UNIVERSITÉ D'ORLÉANS

ÉCOLE DOCTORALE
SANTÉ, SCIENCES BIOLOGIQUES ET CHIMIE DU VIVANT
INSTITUT DE CHIMIE ORGANIQUE ET ANALYTIQUE

THÈSE présentée par :

Rayan BERABEZ

soutenue le : **28 novembre 2023**

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

Discipline/ Spécialité : Chimie Organique

Conception et validation préclinique de nouveaux inhibiteurs de LIMK pour le traitement de la Neurofibromatose de type 1

THÈSE dirigée par :

Mme PLÉ Karen	CRHC CNRS, Université d'Orléans
M. ROUTIER Sylvain	Pr, Université d'Orléans

RAPPORTEURS :

M. GÉRARD Stéphane	Pr, Université de Reims Champagne-Ardenne
M. JEAN Ludovic	Pr, Université Paris Cité

JURY :

M. GÉRARD Stéphane	Pr, Université de Reims Champagne-Ardenne, Rapporteur
M. JEAN Ludovic	Pr, Université Paris Cité, Rapporteur
Mme HABERKORN Laure	Dr, Institut de R&D SERVIER Paris-Saclay, Examinatrice
Mme BÉNÉDETTI Hélène	DR CNRS, Université d'Orléans, Examinatrice, Présidente du jury
Mme PLÉ Karen	CRHC CNRS, Université d'Orléans, Directrice de thèse
M. ROUTIER Sylvain	Pr, Université d'Orléans, Co-Directeur de thèse
Mme VALLÉE Béatrice	CR CNRS, Université d'Orléans, Membre invitée

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer ma gratitude envers les Professeurs Stéphane Gerard et Ludovic Jean pour avoir l'amabilité d'évaluer ces travaux de thèse en tant que rapporteurs. Mes remerciements s'adressent également aux Docteurs Laure Haberkorn, Hélène Bénedetti pour avoir accepté d'examiner mes travaux ainsi qu'au Docteur Béatrice Vallée pour faire partie de mon jury.

Je voudrais remercier ma directrice de thèse, le Docteur Karen Plé pour les nombreux conseils, la grande disponibilité et la patience dont elle a fait preuve durant ces trois dernières années. Je tiens également à remercier le Professeur Sylvain Routier en ses qualités de co-directeur de thèse et de directeur de l'Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA, UMR-CNRS 6005) de l'Université d'Orléans.

J'adresse mes remerciements au Professeur Pascal Bonnet, pour m'avoir accueilli au sein de l'ICOA en 2020 et pour son implication dans ce projet avec son équipe Bioinformatique Structurale et Chémoinformatique. J'en profite pour remercier ses membres : les Docteurs Samia Aci-Sèche et Adnane Aouidate pour les travaux de modélisation moléculaire et l'exploitation des structures cristallines réalisés dans le cadre de cette thèse.

Ces travaux de thèse sont le fruit d'une collaboration entre les chimistes de l'ICOA, et les biologistes du Centre de Biophysique Moléculaire (CBM) et de l'Institut Mondor de Recherche Biomédicale (IRBM). À ce titre, j'aimerais réexprimer ma gratitude envers les Docteurs Hélène Bénedetti et Béatrice Vallée ainsi que les Docteurs Caroline Girardin et Amandine Serrano du CBM, pour leur important travail de caractérisation biologique des composés synthétisés, leur accessibilité ainsi que pour leur contribution à la rédaction de ce manuscrit de thèse.

Je souhaite également adresser mes remerciements au Professeur Piotr Topilko et au Docteur Fanny Coulpier de l'IRBM pour leur précieuse collaboration dans la mise en place et l'analyse des études *in vivo* menées sur les molécules développées au cours de cette thèse.

Je tiens à remercier l'ensemble des personnes qui ont été impliquées dans ce projet de chimie médicinale, et notamment l'équipe du Docteur Sandrine Ruchaud de la Station Biologique de Roscoff ainsi que celle du Docteur Franck Verrecchia de l'Institut national de la santé et de la recherche médicale de Nantes.

Durant les années précédant mon arrivée en thèse, de nombreuses personnes ont su me transmettre avec bienveillance et gentillesse leur savoir et leur passion. J'aimerais ainsi adresser ma profonde reconnaissance au Docteur Jordy Saya, à Mesdames Stéphanie Dupas, Graciela Valério et Sophie Soury. Je remercie particulièrement le Docteur Sophie Négrel dont la détermination et la résilience ont été une source d'inspiration pour moi.

Durant ces trois années de thèse, j'ai eu l'opportunité de faire de nombreuses rencontres au sein du laboratoire, et chacune d'entre elles a laissé une empreinte sur ce travail de thèse.

J'exprime, avant tout, un grand merci aux chimistes qui ont contribué grandement à la synthèse de plusieurs composés décrits dans ce manuscrit. Je tiens donc à exprimer ma gratitude envers le Docteur Martin Oliver pour son remarquable travail de synthèse sur ce projet, ainsi que pour sa gentillesse et l'état d'esprit dont il a fait preuve durant son passage à l'ICOA. Je remercie également le Docteur Benjamin Blondeau qui, malgré les difficultés rencontrées, a toujours su garder sa bonne humeur en toute circonstance et a poursuivi ses efforts pour permettre l'avancée du projet. Et enfin, j'exprime ma gratitude envers Madame Joulicane Chatelier, qui a su marquer ce projet par la qualité de son travail réalisé au cours de son stage de troisième année de licence professionnelle.

Je tiens à remercier le Docteur Hamid Marzag qui m’a accueilli dans l’équipe à mon arrivée à l’ICOA et qui a toujours répondu avec bienveillance à mes différentes questions de chimie. Mes remerciements vont également au Docteur Jonathan Ribes, pour la correction de cette thèse et pour m'avoir accordé du temps en toute circonstance pour répondre à mes innombrables questions de biologie, avec une sérénité et une sympathie qui le caractérisent.

Si j’ai pu passer de très agréables moments au laboratoire dans une bonne ambiance, c’est avant tout grâce aux caractères et à la joie de vivre des différents membres du laboratoire 9. Je remercie en plus François, Modou, Théo, Alphonsine, Emma et Lilou pour tous les instants que nous avons partagés, que ce soit au laboratoire ou en dehors.

Enfin, je tiens à remercier l’ensemble des personnes de l’ICOA que j’ai pu côtoyer durant ces trois ans, et qui ont contribué chacun à leur manière au bon déroulement de cette thèse. Je porte notamment une attention toute particulière aux membres du laboratoire 10.

Un grand merci à tous

Liste des abréviations

ADF	*Actin-depolymerizing factor*
ADME-tox	Absorption, Distribution, Métabolisme, Élimination, Toxicité
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
ALH	Accepteur de liaisons hydrogène
AMP	Adénosine monophosphate
ATP	Adénosine triphosphate
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BMS	Bristol-Myers Squibb
BnBr	Bromure de benzyle
Boc	*tert*-butoxycarbonyle
Cbz	Carboxybenzyle
CDI	1,1'-Carbonyldiimidazole
Clint	Clairance intrinsèque
DABAL-Me3	Bis(trimethylaluminum)-DABCO
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane
DALH	Donneur-accepteur de liaisons hydrogène
Dba	Dibenzylidèneacétone
DBTRG	Lignée cellulaire de glioblastome
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène
DCC	Dicyclohexylcarbodiimide
DCM	Dichlorométhane
DFG	Motif Asp-Phe-Gly
DIAD	Diisopropyl azodicarboxylate
DIPEA	*N*,*N*-Diisopropyléthylamine
DLH	Donneur de liaisons hydrogène
DMAP	4-Diméthylaminopyridine
DMF	*N*,*N*-Diméthylformamide
DMP	Périodinane de Dess-Martin
DMSO	Diméthylsulfoxyde
Dppf	1,1'-bis(diphénylphosphino)ferrocène
DSC	*N*,*N*'-disuccinimidyl carbonate
EC_{50}	Concentration médiane effective
EDC	1-Éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
EDCI	1-Éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide chlorhydrate
EGF	Facteur de croissance épidermique
EGFR	Récepteur du facteur de croissance épidermique
éq.	Équivalent
FACS	*Fluorescence-activated cell sorting*
FDA	*Food and Drug Administration*
FRET	Transfert d'énergie entre molécules fluorescentes
GDP	Guanosine diphosphate

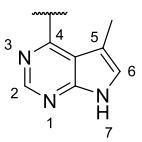
GEFs	*Guanine nucleotide exchange factors*
GP	Groupement protecteur
GRD	*GAP Related Domain*
GTP	Guanosine triphosphate
HATU	Hexafluorophosphate de (diméthylamino)-*N*,*N*-diméthyl(3*H*-[1,2,3]triazolo[4,5-*b*]pyridin-3-yloxy)méthaniminium
HeLa	Lignée cellulaire Henrietta Lacks, cancer du col de l'utérus
HOBt	Hydroxybenzotriazole
HPLC	*High-performance liquid chromatography*
HRD	Motif His-Arg-Asp
HRMS	*High Resolution Mass Spectrometry*
IC_{50}	Concentration inhibitrice médiane
IHC	Immunohistochimique
Inhib	Inhibition
IP	Intrapéritonéale
IR	Infrarouge
Kd	Constante de dissociation
KHOS	Lignée cellulaire d'ostéosarcome
Ki	Constante d'inhibition
KO	*Knockout*, invalidation d'un gène
LC-MS	Chromatographie en phase liquide-spectrométrie de masse
MET	Microenvironnement tumoral
MPNST	Tumeurs malignes des gaines nerveuses périphériques
Mp	Melting point
Ms	Méthanesulfonyle
NCS	*N*-Chlorosuccinimide
ND	Non déterminé
Nf	Nonafluorobutanesulfonyle
NF1	Neurofibromatose de type 1
Nf1	Neurofibromine
NF1	Gène codant pour la neurofibromine
NFc	Neurofibrome cutané
NFp	Neurofibrome plexiforme
NHS	*N*-Hydroxysuccinimide
NLS	*Nuclear Localisation Sequence*, Signal de localisation nucléaire
NMO	*N*-Oxyde de *N*-méthylmorpholine
NMP	*N*-Méthyl-2-pyrrolidone
P-cofiline	Cofiline phosphorylée
PE	Petroleum ether
PEG	Polyéthylène glycol
Ph	Phényle
Phospho	Phosphorylation
Pin	Pinacole
POI	Protéine d'intérêt
PPB	*Protein plasma binding*, Fixation aux protéines plasmatiques

Ppi	Anion pyrophosphate
PROTAC	*Proteolysis-targeting chimera*
PTM	*Post-translational modification*, Modification post-traductionnelle
Rdt	Rendement
Quant.	Quantitatif
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G
RTK	Récepteur à activité tyrosine kinase
R_f	Rapport frontal
RSA	Relations structure-activité
SFC	Chromatographie en phase supercritique
T3P	Anhydride propylphosphonique
ta.	Température ambiante
TAAM	Typage et Archivage Animaux Modèles
TCI	*Targeted covalent inhibitors,* Inhibiteurs covalents spécifiques
TFA	Acide trifluoroacétique
THF	Tétrahydrofurane
TMS	Triméthylsilyle
TMSDAM	Triméthylsilyldiazométhane
TPAP	Perruthénate de tétrapropylammonium
U251	Lignée cellulaire de glioblastome
U2OS	Lignée cellulaire d'ostéosarcome
Ub	Ubiquitine
Xphos	2-Dicyclohexylphosphino-2',4',6'-triisopropylbiphényle
µW	Micro-ondes

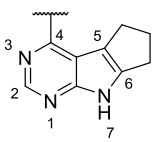
Acides aminés

Acide glutamique	Glu	E	Leucine	Leu	L
Acide aspartique	Asp	D	Lysine	Lys	K
Alanine	Ala	A	Méthionine	Met	M
Arginine	Arg	R	Phénylalanine	Phe	F
Asparagine	Asn	N	Proline	Pro	P
Cystéine	Cys	C	Sérine	Ser	S
Glutamine	Gln	Q	Thréonine	Thr	T
Glycine	Gly	G	Tryptophane	Trp	W
Histidine	His	H	Tyrosine	Tyr	Y
Isoleucine	Ile	I	Valine	Val	V

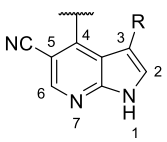
Nomenclature des bases hétérocycliques :



Base méthylée



Base tricyclique



Base cyano

Table des matières

Remerciements **3**

Liste des abréviations **5**

Table des matières **8**

Introduction générale **13**

I – Les kinases 14

1. Généralités 14
2. Structure et fonctionnement des kinases 14
3. Inhibiteurs de kinases 17

II – Les LIM kinases (LIMKs) 20

1. Généralités des LIMKs 20
2. Structure des LIMKs 20
3. Voies biologiques des LIMKs 21
   a) Voie de la cofiline 22
   b) Voie des microtubules 24

III – Pathologies liées à la dérégulation des LIMKs 26

1. Le cancer 26
   a) L'ostéosarcome 27
   b) Le glioblastome 28
2. Les maladies neurologiques 29
   a) Maladie d'Alzheimer 29
   b) La maladie de Parkinson 30
   c) Autres maladies neurologiques 30
3. La neurofibromatose de type 1 (NF1) 30

IV – Les inhibiteurs des LIMKs 32

1. Inhibiteurs de la littérature 32
   a) Les inhibiteurs de type aminothiazole (BMS) 33
   b) L'inhibiteur **Pyr1** 33
   c) Les inhibiteurs de type pyrrolopyrimidine 34
2. Travaux précédents de l'équipe 35

V – Objectifs du projet 38

Chapitre 1 Conception et Synthèse d'inhibiteurs des LIMKs : De l'exploration chimique « hit to lead » à la phase d'optimisation « lead optimisation » 39

I – Introduction 40

1. Voies de synthèse des plateformes hétérocycliques 40

a) Synthèse de la plateforme méthylée **8** 40

b) Synthèse de la plateforme tricyclique **12** 41

2. Travaux antérieurs 42

II – Modulation de l'aniline de l'urée 43

1. Relations structure-activité des urées de type phénoxyaryle 43

a) Synthèse des anilines précurseurs 43

b) Étape finale de formation des urées 46

c) Évaluations *in vitro* sur LIMKs et ROCKs 47

d) Synthèse et résultats cellulaires en base tricyclique des meilleurs composés phénoxyaryle 51

e) Exploration de la topologie des sites actifs 52

2. Amélioration de la solubilité des composés 54

a) Modification de l'aniline 55

b) Remplacement du 2nd cycle aromatique par une chaîne aliphatique 60

3. Changements de structure par la modélisation moléculaire et les données cristallographiques 65

a) Résultats cristallographiques et modélisation moléculaire 65

b) Synthèse d'urées de type diphénylamine 66

II – Modulation structurelle du cycle central 70

1. Introduction d'un cycle acide aminé 70

a) Rappels bibliographiques 70

b) Rétrosynthèse des inhibiteurs dérivés d'acide aminé 71

c) Voie de synthèse de l'acide aminé protégé **III** 71

2. Synthèse de la plateforme hétérocyclique méthylée composée d'un cycle central acide aminé 74

a) Essais préliminaires 74

b) Synthèse de l'acide aminé protégé par un Boc **179** 75

III – Modulation de la base hétérocyclique 81

1. Travaux antérieurs 81

a) Modélisation moléculaire 81

b) Évaluation biologique des premiers composés de type 1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carbonitrile (série cyano) 82

2. Exploration de la série cyano 83
a) Relations structure-activité sur les anilines de la série 1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carbonitrile .. 83
b) Modification du cycle central dihydropyridine en pipérazine 85
3. Optimisation chimique de la base 7-azaindolique 86
a) Synthèse de composés de type 3-chloro-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carbonitrile 86
b) Remplacement du groupement nitrile en son bioisostère fluoré 88
c) Modélisation moléculaire de la série « cyano » 89
IV – Conclusion 92

