thiophen-2-yl)oxazolo[5,4-*d*]pyrimidine (62b)



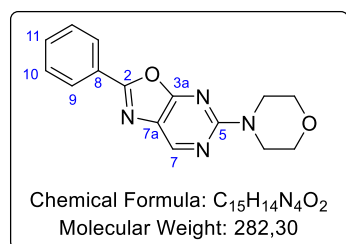
The title compound was prepared according to the **general procedure (E)** with **58** (211 mg, 0.86 mmol, 1.0 eq.) and 2-(tributylstannyl)thiophene (1.1 mL, 3.44 mmol, 4.0 eq.), affording after purification the desired compound as a white solid (220 mg, 0.75 mmol) in 87% yield. **R_f**= 0.54 (PE/EtOAc, 4:1). **Mp**= 228 ± 2 °C. **IR (cm⁻¹)**: 1611, 1482, 1422, 1225, 1026, 952, 826, 711. **¹H NMR (250 MHz, CDCl₃)**: δ 8.30-8.26 (m, 2H, H_{9-9'}), 8.07 (dd, ⁴*J*_{H13-H15} = 1.2 Hz, ³*J*_{H13-H14} = 3.7 Hz, 1H, H₁₃), 7.61-7.52 (m, 3H, H_{10-10'}, H₁₁), 7.49 (dd, ⁴*J* = 1.2 Hz, ³*J* = 5.1 Hz, 1H, H₁₅), 7.16 (dd, ³*J* = 3.7 Hz, ³*J* = 5.1 Hz, 1H, H₁₄), 2.88 (s, 3H, -CH₃). **¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃)**: δ 165.0 (quat C, C₅), 161.8 (quat C, C₂), 159.9 (quat C, C_{3a}), 156.9 (quat C, C₇), 142.9 (quat C, C₁₂), 132.5 (CH, C₁₁), 130.0 (CH, C₁₅), 129.6 (quat C, C_{7a}), 129.2 (CH, C₁₃), 129.1 (2x CH, C_{10-10'}), 128.3 (CH, C₁₄), 127.9 (2x CH, C_{9-9'}), 126.0 (quat C, C₈), 19.8 (-CH₃). **HRMS (ESI⁺) *m/z***: calcd. for C₁₆H₁₂N₃OS, 294.0696 [M+H]⁺; found 294.0697.

2-Phenyl-5-(piperidin-1-yl)oxazolo[5,4-*d*]pyrimidine (63a)



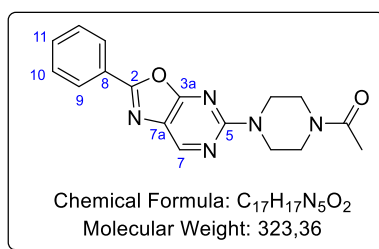
The title compound was prepared from **56** (100 mg, 0.43 mmol, 1.0 eq.) and piperidine (0.11 mL, 1.07 mmol, 2.5 eq.) following the **general procedure (F)**. Compound **63a** (78 mg, 0.28 mmol) was obtained as a white solid in 65% yield. **Rf**= 0.50 (PE/EtOAc, 4:1). **Mp**= 173 ± 2 °C. **IR (cm⁻¹)**: 3276, 2949, 2870, 2805, 1612, 1480, 1423, 1318, 1235, 1030, 949, 826, 711. **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)**: δ 8.67 (s, 1H, H₇), 8.16 (m, 2H, H_{9-9'}), 7.51 (m, 3H, H_{10-10'}, H₁₁), 3.87 (m, 4H, H_{piperidine}), 1.65 (m, 6H, H_{piperidine}). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃)**: δ 167.0 (quat C, C₅), 159.6 (quat C, C₂), 159.3 (quat C, C_{3a}), 149.1 (CH, C₇), 131.5 (CH, C₁₁), 129.0 (2x CH, C_{10-10'}), 127.3 (2x CH, C_{9-9'}), 126.6 (quat C, C_{7a}), 123.3 (quat C, C₈), 45.6 (2x CH₂), 25.7 (2x CH₂), 24.8 (CH₂). **HRMS (ESI⁺) m/z**: calcd. for C₁₆H₁₇N₄O, 281,1397 [M+H]⁺; found 281,1395.

5-Morpholino-2-phenyloxazolo[5,4-*d*]pyrimidine (63b)



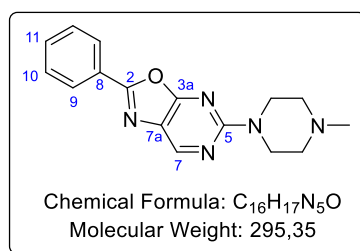
The title compound was prepared from **56** (100 mg, 0.43 mmol, 1.0 eq.) and morpholine (0.10 mL, 1.07 mmol, 2.5 eq.) following the **general procedure (F)**. Compound **63b** (99 mg, 0.37 mmol) was obtained as a white solid in 82% yield. **Rf**= 0.30 (PE/EtOAc, 4:1). **Mp**= 180 ± 2 °C. **IR (cm⁻¹)**: 3334, 2949, 2851, 2891, 1612, 1463, 1319, 1235, 1097, 949, 835, 806. **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)**: δ 8.69 (s, 1H, H₇), 8.16 (m, 2H, H_{9-9'}), 7.53 (m, 3H, H_{10-10'}, H₁₁), 3.91 (t, ³J = 4,4 Hz, 4H, H_{morpholine}), 3.82 (t, ³J = 4,4 Hz, 4H, H_{morpholine}). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)**: δ 166.8 (quat C, C₅), 159.9 (quat C, C₂), 159.7 (quat C, C_{3a}), 149.1 (CH, C₇), 131.8 (CH, C₁₁), 129.0 (2x CH, C_{10-10'}), 127.4 (2x CH, C_{9-9'}), 126.4 (quat C, C_{7a}), 124.3 (quat C, C₈), 66.7 (2x CH₂), 44.9 (2x CH₂). **HRMS (ESI⁺) m/z**: calcd. for C₁₅H₁₅N₄O₂, 283,1190 [M+H]⁺; found 283,1191.

1-(4-(2-Phenylloxazolo[5,4-*d*]pyrimidin-5-yl)piperazin-1-yl)ethan-1-one (63c)



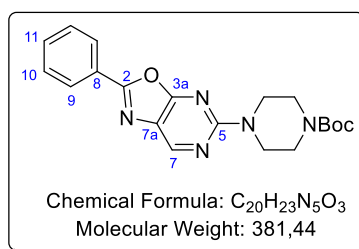
The title compound was prepared from **56** (100 mg, 0.43 mmol, 1.0 eq.) and *N*-acetylpiperazine (0.13 mL, 1.07 mmol, 2.5 eq.) following the **general procedure (F)**. Compound **63c** (104 mg, 0.32 mmol) was obtained as a white solid in 75% yield. *R*_f = 0.12 (EtOAc, 100%). *Mp* = 215 ± 2 °C. IR (cm⁻¹): 3317, 2943, 1640, 1612, 1480, 1429, 1265, 1234, 1030, 996, 815, 711. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.70 (s, 1H, H₇), 8.17 (m, 2H, H_{9-9'}), 7.53 (m, 3H, H_{10-10'}, H₁₁), 3.94 (m, 4H, H_{piperidine}), 3.74 (t, ³*J* = 5.6 Hz, 2H, H_{piperidine}), 3.58 (t, ³*J* = 5.6 Hz, 2H, H_{piperidine}), 2.17 (s, 3H, CH₃). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 169.2 (quat C, CO), 166.8 (quat C, C₅), 160.0 (quat C, C₂), 159.4 (quat C, C_{3a}), 149.3 (CH, C₇), 131.9 (CH, C₁₁), 129.0 (2x CH, C_{10-10'}), 127.4 (2x CH, C_{9-9'}), 126.3 (quat C, C_{7a}), 124.4 (quat C, C₈), 46.0 (CH₂), 44.5 (CH₂), 44.3 (CH₂), 41.2 (CH₂), 21.5 (CH₃). HRMS (ESI⁺) *m/z*: calcd. for C₁₇H₁₈N₅O₂, 324,1455 [M+H]⁺; found 324,1454.

5-(4-Methylpiperazin-1-yl)-2-phenylloxazolo[5,4-*d*]pyrimidine (63d)



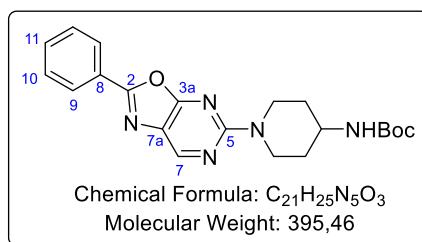
The title compound was prepared from **56** (100 mg, 0.43 mmol, 1.0 eq.) and *N*-methylpiperazine (0.12 mL, 1.07 mmol, 2.5 eq.) following the **general procedure (F)**. Compound **63d** (93 mg, 0.31 mmol) was obtained as a white solid in 73% yield. *R*_f = 0.16 (PE/EtOAc, 4:1). *Mp* = 189 ± 2 °C. IR (cm⁻¹): 3266, 2937, 2789, 1612, 1454, 1423, 1319, 1281, 1030, 949, 823, 779. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.68 (s, 1H, H₇), 8.15 (m, 2H, H_{9-9'}), 7.52 (m, 3H, H_{10-10'}, H₁₁), 3.93 (m, 4H, H_{piperazine}), 2.50 (m, 4H, H_{piperazine}), 1.65 (s, 3H, CH₃). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 166.8 (quat C, C₅), 159.7 (quat C, C₂), 159.6 (quat C, C_{3a}), 149.2 (CH, C₇), 131.7 (CH, C₁₁), 129.0 (2x CH, C_{10-10'}), 127.3 (2x CH, C_{9-9'}), 126.5 (quat C, C_{7a}), 123.9 (quat C, C₈), 54.9 (2x CH₂), 46.2 (CH₃), 44.4 (2x CH₂). HRMS (ESI⁺) *m/z*: calcd. for C₁₆H₁₈N₅O, 296,1506 [M+H]⁺; found 296,1504.