Chapitre 2 Évaluations *in cellulo* et *in vivo* des inhibiteurs des LIMKs 95

I – Objectifs 96

II – Évaluation des paramètres cellulaires des inhibiteurs des LIMKs 98

1. Détermination de la cytotoxicité des composés 98
a) Principe du test 98
b) Résultats de cytotoxicité (HeLa) 98
c) Résultats de cytotoxicité (DBTRG) 100
2. Mesure des taux de phosphorylation de la cofiline 101
a) Principe de la mesure 101
b) Lignée HeLa 102
c) Lignées U251 et DBTRG 104
III – Effet des inhibiteurs sur la migration cellulaire 106

1. Principe du test de cicatrisation 106
2. Exploitation des résultats des tests de cicatrisation 107
a) Lignée U251 et DBTRG 107
b) Lignée U2OS 108
IV – Évaluation préclinique sur un modèle murin de NF1 109

1. Études de sélectivité des composés **AC429** et **59**(**RB117**) 110
2. Études ADME-tox 111
a) Généralités 111
b) Résultats ADME 114
c) Études de toxicité 115
3. Résultats des tests *in vivo* sur un modèle murin de NF1 116
a) Contexte et présentation du modèle murin 116
b) Résultats *in vivo* du composé **AC429** 119

c) Résultats *in vivo* du composé **59**(**RB117**)..... 122

Chapitre 3 Modes d'inhibition alternatifs des LIMKs 125

I – Généralités.....126

1. Inhibiteurs covalents 126

a) Historique 126

b) Mode d'action des inhibiteurs covalents spécifiques à une cible (TCI) 128

c) Types de fonctions électrophiles utilisées..... 129

2. *Proteolysis-targeting chimeras* (PROTACs)..... 132

a) Définition..... 132

b) Historique..... 133

c) Conception de PROTACs..... 139

3. Application aux LIMKs..... 142

II – Inhibiteurs covalents des LIMKs 144

1. Synthèse des inhibiteurs..... 144

a) Motif acrylamide **246(OM145)**..... 144

b) Motif 4-diméthylaminocrotonamide 146

c) Motif sulfonamide de vinyle..... 148

d) Motif propiolamide 149

e) Motif α-cyanoacrylamide 151

f) Évaluations biologiques des inhibiteurs..... 152

2. Caractérisation de **246(OM145)**..... 153

a) Type d'inhibition..... 153

b) Données biologiques de **246(OM145)** 156

III – PROTACs ciblant les LIMKs.....158

1. Synthèse du PROTAC-amide (**283**)..... 158

a) Conception du PROTAC-amide..... 158

b) Synthèse du PROTAC **283**..... 159

2. Synthèse des PROTACs-triazole (**295**, **296**, **301**)..... 160

a) Validation du motif triazole..... 161

b) Synthèse des PROTACs-triazole..... 164

3. Évaluations biologiques des PROTACs ciblant les LIMKs..... 166

a) Dégradations des LIMKs par les PROTACs..... 166

b) Inhibition de la phosphorylation de la cofiline par les PROTACs 169

Conclusion et Perspectives 173

Annexe 183

Partie expérimentale..... 185

I – Indications générales.....186

1. Réactifs et solvants..... 186

2. Appareillage et outils d'analyse..... 186

II – Modes opératoires généraux et caractérisations structurales 188

Bibliographie..... 389

Contributions scientifiques..... 407

Introduction générale

I – Les kinases

1. Généralités

Les kinases sont des enzymes qui catalysent la réaction de phosphorylation, c'est-à-dire le transfert d'un groupement γ-phosphate de l'ATP (Adénosine Triphosphate) vers une molécule cible, le substrat (Figure 1). La réaction inverse de déphosphorylation d'un substrat en présence d'ADP (Adénosine Diphosphate) est quant à elle réalisée par une autre classe d'enzymes appelées phosphatases.[1]

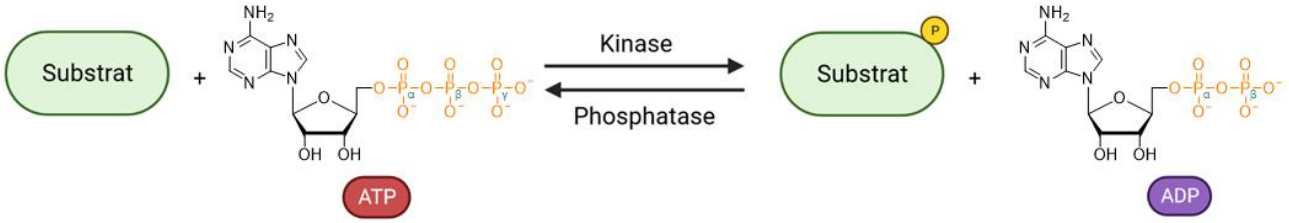


Figure 1 : Régulation enzymatique de la phosphorylation et déphosphorylation d'un substrat.

Le transfert d'un groupement phosphate s'effectue principalement sur les groupes hydroxyles des acides aminés suivants: sérine (86 %), thréonine (12 %) et tyrosine (2 %).[22] On distingue 3 familles de kinases selon la fonction phosphorylée : les sérine/thréonine kinases (alcools), les tyrosine kinases (phénols) et les sérine/thréonine/tyrosine kinases. L'ensemble des kinases humaines, connu sous le terme de kinome humain, est composé à ce jour de 538 kinases codées par près de 2 % du génome humain.[3,4]

La phosphorylation d'une protéine est une modification post-traductionnelle (PTM) majeure qui modifie la polarité de la région phosphorylée. Il peut en résulter un changement de conformation de la protéine, un changement de son activité (activation, inhibition), une relocalisation (cytoplasme, noyau) et/ou une modification des interactions avec ses partenaires. Ce type de PTM est fortement impliqué dans des processus cellulaires tels que la prolifération, la migration, la biosynthèse de protéines ou encore l'activation de voies de signalisation cellulaire.[5] L'équilibre phosphorylation/déphosphorylation est ainsi essentiel pour la régulation de nombreux processus cellulaires et le bon fonctionnement de la cellule. L'activation des kinases est elle-même réalisée par leur propre phosphorylation, soit par une autre kinase, soit par autophosphorylation : par exemple, les récepteurs transmembranaires à activité tyrosine kinase EGFR s'autophosphorylent suite à la fixation du facteur de croissance épidermique (EGF) pour conduire à la transduction du signal dans la cellule.[6,7]

2. Structure et fonctionnement des kinases

La structure des kinases est conservée dans les 538 protéines du kinome humain. Elle se compose de 2 principaux domaines appelés lobes, un lobe *N*-terminal et un lobe *C*-terminal, reliés par une région charnière : la "hinge" (Figure 2).

---

[1] Bhullar, K. S.; Lagarón, N. O.; McGowan, E. M.; Parmar, I.; Jha, A.; Hubbard, B. P.; Rupasinghe, H. P. V. *Mol. Cancer* **2018**, *17* (1), 48.
[2] Olsen, J. V.; Blagoev, B.; Gnad, F.; Macek, B.; Kumar, C.; Mortensen, P.; Mann, M. *Cell* **2006**, *127* (3), 635–648.
[3] Manning, G.; Whyte, D. B.; Martinez, R.; Hunter, T.; Sudarsanam, S. *Science* **2002**, *298* (5600), 1912–1934.
[4] Zhang, H.; Cao, X.; Tang, M.; Zhong, G.; Si, Y.; Li, H.; Zhu, F.; Liao, Q.; Li, L.; Zhao, J.; Feng, J.; Li, S.; Wang, C.; Kaulich, M.; Wang, F.; Chen, L.; Li, L.; Xia, Z.; Liang, T.; Lu, H.; Feng, X.-H.; Zhao, B. *eLife* **2021**, *10*, e64943.
[5] Ardito, F.; Giuliani, M.; Perrone, D.; Troiano, G.; Muzio, L. L. *Int. J. Mol. Med.* **2017**, *40* (2), 271–280.
[6] Yarden, Y.; Schlessinger, J. *Biochemistry* **1987**, *26* (5), 1434–1442.
[7] Downward, J.; Parker, P.; Waterfield, M. D. *Nature* **1984**, *311*, 483–485.

Le lobe *N*-terminal est pour sa part constitué de 5 feuillets β, d'une hélice α dite "hélice αC" et d'une boucle riche en glycine, la *P-loop* pour *phosphate-binding loop*. Le lobe *C*-terminal, plus volumineux, est constitué de 6 hélices α ainsi que de 2 boucles, la boucle catalytique et la boucle d'activation. Celles-ci permettent l'accès de l'ATP à la région charnière et l'activation du substrat.[8] Un enchaînement d'acides aminés est conservé entre les kinases sur chacune des boucles : on distingue le motif DFG (Asp-Phe-Gly) dans la séquence de la boucle d'activation, et le motif HRD (His-Arg-Asp) sur la boucle catalytique. Tous deux sont nécessaires à l'activité enzymatique des kinases en réponse à leur activation par la phosphorylation de la boucle d'activation.[9]

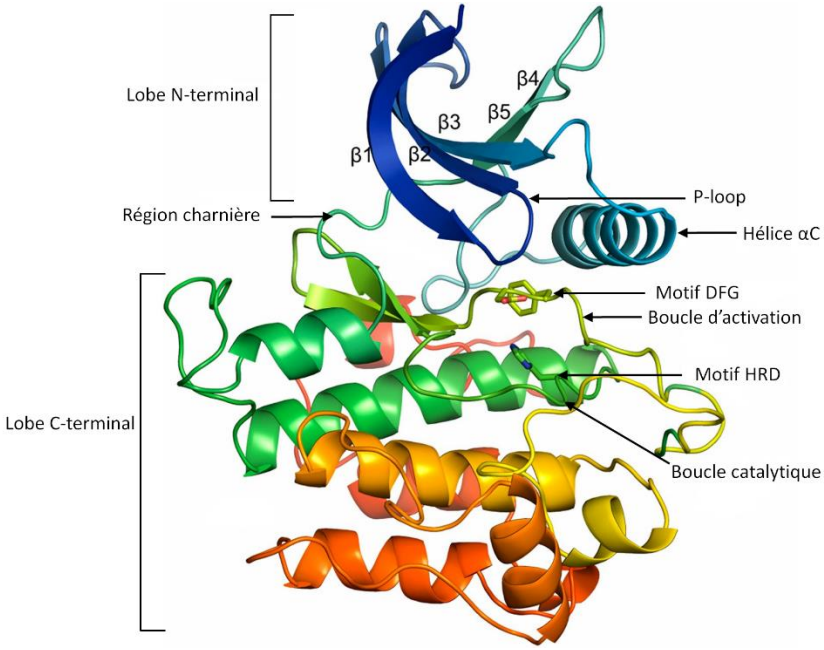


Figure 2 : Structure du domaine kinase.

Les kinases peuvent être comparées à des interrupteurs alternant entre 2 positions ou conformations : une conformation inactive "*off*" que l'enzyme adopte par défaut et pour laquelle l'activité enzymatique est limitée, et une conformation active "*on*" qui permet une activité enzymatique maximale. Le passage d'une conformation à l'autre nécessite l'activation de la kinase par la phosphorylation de la boucle d'activation située dans le lobe *C*-terminal.

Dans l'état activé de la kinase, une molécule d'ATP est prise en étau entre les lobes *N*- et *C*-terminaux, au niveau de la région charnière (Figure 3). Des liaisons hydrogène se créent entre le motif adénine de la molécule d'ATP et les liaisons de la chaine polypeptidique formant la région charnière. Dans le lobe *N*-terminal, la *P-loop* riche en glycine peut s'approcher et orienter l'ATP dans le site actif.[10] Ainsi, une lysine du feuillet β, stabilisée par un résidu glutamate de l'hélice αC, crée des liaisons hydrogène avec les groupements phosphates α et β de l'ATP. Dans le lobe *C*-terminal, la boucle d'activation adopte une position DFG-*In* qui permet :

- L'interaction de l'hélice αC avec la région *N*-terminale de la boucle d'activation.
- La création d'un pont ionique entre les groupements phosphates β et γ de l'ATP, le cofacteur Mg^{2+}et le résidu aspartate du motif DFG.

[8] McClendon, C. L.; Kornev, A. P.; Gilson, M. K.; Taylor, S. S. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2014**, *111* (43), E4623–E4631.
[9] Kornev, A. P.; Haste, N. M.; Taylor, S. S.; Ten Eyck, L. F. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103* (47), 17783–17788.
[10] Hemmer, W.; McGlone, M.; Tsigelny, I.; Taylor, S. S. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272* (27), 16946–16954.

- L'interaction du résidu aspartate du motif His-Arg-Asp (HRD) de la boucle catalytique, avec le groupement hydroxyle du substrat, afin d'induire l'attaque nucléophile de ce dernier sur le phosphate γ.[11,12]

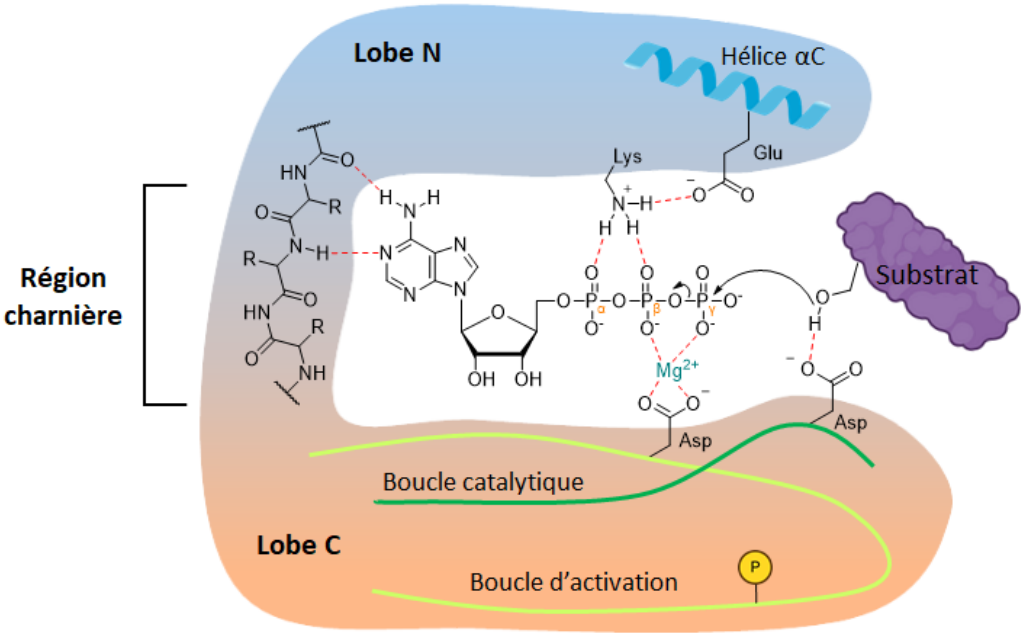


Figure 3 : Structure générale de la forme active d'une kinase.

Plusieurs changements de conformation peuvent être responsables de l'état inactif des kinases, ceux-ci concernent principalement l'hélice αC et la boucle d'activation qui sont conservées entre les kinases. La boucle d'activation peut se replier sur la surface de la protéine, bloquant ainsi l'approche du substrat. Une autre manière d'inactiver une kinase réside dans la position du motif DFG. En position DFG-*in,* la kinase est activée, mais en position DFG-*out* le résidu Phe se retrouve à la place de l'Asp et en conséquence, empêche l'amarrage de l'ATP dans le site actif puisque les liaisons phosphate-Mg^{2+} ne peuvent pas se réaliser (Figure 3).[13,14]

Ainsi, l'activité des kinases est liée à ces mécanismes d'autorégulation, dont la conformation oscille entre les formes actives et inactives selon les besoins de la cellule.[15] Cependant, il arrive que ces processus d'inactivation échouent, et ce à cause d'une dérégulation ou de mutations de ces kinases. Depuis ces 30 dernières années, la dérégulation des kinases a été mise en évidence dans de nombreux cancers[16] mais aussi dans différentes maladies immunitaires, neurologiques ou infectieuses.[17,18,19,20]

[11] Huse, M.; Kuriyan, J. *Cell* **2002**, *109* (3), 275–282.
[12] Adams, J. A. *Chem. Rev.* **2001**, *101* (8), 2271–2290.
[13] Hubbard, S. R.; Wei, L.; Hendrickson, W. A. *Nature* **1994**, *372*, 746–754.
[14] Modi, V.; Dunbrack, R. L. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2019**, *116* (14), 6818–6827.
[15] Pucheta-Martínez, E.; Saladino, G.; Morando, M. A.; Martinez-Torrecuadrada, J.; Lelli, M.; Sutto, L.; D'Amelio, N.; Gervasio, F. L. *Sci. Rep.* **2016**, *6* (1), 24235.
[16] Cicenas, J.; Zalyte, E.; Bairoch, A.; Gaudet, P. *Cancers* **2018**, *10* (3), 63.
[17] Tabit, C. E.; Shenouda, S. M.; Holbrook, M.; Fetterman, J. L.; Kiani, S.; Frame, A. A.; Kluge, M. A.; Held, A.; Dohadwala, M. M.; Gokce, N.; Farb, M. G.; Rosenzweig, J.; Ruderman, N.; Vita, J. A.; Hamburg, N. M. *Circulation* **2013**, *127* (1), 86–95.
[18] Sato, S.; Sanjo, H.; Takeda, K.; Ninomiya-Tsuji, J.; Yamamoto, M.; Kawai, T.; Matsumoto, K.; Takeuchi, O.; Akira, S. *Nat. Immunol.* **2005**, *6* (11), 1087–1095.
[19] Mueller, B. K.; Mack, H.; Teusch, N. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4* (5), 387–398.
[20] Cohen, P. *Nat. Immunol.* **2014**, *15* (6), 521–529.

3. Inhibiteurs de kinases

En 2001, l'imatinib (Glivec®) a été le premier inhibiteur de kinase à recevoir une autorisation de mise sur le marché par la *Food and Drug Administration* (FDA). Cet inhibiteur de la tyrosine kinase Abeslon (Abl) développé par Novartis, a montré son efficacité dans le traitement de la leucémie myéloïde chronique à un stade précoce.[21] Depuis cette découverte, de nombreux inhibiteurs de kinases sont régulièrement approuvés et mis sur le marché chaque année, principalement pour une utilisation dans des traitements anticancéreux et anti-inflammatoires.[22] En 2023, plus de 180 inhibiteurs de kinases sont engagés dans des essais cliniques et 72 d'entre eux ont reçu une autorisation de mise sur le marché de la part de la FDA (Figure 4). Bien que le nombre de nouveaux inhibiteurs de kinases disponibles sur le marché augmente chaque année, seulement une trentaine de kinases sont ciblées par ces produits parmi les 538 kinases découvertes à ce jour.[23,24] La plupart de ces inhibiteurs, comme l'imatinib, agissent sur plusieurs cibles et sont donc relativement peu sélectifs. Cela n'empêche pas 18 inhibiteurs de kinases d'être utilisés pour le traitement de plusieurs pathologies.

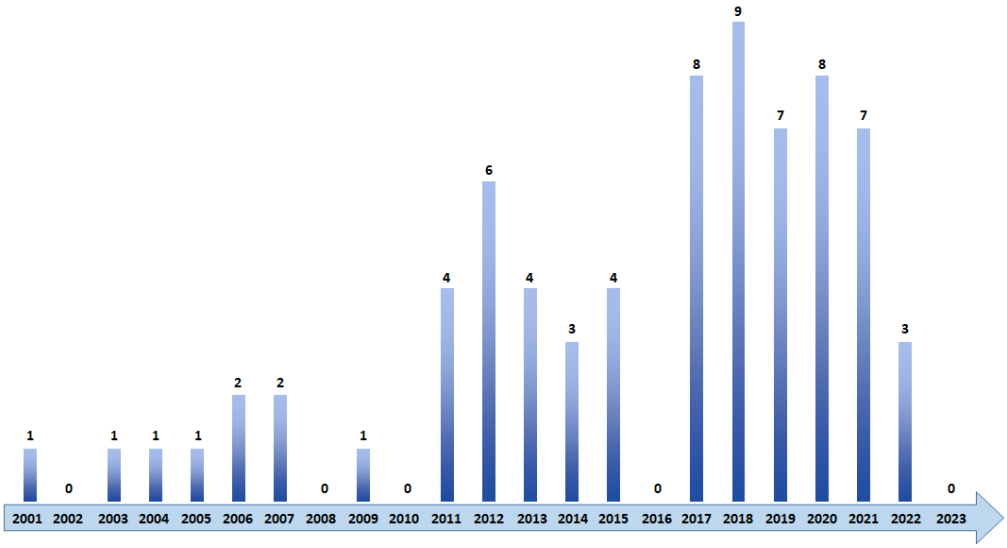


Figure 4 : Nombre d'inhibiteurs de kinases approuvés chaque année par la FDA depuis 2001 à mai 2023.

Les nouvelles connaissances des fonctions cellulaires des kinases, combinées aux structures cristallographiques de ces dernières, contribuent au développement de nouvelles générations d'inhibiteurs de kinases, afin notamment de gagner en sélectivité et d'éviter des inhibitions néfastes d'autres kinases appelées "*off target*".[25] Les inhibiteurs de kinases sont classés en plusieurs types en fonction de leur mode d'interaction à l'enzyme (Figure 5) :

- Inhibiteurs de **type I** : composés compétitifs de l'ATP qui se fixent dans le site actif au niveau de la *hinge* et dans une conformation active DFG-*in* de la kinase.[26]
- Inhibiteurs de **type I$^{1/2}$** : composés hybrides entre les types I et II, ils lient au *hinge* et interagissent avec une région appelée *back-pocket*. Bien que la position du motif DFG soit en DFG-*in*, la kinase est

[21] Capdeville, R.; Buchdunger, E.; Zimmermann, J.; Matter, A. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1* (7), 493–502.
[22] Cohen, P.; Cross, D.; Jänne, P. A. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2021**, *20* (7), 551–569.
[23] Carles, F.; Bourg, S.; Meyer, C.; Bonnet, P. *Molecules* **2018**, *23* (4), 908.
[24] Roskoski, R. *Pharmacol. Res.* **2023**, *187*, 106552.
[25] Fabbro, D.; Cowan-Jacob, S. W.; Moebitz, H. *Br. J. Pharmacol.* **2015**, *172* (11), 2675–2700.
[26] Zhang, J.; Yang, P. L.; Gray, N. S. *Nat. Rev. Cancer* **2009**, *9* (1), 28–39.

sous une forme catalytique inactive due à la position de l'hélice αC dite "*C*-helix-out", ce qui rompt la stabilisation de la Lys par le Glu et l'amarrage de l'ATP dans le site actif.[27]

- Inhibiteurs de **type II** : ciblent la forme inactive de la kinase (DFG-*out*) en se fixant dans la poche de l'ATP et en se liant également à une poche hydrophobe adjacente, démasquée par la conformation DFG-*out*. Ces inhibiteurs stabilisent la kinase dans sa conformation inactive.[28]
- Inhibiteurs de **type III** : non ATP-compétitifs, ils se fixent sur un site allostérique proche du site actif et induisent une forme inactive de la kinase.[29]
- Inhibiteurs de **type IV** : se fixent sur un site allostérique éloigné du domaine catalytique.[30]
- Inhibiteurs de **type V** : inhibiteurs bivalents qui peuvent se lier dans deux sites de fixations différents (site de fixation de l'ATP et site allostérique par exemple).[31]
- Inhibiteurs de **type VI** : inhibiteurs covalents ou inhibiteurs suicides, se lient de manière irréversible au site actif par la création d'une liaison covalente entre un résidu du site actif (cystéine, lysine, histidine, etc…) et l'inhibiteur.[32]

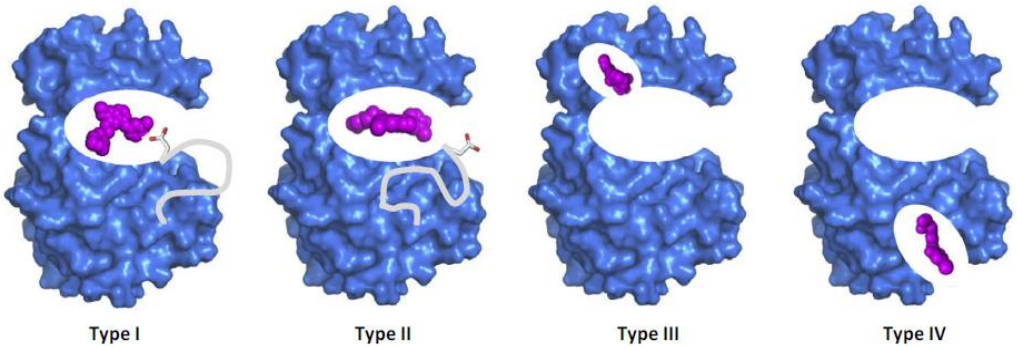


Figure 5 : Représentation des types d'inhibiteur de kinase.[33]

Seule la co-cristallisation d'un inhibiteur dans sa kinase permet de déterminer le type d'inhibition de ce dernier. La majorité des inhibiteurs disponibles sur le marché sont des inhibiteurs ATP-compétitifs de types I, $I^{1/2}$ et II (Figure 6), qui se lient au site actif des kinases avec de bonnes affinités.

[27] Zuccotto, F.; Ardini, E.; Casale, E.; Angiolini, M. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (7), 2681–2694.
[28] Liu, Y.; Gray, N. S. *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2* (7), 358–364.
[29] Cowan-Jacob, S. W.; Möbitz, H.; Fabbro, D. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2009**, *21* (2), 280–287.
[30] Gavrin, L. K.; Saiah, E. *MedChemComm* **2013**, *4* (1), 41–51.
[31] Lamba, V.; Ghosh, I. *Curr. Pharm. Des.* **2012**, *18* (20), 2936–2945.
[32] Roskoski, R. *Pharmacol. Res.* **2016**, *103*, 26–48.
[33] Wu, P.; Nielsen, T. E.; Clausen, M. H. *Trends Pharmacol. Sci.* **2015**, *36* (7), 422–439.

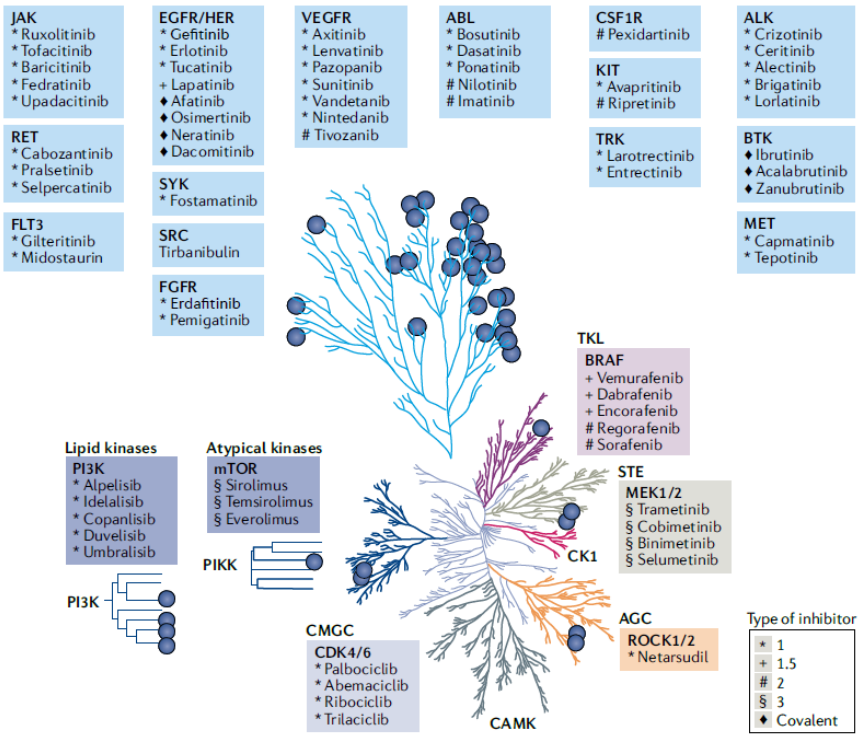


Figure 6: Représentation du kinome humain et des inhibiteurs de kinases approuvés par la FDA en 2021.[34]

L'efficacité d'un inhibiteur pour une enzyme (cible) est le plus souvent exprimée par la détermination de sa constante d'inhibition médiane (IC_{50}), concentration d'inhibiteur à laquelle 50 % de l'activité enzymatique est inhibée. Lorsque la détermination de l'IC_{50} est difficile, il est possible d'évaluer l'affinité d'un ligand grâce à la mesure de sa constante d'inhibition (Ki), concentration à laquelle 50 % des sites actifs de l'enzyme sont occupés par l'inhibiteur. Cette valeur thermodynamique est liée à l'IC_{50} par une des formules mathématiques provenant de l'équation de Michaelis–Menten, selon le type d'inhibition.[35,36] En raison de la conservation des sites actifs entre les kinases, de fortes similitudes de structures subsistent entre leurs sites actifs, ce qui conduit à une perte de sélectivité observée pour une grande partie des inhibiteurs ATP-compétitifs. C'est pourquoi on observe depuis quelques années l'émergence de nouveaux inhibiteurs plus sélectifs, avec des modes d'inhibition différents comme les inhibiteurs de type III et VI.[37]

Avec l'émergence de nouvelles cibles thérapeutiques, la recherche de nouveaux inhibiteurs de kinases, sélectifs et très affins, est l'un des défis que doivent relever les chimistes médicinaux de nos jours. Avec l'appui de la connaissance des structures cristallines (rayons X) et de la modélisation moléculaire, des études de relations structure-activité (RSA) sont au cœur de la recherche de nouvelles molécules efficaces et sélectives. En plus des activités sur la cible thérapeutique, ces nouvelles molécules doivent prendre en compte des critères d'ADME-tox (Absorption, Distribution, Métabolisme, Élimination, Toxicité) et des paramètres physico-chimiques (poids moléculaire, nombre de donneurs/accepteurs de liaisons hydrogène (DLH/DAH), log P, *polar surface area* (PSA), etc…)[38] pour pouvoir espérer entrer en phase d'essais cliniques.

[34] Attwood, M. M.; Fabbro, D.; Sokolov, A. V.; Knapp, S.; Schiöth, H. B. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2021**, *20* (11), 839–861.
[35] Cer, R. Z.; Mudunuri, U.; Stephens, R.; Lebeda, F. J. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, W441–W445.
[36] Johnson, K. A.; Goody, R. S. *Biochemistry* **2011**, *50* (39), 8264–8269.
[37] Ayala-Aguilera, C. C.; Valero, T.; Lorente-Macías, Á.; Baillache, D. J.; Croke, S.; Unciti-Broceta, A. *J. Med. Chem.* **2022**, *65* (2), 1047–1131.
[38] Bournez, C.; Carles, F.; Peyrat, G.; Aci-Sèche, S.; Bourg, S.; Meyer, C.; Bonnet, P. *Molecules* **2020**, *25* (14), 3226.