tert-Butyl 4-(2-phenyloxazolo[5,4-*d*]pyrimidin-5-yl)piperazine-1-carboxylate (63e)



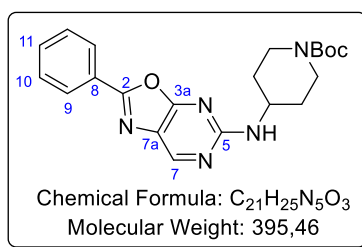
The title compound was prepared from **56** (100 mg, 0.43 mmol, 1.0 eq.) and Boc-piperazine **24** (199 mg, 1.07 mmol, 2.5 eq.) following the **general procedure (F)**. Compound **63e** (103 mg, 0.27 mmol) was obtained as a white solid in 64% yield. **R_f**= 0.72 (PE/EtOAc, 4:1). **Mp**= 228 ± 2 °C. **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)**: δ 8.67 (s, 1H, H₇), 8.15 (m, 2H, H_{9-9'}), 7.50 (m, 3H, H_{10-10'}, H₁₁), 3.88 (m, 4H, H_{piperazine}), 3.53 (m, 4H, H_{piperazine}), 1.49 (s, 9H, CH₃-Boc). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)**: δ 166.8 (quat C, C₅), 159.8 (quat C, C₂), 159.5 (quat C, C_{3a}), 154.8 (quat C, CO), 149.2 (CH, C₇), 131.8 (CH, C₁₁), 129.0 (2x CH, C_{10-10'}), 127.3 (2x CH, C_{9-9'}), 126.4 (quat C, C_{7a}), 124.2 (quat C, C₈), 80.1 (quat C, C(CH₃)₃), 44.3 (4x CH₂), 28.4 (3x CH₃). **HRMS (ESI⁺) *m/z***: calcd. for C₂₀H₂₄N₅O₃, 382,1874 [M+H]⁺; found 382,1876.

tert-butyl 4-((2-phenyloxazolo[5,4-*d*]pyrimidin-5-yl)amino)piperidine-1-carboxylate (63f)



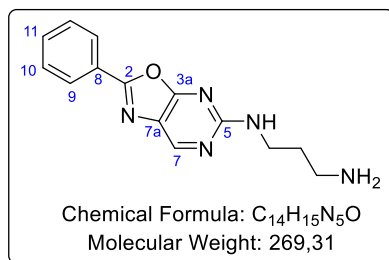
The title compound was prepared from **56** (100 mg, 0.43 mmol, 1.0 eq.) and 4-(*N*-Boc-amino)piperidine **43** (214 mg, 1.07 mmol, 2.5 eq.) following the **general procedure (F)**. Compound **63f** (146 mg, 0.37 mmol) was obtained as a white solid in 85% yield. **R_f**= 0.66 (PE/EtOAc, 1:1). **Mp**= 240 ± 2 °C. **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)**: δ 8.67 (s, 1H, H₇), 8.16 (m, 2H, H_{9-9'}), 7.52 (m, 3H, H_{10-10'}, H₁₁), 4.73 (m, 2H, H_{piperidine}), 4.47 (br s, 1H, NH), 3.75 (m, 1H, CH_{piperidine}), 3.15 (m, 2H, H_{piperidine}), 2.06 (m, 2H, H_{piperidine}), 1.46 (s, 9H, CH₃-Boc), 1.41 (m, 2H, H_{piperidine}). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)**: δ 166.9 (quat C, C₅), 159.6 (quat C, C₂), 159.5 (quat C, C_{3a}), 155.1 (quat C, CO), 149.3 (CH, C₇), 131.7 (CH, C₁₁), 129.0 (2x CH, C_{10-10'}), 127.3 (2x CH, C_{9-9'}), 126.5 (quat C, C_{7a}), 123.7 (quat C, C₈), 79.5 (quat C, C(CH₃)₃), 48.2 (CH, CH_{piperidine}), 43.5 (2x CH₂), 32.3 (2x CH₂), 28.4 (3x CH₃, CH₃-Boc). **HRMS (ESI⁺) *m/z***: calcd. for C₂₁H₂₆N₅O₃, 396,2030 [M+H]⁺; found 396,2031.

tert-butyl (1-(2-phenyloxazolo[5,4-d]pyrimidin-5-yl)piperidin-4-yl)carbamate (63g)



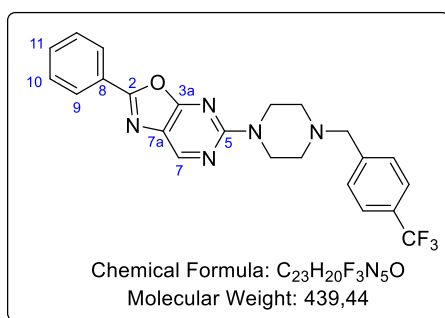
The title compound was prepared from **56** (500 mg, 2.16 mmol, 1.0 eq.) and 4-amino-1-Boc-piperidine **44** (1.08 mg, 5.4 mmol, 2.5 eq.) in toluene (18 mL), following the **general procedure (F)**. Compound **63g** (848 mg, 2.14 mmol) was obtained as a white solid in 99% yield. **R_f**= 0.10 (PE/EtOAc, 4:1). **Mp**= 238 ± 2 °C. **¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 8.76 (s, 1H, H₇), 8.09 (m, 2H, H_{9-9'}), 7.60 (m, 4H, H_{10-10'}, H₁₁, NH), 3.93 (m, 3H, H_{piperidine}), 2.89 (m, 2H, H_{piperidine}), 1.88 (m, 2H, H_{piperidine}), 1.41 (s, 9H, CH₃-Boc), 1.38 (m, 2H, H_{piperidine}). **¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 166.9 (quat C, C₅), 158.5 (quat C, C₂), 158.4 (quat C, C_{3a}), 154.3 (quat C, CO), 150.4 (CH, C₇), 132.3 (CH, C₁₁), 129.8 (2x CH, C_{10-10'}), 127.3 (2x CH, C_{9-9'}), 126.5 (quat C, C_{7a}), 123.3 (quat C, C₈), 79.1 (quat C, C(CH₃)₃), 48.6 (CH), 42.9 (2x CH₂), 31.7 (2x CH₂), 28.6 (3x CH₃, CH₃-Boc). **HRMS (ESI⁺) *m/z***: calcd. for C₂₁H₂₆N₅O₃, 396,2030 [M+H]⁺; found 396,2031.

N¹-(2-phenyloxazolo[5,4-d]pyrimidin-5-yl)propane-1,3-diamine (63h)



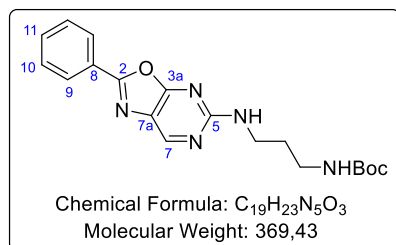
The title compound was prepared from **63k** (259 mg, 0.70 mmol, 1.0 eq.) and TFA (0.86 mL, 11.2 mmol, 16.0 eq.) following the **general procedure (B)**. Compound **63h** (153 mg, 0.57 mmol) was obtained as a white solid in 81% yield. **R_f**= 0.12 (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1). **Mp**= 202 ± 2 °C. IR (cm⁻¹): 3369, 2958, 2922, 1603, 1455, 1375, 1235, 1061, 949, 861, 711. **¹H NMR (400 MHz, MeOD + CDCl₃)**: δ 8.65 (s, 1H, H₇), 8.16 (m, 2H, H_{9-9'}), 7.60 (m, 3H, H_{10-10'}, H₁₁), 3.53 (q, ³J = 6.5 Hz, CH₂), 3.21 (q, ³J = 6.5 Hz, CH₂), 1.82 (q, ³J = 6.5 Hz, CH₂). **¹³C NMR (100 MHz, MeOD + CDCl₃)**: δ 166.9 (quat C, C₅), 159.6 (quat C, C₂), 159.3 (quat C, C_{3a}), 149.1 (CH, C₇), 131.5 (CH, C₁₁), 129.1 (2x CH, C_{10-10'}), 127.0 (2x CH, C_{9-9'}), 126.6 (quat C, C_{7a}), 123.3 (quat C, C₈), 38.8 (CH₂), 37.6 (CH₂), 29.8 (CH₂). **HRMS (ESI⁺) *m/z***: calcd. for C₁₄H₁₆N₅O, 270,1349 [M+H]⁺; found 270,1348.

2-Phenyl-5-(4-(4-(trifluoromethyl)benzyl)piperazin-1-yl)oxazolo[5,4-*d*]pyrimidine (63j)



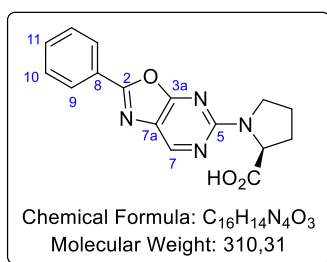
The title compound was prepared from **56** (100 mg, 0.43 mmol, 1.0 eq.) and 1-(4-(trifluoromethyl)benzyl)piperazine (0.2 mL, 1.07 mmol, 2.5 eq.) following the **general procedure (F)**. Compound **63j** (127 mg, 0.29 mmol) was obtained as a white solid in 67% yield. **R_f** = 0.54 (PE/EtOAc, 4:1). **Mp** = 242 ± 2 °C. **IR (cm⁻¹)**: 3262, 2927, 2791, 1609, 1451, 1421, 1320, 1280, 1031, 949, 823, 769. **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)**: δ 8.67 (s, 1H, H₇), 8.19 (m, 2H, H_{9-9'}), 7.63 (d, 3J = 8.0 Hz, 2H, H_{ar}), 7.51 (m, 5H, H_{10-10'}, H₁₁, H_{ar}), 3.95 (m, 4H, H_{piperidine}), 3.64 (s, 2H, CH₂), 2.57 (m, 6H, H_{piperidine}). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)**: δ 166.8 (quat C, C₅), 159.6 (2x quat C, C₂, C_{3a}), 149.2 (CH, C₇), 142.3 (quat C, C_{ar}), 131.7 (CH, C₁₁), 131.7 (quat C, C_{ar}), 129.2 (2x CH, C_{ar}), 129.0 (2x CH, C_{10-10'}), 127.3 (2x CH, C_{9-9'}), 126.5 (quat C, C_{7a}), 125.3 (2x CH, C_{ar}), 123.9 (quat C, C₈), 62.5 (CH₂), 52.9 (2x CH₂), 44.5 (2x CH₂). **HRMS (ESI⁺) *m/z***: calcd. for $C_{23}H_{21}F_3N_5O$, 440,1693 [M+H]⁺; found 440,1694.