II – Les LIM kinases (LIMKs)

1. Généralités des LIMKs

La famille des LIM kinases (LIMKs) est composée de 2 membres, LIMK1 et LIMK2, découverts en 1994[39] et 1995.[40] Ces serine/thréonine/tyrosine kinases tirent leur nom de leur domaine LIM, nommé ainsi car il correspond à la première lettre du nom de trois facteurs de transcription possédant ce domaine : Lin11, Isl-1 et Mec-3.[41,42,43] Si les LIMKs sont exprimées de façon ubiquitaire dans les tissus, on retrouve une prédominance de LIMK1 dans le cerveau, la peau et le système digestif tandis que l'on retrouve plus majoritairement LIMK2 dans les muscles.[44,45]

2. Structure des LIMKs

LIMK1 et LIMK2 présentent une structure commune composée de deux domaines LIM en *N*-terminal, adjacents à un domaine PDZ (acronyme tiré des protéines PSD95, Dig1 et zo-1), lui-même suivi d'une région riche en sérine/proline (S/P) ainsi que d'un domaine kinase, en *C*-terminal, qui porte l'activité catalytique des LIMKs. LIMK1 et LIMK2 partagent une identité globale de 50 % sur l'ensemble de leur structure protéique, leur ressemblance s'accentue au niveau de leur domaine kinase qui partagent 70 % d'identité (Figure 7).[46]

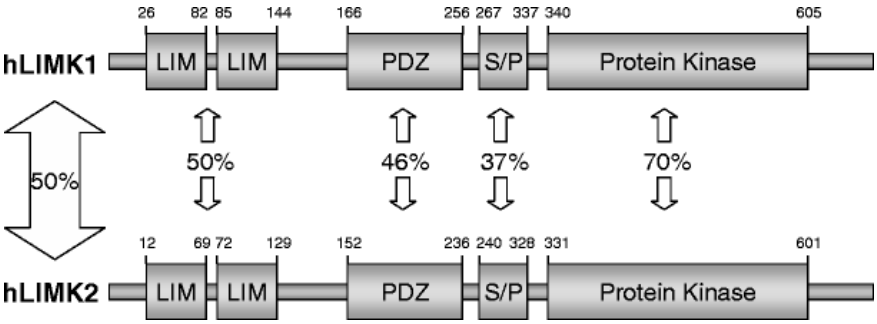


Figure 7 : Structure des protéines LIMK1 et LIMK2.[46]

Les domaines LIM et PDZ sont constitués de motifs capables d'interagir avec d'autres protéines ou pour les domaines LIM avec de l'ADN. Les domaines LIM, riches en cystéine et histidine, forment des complexes avec des atomes de Zinc, ce qui modifient et stabilisent leur architecture 3D pour former des motifs caractéristiques dits en "doigt de Zinc".[47] Les domaines PDZ sont impliqués, grâce à leurs motifs NLS (*nuclear localisation sequence*) dans la relocalisation des LIMKs entre le noyau et le cytoplasme.[48,49]

Comme évoqué, les similitudes de séquence entre LIMK1 et LIMK2 se retrouvent également dans leur site catalytique respectif. Ces derniers ne diffèrent que de 6 acides aminés seulement : Cys349, Phe411

[39] Ohashi, K.; Toshima, J.; Tajinda, K.; Nakamura, T.; Mizuno, K. *J. Biochem.* **1994**, *116* (3), 636–642.
[40] Okano, I.; Hiraoka, J.; Otera, H.; Nunoue, K.; Ohashi, K.; Iwashita, S.; Hirai, M.; Mizuno, K. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270* (52), 31321–31330.
[41] Sala, S.; Ampe, C. *Cell. Mol. Life Sci.* **2018**, *75* (11), 1959–1971.
[42] McConnell, B. V.; Koto, K.; Gutierrez-Hartmann, A. *Mol. Cancer* **2011**, *10* (1), 75.
[43] Kadrmas, J. L.; Beckerle, M. C. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, *5* (11), 920–931.
[44] *Tissue expression of LIMK1 - Summary - The Human Protein Atlas*. https://www.proteinatlas.org/ENSG00000106683-LIMK1/tissue (accédé le 05/06/2023).
[45] *Tissue expression of LIMK2 - Summary - The Human Protein Atlas*. https://www.proteinatlas.org/ENSG00000182541-LIMK2/tissue (accédé le 05/06/2023).
[46] Scott, R. W.; Olson, M. F. *J. Mol. Med.* **2007**, *85* (6), 555–568.
[47] Bach, I. *Mech. Dev.* **2000**, *91* (1–2), 5–17.
[48] Goyal, P.; Pandey, D.; Siess, W. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281* (35), 25223–25230.
[49] Brown, Imogen D. Coghill, Meagan J., S. *IUBMB Life* **2001**, *51* (6), 359–364.

et Lys417 pour LIMK1, Phe341, Leu403 et Glu409 pour LIMK2. Ainsi, la conservation des sites actifs des LIMKs rendrait la conception d'inhibiteurs duaux LIMK1/LIMK2 plus aisée, au détriment d'une sélectivité significative entre ces deux kinases.[50]

3. Voies biologiques des LIMKs

Les LIMKs sont des kinases dont l'activité catalytique est régulée par différentes voies d'activation. Comme vu précédemment, les kinases sont activées par la phosphorylation d'un ou plusieurs résidus de leur boucle d'activation. Les LIMKs sont activées par 3 familles de kinases (Figure 8) : les **ROCK1** & **ROCK2** (Rho-associated protein kinase), les **PAK1/2/4** (p21 protein-activated kinase) et les **MRCKα** (myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase), par la phosphorylation de la Thr508 pour **LIMK1** et la Thr505 pour **LIMK2**.[51,52] Ces 3 familles de kinases sont elles-mêmes activées par de petites protéines G ou **Rho-GTPases** (**RhoA**, **Rac1** et **Cdc42**) de la famille Rho, impliquées dans l'architecture, la migration ainsi que la prolifération cellulaire.[53,54] Ces voies de signalisation cellulaire sont activées à la suite d'un signal extracellulaire reçu par des récepteurs membranaires (RCPG, intégrine, RTK, cadhérine), qui vont transmettre leur activation aux **Rho-GTPases** par l'intermédiaire de facteurs d'échange nucléotidiques ou *Guanine nucleotide Exchange Factors* (**GEFs**).[55] Les LIMKs ainsi activées vont poursuivre la transduction du signal *via* 2 voies biologiques :

- La première est la plus documentée. Elle concerne la déstabilisation des filaments d'actine suite à la désactivation de la **cofiline** induite par la phosphorylation de son résidu Ser3 (Figure 8).[56,57] La cofiline est un facteur de dépolymérisation de l'actine qui a un rôle important dans la dynamique du cytosquelette d'actine.
- La seconde concerne la déstabilisation des microtubules, autre élément majeur du cytosquelette ayant un rôle clé dans le cycle de division cellulaire.

[50] Thèse du Dr Abdennour Braka soutenue à Orléans le 28 mars 2018.
[51] Ohashi, K.; Nagata, K.; Maekawa, M.; Ishizaki, T.; Narumiya, S.; Mizuno, K. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275* (5), 3577–3582.
[52] Sumi, T.; Matsumoto, K.; Nakamura, T. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (1), 670–676.
[53] Etienne-Manneville, S.; Hall, A. *Nature* **2002**, *420*, 629–635.
[54] Sadok, A.; Marshall, C. J. *Small GTPases* **2014**, *5* (4), e983878.
[55] Bellanger, J.-M.; Schmidt, S.; Estrach, S.; Portales-Casamar, É.; Diriong, S.; Debant, A. *Med Sci (Paris)* **2001**, *17* (12), 1316–1321.
[56] Moriyama, K.; Iida, K.; Yahara, I. *Genes to Cells* **1996**, *1* (1), 73–86.
[57] Agnew, B. J.; Minamide, L. S.; Bamburg, J. R. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270* (29), 17582–17587.

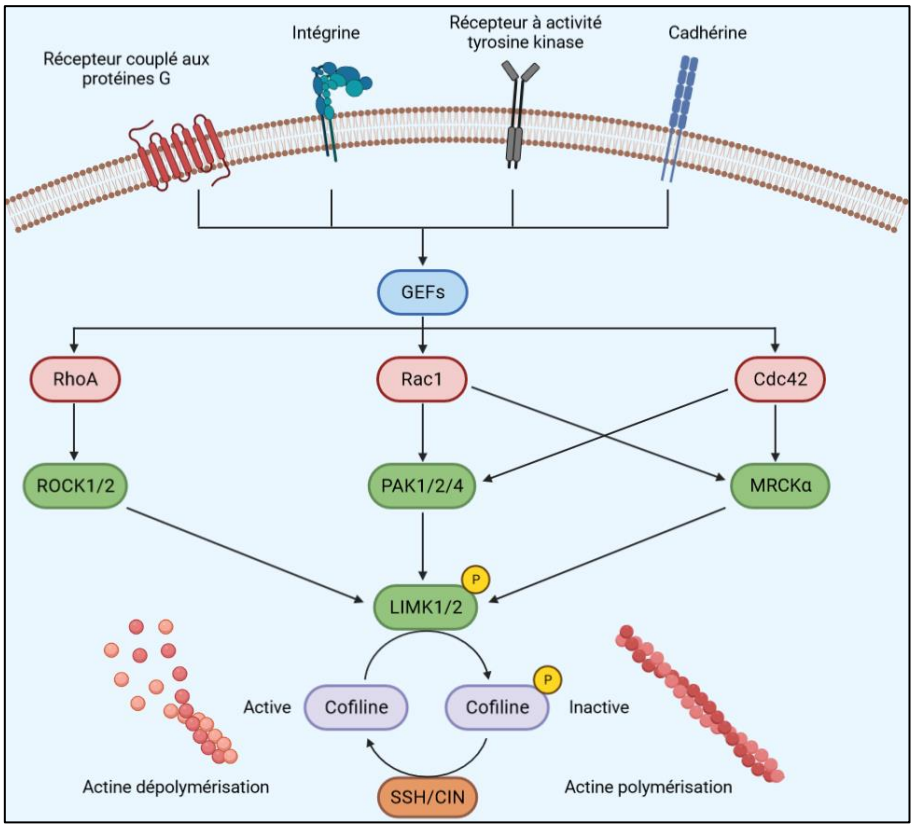


Figure 8 : Régulation de la cofiline par la voie Rho-GTPases/LIMKs (illustration réalisée sur BioRender.com).

a) Voie de la cofiline

L'actine est une protéine ubiquitaire qui fait partie des 3 protéines qui composent le cytosquelette avec les microtubules et les filaments intermédiaires (Figure 9). Ces protéines ont un rôle essentiel dans la forme, la migration, la division, le transport cellulaire et la contraction musculaire.[58,59]

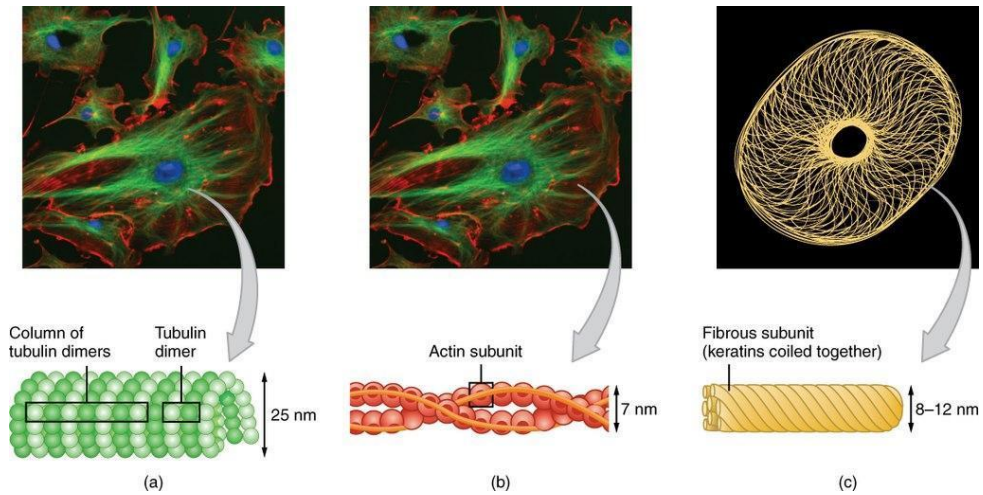


Figure 9 : Illustration des filaments du cytosquelette dans les cellules : microtubules (en vert), filaments d'actine (en rouge), filaments intermédiaires (en jaune).[60]

[58] Hohmann T.; Dehghani F. *Cells* **2019**, *8* (4), 362.
[59] Fletcher, D. A.; Mullins, R. D. *Nature* **2010**, *463*, 485–492.
[60] https://alg.manifoldapp.org/read/fundamentals-of-cell-biology/ consulté le 7 juin 2023.

L'actine est présente sous deux formes : sa forme monomérique, ou globulaire (G-actine), et sa forme polymérisée, ou filamenteuse (F-actine). La dynamique de l'actine *i.e.* le passage d'une forme à l'autre, permet au réseau d'actine de répondre aux besoins de la cellule. Lorsque la concentration en G-actine atteint un seuil critique, les monomères d'actine liés à l'ATP vont pouvoir polymériser spontanément pour former des filaments d'actine hélicoïdaux. Un équilibre s'établit alors entre les formes F et G de l'actine. La polymérisation de l'actine est favorisée par la profiline à l'extrémité (+) des filaments, tandis que l'ADF/cofiline permet la dépolymérisation à l'extrémité (-) (Figure 10).[61]

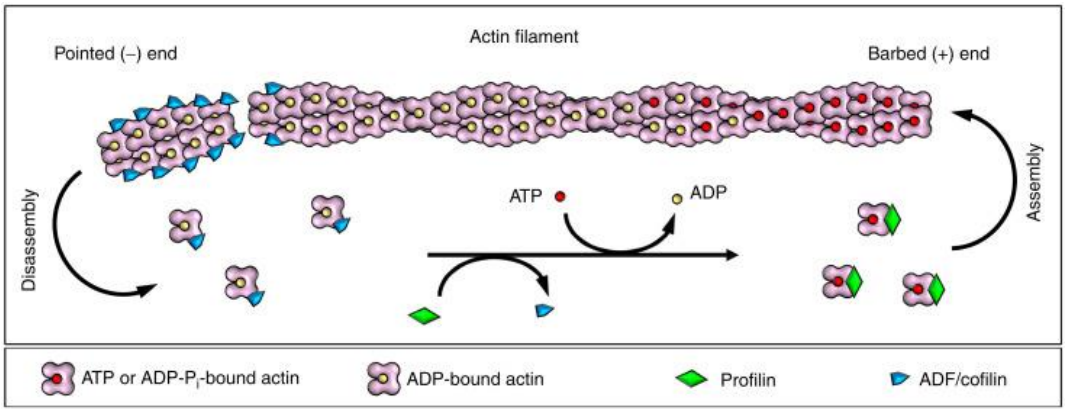


Figure 10 : Dynamique d'un filament d'actine en présence de profiline et d'ADF/cofiline.[62]

L'ADF/cofiline, simplifiée en cofiline, est une famille de protéines composée de 3 membres : la cofiline 1 (présente dans tous les tissus sauf les muscles), la cofiline 2 (présente dans les muscles) et la destrine ou *actin depolymerizing factor* (ADF). Sous sa forme active, la cofiline se fixe préférentiellement sur les monomères d'actine liés à l'ADP, situés à l'extrémité (-) des filaments.[63] En se positionnant dans les filaments d'actine, la cofiline va engendrer une torsion entraînant leur dépolymérisation. Ainsi, la synergie entre la cofiline et la profiline permet le renouvellement des filaments d'actine et conduit à la création de nouvelles ramifications ainsi qu'au développement d'un réseau d'actine évolutif.[64,65]

La phosphorylation de la cofiline effectuée par les LIMKs induit son inactivation, ce qui favorise la forme filamenteuse de l'actine et la création de fibres de stress. Par conséquent, l'expression et la régulation de l'activité des LIMKs joue un rôle majeur dans la dynamique des filaments d'actine.[66,67] À l'inverse, la déphosphorylation de la cofiline par les phosphatases slingshots (**SSH1**) ou chronophine (**CIN**) permet à la cofiline de retourner à son état actif (Figure 8, page 22).[68] L'alternance des états actif et inactif de la cofiline provoque une réorganisation dynamique du cytosquelette d'actine, médiée par la voie de signalisation des Rho-GTPase/LIMK.

[61] Bamburg, J.; Minamide, L.; WigTgan, O.; Tahtamouni, L.; Kuhn, T. *Cells* **2021**, *10* (10), 2726.
[62] Svitkina, T. M. Filopodia and Lamellipodia. In *Encyclopedia of Cell Biology*, Bradshaw, R. A., Stahl, P. D. Eds.; Academic Press, **2016**; pp 683-693.
[63] Nomura, K.; Ono, S. *Biochem. J.* **2013**, *453* (2), 249–259.
[64] McGough, A.; Pope, B.; Chiu, W.; Weeds, A. *J. Cell Biol.* **1997**, *138* (4), 771–781.
[65] Didry, D.; Carlier, M.-F.; Pantaloni, D. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273* (40), 25602–25611.
[66] Arber, S.; Barbayannis, F. A.; Hanser, H.; Schnelder, C.; Stanyon, C. A.; Bernards, O.; Caroni, P. *Nature* **1998**, *393*, 805–809.
[67] Amano, T.; Tanabe, K.; Eto, T.; Narumiya, S.; Mizuno, K. *Biochem. J.* **2001**, *354* (1), 149–159.
[68] Huang, T. Y.; DerMardirossian, C.; Bokoch, G. M. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2006**, *18* (1), 26–31.

b) Voie des microtubules

Les microtubules qui composent le cytosquelette sont les filaments les plus gros (25 nm de diamètre) et les moins dynamiques (Figure 9, page 22). Leur structure cylindrique est composée de 2 monomères, la tubuline α et la tubuline β, dont la base de nucléation est localisée majoritairement sur un centre organisateur des microtubules autour du noyau appelé le centrosome.[69,70] Les tubulines α et β interagissent avec le GTP et s'associent en hétérodimères puis en protofilaments. L'assemblage de 13 à 15 protofilaments mène à la création d'un microtubule hélicoïdale creux en son centre.[71] Contrairement aux filaments d'actine dont la polymérisation et la dépolymérisation dans les cellules s'effectuent aux deux extrémités (+) et (-), la dynamique des microtubules se déroule sur l'extrémité (+), l'extrémité (-) étant ancrée dans le centrosome.[72] Alors que le GTP lié à la tubuline α n'est jamais hydrolysé ni échangé, le GTP lié à la tubuline β peut être hydrolysé en GDP. Le GDP peut être échangé en GTP lorsque le dimère $\alpha\beta$ est libre en solution. Les microtubules présentent une instabilité dynamique qui est caractérisée par un équilibre entre leur polymérisation et leur dépolymérisation. La transition de la polymérisation à la dépolymérisation est qualifiée de catastrophe, et la transition inverse est appelée sauvetage. La croissance des microtubules s'effectue par la polymérisation des hétérodimères de tubuline αβ où β est liée au GTP. L'hydrolyse de ce GTP en GDP déstabilise la structure des microtubules et favorise leur dépolymérisation (Figure 11).[73]

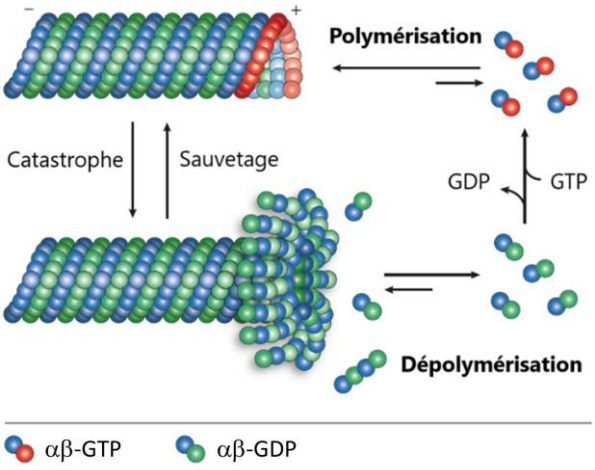


Figure 11 : Dynamique des microtubules (traduit de Cheeseman et al.).[74]

Les microtubules ont une fonction essentielle dans le cycle cellulaire et plus particulièrement lors de la mitose puisqu'ils composent les fuseaux mitotiques responsables de la séparation des paires de chromosomes. Pendant l'interphase (constituée par les phases G1, S et G2), l'ADN ainsi que le centrosome sont dupliqués par la cellule avant son entrée en mitose (Figure 12). Lors de la prophase, les centrosomes sont séparés aux pôles de la cellule. Ainsi, les microtubules s'assemblent en fuseaux mitotiques autour de ceux-ci, tandis que l'enveloppe nucléaire disparaît et que l'ADN se condense en chromosomes. Les fuseaux mitotiques relient les centrosomes aux kinétochores localisés au niveau des centromères des chromosomes pendant la prométaphase. Lors de la métaphase, les chromosomes sont alignés au centre de la cellule. Durant

[69] Arnal, I.; Sassoon, I.; Tournebize, R. *Med Sci (Paris)* **2002**, *18* (12), 1227–1235.
[70] Vineethakumari, C.; Lüders, J. *Front. Cell Dev. Biol.* **2022**, *10*, 867870.
[71] Tilney, L. G.; Bryan, J.; Bush, D. J.; Fujiwara, K.; Mooseker, M. S.; Murphy, D. B.; Snyder, D. H. *J. Cell Biol.* **1973**, *59* (2), 267–275.
[72] Akhmanova, A.; Steinmetz, M. O. *J. Cell Sci.* **2019**, *132* (11), jcs227850.
[73] Brouhard, G. J.; Rice, L. M. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2018**, *19* (7), 451–463.
[74] Cheeseman, I. M.; Desai, A. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9* (1), 33–46.

les deux dernières phases de la mitose (l'anaphase et la télophase), les chromosomes sont séparés aux 2 pôles de la cellule et 2 cellules filles naissent.[75]

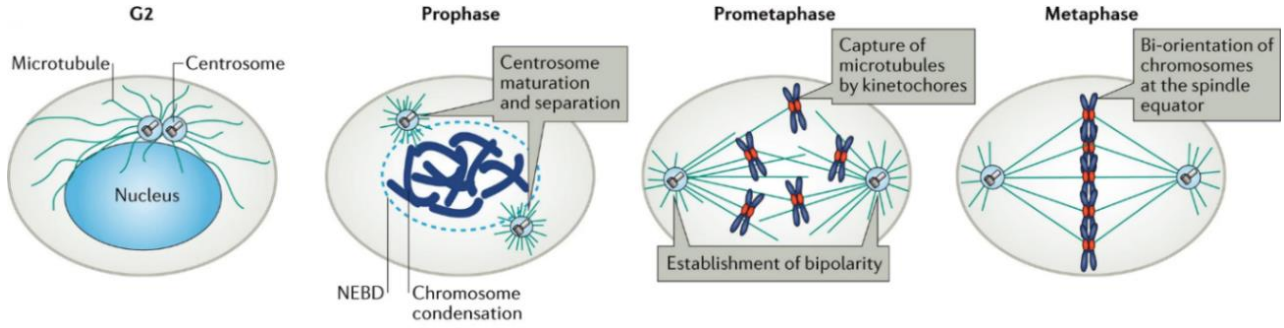


Figure 12 : Rôle des centrosomes et des microtubules, de la phase G2 à la métaphase du cycle cellulaire.[76]

Au regard du rôle important des microtubules dans la division cellulaire, de nombreux médicaments anticancéreux comme la vinblastine, la vincristine ou le paclitaxel (Taxol) ciblent ces filaments pour inhiber leur polymérisation ou pour bloquer leur dépolymérisation.[77,78] Dans chacun des deux cas, un arrêt du cycle cellulaire en pleine mitose et un ralentissement de la prolifération des cellules cancéreuses sont observés.

En plus de leur implication dans la division cellulaire, les microtubules contribuent à la motilité cellulaire. En synergie avec les filaments d'actine, les filaments du cytosquelette permettent aux cellules de se déplacer lors de la migration cellulaire en 4 étapes : la protrusion, l'adhésion, la translocation et enfin la rétraction.[79] Les filaments du cytosquelette vont créer des extensions membranaires appelées filopodes et lamellipodes dans la direction du déplacement pour adhérer à un point focal d'adhésion (Figure 13).[80] La contraction de la cellule est réalisée grâce aux fibres de stress du cytosquelette et caractérisée par la rétractation de la membrane arrière, ce qui permet à la cellule de se mouvoir.[81,82]

[75] Pilon, A.; Poüs, C. *Med Sci (Paris)* **2013**, *29* (2), 194–199.
[76] Prosser, S. L.; Pelletier, L. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2017**, *18* (3), 187–201.
[77] Wordeman, L.; Vicente, J. J. *Cancers* **2021**, *13* (22), 5650.
[78] Stanton, R. A.; Gernert, K. M.; Nettles, J. H.; Aneja, R. *Med. Res. Rev.* **2011**, *31* (3), 443–481.
[79] Merino-Casallo, F.; Gomez-Benito, M. J.; Hervas-Raluy, S.; Garcia-Aznar, J. M. *Cell Adhes. Migr.* **2022**, *16* (1), 25–64.
[80] Dogterom, M.; Koenderink, G. H. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2019**, *20* (1), 38–54.
[81] Seetharaman, S.; Etienne-Manneville, S. *Trends Cell Biol.* **2020**, *30* (9), 720–735.
[82] Schwartz, M. A.; Horwitz, A. R. *Cell* **2006**, *125* (7), 1223–1225.

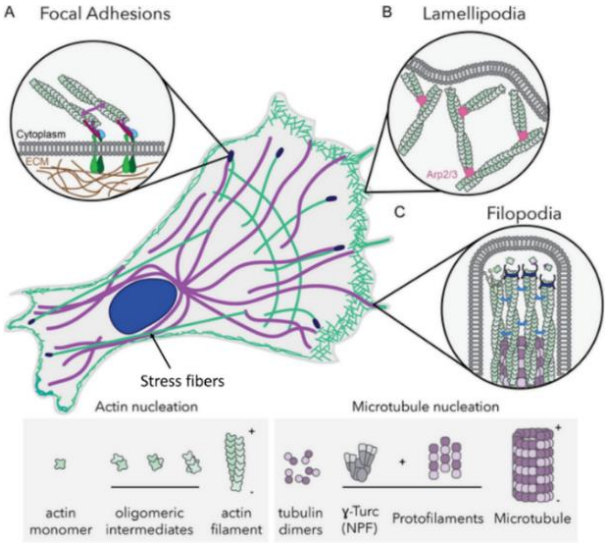


Figure 13 : Représentation des réseaux d'actine et de microtubule lors de la migration cellulaire.[83]

En 2002, l'équipe de Bokoch a montré que l'instabilité des microtubules et la formation de filaments d'actine étaient liées.[84] En effet, le désassemblage des microtubules libère un facteur d'échange nucléotidique GEF-H1, responsable de l'activation de la voie RhoA/ROCK/LIMK1 (Figure 8, page 22). La cofiline est alors inactivée par LIMK1, ce qui entraîne une polymérisation accrue des filaments d'actine en fibre de stress.[85] En 2005, une nouvelle équipe a mis en évidence une interaction de LIMK1 avec les microtubules *via* son domaine PDZ, menant à la déstabilisation de ces derniers. À l'inverse, la régulation négative de LIMK1 mène à une stabilisation des microtubules.[86] Plus tard, l'équipe de Kavallaris a démontré que l'inhibition de LIMK2 induit la formation de fuseaux mitotiques anormaux, rendant les cellules plus sensibles aux agents qui déstabilisent les microtubules tels que les alcaloïdes de Vinca ou la colchicine.[87] Toutefois, l'ensemble des mécanismes de régulation des microtubules par les LIMKs demeure mal compris.[88] Une bonne synergie entre des inhibiteurs des LIMKs et des agents affectant les microtubules a montré une avancée lorsque des lignées cancéreuses résistantes ont pu être traitées par ces molécules.[89]

III – Pathologies liées à la dérégulation des LIMKs

Comme évoqué précédemment, les LIMKs jouent un rôle majeur dans le dynamisme du cytosquelette et par conséquent, dans des processus biologiques essentiels comme la division ou la migration cellulaire. La dérégulation des LIMKs a été observée dans de nombreuses pathologies.

1. Le cancer

Les pathologies cancéreuses sont liées à une division anormale et non contrôlée des cellules menant à la formation de tumeurs, pouvant se répandre à d'autres organes ou tissus. Suite à des mutations d'origine

[83] Pimm, M. L.; Hotaling, J.; Henty-Ridilla, J. L. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **2020**, *355*, 155–204.
[84] Krendel, M.; Zenke, F. T.; Bokoch, G. M. *Nat. Cell Biol.* **2002**, *4* (4), 294–301.
[85] Ren, X.-D.; Kiosses, W. B.; Schwartz, M. A. *EMBO J.* **1999**, *18* (3), 578–585.
[86] Gorovoy, M.; Niu, J.; Bernard, O.; Profirovic, J.; Minshall, R.; Neamu, R.; Voyno-Yasenetskaya, T. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (28), 26533–26542.
[87] Po'uha, S. T.; Shum, M. S. Y.; Goebel, A.; Bernard, O.; Kavallaris, M. *Oncogene* **2010**, *29* (4), 597–607.
[88] Prunier, C.; Prudent, R.; Kapur, R.; Sadoul, K.; Lafanechère, L. *Oncotarget* **2017**, *8* (25), 41749–41763.
[89] Mardilovich, K.; Baugh, M.; Crighton, D.; Kowalczyk, D.; Gabrielsen, M.; Munro, J.; Croft, D. R.; Lourenco, F.; James, D.; Kalna, G.; McGarry, L.; Rath, O.; Shanks, E.; Garnett, M. J.; McDermott, U.; Brookfield, J.; Charles, M.; Hammonds, T.; Olson, M. F. *Oncotarget* **2015**, *6* (36), 38469–38486.

génétique ou des facteurs extérieurs, les cellules cancéreuses prolifèrent et peuvent migrer à travers les tissus afin de former des métastases. Il n'existe pas un cancer, mais des cancers qui diffèrent par leur localisation et le type de cellules touchées.[90] En conséquence, le traitement du cancer se réfère à l'ensemble des traitements des différents cancers avec des taux de survie dépendant de différents facteurs, dont la nature du cancer et de la progression (ou stade) du cancer, avec la présence ou non de métastases. La recherche de nouvelles cibles thérapeutiques est ainsi au cœur de la recherche contre le cancer, dans laquelle les LIMKs apparaissent comme des cibles prometteuses.[91,92]

La régulation des LIMKs permet d'avoir un impact sur deux processus biologiques essentiels au développement d'un cancer :

- Premièrement, elle permet de limiter la prolifération des cellules cancéreuses en déstabilisant les microtubules, indispensables pour la mitose et cibles de choix des anticancéreux sur le marché.[93]
- Deuxièmement, l'impact des LIMKs sur la dynamique des filaments d'actine rend la migration cellulaire et donc le développement de métastases plus difficile.[94,95]

La dérégulation des LIMKs a été mise en évidence dans divers cancers comme celui du sein ou de la prostate mais aussi dans certains types de leucémie.[96,97,98] Parmi eux, l'ostéosarcome et le glioblastome sont deux des cancers les plus agressifs pour lesquels la recherche de traitements s'avère complexe.[99,100]

a) L'ostéosarcome

L'ostéosarcome est le principal cancer de l'os représentant 20 % des tumeurs malignes osseuses et touche 1 personne sur 300 000 dans le monde. Celui-ci est principalement diagnostiqué chez les adolescents et les jeunes adultes ainsi que chez les personnes de plus de 60 ans.[101] L'os est un tissu qui se renouvelle en permanence par deux processus : la dégradation de ce dernier s'effectue par les ostéoclastes tandis que sa formation est réalisée par les ostéoblastes qui se transforment en ostéocytes (cellules quiescentes) (Figure 14). Dans le cas de l'ostéosarcome, les ostéoblastes prolifèrent de manière anarchique ce qui conduit à une tumeur agressive qui se développe et métastase principalement dans les poumons.[102]

---

[90] *Liste des types de cancers*. Ligue contre le cancer. https://www.ligue-cancer.net/article/26123_liste-des-types-de-cancers (accédé le 13/06/2023)
[91] Yoshioka, K.; Foletta, V.; Bernard, O.; Itoh, K. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100* (12), 7247–7252.
[92] Zhang, M.; Wang, R.; Tian, J.; Song, M.; Zhao, R.; Liu, K.; Zhu, F.; Shim, J.; Dong, Z.; Lee, M. *J. Cell. Mol. Med.* **2021**, *25* (12), 5560–5571.
[93] Jordan, M. A.; Wilson, L. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4* (4), 253–265.
[94] Izdebska, M.; Zielińska, W.; Grzanka, D.; Gagat, M. *BioMed Res. Int.* **2018**, *2018*, 1–13.
[95] Bagheri-Yarmand, R.; Mazumdar, A.; Sahin, A. A.; Kumar, R. *Int. J. Cancer* **2006**, *118* (11), 2703–2710.
[96] Davila, M.; Jhala, D.; Ghosh, D.; Grizzle, W. E.; Chakrabarti, R. *Mol. Cancer* **2007**, *6* (1), 40.
[97] Jensen, P.; Carlet, M.; Schlenk, R. F.; Weber, A.; Kress, J.; Brunner, I.; Słabicki, M.; Grill, G.; Weisemann, S.; Cheng, Y.-Y.; Jeremias, I.; Scholl, C.; Fröhling, S. *Leukemia* **2020**, *34* (12), 3173–3185.
[98] Villalonga, E.; Mosrin, C.; Normand, T.; Girardin, C.; Serrano, A.; Žunar, B.; Doudeau, M.; Godin, F.; Bénédetti, H.; Vallée, B. *Cells* **2023**, *12* (5), 805.
[99] Seigneurin, A.; Plouvier, S.; Désandes, E.; Amadéo, B.; Delfosse, P.; Lecoffre, C.; Lafay, L.; Mounier, M.; Coureau, G.; Trétarre, B. *Survie Des Personnes Atteintes de Cancer En France Métropolitaine 1989-2018 - Sarcome Des Os*; Institut National du Cancer, **2021**.
[100] Cowppli-Bony, A.; Delafosse, P.; Lacour, B.; Baldi, I.; Lecoffre, C.; Lafay, L.; Coureau; Trétarre, B.; Mounier, M. *Survie Des Personnes Atteintes de Cancer En France Métropolitaine 1989-2018 - Système Nerveux Central Glioblastomes*; Institut National du Cancer, **2020**.
[101] Zhao, X.; Wu, Q.; Gong, X.; Liu, J.; Ma, Y. *Biomed. Eng. OnLine* **2021**, *20* (1), 24.
[102]Albuquerque M. Silva, J.; Marchiori, E.; Carvalho De Macedo, F.; Ricardo Garcia Da Silva, P.; Brandão Amorim, V. *J. Bras. Pneumol.* **2022**, e20210478.