tert-Butyl (3-((2-phenyloxazolo[5,4-*d*]pyrimidin-5-yl)amino)propyl)carbamate (63k)



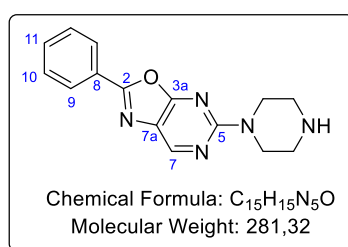
The title compound was prepared from **56** (100 mg, 0.43 mmol, 1.0 eq.) and N-Boc-propanediamine (190 mg, 1.07 mmol, 2.5 eq.) following the **general procedure (F)**. Compound **63k** (146 mg, 0.40 mmol) was obtained as a white solid in 92% yield. **R_f** = 0.26 (PE/EtOAc, 1:1). **Mp** = 232 ± 2 °C. **¹H NMR (400 MHz, Acetone-*d*₆)**: δ 8.65 (s, 1H, H₇), 8.16 (m, 2H, H_{9-9'}), 7.60 (m, 3H, H_{10-10'}, H₁₁), 6.83 (br s, 1H, NH), 6.09 (br s, 1H, NH), 3.53 (q, 3J = 6.5 Hz, 2H, CH₂), 3.21 (q, 3J = 6.5 Hz, 2H, CH₂), 1.82 (q, 3J = 6.5 Hz, 2H, CH₂), 1.42 (s, 9H, CH₃-Boc). **¹³C NMR (101 MHz, Acetone-*d*₆)**: δ 166.9 (quat C, C₅), 159.6 (quat C, C₂), 159.3 (quat C, C_{3a}), 155.1 (quat C, CO), 149.1 (CH, C₇), 131.5 (CH, C₁₁), 129.1 (2x CH, C_{10-10'}), 127.0 (2x CH, C_{9-9'}), 126.6 (quat C, C_{7a}), 123.3 (quat C, C₈), 79.1 (quat C, C(CH₃)₃), 38.8 (CH₂), 37.6 (CH₂), 29.8 (CH₂), 27.8 (3x CH₃, CH₃-Boc). **HRMS (ESI⁺) *m/z***: calcd. for $C_{19}H_{24}N_5O_3$, 370,1874 [M+H]⁺; found 370,1873.

(2-Phenylloxazolo[5,4-*d*]pyrimidin-5-yl)-L-proline (**63I**)



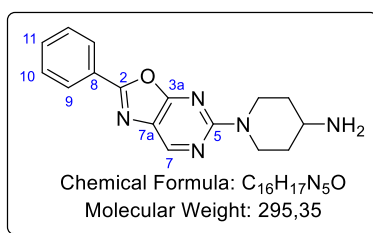
The title compound was prepared from **56** (100 mg, 0.43 mmol, 1.0 eq.), L-proline (99 mg, 0.86 mmol, 2.0 eq.) and Cs₂CO₃ (560 mg, 1.72 mmol, 4.0 eq.), following the **general procedure (F)**. Compound **63I** (63 mg, 0.20 mmol) was obtained as a white solid in 47% yield. **R_f**= 0.14 (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1). **Mp**= 243 ± 2 °C. **IR (cm⁻¹)**: 3058, 3008, 2984, 2606, 1616, 1565, 1409, 1380, 1235, 1030, 949, 796, 644. **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)**: δ 8.71 (s, 1H, H₇), 8.18 (m, 2H, H_{9-9'}), 7.52 (m, 3H, H_{10-10'}, H₁₁), 4.65 (m, 1H, H_{proline}), 3.72 (m, 2H, H_{proline}), 2.54 (br s, 1H, COOH), 2.13 (m, 4H, H_{proline}). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)**: δ 175.4 (quat C, COOH), 167.0 (quat C, C₅), 160.3 (quat C, C₂), 158.3 (quat C, C_{3a}), 148.3 (CH, C₇), 132.1 (CH, C₁₁), 129.1 (2x CH, C_{10-10'}), 127.5 (2x CH, C_{9-9'}), 126.1 (quat C, C_{7a}), 124.7 (quat C, C₈), 60.7 (CH), 48.2 (CH₂), 29.4 (CH₂), 24.2 (CH₂). **HRMS (ESI⁺) m/z**: calcd. for C₁₆H₁₅N₄O₃, 311,1139 [M+H]⁺; found 311,1139.

2-Phenyl-5-(piperazin-1-yl)oxazolo[5,4-*d*]pyrimidine (**64a**)



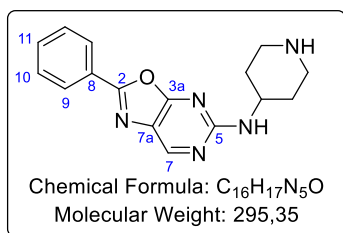
The title compound was prepared from **63e** (267 mg, 0.70 mmol, 1.0 eq.) and TFA (0.86 mL mL, 11.2 mmol, 16.0 eq.) following the **general procedure (B)**. Compound **64a** (159 mg, 0.57 mmol) was obtained as a white solid in 81% yield. **R_f**= 0.33 (CH₂Cl₂/MeOH, 4:1). **Mp**= 228 ± 2 °C. **IR (cm⁻¹)**: 2946, 2920, 2826, 2810, 1454, 1439, 1320, 1135, 567. **¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 8.83 (s, 1H, H₇), 8.11 (m, 2H, H_{9-9'}), 7.61 (m, 3H, H_{10-10'}, H₁₁), 3.73 (m, 4H, H_{piperazine}), 2.76 (m, 4H, H_{piperazine}). **¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 166.8 (quat C, C₅), 159.7 (quat C, C₂), 158.9 (quat C, C_{3a}), 150.1 (CH, C₇), 132.4 (CH, C₁₁), 129.8 (2x CH, C_{10-10'}), 127.4 (2x CH, C_{9-9'}), 126.5 (quat C, C_{7a}), 123.6 (quat C, C₈), 45.9 (4x CH₂). **HRMS (ESI⁺) m/z**: calcd. for C₁₅H₁₆N₅O, 282,1349 [M+H]⁺; found 282,1347.

1-(2-Phenylloxazolo[5,4-*d*]pyrimidin-5-yl)piperidin-4-amine (**64b**)



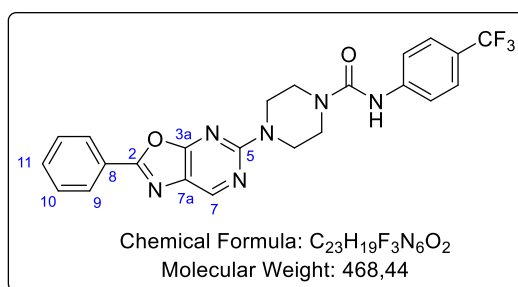
The title compound was prepared from **63f** (277 mg, 0.70 mmol, 1.0 eq.) and TFA (0.86 mL mL, 11.2 mmol, 16.0 eq.) following the **general procedure (B)**. Compound **64b** (196 mg, 0.66 mmol) was obtained as a white solid in 95% yield. **R_f**= 0.06 (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1). **Mp**= 207 ± 2 °C. **IR (cm⁻¹)**: 3333, 2940, 2808, 1610, 1521, 1449, 1251, 1037, 807, 713. **¹H NMR (400 MHz, MeOD)**: δ 8.67 (s, 1H, H₇), 8.16 (m, 2H, H_{9-9'}), 7.57 (m, 3H, H_{10-10'}, H₁₁), 4.82 (m, 2H, H_{piperidine}), 3.03 (m, 3H, H_{piperidine}), 1.96 (m, 2H, H_{piperidine}), 1.37 (m, 2H, H_{piperidine}). **¹³C NMR (101 MHz, MeOD)**: δ 166.7 (quat C, C₅), 159.7 (2x quat C, C₂, C_{3a}), 148.9 (CH, C₇), 131.6 (CH, C₁₁), 128.8 (2x CH, C_{10-10'}), 126.9 (2x CH, C_{9-9'}), 126.2 (quat C, C_{7a}), 123.2 (quat C, C₈), 48.6 (CH, CH_{piperidine}), 43.2 (2x CH₂), 32.6 (2x CH₂). **HRMS (ESI⁺) m/z**: calcd. for C₁₆H₁₈N₅O, 296,1506 [M+H]⁺; found 296,1507.

2-Phenyl-N-(piperidin-4-yl)oxazolo[5,4-*d*]pyrimidin-5-amine (**64c**)



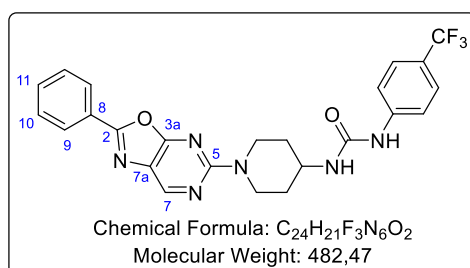
The title compound was prepared from **63g** (277 mg, 0.70 mmol, 1.0 eq.) and TFA (0.86 mL mL, 11.2 mmol, 16.0 eq.) following the **general procedure (B)**. Compound **64c** (183 mg, 0.62 mmol) was obtained as a white solid in 89% yield. **R_f**= 0.22 (CH₂Cl₂/MeOH, 4:1). **Mp**= 224 ± 2 °C. **IR (cm⁻¹)**: 3335, 2941, 2805, 1612, 1513, 1454, 1255, 1032, 817, 713. **¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 8.75 (s, 1H, H₇), 8.11 (m, 2H, H_{9-9'}), 7.59 (m, 4H, H_{10-10'}, H₁₁, NH), 3.79 (m, 1H, H_{piperidine}), 2.96 (m, 2H, H_{piperidine}), 2.55 (m, 2H, H_{piperidine}), 2.09 (br s, 1H, NH), 1.82 (m, 2H, H_{piperidine}), 1.38 (m, 2H, H_{piperidine}). **¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 166.9 (quat C, C₅), 158.5 (quat C, C₂), 158.4 (quat C, C_{3a}), 150.4 (CH, C₇), 132.3 (CH, C₁₁), 129.8 (2x CH, C_{10-10'}), 127.3 (2x CH, C_{9-9'}), 126.5 (quat C, C_{7a}), 123.3 (quat C, C₈), 49.6 (CH), 45.7 (2x CH₂), 33.4 (2x CH₂). **HRMS (ESI⁺) m/z**: calcd. for C₁₆H₁₈N₅O, 296,1506 [M+H]⁺; found 296,1504.