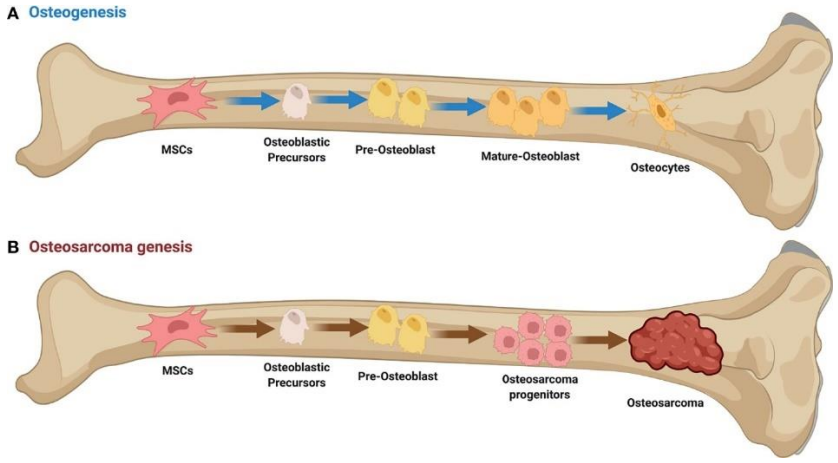


Figure 14 : Représentation de l'ostéogenèse et de la formation de l'ostéosarcome.[103]

Dans une récente revue publiée par l'équipe du Dr Verrechia, la surexpression des LIMKs permet une prolifération des cellules tumorales d'ostéosarcome ainsi que leur métastase.[104] En outre, l'inactivation des voies de signalisation RhoA/ROCK/LIMK2 ou Rac1/PAK1/LIMK1 a montré une diminution de la migration ainsi qu'une activité anti-métastatique sur ces cellules.[105,106]

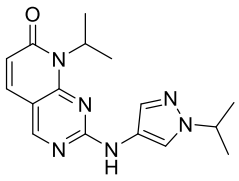
b) Le glioblastome

Le glioblastome est le plus fréquent et le plus agressif type de tumeur du système nerveux central chez l'adulte. Son taux d'incidence a presque triplé en 30 ans en France, passant de 823 cas en 1990 à 3481 cas en 2018.[107] À ce jour, seulement 20 % des patients atteints d'un glioblastome ont un taux de survie dépassant les 5 ans. La recherche d'un traitement est fortement ralentie par la présence de cellules souches neurales cancéreuses capable de s'auto-renouveler, de s'infiltrer rapidement dans les tissus adjacents et responsables de la rechute des patients traités contre ce cancer.[108,109]

Depuis 2014, plusieurs études ont montré que les LIMKs sont surexprimées dans les cellules cancéreuses de glioblastome et jouent un rôle dans leur invasion ainsi que dans la progression de la tumeur. L'inhibition des LIMKs et de la voie de la cofiline a par ailleurs permis de diminuer la viabilité de ces cellules cancéreuses sans effet cytotoxique pour les cellules saines périphériques.[110,111] En 2022, un inhibiteur dual **1** visant à la fois les LIMKs et les Aurora kinases (AURKs), associées aux fonctions du cycle cellulaire et du centrosome[112], a été décrit comme constituant une avancée dans le traitement du glioblastome (Figure 15). L'inhibition des deux familles de kinases par cet inhibiteur de type I a permis une diminution de la taille des tumeurs dans un organoïde de cerveau comportant des cellules souches de glioblastome.[113]

---

[103] Xie, D.; Wang, Z.; Li, J.; Guo, D.; Lu, A.; Liang, C. *Front. Oncol.* **2022**, *12*.
[104] Brion, R.; Regnier, L.; Mullard, M.; Amiaud, J.; Rédini, F.; Verrecchia, F. *Cells* **2021**, *10* (12), 3542.
[105] Zhang, M.; Chen, L.; Liu, Y.; Chen, M.; Zhang, S.; Kong, D. *Oncol. Rep.* **2020**, *44* (2), 469–476.
[106] Zheng, B.; Zhou, C.; Qu, G.; Ren, C.; Yan, P.; Guo, W.; Yue, B. *Front. Oncol.* **2020**, *10*, 543562.
[107] *PAIR tumeurs cérébrales - Les PAIR*. https://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-la-recherche/Recherche-translationnelle/Les-PAIR/PAIR-tumeurs-cerebrales (accédé le 22/06/2023).
[108] Maghe, C.; Jacobs, K. A.; Bidère, N.; Gavard, J. *Med Sci (Paris)* **2020**, *36* (5), 452–454.
[109] Rispoli, R.; Conti, C.; Celli, P.; Caroli, E.; Carletti, S. *Neuroradiol. J.* **2014**, *27* (2), 169–174.
[110] Park, J.-B.; Agnihotri, S.; Golbourn, B.; Bertrand, K. C.; Luck, A.; Sabha, N.; Smith, C. A.; Byron, S.; Zadeh, G.; Croul, S.; Berens, M.; Rutka, J. T. *Oncotarget* **2014**, *5* (19), 9382–9395.
[111] Chen, J.; Ananthanarayanan, B.; Springer, K. S.; Wolf, K. J.; Sheyman, S. M.; Tran, V. D.; Kumar, S. *Cancer Res.* **2020**, *80* (1), 69–78.
[112] Carmena, M.; Earnshaw, W. C. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2003**, *4* (11), 842–854.
[113] Rybin, M. J.; Laverde-Paz, M. J.; Suter, R. K.; Affer, M.; Ayad, N. G.; Feng, Y.; Zeier, Z. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2022**, *61* (2022), 128614.



1

IC_{50} (AURKA) = 72 nM

IC_{50} (LIMK1) = 137 nM

Figure 15 : Inhibiteur dual Aurora/LIMKs contre le glioblastome décrit par Rybin et al.

2. Les maladies neurologiques

Les LIMKs et en particulier LIMK1 ont un rôle déterminant dans la plasticité neuronale, mécanisme que possède le cerveau pour se réorganiser lors de l'apprentissage ou pour faire face à un trauma. Grâce à son rôle dans la régulation du cytosquelette d'actine, LIMK1 (membre des LIMKs la plus exprimée dans le cerveau) a une influence sur la morphologie des épines dendritiques des neurones et sur les fonctions synaptiques.[114,115,116] Au cours des dernières années, une dérégulation des LIMKs a été constatée dans plusieurs types de maladies neurologiques.

a) Maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est le trouble neurologique le plus fréquent chez l'adulte, touchant plus de 1,2 millions de personnes en France et dont la proportion atteint 1 personne sur 5 après 85 ans.[117,118] Elle représente 70 % des cas de démence et se place au 4ème rang des causes de décès en France avec 18 000 morts par an. Principalement diagnostiquée chez les personnes de plus de 65 ans, la maladie d'Alzheimer se caractérise par une perte de la mémoire ainsi que par une diminution des fonctions cognitives des malades. Elle est caractérisée par deux types de lésions cérébrales : la formation de plaques amyloïdes causée par le dépôt extracellulaire de protéines β-amyloïde et la formation de filaments anormaux causés par l'accumulation de la protéine tau hyperphosphorylée.[119,120]

Aucun traitement n'existe actuellement, mais la recherche de cibles biologiques contre la maladie d'Alzheimer a démontré qu'une concentration élevée en LIMK1 phosphorylée est présente dans les zones du cerveau affectées par la maladie.[121] En 2019, une étude *in vivo* sur un modèle murin d'Alzheimer a montré une restauration de la morphologie des épines dendritiques par l'inhibition de LIMK1, ce qui en fait une cible thérapeutique intéressante.[122] En 2012, l'utilisation de fasudil, inhibiteur des ROCKs, sur un modèle de rat a indiqué que l'inhibition de LIMK2 provoquait une amélioration de la structure synaptique.[123]

---

[114] Ben Zablah, Y.; Zhang, H.; Gugustea, R.; Jia, Z. *Cells* **2021**, *10* (8), 2079.

[115] Pröschel, C.; Blouin, M. J.; Gutowski, N. J.; Ludwig, R.; Noble, M. *Oncogene* **1995**, *11* (7), 1271–1281.

[116] Meng, Y.; Zhang, Y.; Tregoubov, V.; Janus, C.; Cruz, L.; Jackson, M.; Lu, W.-Y.; MacDonald, J. F.; Wang, J. Y.; Falls, D. L.; Jia, Z. *Neuron* **2002**, *35* (1), 121–133.

[117] *Maladies neurodégénératives*. https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/maladies-neurodegeneratives (accédé le 23/06/2023).

[118] *La maladie d'Alzheimer : qu'est-ce que c'est ?* Institut du Cerveau. https://institutducerveau-icm.org/fr/alzheimer/ (accédé le 23/06/2023).

[119] Ma, C.; Hong, F.; Yang, S. *Molecules* **2022**, *27* (4), 1210.

[120] Medeiros, R.; Baglietto-Vargas, D.; LaFerla, F. M. *CNS Neurosci. Ther.* **2011**, *17* (5), 514–524.

[121] Heredia, L.; Helguera, P.; De Olmos, S.; Kedikian, G.; Sola Vigo, F.; LaFerla, F.; Staufenbiel, M.; De Olmos, J.; Busciglio, J.; Caceres, A.; Lorenzo, A. *Neurosci.* **2006**, *26* (24), 6533–6542.

[122] Henderson, B. W.; Greathouse, K. M.; Ramdas, R.; Walker, C. K.; Rao, T. C.; Bach, S. V.; Curtis, K. A.; Day, J. J.; Mattheyses, A. L.; Herskowitz, J. H. *Sci. Signal.* **2019**, *12* (587), eaaw9318.

[123] Hou, Y.; Zhou, L.; Yang, Q. D.; Du, X. P.; Li, M.; Yuan, M.; Zhou, Z. W. *Neuroscience* **2012**, *200*, 120–129.

b) La maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson est la seconde maladie neurologique la plus fréquente après la maladie d'Alzheimer avec 25 000 nouveaux cas en France chaque année.[124] Touchant principalement les personnes de plus de 60 ans, elle se caractérise par des troubles du mouvement avec des tremblements, de la lenteur à initier un mouvement ainsi qu'une certaine rigidité musculaire et articulaire. La maladie de Parkinson est due à une perte progressive des neurones dopaminergiques impliqués dans le mouvement.[125] Les formes précoces de la maladie sont dues à la mutation du gène Parkin (PARK2) qui code pour la protéine Parkine qui est une E3 ubiquitine ligase. Son rôle est d'ubiquitinyler certaines protéines afin que ces dernières soient dégradées par le protéasome.[126] En 2007, une étude a montré l'existence d'un lien entre les LIMKs et la protéine Parkine dans des neurones dopaminergiques.[127] En effet, outre une interaction entre les LIMKs et la Parkine, l'ubiquitination de LIMK1 par cette E3 ubiquitine ligase provoque une diminution du taux de cofiline phosphorylée et ainsi, une augmentation de la forme globulaire de l'actine. Ainsi, la forme atrophiée des épines dendritiques et la perte des fonctions synaptiques de ces neurones pourraient être reliées à une modification du cytosquelette causée en partie par la dérégulation de LIMK1.[128,129]

c) Autres maladies neurologiques

Au cours des deux dernières décennies, de nouveaux liens ont été trouvés entre la famille des LIMKs et diverses maladies neurologiques telles que la schizophrénie, le syndrôme de Williams-Beuren, la sclérose latérale amyotrophique (maladie de Charcot) ou encore les troubles du spectre de l'autisme.[130,131,132,133] Ainsi, la découverte de molécules capables de réguler les LIMKs, et de passer la barrière hémato-encéphalique (BHE), serait une avancée majeure dans le traitement de ces maladies neurologiques.

3. La neurofibromatose de type 1 (NF1)

La neurofibromatose de type 1 (NF1) ou maladie de Von Recklinghausen, est une maladie génétique dominante qui touche 1 personne sur 3000 dans le monde. Les malades peuvent présenter plusieurs des signes cliniques suivants :

- Des tâches café au lait sur la peau.
- Des neurofibromes cutanés ou plexiformes, qui sont des tumeurs bénignes formées à la base des nerfs périphériques.
- Des nodules de Lisch, petites tumeurs pigmentées de l'iris.
- Un gliome du nerf optique.
- Des troubles de l'apprentissage et cognitifs, notamment chez l'enfant.

---

[124] *Maladie de Parkinson : 2 fois plus de cas en 25 ans*. https://www.santepubliquefrance.fr/liste-des-actualites/maladie-de-parkinson-2-fois-plus-de-cas-en-25-ans (accédé le 24/06/2023).
[125] Aarsland, D.; Batzu, L.; Halliday, G. M.; Geurtsen, G. J.; Ballard, C.; Ray Chaudhuri, K.; Weintraub, D. *Nat. Rev. Dis. Primer* **2021**, *7* (1), 47.
[126] Dawson, T. M.; Dawson, V. L. *Mov. Disord.* **2010**, *25* (S1), S32–S39.
[127] Lim, M. K.; Kawamura, T.; Ohsawa, Y.; Ohtsubo, M.; Asakawa, S.; Takayanagi, A.; Shimizu, N. *Exp. Cell Res.* **2007**, *313* (13), 2858–2874.
[128] Hotulainen, P.; Hoogenraad, C. C. *J. Cell Biol.* **2010**, *189* (4), 619–629.
[129] Huynh, D. P.; Scoles, D. R.; Ho, T. H.; Del Bigio, M. R.; Pulst, S. M. *Ann. Neurol.* **2000**, *48* (5), 737–744.
[130] Datta, D.; Arion, D.; Corradi, J. P.; Lewis, D. A. *Biol. Psychiatry* **2015**, *78* (11), 775–785.
[131] Kozel, B. A.; Barak, B.; Kim, C. A.; Mervis, C. B.; Osborne, L. R.; Porter, M.; Pober, B. R. *Nat. Rev. Dis. Primer* **2021**, *7* (1), 42.
[132] Conti, A.; Riva, N.; Pesca, M.; Iannaccone, S.; Cannistraci, C. V.; Corbo, M.; Previtali, S. C.; Quattrini, A.; Alessio, M. *Biochim. Biophys. Acta.* **2014**, *1842* (1), 99–106.
[133] Yao, F.; Zhang, K.; Feng, C.; Gao, Y.; Shen, L.; Liu, X.; Ni, J. *Front. Psychiatry* **2021**, *12*, 554621.