4-(2-Phenyloxazolo[5,4-*d*]pyrimidin-5-yl)-*N*-(4-(trifluoromethyl)phenyl)piperazine-1-carboxamide (65a)



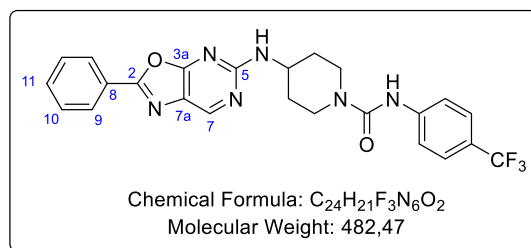
The title compound was prepared from **64a** (70 mg, 0.25 mmol, 1.0 eq.) and 4-(trifluoromethyl)phenyl isocyanate **33** (40 μ L, 0.30 mmol, 1.2 eq.), following the **general procedure (G)**. Compound **65a** (91 mg, 0.19 mmol) was obtained as a white solid in 78% yield. **Rf** = 0.12 (PE/EtOAc, 4:1). **Mp** > 250 °C. **IR (cm⁻¹)**: 3337, 2939, 2801, 1609, 1515, 1451, 1252, 1029, 810, 708. **¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 9.02 (s, 1H, NH), 8.88 (s, 1H, H₇), 8.12 (d, ³*J* = 6.6 Hz, 2H, H_{9-9'}), 7.72 (d, ³*J* = 8.4 Hz, 2H, H_{ar}), 7.61 (m, 5H, H_{10-10'}, H₁₁, H_{ar}), 3.88 (m, 4H, H_{piperazine}), 3.62 (m, 4H, H_{piperazine}). **¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 166.8 (quat C, C₅), 159.5 (quat C, C₂), 159.3 (quat C, C_{3a}), 155.0 (quat C, CO), 150.1 (CH, C₇), 144.8 (quat C, C_{ar}), 132.5 (CH, C₁₁), 129.8 (2x CH, C_{10-10'}), 127.4 (2x CH, C_{9-9'}), 126.4 (quat C, C_{7a}), 126.1 (2x CH, C_{ar}), 124.1 (quat C, C₈), 122.3 (quat C, C_{ar}), 119.4 (2x CH, C_{ar}), 44.4 (2x CH₂), 43.9 (2x CH₂). **HRMS (ESI⁺)** *m/z*: calcd. for C₂₃H₂₀F₃N₆O₂, 469,1594 [M+H]⁺; found 469,1595.

1-(1-(2-Phenyloxazolo[5,4-*d*]pyrimidin-5-yl)piperidin-4-yl)-3-(4-(trifluoromethyl)phenyl)urea (65b)



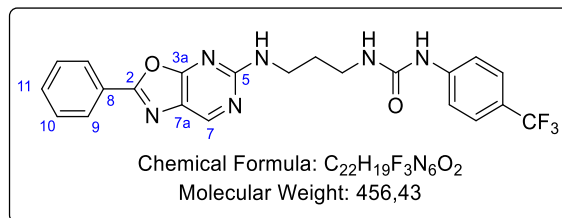
The title compound was prepared from **64b** (60 mg, 0.20 mmol, 1.0 eq.) and 4-(trifluoromethyl)phenyl isocyanate **33** (34 μ L, 0.30 mmol, 1.2 eq.), following the **general procedure (G)**. Compound **65b** (86 mg, 0.18 mmol) was obtained as a white solid in 90% yield. **Rf** = 0.54 (PE/EtOAc, 1:1). **Mp** > 250 °C. **IR (cm⁻¹)**: 3340, 2947, 2805, 1607, 1519, 1443, 1251, 1037, 805, 713. **¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 8.84 (s, 1H, H₇), 8.79 (s, 1H, NH), 8.12 (m, 2H, H_{9-9'}), 7.58 (m, 7H, H_{10-10'}, H₁₁, H_{ar}), 6.37 (d, ³*J* = 7.0 Hz, 1H, CO-NH-Ar), 4.52 (m, 2H, H_{piperidine}), 3.83 (m, 1H, H_{piperidine}), 3.27 (m, 2H, H_{piperidine}), 1.94 (m, 2H, H_{piperidine}), 1.42 (m, 2H, H_{piperidine}). **¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 166.9 (quat C, C₅), 159.5 (quat C, C₂), 159.0 (quat C, C_{3a}), 154.6 (quat C, CO), 150.2 (CH, C₇), 144.6 (quat C, C_{ar}), 132.4 (CH, C₁₁), 129.8 (quat C, C_{ar}), 129.8 (2x CH, C_{10-10'}), 127.4 (2x CH, C_{9-9'}), 126.5 (quat C, C_{7a}), 126.4 (2x CH, C_{ar}), 123.6 (quat C, C₈), 118.7 (2x CH, C_{ar}), 47.0 (CH, CH_{piperidine}), 43.3 (2x CH₂), 32.0 (2x CH₂). **HRMS (ESI⁺)** *m/z*: calcd. for C₂₄H₂₂F₃N₆O₂, 483,1751 [M+H]⁺; found 483,1750.

4-((2-Phenyloxazolo[5,4-*d*]pyrimidin-5-yl)amino)-*N*-(4-(trifluoromethyl)phenyl)piperidine-1-carboxamide (65c)



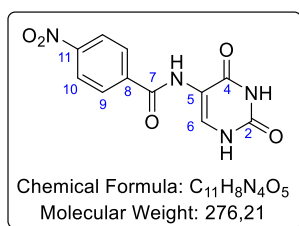
The title compound was prepared from **64c** (50 mg, 0.17 mmol, 1.0 eq.) and 4-(trifluoromethyl)phenyl isocyanate **33** (29 μ L, 0.20 mmol, 1.2 eq.), following the **general procedure (G)**. Compound **65c** (86 mg, 0.18 mmol) was obtained as a white solid in 90% yield. **R_f** = 0.50 (PE/EtOAc, 1:1). **Mp** > 250 °C. **IR (cm⁻¹)**: 3336, 2939, 2800, 1609, 1511, 1449, 1251, 1031, 815, 714. **¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆)** δ 8.93 (s, 1H, NH), 8.78 (s, 1H, H₇), 8.11 (m, 2H, H_{9-9'}), 7.70 (m, 2H, H_{ar}), 7.60 (m, 3H, H_{10-10'}, H₁₁), 4.13 (m, 2H, H_{piperidine}), 4.02 (m, 1H, H_{piperidine}), 3.02 (m, 2H, H_{piperidine}), 1.97 (m, 2H, H_{piperidine}), 1.48 (m, 2H, H_{piperidine}). **¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 166.9 (quat C, C₅), 160.3 (quat C, C₂), 158.5 (quat C, C_{3a}), 154.9 (quat C, CO), 150.3 (CH, C₇), 145.1 (quat C, C_{ar}), 132.3 (CH, C₁₁), 129.8 (quat C, C_{ar}), 129.8 (2x CH, C_{10-10'}), 127.3 (2x CH, C_{9-9'}), 126.6 (quat C, C_{7a}), 126.0 (2x CH, C_{ar}), 122.1 (quat C, C₈), 119.3 (2x CH, C_{ar}), 48.7 (CH, CH_{piperidine}), 43.5 (2x CH₂), 31.8 (2x CH₂). **HRMS (ESI⁺) *m/z***: calcd. for C₂₄H₂₂F₃N₆O₂, 483,1751 [M+H]⁺; found 483,1751.

1-(3-((2-Phenyloxazolo[5,4-*d*]pyrimidin-5-yl)amino)propyl)-3-(4-(trifluoromethyl)phenyl)urea (65d)



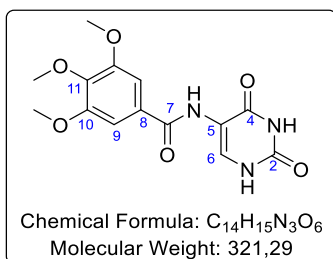
The title compound was prepared from **63h** (100 mg, 0.37 mmol, 1.0 eq.) and 4-(trifluoromethyl)phenyl isocyanate **33** (64 μ L, 0.45 mmol, 1.2 eq.), following the **general procedure (G)**. Compound **65d** (151 mg, 0.33 mmol) was obtained as a white solid in 88% yield. **R_f** = 0.15 (PE/EtOAc, 1:1). **Mp** > 250 °C. **IR (cm⁻¹)**: 3371, 2960, 2925, 1601, 1452, 1379, 1235, 1061, 949, 859, 721. **¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 9.15 (br s, 1H, NH), 8.76 (s, 1H, H₇), 8.09 (m, 2H, H_{9-9'}), 7.56 (m, 7H, H_{10-10'}, H₁₁, H_{ar}), 6.60 (br s, 1H, NH), 3.38 (m, 2H, CH₂), 3.20 (m, 2H, CH₂), 1.75 (m, 2H, CH₂). **¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 166.9 (quat C, C₅), 159.6 (quat C, C₂), 159.3 (quat C, C_{3a}), 155.5 (quat C, CO), 149.1 (CH, C₇), 144.9 (quat C, C_{ar}), 132.2 (CH, C₁₁), 132.2 (quat C, C_{ar}), 129.8 (2x CH, C_{10-10'}), 127.3 (2x CH, C_{9-9'}), 126.6 (quat C, C_{7a}), 126.3 (2x CH, C_{ar}), 123.3 (quat C, C₈), 117.6 (2x CH, C_{ar}), 37.4 (2x CH₂), 29.9 (CH₂). **HRMS (ESI⁺) *m/z***: calcd. for C₂₂H₂₀F₃N₆O₂, 457,1594 [M+H]⁺; found 457,1593.

***N*-(2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-5-yl)-4-nitrobenzamide (67a)**



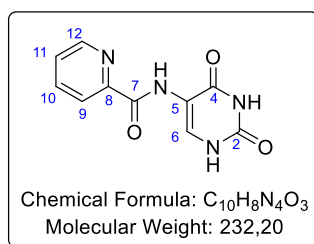
The title compound was prepared according to the **general procedure (G)** with 4-nitrobenzoyl chloride (3.30 g, 17.7 mmol, 1.5 eq.). Compound **67a** (2.77 g, 10.03 mmol) was obtained as a white solid in 85% yield. **Rf**= 0.43 (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1). **Mp** > 250 °C. **IR (cm⁻¹)**: 3322, 3090, 3027, 1773, 1660, 1521, 1347, 1246, 803. **¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 11.48 (s, 1H, NH), 10.89 (s, 1H, NH), 9.66 (s, 1H, CO-NH), 8.34 (d, ³*J* = 8.8 Hz, 2H, H_{ar}), 8.13 (d, ³*J* = 8.8 Hz, 2H, H_{ar}), 7.94 (br s, 1H, H₆). **¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 164.6 (quat C, C₇), 161.5 (quat C, C₄), 150.6 (quat C, C₂), 149.7 (quat C, C₁₁), 139.9 (quat C, C₈), 135.1 (CH, C₆), 129.6 (2x CH, C), 124.0 (2x CH, C), 112.3 (quat C, C₅). **HRMS (ESI⁺) *m/z***: calcd. for C₁₁H₈N₄O₅, 277,0567 [M+H]⁺; found 277,0566.

***N*-(2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-5-yl)-3,4,5-trimethoxybenzamide (67b)**



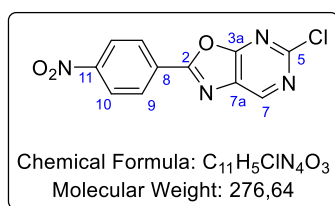
The title compound was prepared according to the **general procedure (G)** with 3,4,5-trimethoxybenzoyl chloride (4.08 g, 17.7 mmol, 1.5 eq.). Compound **67a** (3.18 g, 10.7 mmol) was obtained as a white solid in 91% yield. **Rf**= 0.42 (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1). **Mp** > 250 °C. **IR (cm⁻¹)**: 3326, 3088, 3030, 1773, 1660, 1596, 1493, 1470, 1244, 1112, 803, 780. **¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 11.43 (s, 1H, NH), 10.84 (s, 1H, NH), 9.23 (s, 1H, CO-NH), 7.83 (s, 1H, H₆), 7.24 (s, 2H, H_{9-9'}), 3.84 (s, 6H, *m*-OMe), 3.72 (s, 3H, *p*-OMe). **¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 165.6 (quat C, C₇), 161.8 (quat C, C₄), 153.1 (2x quat C, C_{10-10'}), 150.7 (quat C, C₂), 140.8 (quat C, C₁₁), 135.3 (CH, C₆), 129.4 (quat C, C₈), 112.5 (quat C, C₅), 105.6 (2x CH, C_{9-9'}), 60.6 (2x CH₃), 56.5 (CH₃, *p*-OMe). **HRMS (ESI⁺) *m/z***: calcd. for C₁₄H₁₆N₃O₆, 322,1034 [M+H]⁺; found 322,1034.

***N*-(2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-5-yl)picolinamide (67c)**



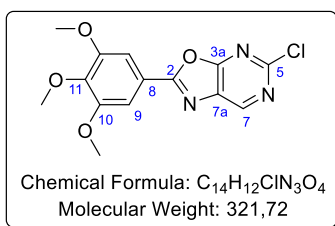
The title compound was prepared according to the **general procedure (G)** with 3,4,5-trimethoxybenzoyl chloride (4.08 g, 17.7 mmol, 1.5 eq.). Compound **67a** (3.18 g, 10.7 mmol) was obtained as a white solid in 91% yield. **Rf** = 0.42 (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1). **Mp** > 250 °C. IR (cm⁻¹): 3321, 3091, 3024, 1773, 1657, 1581, 1458, 1246, 803. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11.68 (br s, 1H, NH), 10.78 (br s, 1H, NH), 10.01 (s, 1H, CO-NH), 8.73 (d, ³J = 5.1 Hz, 1H, H₁₂), 8.32 (s, 1H, H₆), 8.10 (m, 2H, H₉, H₁₀), 7.68 (m, 1H, H₁₁). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ 161.8 (quat C, C₇), 161.1 (quat C, C₄), 149.9 (quat C, C₂), 149.3 (CH, C₁₂), 148.9 (quat C, C₈), 138.9 (quat C, C₁₀), 127.7 (2x CH, C₆, C₁₁), 105.6 (CH, C₉), 113.3 (quat C, C₅). HRMS (ESI⁺) *m/z*: calcd. for C₁₀H₉N₄O₃, 233.0669 [M+H]⁺; found 233.0670.

5-Chloro-2-(4-nitrophenyl)oxazolo[5,4-*d*]pyrimidine (68a)



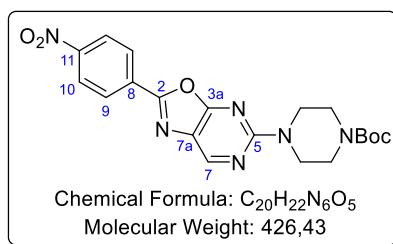
The title compound was prepared according to the **general procedure (D)** from the amide **67a** (1.0 g, 3.62 mmol). Compound **68a** (651 mg, 2.35 mmol) was obtained as a white powder in 65% yield. **Rf** = 0.46 (PE/EtOAc, 7:3). **Mp** = 187 ± 2 °C. IR (cm⁻¹): 1771, 1658, 1521, 1447, 1292, 1032, 928, 705. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 9.07 (s, 1H, H₇), 8.46 (q, ³J = 9.1 Hz, 4H, H_{9-9'}, H_{10-10'}). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 166.1 (quat C, C₅), 161.7 (quat C, C₁₁), 156.6 (quat C, C₂), 150.9 (CH, C₇), 150.5 (quat C, C₈), 131.9 (quat C, C_{3a}), 130.6 (quat C, C_{7a}), 129.3 (2x CH, C_{10-10'}), 124.5 (2x CH, C_{9-9'}). HRMS (ESI⁺) *m/z*: calcd. for C₁₁H₇ClN₃O, 232.0272 [M+H]⁺; found 232.0277.

5-chloro-2-(3,4,5-trimethoxyphenyl)oxazolo[5,4-*d*]pyrimidine (68b)



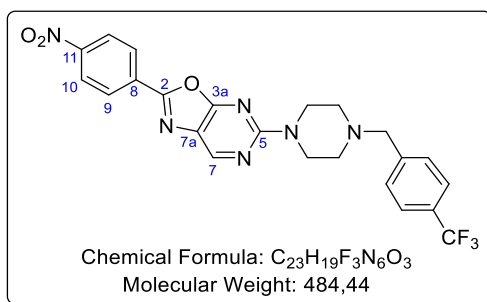
The title compound was prepared according to the **general procedure (D)** from the amide **67b** (1.0 g, 3.11 mmol). Compound **68b** (740 mg, 2.30 mmol) was obtained as a white powder in 74% yield. **R_f**= 0.18 (PE/EtOAc, 7:3). **Mp**= 201 ± 2 °C. **IR (cm⁻¹)**: 3031, 1770, 1657, 1600, 1491, 1471, 1292, 1032, 928, 705. **¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 9.22 (s, 1H, H₇), 7.50 (s, 2H, H_{9-9'}), 3.93 (s, 6H, *m*-OMe), 3.80 (s, 3H, *p*-OMe). **¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 166.5 (quat C, C₅), 163.5 (quat C, C₂), 154.0 (2x quat C, C_{10-10'}), 154.0 (quat C, C₈), 150.4 (CH, C₇), 142.6 (quat C, C₁₁), 133.0 (quat C, C_{3a}), 120.3 (quat C, C_{7a}), 105.9 (2x CH, C_{10-10'}), 60.8 (CH₃, *p*-OMe), 56.7 (2x CH₃). **HRMS (ESI⁺)** *m/z*: calcd. for C₁₁H₇ClN₃O, 232.0272 [M+H]⁺; found 232.0277.

***tert*-Butyl 4-(2-(4-nitrophenyl)oxazolo[5,4-*d*]pyrimidin-5-yl)piperazine-1-carboxylate (**72a**)**



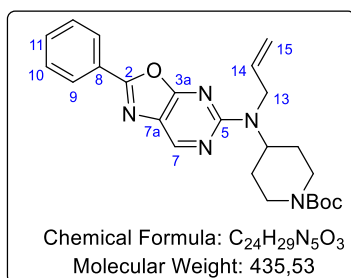
The title compound was prepared from **68a** (100 mg, 0.36 mmol, 1.0 eq.) and Boc-piperazine **24** (168 mg, 0.90 mmol, 2.5 eq.) following the **general procedure (F)**. Compound **72a** (81 mg, 0.19 mmol) was obtained as a white solid in 52% yield. **R_f**= 0.72 (PE/EtOAc, 1:1). **Mp**= 237 ± 2 °C. **IR (cm⁻¹)**: 3257, 2926, 2792, 1770, 1656, 1519, 1447, 1283, 1035, 930, 710. **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)**: δ 8.73 (s, 1H, H₇), 8.31 (m, 4H, H_{9-9'}, H_{10-10'}), 3.90 (m, 4H, H_{piperazine}), 3.53 (m, 4H, H_{piperazine}), 1.49 (s, 9H, CH₃-Boc). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)**: δ 166.8 (quat C, C₅), 159.8 (quat C, C₂), 154.7 (quat C, C₁₁), 159.5 (quat C, C_{3a}), 154.7 (quat C, CO), 150.4 (CH, C₇), 149.3 (quat C, C₈), 128.0 (2x CH, C_{10-10'}), 124.3 (2x CH, C_{9-9'}), 123.9 (quat C, C_{7a}), 80.2 (quat C, C(CH₃)₃), 44.3 (4x CH₂), 28.4 (3x CH₃). **HRMS (ESI⁺)** *m/z*: calcd. for C₂₀H₂₃N₆O₅, 427,1724 [M+H]⁺; found 427,1723.