- Des fortes chances de développer des cancers des tissus nerveux périphériques (MPNST).[134,135,136]

La neurofibromatose de type 1 est due à la mutation du gène suppresseur de tumeur *NF1*, situé sur le chromosome 17 et qui code pour la neurofibromine (ou Nf1). Cette protéine est principalement connue en tant que protéine activatrice des GTPases Ras, c'est une Ras GAP pour *Ras GTPase Activating Protein*. La protéine Nf1 interagit avec la forme active de Ras, Ras-GTP via son domaine GRD (*GAP Related Domain*), et déclenche l'activité GTPase intrinsèque de Ras (Figure 16). Ceci a pour effet de convertir la protéine Ras-GTP en sa forme inactive, Ras-GDP, ce qui contribue à réguler négativement la voie de signalisation cellulaire afférente à Ras, qui est impliquée dans la prolifération cellulaire.[137] Ainsi, les mutations du gène *NF1* associées à la maladie conduisent à une hyperactivité de la voie Ras et conduisent à la formation de cellules tumorales.[138]

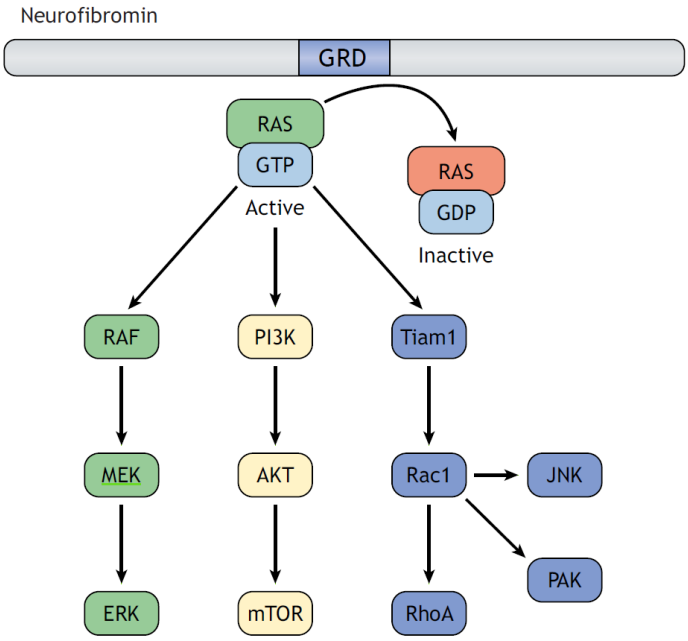


Figure 16 : Inactivation de la protéine Ras par le domaine GRD de la neurofibromine.[139]

Le rôle de Nf1 dans l'organisation du cytosquelette d'actine a tout d'abord été mis en évidence par Ozawa *et al.*[140] qui ont montré l'implication de Nf1 dans la régulation de la motilité cellulaire via la dynamique des filaments d'actine en lien avec la voie de signalisation Rho/ROCK/LIMK2/cofiline. Ensuite, l'équipe du Pr Kloog en 2009 a montré qu'un domaine pré-GAP situé dans le domaine *N*-terminal de la neurofibromine régule négativement la voie Rac1/Pak1/LIMK1 et favorise ainsi la forme dépolymérisée de l'actine (Figure 17).[141] Une autre étude a montré que la protéine Nf1 régulait négativement la voie RhoA/ROCK/LIMK2 et que

[134] Peduto, C.; Zanobio, M.; Nigro, V.; Perrotta, S.; Piluso, G.; Santoro, C. *Cancers* **2023**, *15* (4), 1217.
[135] Shilyansky, C.; Lee, Y. S.; Silva, A. J. *Annu. Rev. Neurosci.* **2010**, *33* (1), 221–243.
[136] Reilly, K. M.; Kim, A.; Blakely, J.; Ferner, R. E.; Gutmann, D. H.; Legius, E.; Miettinen, M. M.; Randall, R. L.; Ratner, N.; Jumbé, N. L.; Bakker, A.; Viskochil, D.; Widemann, B. C.; Stewart, D. R. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **2017**, *109* (8).
[137] Xu, G.; Lin, B.; Tanaka, K.; Dunn, D.; Wood, D.; Gesteland, R.; White, R.; Weiss, R.; Tamanoi, F. *Cell* **1990**, *63* (4), 835–841.
[138] Wolkenstein, P. *Med Sci (Paris)* **2001**, *17* (11), 1158–1167.
[139] Anastasaki, C.; Orozco, P.; Gutmann, D. H. *Dis. Model. Mech.* **2022**, *15* (2), dmm049362.
[140] Ozawa, T.; Araki, N.; Yunoue, S.; Tokuo, H.; Feng, L.; Patrakitkomjorn, S.; Hara, T.; Ichikawa, Y.; Matsumoto, K.; Fuji, K.; Saya, H. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (47), 39524–39533.
[141] Starinsky-Elbaz, S.; Faigenbloom, L.; Friedman, E.; Stein, R.; Kloog, Y. *Mol. Cell. Neurosci.* **2009**, *42* (4), 278–287.

le mécanisme moléculaire à l'origine de cette régulation impliquait une interaction entre le domaine SecPH de Nf1 et LIMK2 empêchant cette dernière d'être activée par ROCK.[140,142]

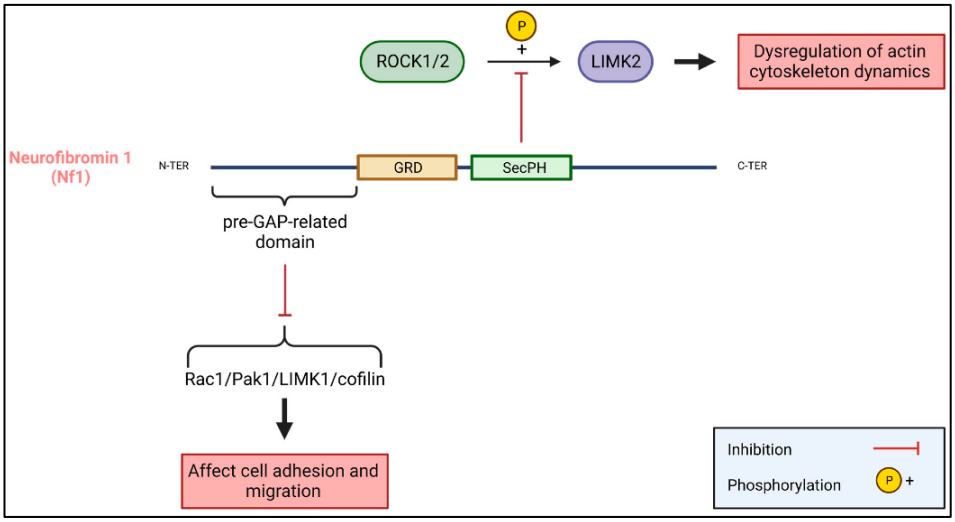


Figure 17 : Régulation des LIMKs par la neurofibromine.[98]

Ainsi, dans le cas de la NF1, la protéine Nf1 ne peut plus inactiver les voies Rac1/PaK1/LIMK1 et RhoA/ROCK/LIMK2. Il en résulte une phosphorylation accrue de la cofiline et une inhibition de la dépolymérisation de l'actine. À ce jour, un seul traitement concernant certaines manifestations graves de la NF1 chez les enfants (neurofibromes plexiformes inopérables) a été approuvé par la FDA. Il consiste en l'inhibition de la voie Ras/MAPK par le selumetinib, un inhibiteur des kinases MEK.[143] Cependant, seuls 60 % des patients traités répondent au traitement et ce dernier engendre d'importants effets secondaires. La recherche d'autres thérapies ciblées est donc nécessaire contre cette maladie et l'utilisation d'inhibiteurs des LIMKs est une piste intéressante pour le traitement de la NF1.[144]

IV – Les inhibiteurs des LIMKs

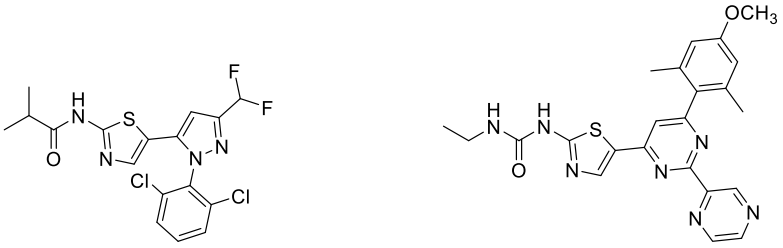
1. Inhibiteurs de la littérature

Le rôle important des LIMKs dans la dynamique du cytosquelette d'actine et des microtubules, ainsi que l'impact de leur dérégulation dans diverses pathologies, ont suscité la mise au point d'inhibiteurs dirigés contre ces cibles. Depuis 2006, de nombreux inhibiteurs des LIMKs ont été conçus et évalués *in vitro*. Le Pr Manetti a référencé l'ensemble de ces données dans deux revues.[145,146] Bien qu'une multitude de familles chimiques y soient décrites, peu d'entre elles ont réussi à passer au stade d'essai préclinique. Notre équipe a publié en 2022 une revue recensant les inhibiteurs des LIMKs qui ont atteint la phase d'essais précliniques pour diverses pathologies.[147] Dans ce manuscrit, nous reviendrons sur certaines familles d'inhibiteurs évoquées précédemment dans cette revue.

[142] Vallée, B.; Doudeau, M.; Godin, F.; Gombault, A.; Tchalikian, A.; De Tauzia, M.-L.; Bénédetti, H. *PLoS ONE* **2012**, *7* (10), e47283.
[143] Gross, A. M.; Dombi, E.; Widemann, B. C. *Childs Nerv. Syst.* **2020**, *36* (10), 2443–2452.
[144] Rak, R.; Kloog, Y. *Cell Cycle* **2014**, *13* (9), 1360–1361.
[145] Manetti, F. *Med. Res. Rev.* **2012**, *32* (5), 968–998.
[146] Manetti, F. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *155* (2018), 445–458.
[147] Berabez, R.; Routier, S.; Bénédetti, H.; Plé, K.; Vallée, B. *Cells* **2022**, *11* (13), 2090.

a) Les inhibiteurs de type aminothiazole (BMS)

En 2006 et 2008, la société Bristol-Myers-Squibb (BMS) a breveté et publié plus de 300 molécules inhibitrices des LIMKs et de p38, basées sur un squelette de type aminothiazole.[148,149] Parmi ces premiers inhibiteurs des LIMKs, seuls certains comme **LIMKi3/BMS5** et **LIMKi4/BMS4** sont sélectifs des LIMKs et sans effet cytotoxique (Figure 18). Les auteurs ont par ailleurs montré que l'utilisation de ces inhibiteurs induisait un arrêt de la mitose des cellules ainsi qu'une stabilisation des microtubules. En 2012, une étude des relations structure-activité a été réalisée afin d'améliorer la sélectivité de ces composés vis-à-vis d'autres kinases. L'inhibition des LIMKs a notamment permis d'observer une diminution du taux d'actine polymérisée.[150]



LIMKi3/BMS5

IC_{50} (LIMK1) = 7 nM
IC_{50} (LIMK2) = 8 nM

LIMKi4/BMS4

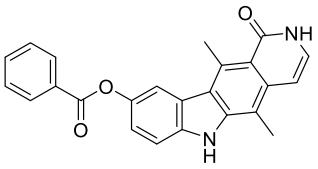
IC_{50} (LIMK1) = 22 nM
IC_{50} (LIMK2) = 14 nM

Figure 18 : Inhibiteurs de type aminothiazole, décrits par BMS.

b) L'inhibiteur **Pyr1**

En 2012, l'équipe du Dr Lafanechère a réalisé un criblage cellulaire dans le but de trouver de petites molécules pouvant réguler la dynamique des microtubules à des fins anticancéreuses. Le composé **Pyr1**, synthétisé pour la 1ère fois en 1983[151], fut sélectionné pour son activité antitumorale, ralentissant la croissance des tumeurs par son effet sur la dynamique des microtubules et des filaments d'actine.[152] D'après cette étude, **Pyr1** (Figure 19) n'interagit pas avec les microtubules, son effet sur ces derniers provient de l'inhibition des LIMKs. Par ailleurs, un test sur un panel de 110 kinases a montré une très bonne sélectivité de **Pyr1** pour les LIMKs. La même équipe a démontré récemment, grâce à l'utilisation de ce composé, une restauration de la plasticité synaptique dans un modèle murin (MAP6 KO) de schizophrénie.[153]

[148] Wrobelski S.T.; Lin, S.; Leftheris, K.; He, L.; Seitz, S. P.; Lin, T.-A.; Vaccaro, W. WO2006084017, **2006**.
[149] Ross-Macdonald, P.; de Silva, H.; Guo, Q.; Xiao, H.; Hung, C.-Y.; Penhallow, B.; Markwalder, J.; He, L.; Attar, R. M.; Lin, T.; Seitz, S.; Tilford, C.; Wardwell-Swanson, J.; Jackson, D. *Mol. Cancer Ther.* **2008**, *7* (11), 3490–3498.
[150] He, L.; Seitz, S. P.; Trainor, G. L.; Tortolani, D.; Vaccaro, W.; Poss, M.; Tarby, C. M.; Tokarski, J. S.; Penhallow, B.; Hung, C.-Y.; Attar, R.; Lin, T.-A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22* (18), 5995–5998.
[151] Rivalle, C.; Wendling, F.; Tambourin, P.; Lhoste, J.-M.; Bisagni, E.; Chermann, J.-C. *J. Med. Chem.* **1983**, *26* (2), 181–185.
[152] Prudent, R.; Vassal-Stermann, E.; Nguyen, C.-H.; Pillet, C.; Martinez, A.; Prunier, C.; Barette, C.; Soleilhac, E.; Filhol, O.; Beghin, A.; Valdameri, G.; Honoré, S.; Aci-Sèche, S.; Grierson, D.; Antonipillai, J.; Li, R.; Di Pietro, A.; Dumontet, C.; Braguer, D.; Florent, J.-C.; Knapp, S.; Bernard, O.; Lafanechère, L. *Cancer Res.* **2012**, *72* (17), 4429–4439.
[153] Gory-Fauré, S.; Powell, R.; Jonckheere, J.; Lanté, F.; Denarier, E.; Peris, L.; Nguyen, C. H.; Buisson, A.; Lafanechère, L.; Andrieux, A. *Front. Pharmacol.* **2021**, *12*, 1–11.



Pyr1

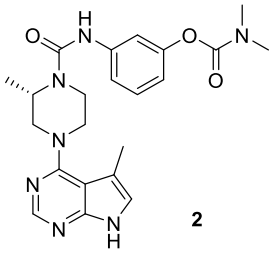
IC_{50} (LIMK1) = 50 nM

IC_{50} (LIMK2) = 70 nM

*Figure 19 : Inhibiteur des LIMKs de type I : **Pyr1**.*

c) Les inhibiteurs de type pyrrolopyrimidine

L'une des familles les plus documentées d'inhibiteurs des LIMKs est basée sur un squelette pyrrolopyrimidine. En 2009, Lexicon Pharmaceuticals a développé une série d'inhibiteurs des LIMKs et des ROCKs pour le traitement du glaucome, maladie optique liée à une hypertension oculaire.[154] Les molécules les plus actives sur ces kinases ont été testées pour leur inhibition de la phosphorylation de la cofiline, ce qui a permis de conduire aux composés comme le **2** (Figure 20). Leur structure chimique est la suivante : la base hétérocyclique pyrrolopyrimidine est substituée en position *C*-4 par la (*S*)-2-méthylpipérazine, une fonction urée relie une aniline substituée en position méta à la pipérazine. La faible solubilité de **2** ainsi que son instabilité chimique dans son milieu de formulation ont conduit Lexicon Pharmaceuticals à modifier la structure de leurs composés. En 2015, **LX7101** est décrit comme leur composé phare : l'urée est remplacée par un amide plus stable métaboliquement ; la solubilité est améliorée par la présence d'une amine primaire en alpha du carbonyle.[155] Cependant la sélectivité vis-à-vis des ROCKS a fortement diminué avec des IC_{50} de 69 nM et 32 nM sur ROCK1 et ROCK2 respectivement.