2-(4-Nitrophenyl)-5-(4-(4-(trifluoromethyl)benzyl)piperazin-1-yl)oxazolo[5,4-*d*]pyrimidine (72b**)**



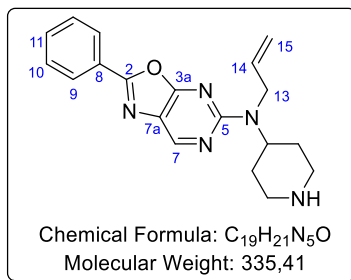
The title compound was prepared from **68a** (100 mg, 0.36 mmol, 1.0 eq.) and 1-(4-(trifluoromethyl)benzyl)piperazine (0.18 mL, 0.90 mmol, 2.5 eq.) following the **general procedure (F)**. Compound **72b** (73 mg, 0.15 mmol) was obtained as a white solid in 41% yield. *R_f* = 0.66 (PE/EtOAc, 4:1). *Mp* > 250 °C. **IR (cm⁻¹)**: 3263, 2924, 2781, 1768, 1661, 1521, 1447, 1421, 1320, 1283, 1031, 949, 823, 719. **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)**: δ 8.74 (s, 1H, H₇), 8.33 (m, 4H, H_{9-9'}, H_{10-10'}), 7.60 (d, ³*J* = 8.0 Hz, 2H, H_{ar}), 7.49 (d, ³*J* = 8.0 Hz, 2H, H_{ar}), 3.95 (m, 4H, H_{piperidine}), 3.62 (s, 2H, CH₂), 2.55 (m, 6H, H_{piperidine}). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)**: δ 166.8 (quat C, C₅), 159.9 (quat C, C₂), 157.0 (quat C, C₁₁), 150.5 (CH, C₇), 149.3 (quat C, C₈), 142.2 (quat C, C_{ar}), 132.1 (2 quat C, C_{3a}, C_{ar}), 129.2 (2x CH, C_{ar}), 127.9 (2x CH, C_{10-10'}), 125.3 (2x CH, C_{ar}), 124.3 (2x CH, C_{9-9'}), 123.6 (quat C, C_{7a}), 62.4 (CH₂), 52.9 (2x CH₂), 44.5 (2x CH₂). **HRMS (ESI⁺) *m/z***: calcd. for C₂₃H₂₀F₃N₆O₃, 485,1543 [M+H]⁺; found 485,1544.

***tert*-butyl 4-(allyl(2-phenyloxazolo[5,4-*d*]pyrimidin-5-yl)amino)piperidine-1-carboxylate (75)**



Under a dried and inert atmosphere (argon), a 60% emulsion of sodium hydride (56 mg, 1.40 mmol, 1.1 eq.) in mineral oil was added in three portions to a mixture of **63g** (250 mg, 0.63 mmol, 1.0 eq.) in anhydrous THF (12 mL) stirred at 0 °C. After 1 hour at 0 °C, TBAI (48 mg, 0.13 mmol, 20 mol%) and 1,3-dibromopropane (32 μL, 0.31 mmol, 0.5 eq.) were added, and the reaction mixture was allowed to warm slowly at room temperature over 8 hours. A white solid precipitated and volatiles were evaporated under reduced pressure. EtOAc was added and the resulting organic phase was treated with sat. aq. NaHCO₃. After extractions with EtOAc, organic layers were combined, dried over MgSO₄ and solvent evaporated. The crude material was purified by flash-column chromatography (silica, PE/EtOAc, 4:1) to afford the compound **75** (126 mg, 0.29 mmol) as a colourless oil in 95% yield. *R_f* = 0.74 (PE/EtOAc, 1:1). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)**: δ 8.71 (s, 1H, H₇), 8.17 (m, 2H, H_{9-9'}), 7.51 (m, 3H, H_{10-10'}, H₁₁), 5.94 (m, 1H, H₁₄), 5.15 (m, 2H, H₁₅), 4.83 (m, 1H, H_{piperidine}), 4.23 (m, 4H, H₁₃, H_{piperidine}), 2.87 (m, 2H, H_{piperidine}), 1.75 (m, 4H, H_{piperidine}), 1.49 (s, 9H, CH₃-Boc). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)**: δ 166.8 (quat C, C₅), 159.4 (quat C, C₂), 159.3 (quat C, C_{3a}), 154.8 (quat C, CO), 149.2 (quat C, C₇), 135.4 (CH, C₁₄), 131.6 (CH, C₁₁), 129.0 (2x CH, C_{10-10'}), 127.3 (2x CH, C_{9-9'}), 126.6 (quat C, C_{7a}), 123.9 (quat C, C₈), 115.7 (CH₂, C₁₅), 79.6 (quat C, C(CH₃)₃), 54.1 (CH, C_{piperidine}), 45.8 (CH₂, C₁₃), 43.6 (2x CH₂, C_{piperidine}), 29.8 (2x CH₂, C_{piperidine}), 28.5 (3x CH₃). **HRMS (ESI⁺) *m/z***: calcd. for C₂₄H₃₀N₅O₃, 436,2343 [M+H]⁺; found 436,2344.

***N*-allyl-2-phenyl-*N*-(piperidin-4-yl)oxazolo[5,4-*d*]pyrimidin-5-amine (76)**



The title compound was prepared from **75** (305 mg, 0.70 mmol, 1.0 eq.) and TFA (0.86 mL mL, 11.2 mmol, 16.0 eq.) following the **general procedure (B)**. Compound **76** (198 mg, 0.59 mmol) was obtained as a white solid in 85% yield. *R*_f = 0.22 (CH₂Cl₂/MeOH, 4:1). *Mp* = 229 ± 2 °C. **IR (cm⁻¹):** 3329, 2931, 2801, 1620, 1513, 1452, 1249, 1032, 822, 713. **¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆):** δ 8.75 (s, 1H, H₇), 8.11 (m, 2H, H_{9-9'}), 7.59 (m, 4H, H_{10-10'}, H₁₁, NH), 5.94 (m, 1H, H₁₄), 5.15 (m, 2H, H₁₅), 4.23 (m, 2H, H₁₃), 3.79 (m, 1H, H_{piperidine}), 2.96 (m, 2H, H_{piperidine}), 2.55 (m, 2H, H_{piperidine}), 1.82 (m, 2H, H_{piperidine}), 1.38 (m, 2H, H_{piperidine}). **¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆):** δ 166.9 (quat C, C₅), 158.5 (quat C, C₂), 158.4 (quat C, C_{3a}), 150.4 (CH, C₇), 135.8 (CH, C₁₄), 132.3 (CH, C₁₁), 129.8 (2x CH, C_{10-10'}), 127.3 (2x CH, C_{9-9'}), 126.5 (quat C, C_{7a}), 123.3 (quat C, C₈), 115.2 (CH₂, C₁₅), 49.6 (CH), 45.5 (CH₂, C₁₃), 43.7 (2x CH₂), 33.4 (2x CH₂). **HRMS (ESI⁺) *m/z*:** calcd. for C₁₉H₂₂N₅O, 336,1819 [M+H]⁺; found 336,1817.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Actuellement, le développement de nouveaux traitements antiviraux contre l'apparition de virus émergents de zoonoses est une nécessité. Ces stratégies inédites peuvent s'appuyer sur l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques impliquées dans l'immunité innée, présentes à la fois chez l'homme et l'animal. Par son rôle central dans la détection des différents virus (virus à ADN, à ARN, rétrovirus), ainsi que par la mise en place d'une réponse antivirale, la protéine STING est identifiée comme une cible thérapeutique de vif intérêt depuis une dizaine d'année. En effet, en stimulant la voie de signalisation STING, les ligands agonistes permettent une meilleure induction de la réponse immunitaire innée. En outre, celle-ci s'avère bénéfique dans l'inhibition de l'infection virale. Or, les ligands naturels de cette protéine (les dinucléotides cycliques), ne peuvent être utilisés comme médicament à cause de leur nature non « drug-like » et de leur faible ADME. De plus, le développement de leurs meilleurs analogues synthétiques a été interrompu en phase clinique pour des raisons similaires.

Dans un premier chapitre, nous avons décrit la synthèse d'analogues de CDNs portant des liens inter-nucléotidiques non ionisables (ou neutres), *i.e.* un lien triazole et une chaîne carbonée insaturée. Ces liens ont été choisis en vue d'améliorer la perméabilité cellulaire. En effet, le 2',3'-cGAMP et ses analogues thiophosphates ont, par leurs liens phosphates, de faibles ADME (ou pharmacocinétiques) en raison de leur caractère très polaire (présence de charges) et de leur instabilité prononcée vis-à-vis de certains enzymes.

Une première approche (Schéma 79) repose alors sur la synthèse convergente d'un macrocycle à partir d'un « pool chiral » osidique. Le macrocycle est ainsi construit par (1) une cycloaddition [1,3] dans les conditions de Huisgen ; (2) une macrocyclisation *via* une métathèse cyclisante catalysée au ruthénium. La dernière étape clé de cette synthèse est (3) le couplage des nucléobases avec le macrocycle par *N*-glycosylation dans les conditions de Vorbrüggen. L'insertion étape par étape des nucléobases en vue de former des analogues hétérodimères (comme le 2',3'-cGAMP), n'a pas été fructueuse sur les quelques essais menés avec des bases puriques : obtention de mélanges complexes et de produits de trans-glycosylation. Nous nous sommes alors orientés vers la synthèse d'homodimères à partir du même substrat macrocyclique. Deux composés ont donc été synthétisés, dont un premier portant deux bases thymines (**50a**), et un second portant deux bases 6-amino-2-chloropurines (**50b**). À noter que la réaction de double *N*-glycosylation de type Vorbrüggen est beaucoup plus aléatoire en série purine qu'en série pyrimidine, limitant ainsi le nombre d'analogues obtenus en fin de synthèse. Des travaux méthodologiques sont donc à envisager afin d'améliorer les résultats de ces synthèses, au cours desquelles le principal verrou identifié est la réaction de *N*-glycosylation de Vorbrüggen.

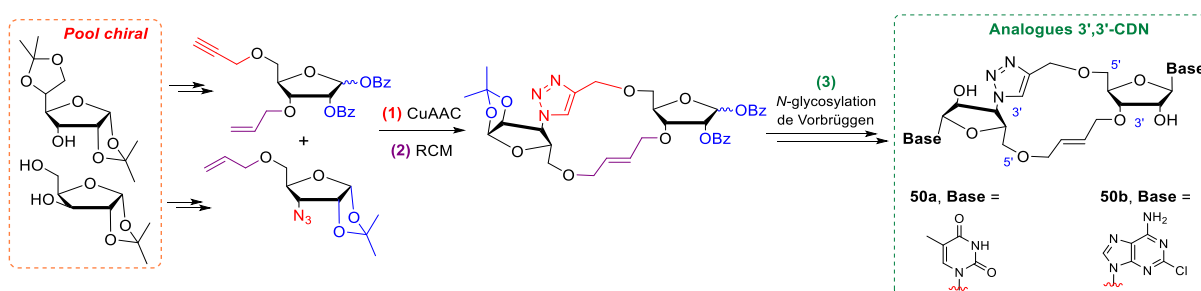


Schéma 79. Première approche synthétique des analogues de CDNs

Ces composés ont été finalement évalués biologiquement sur des macrophages de souris (BMDMs), mais ils n'ont montré aucune activité agoniste, ni antagoniste. Ces derniers ne sont cependant pas cytotoxiques.

Une seconde approche (Schéma 80) utilise l'adénosine comme substrat initial pour former un dinucléotide cyclique de manière convergente à partir du couplage, (1) par CuAAC, de deux précurseurs nucléosidiques, suivi (2) d'une métathèse cyclisante. L'étape de couplage des nucléobases par *N*-glycosylation de Vorbrüggen est alors évitée, étant donné les résultats obtenus lors de la première approche. La structure de ce nouvel analogue a été sélectionnée par ciblage *in silico*. Malheureusement, l'analogue de CDN désiré n'a pas pu être obtenu par suite de la réaction de RCM (dernière étape). Le catalyseur semble en effet être empoisonné par la présence des nucléobases, et ce, malgré la présence de groupements protecteurs sur les fonctions amines. Le temps et les quantités de produits nous faisant défaut, l'exploration de cette voie de synthèse s'est achevée sur cette dernière étape. Toutefois, cette dernière mérite d'être étudiée plus en profondeur, dans le but de fournir le composé désiré.

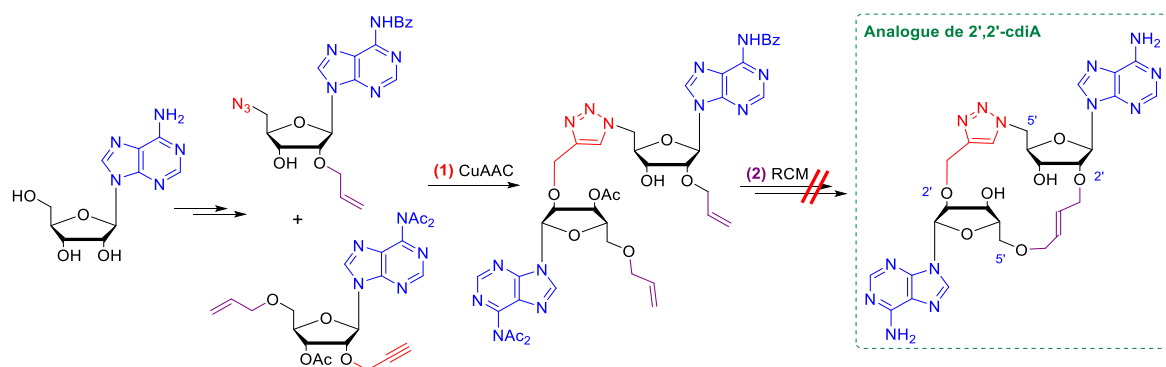


Schéma 80. Deuxième approche synthétique de CDN envisagée

Outre les analogues de type dinucléotidique cyclique, de petites molécules (aromatiques), décrites dans la littérature, présentent des activités agonistes de STING, parfois même supérieures à celles des CDNs. Nous nous sommes alors orientés, dans un second chapitre, vers la préparation de chimiothèques contenant des molécules dérivées du noyau 1*H*-benzimidazole et oxazolo[5,4-*d*]pyrimidine. L'approche synthétique est ici axée sur la diversité, en étant guidée par l'évaluation biologique systématique de nos produits. Un travail de modélisation *in silico* est également venu en appui pour l'orientation de quelques synthèses. Un premier criblage biologique d'une chimiothèque interne a permis d'identifier plusieurs dérivés portant un noyau 1*H*-benzimidazole comme étant biologiquement actifs.

Dans un premier temps, un travail de pharmaco-modulation a été réalisé autour du motif aryle terminal du « hit » 1*H*-benzimidazole identifié (Figure 82). La synthèse convergente explorée a rendu possible l'obtention de **11 nouveaux produits**, qui ont tous été évalués biologiquement. À partir de ces résultats, une seconde modulation de la structure, portant sur le motif central pipérazine en conservant le motif para-trifluorométhyle (-CF₃), a été réalisée. Ce dernier affiche la meilleure activité antagoniste de la série précédente. De plus, cette seconde modulation a mené à la synthèse de **2 composés originaux**, qui présentent des activités antagonistes intéressantes, mais inférieures au « hit » identifié.

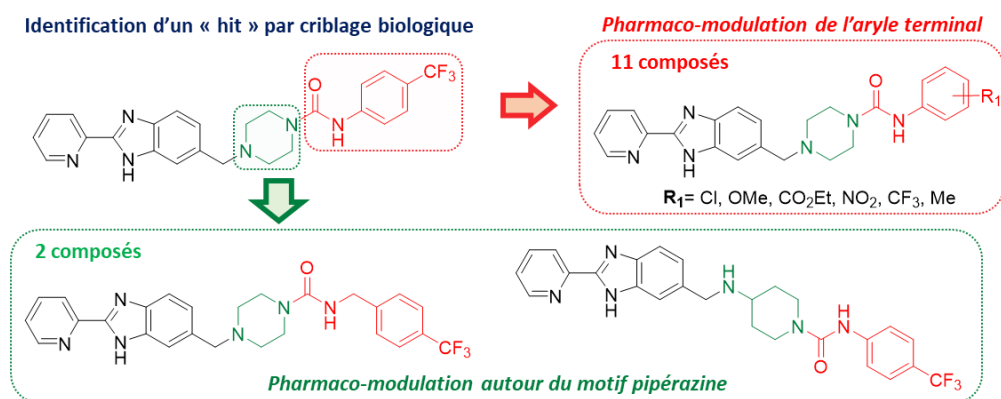


Figure 82. Objectifs de modulation autour du « hit » benzimidazole identifié

Les divers tests biologiques réalisés permettent donc de conclure que le « hit » découvert inhibe spécifiquement la voie de signalisation cGAS-STING, avec des valeurs d'IC₅₀ similaires à celles d'inhibiteurs commerciaux. Si la cible thérapeutique reste encore à élucider, nous avons néanmoins découvert une molécule antagoniste au fort potentiel, pouvant servir dans la lutte des maladies auto-immunes.

En parallèle, l'exploration de dérivés portant un squelette oxazolo[5,4-*d*]pyrimidine, s'est effectuée autour de la réactivité du squelette 5-chloro-2-phényloxazolo[5,4-*d*]pyrimidine vis-à-vis des organolithiens, de couplages palladés et de SNAr. (Figure 83). Les couplages palladés de type Suzuki-Miyaura et Stille, ont permis l'insertion de groupements aromatiques sur la position C-5, aboutissant à la formation d'une chimiothèque de **14 composés**. Ces derniers présentent néanmoins une faible solubilité aqueuse, problématique lors des tests cellulaires. Par conséquent, il a été décidé d'introduire des substituants augmentant la solubilité aqueuse (donc plus polaire) sur cette charpente : la globalité de ces substituants étant des amines, ceux-ci ont alors été couplés par simple réaction de SNAr. Une partie de ces composés a donc été fonctionnalisée avec le motif *N*-(4-(trifluorométhyl)phényl)carboxamide, afin de proposer des structures assez proches de l'analogue de benzimidazole le plus actif. La chimiothèque résultante comporte **18 composés originaux**.

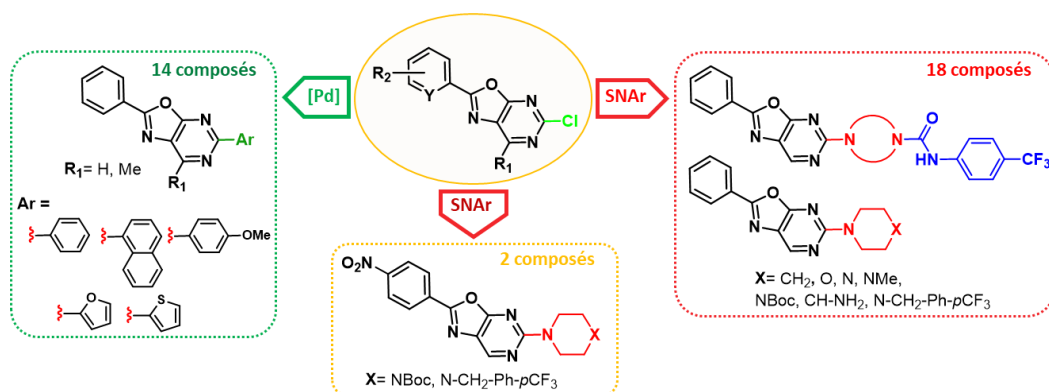


Figure 83. Exploration autour du squelette 5-chloro-2-phényloxazolo[5,4-*d*]pyrimidine

Dans un deuxième temps, un travail de modulation autour de la position C-2 du noyau oxazolo[5,4-*d*]pyrimidine a également été réalisé, en vue de proposer plus de diversité structurale (Figure 84). La synthèse de nouveaux *N*-(2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-5-yl)arylamide (**3 composés**) à partir de la 5-aminouracile, grâce à une silylation préalable, se déroule cette fois sous conditions organiques, et non plus

aqueuses. Cela a donné lieu à l'obtention d'un système compatible avec plusieurs chlorures d'acyles. Ces précurseurs amides ont donc fourni, après cyclisation sous POCl_3 , **2 nouvelles charpentes aromatiques** : le 5-chloro-2-(*p*-nitrophényl)oxazolo[5,4-*d*]pyrimidine et le 5-chloro-2-(3,4,5-triméthoxyphényl)oxazolo[5,4-*d*]pyrimidine, dont l'exploration chimique doit être poursuivie après les quelques résultats encourageants obtenus.

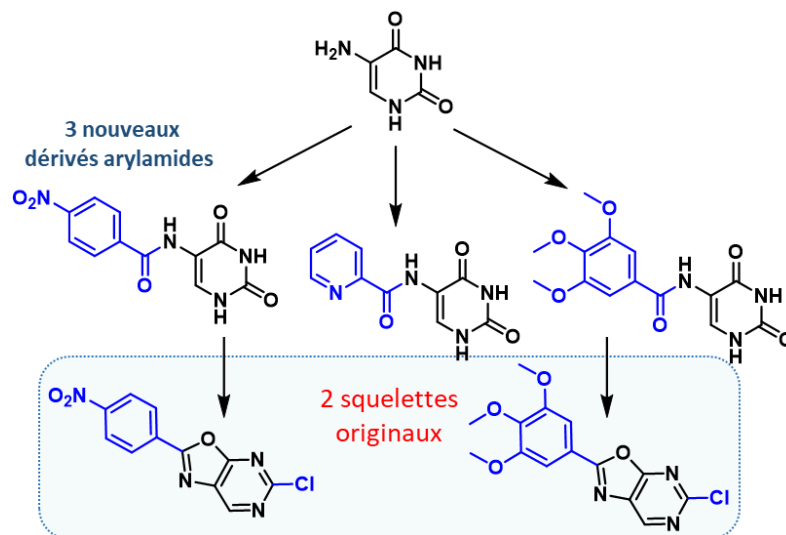


Figure 84. Modulation de la position C-2 du squelette oxazolo[5,4-*d*]pyrimidine

Si les tests biologiques réalisés sur les macrophages de souris indiquent que la plupart des composés de cette famille hétérocyclique ont une activité antagoniste faible, voire nulle, des résultats plus encourageants ont été obtenus sur les macrophages de poulet (cSTING), où un composé présente un fort potentiel antagoniste. Bien entendu, d'autres études sont à mener pour connaître le mode d'action et la cible thérapeutique exacte de cette molécule dans la voie de signalisation associée.

Enfin, nous nous sommes proposés de former des dimères à partir des structures de 1*H*-benzimidazole et d'oxazolo[5,4-*d*]pyrimidine au meilleur potentiel, reliés par une simple chaîne propane. Toutefois, les différentes tentatives réalisées avec le 1,3-dibromopropane n'ont pas été concluantes. Dans le cadre des benzimidazoles, la présence de deux formes tautomères sur le squelette induit effectivement la formation de plusieurs régioisomères d'alkyles. De plus, l'amine portée est peu nucléophile, et son activation en amidure conduit inévitablement à la formation d'une chaîne *N*-allyl. Ce phénomène se retrouve dans le cas du dérivé d'oxazolo[5,4-*d*]pyrimidine sélectionné pour former les dimères. D'autres stratégies de synthèse doivent donc être explorées pour pouvoir accéder à ces dérivés homodimériques.

Articles et communications de l'auteur

Publications :

Magand, J.; Roy, V.; Meudal, H.; Rose, S.; Quesniaux, V.; Chalupska, D.; Agrofoglio, L. A. Synthesis of novel 3',3'-cyclic dinucleotide analogues targeting STING protein. *Asian J. Org. Chem.* **2022**, e202200597.

Brevets :

Hétérocycles antagonistes de la voie cGAS/STING (en cours).

Communications :

- Orales

Magand, J.; Roy, V.; Warszycki, D.; Bojarski, A. J.; Guabiraba-Brito, R.; Rose, S.; Quesniaux, V.; Bourra, E.; Agrofoglio L. A. Conception et synthèse de ligands ciblant la voie de signalisation cGAS-STING. 34e Colloque Biotechnocentre, 20-21 Octobre, **2022**, Nouan le Fuzelier (France).

- Posters

Magand, J.; Roy, V.; Warszycki, D.; Bojarski, A. J.; Guabiraba-Brito, R.; Rose, S.; Quesniaux, V.; Bourra, E.; Agrofoglio L. A. Synthesis of oxazolo[5,4-d]pyrimidine and benzimidazole derivatives targeting the STING pathway. BOSS XVII, 3-5 Juillet, **2022**, Namur (Belgique).

Magand, J.; Roy, V.; Warszycki, D.; Bojarski, A. J.; Guabiraba-Brito, R.; Rose, S.; Quesniaux, V.; Bourra, E.; Agrofoglio L. A. Synthesis of novel cyclic dinucleotides as potential modulators of STING. BOSS XVII, 3-5 Juillet, **2022**, Namur (Belgique).

Magand, J.; Ojeda-Porras, A. C.; Meudal, H.; Rose, S.; Quesniaux, V.; Roy, V.; Agrofoglio L. A. Synthesis of novel cyclic dinucleotides: a perspective for new STING modulators ? 33e Colloque Biotechnocentre, 7-8 Octobre, **2021**, Chaumont sur Tharonne (**prix meilleur poster**, France)

Magand, J.; Ojeda-Porras, A. C.; Meudal, H.; Rose, S.; Quesniaux, V.; Roy, V.; Agrofoglio L. A. Synthesis of cyclic dinucleotides as modulators of STING, a pivotal protein in immunity and diseases. IS3NA-IRT Virtual Symposium, 26-27 Août, **2021**.

Jérémy MAGAND

Synthèse de dinucléotides cycliques et d'hétérocycles visant la protéine STING et étude sur la réponse immunitaire innée

Résumé :

La protéine STING est une protéine unique et essentielle de la voie de signalisation cGAS-STING. Sa modulation est impliquée dans l'immunité innée et STING est considéré comme une nouvelle cible thérapeutique attractive pour traiter les infections et les cancers. Le dinucléotide cyclique (CDN) 2',3'-GMP-AMP (cGAMP) est l'agoniste endogène de STING ayant des activités d'immunomodulation et a servi de fil conducteur pour le développement de nouveaux analogues de CDN et de composés hétérocycliques ciblant STING. En effet, du fait de certaines limitations du cGAMP (instabilité enzymatique, liaisons ionisables, faible pénétration cellulaire, etc), de nouveaux dérivés ciblant la protéine STING sont encore nécessaires.

Nous rapportons ici la synthèse de nouveaux CDN portant un fragment 1,2,3-triazole et une chaîne insaturée comme liaisons inter-nucléotidiques ; ainsi que la synthèse de petites banques de molécules portant un noyau 1*H*-benzimidazole ou oxazolo[5,4-*d*]pyrimidine. Les composés ont été évalués *in silico* sur la structure cristalline de la protéine STING par des études de docking, *in vitro* en mesurant le niveau de sécrétion de la chimiokine CXCL10, induite par l'interféron, et par fluorimétrie différentielle à balayage (DSF) pour déterminer leur affinité avec la protéine. Parmi les composés synthétisés, deux d'entre eux présentent une activité biologique prometteuse.

Mots clés : dinucléotides cycliques, antiviral, immunothérapie, ligands de STING, CuAAC, métathèse, *N*-glycosylation de Vorbrüggen, oxazolo[5,4-*d*]pyrimidine, 1*H*-benzimidazole.

Synthesis of cyclic dinucleotides and heterocyclic compounds targeting the STING protein and study of the innate immune response

Summary :

STING protein is a unique and pivotal protein of cGAS-STING signaling pathway. Its modulation is involved in innate immunity and STING is considered as a new attractive drug-target to treat infections and cancers. The cyclic dinucleotide (CDN) 2',3'-GMP-AMP (cGAMP) is the endogenous agonist of STING with immunomodulation activities and has served as lead for new CDN analogs and heterocyclic compounds development to target STING. Indeed, due to some limitations of the cGAMP (enzymatic instability, charged linkages, cell penetration, etc), new derivatives targeting the STING protein are still needed.

Herein, we report the synthesis of new CDN bearing a 1,2,3-triazole moiety and an unsaturated chain as inter-nucleotide linkages; and as well the synthesis of small libraries of compounds bearing a 1*H*-benzimidazole or oxazolo[5,4-*d*]pyrimidine core. Compounds were evaluated *in silico* on STING protein crystal structure through docking studies, *in vitro* by measuring the secretion level of the interferon-induced chemokine CXCL10, and by differential scanning fluorimetry (DSF) to determine their affinity to the protein. Among the synthesized compounds, two of them display a promising bioactivity.

Keywords : cyclic dinucleotides, antiviral, immunotherapy, STING ligands, CuAAC, metathesis, Vorbrüggen *N*-glycosylation, oxazolo[5,4-*d*]pyrimidine, 1*H*-benzimidazole.



ICOA, Institut de Chimie Organique et Analytique
UMR 7311 - UFR Sciences - BP 6759 - rue de Chartres
45067 Orléans cedex 2