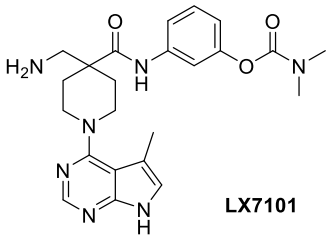
2

IC_{50} (LIMK1) = 3,2 nM

IC_{50} (LIMK2) = 1,2 nM

IC_{50} (ROCK1) = 490 nM

IC_{50} (ROCK2) = 1100 nM



LX7101

IC_{50} (LIMK1) = 32 nM

IC_{50} (LIMK2) = 4,3 nM

IC_{50} (ROCK1) = 69 nM

IC_{50} (ROCK2) = 32 nM

Figure 20 : Inhibiteurs de type pyrrolopyrimidine décrits par Lexicon Pharmaceuticals.

Les activités de **LX7101** à la fois sur les LIMKs et sur les ROCKs ainsi que la baisse de la pression intraoculaire induite sur des modèles murins de glaucome ont permis à ce composé d'atteindre la phase 1/2a des essais cliniques [ClinicalTrials.gov (accédé le 06/07/2023) identifiant NCT01528111] dans cette indication dès 2012. Cependant, l'étude s'arrêta la même année pour des raisons non communiquées. Le manque de sélectivité de **LX7101** vis-à-vis d'autres kinases telles que les ROCKs pourrait en être l'une des raisons. De

[154] Harrison, B. A.; Whitlock, N. A.; Voronkov, M. V.; Almstead, Z. Y.; Gu, K.; Mabon, R.; Gardyan, M.; Hamman, B. D.; Allen, J.; Gopinathan, S.; McKnight, B.; Crist, M.; Zhang, Y.; Liu, Y.; Courtney, L. F.; Key, B.; Zhou, J.; Patel, N.; Yates, P. W.; Liu, Q.; Wilson, A. G. E.; Kimball, S. D.; Crosson, C. E.; Rice, D. S.; Rawlins, D. B. *J. Med. Chem.* **2009**, *52* (21), 6515–6518.

[155] Harrison, B. A.; Almstead, Z. Y.; Burgoon, H.; Gardyan, M.; Goodwin, N. C.; Healy, J.; Liu, Y.; Mabon, R.; Marinelli, B.; Samala, L.; Zhang, Y.; Stouch, T. R.; Whitlock, N. A.; Gopinathan, S.; McKnight, B.; Wang, S.; Patel, N.; Wilson, A. G. E.; Hamman, B. D.; Rice, D. S.; Rawlins, D. B. *ACS Med. Chem. Lett.* **2015**, *6* (1), 84–88.

surcroît, une équipe d'Amakem Therapeutics démontra que les effets de **LX7101** sur la pression intraoculaire provenaient en grande partie de l'inhibition non sélective des ROCKs. Des relations structure-activités ont été réalisées à partir de la structure du **LX7101** par ce groupe pharmaceutique en 2015 et 2016, afin d'améliorer la sélectivité des inhibiteurs des LIMKs.[156,157] La substitution de la base pyrrolopyrimidine en position *C*-6 par un méthyl (**3**) ou la présence d'un cyclohexane fusionné au départ des postions *C*-5 et *C*-6 (**4**) ont amélioré grandement leur sélectivité par rapport aux ROCKs, tout en gardant de très bonnes activités sur les LIMKs (Figure 21).

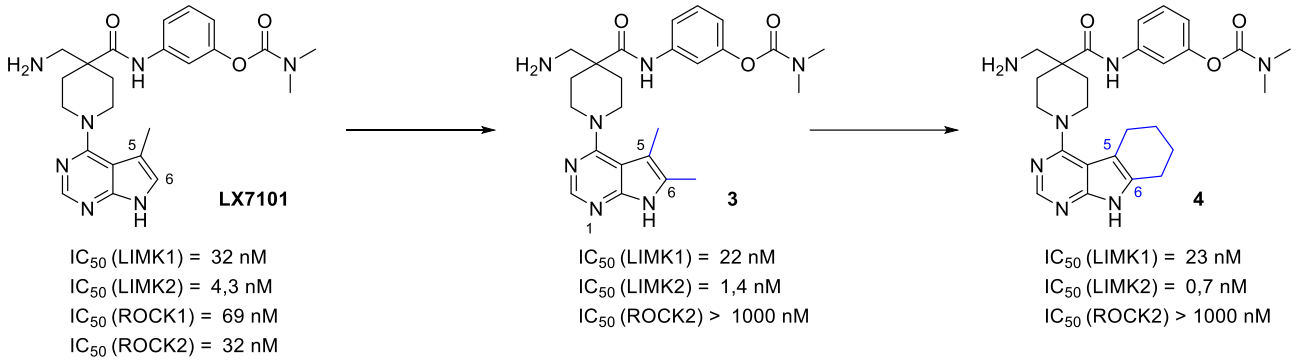


Figure 21 : Inhibiteurs sélectifs des LIMKs décrits par Amakem Therapeutics.

2. Travaux précédents de l'équipe

La recherche d'inhibiteurs puissants et sélectifs des LIMKs par notre équipe a commencé dès 2014, avec la thèse du Dr Champiré.[158] En s'inspirant des composés de type pyrrolopyrimidine et notamment du **2** décrit par Lexicon Pharmaceuticals, une librairie de 134 composés a été préparée entre 2014 et 2020. Pour cela, des RSA ont été réalisées sur 3 sites de pharmacomodulations de la molécule **2** : la base hétérocyclique (en vert), le cycle central (en orange) et la partie aniline de l'urée (en bleu) (Figure 22). L'innovation apportée par ces nouvelles séries de molécules provient du remplacement de la (*S*)-2-méthylpipérazine par un bioisostère : la 1,2,3,6-tétrahydropyridine. En gardant une géométrie et une richesse en électrons similaire à la pipérazine, ce nouveau cycle central a permis de déposer un brevet d'une série d'inhibiteurs originaux des LIMKs.[159]

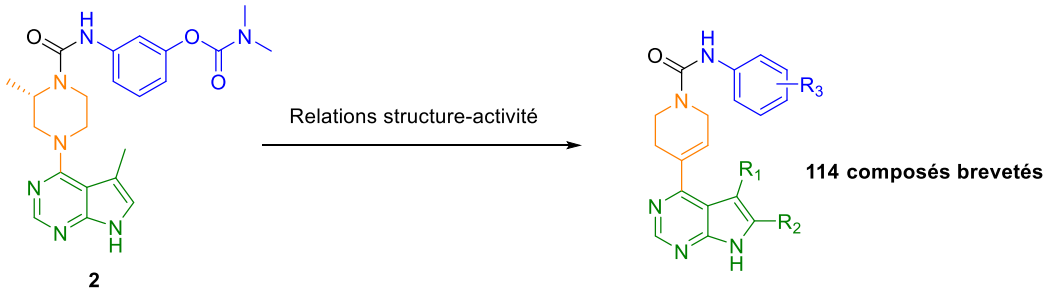
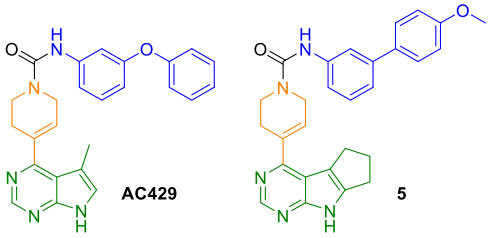


Figure 22 : Structures des inhibiteurs des LIMKs développés et brevetés.

[156] Boland, S.; Bourin, A.; Alen, J.; Geraets, J.; Schroeders, P.; Castermans, K.; Kindt, N.; Boumans, N.; Panitti, L.; Vanormelingen, J.; Fransen, S.; Van de Velde, S.; Defert, O. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25* (18), 4005–4010.
[157] Alen, J.; Bourin, A.; Boland, S.; Geraets, J.; Schroeders, P.; Defert, O. *MedChemComm* **2016**, *7* (3), 478–483.
[158] Thèse du Dr Anthony Champiré soutenue le 30 novembre 2018
[159] Routier, S., Benedetti, H., Vallee-Meheust, B., Bonnet, P., Ple, K., Aci-Seche, S., Ruchaud, S., Braka, A., Champire, A., Andres, C., Vourc'h, P. WO2021239727, **2021**.

Une sélection des meilleurs composés a été réalisée selon différents critères : les constantes d'inhibition des molécules pour les LIMKs, leur sélectivité vis-à-vis des ROCKs, l'évaluation de leur cytotoxicité, l'inhibition de la phosphorylation de la cofiline sur cellules HeLa et enfin leur capacité à affecter la migration cellulaire (test de *wound healing*) sur cellules U2OS. Dans le cadre d'un projet sur le glioblastome, 4 composés (**AC429**, **5**, **6**, **7**) ont été sélectionnés pour évaluer le passage de la BHE dans un modèle de souris Swiss (CD-1) (Tableau 1). **AC429** a également été sélectionné pour des essais précliniques sur un modèle murin d'ostéosarcome en collaboration avec l'équipe du Dr Verrecchia de l'Université de Nantes.

Tableau 1 : Inhibiteurs des LIMKs sélectionnés en 2020 pour des tests in vivo.



Ki (LIMK1)	19 nM	3 nM	22 nM	5 nM
Ki (LIMK2)	14 nM	22 nM	5 nM	41 nM
Inhib ROCK1 (1 µM)	44 %	6 %	19 %	3 %
Inhib ROCK2 (1 µM)	24 %	11 %	12 %	9 %
Inhib phospho cofiline (25 µM, HeLa)	92 %	86 %	96 %	79 %
Ratio cerveau/plasma (3 h)	0,13	0,23	0,20	0,38

D'après les résultats cellulaires, **AC429** présentait les meilleurs résultats avec une inhibition de la phosphorylation de la cofiline de 92 % à 25 µM sur cellules HeLa ainsi que d'une excellente sélectivité puisque sur un panel de 100 kinases, seulement 4 étaient inhibées à 80 % à une concentration de 1 µM. Comparée à **LX7101**, **AC429** a eu un effet plus prononcé sur l'arrêt de la migration cellulaire en 24 h sur des cellules U2OS (lignée d'ostéosarcome), il a présenté aussi une très bonne dose réponse de l'inhibition de la phosphorylation de la cofiline sur la lignée cellulaire d'ostéosarcome KHOS avec plus de 80 % d'inhibition dès 2,5 µM. Des perturbations de la dynamique de cytosquelette ont aussi été observées dans ces conditions par immunofluorescence (Figure 23). De plus, **AC429** a eu un effet sur la stabilisation des microtubules plus important que **LX7101**, par ailleurs, il a favorisé la forme acétylée de la tubuline (forme présente dans les microtubules). Une analyse cellulaire a montré un blocage des cellules dans la phase G2/M du cycle ainsi que l'induction de l'apoptose par **AC429**.

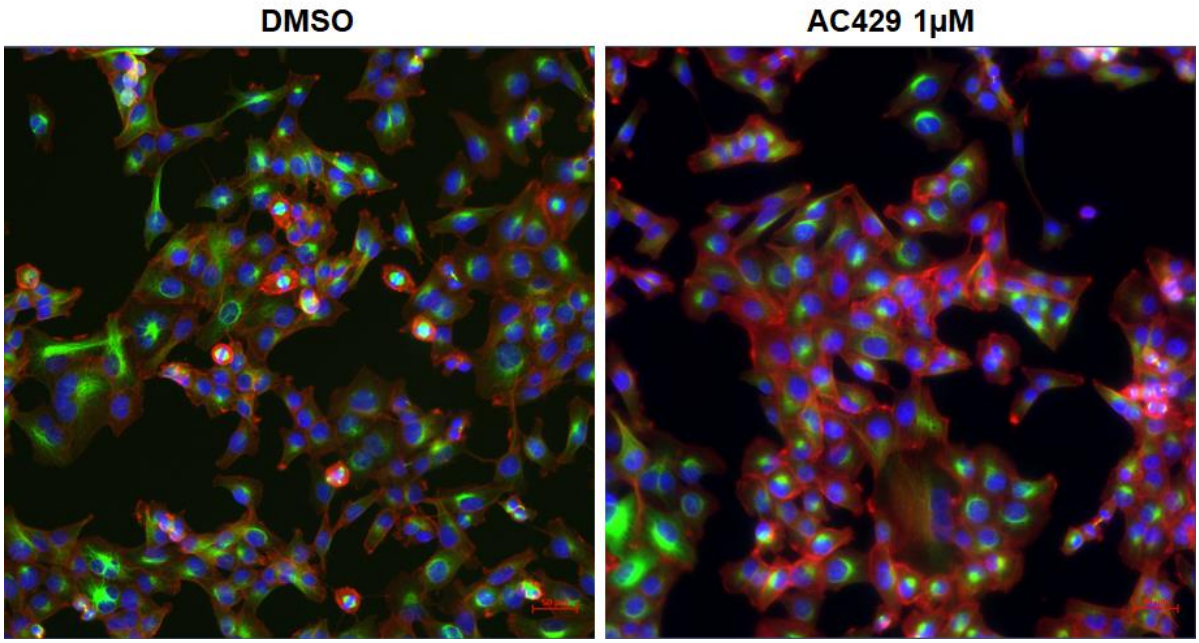


*Figure 23 : Clichés de microscopie confocale en fluorescence montrant l'état du cytosquelette après traitement des cellules KHOS avec **AC429** à 1 µM pendant 24 h. Les filaments d'actine sont marqués par la phalloïdine en rouge, les microtubules sont marqués par un anticorps anti-acétyl-tubuline en vert. Les noyaux sont marqués au DAPI (bleu).*

En collaboration avec l'équipe du Dr Verrecchia du CRCI²NA (Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie Nantes Angers), ce composé a été testé sur un modèle murin de xénogreffe de cellules d'ostéosarcome (KHOS) au début de ma thèse, après avoir réalisé sa resynthèse à l'échelle du gramme. Deux essais indépendants avec à chaque fois un lot de souris contrôle ont été réalisés. Après 40 jours de traitement à une dose quotidienne de 15 mg/kg, le volume des tumeurs a été réduit de 40 à 45 % sans aucun signe de toxicité pour les souris (Figure 24). Au 39ème jour, l'effet semble maintenu tandis qu'une relance semblerait s'opérer avec le **LX7101**. L'impact sur le nombre de métastases n'a pas été reproductible : lors du premier essai, une diminution du nombre de métastases au niveau des poumons a été observée, mais ces résultats n'ont pas pu être confirmés lors du second essai.

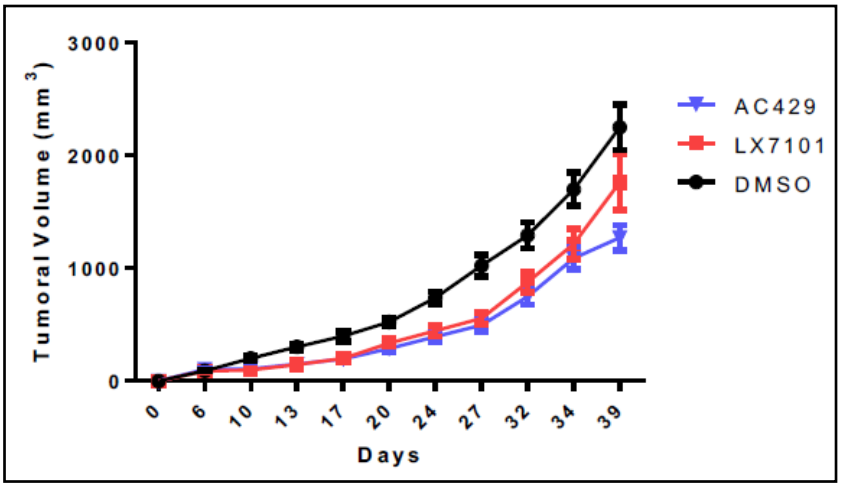


Figure 24 : Évolution de la taille des tumeurs d'ostéosarcome en fonction du temps de traitement.

V – Objectifs du projet

Le but de cette thèse est de poursuivre les travaux initiés en 2015 vers la conception d'inhibiteurs des LIMKs très actifs et sélectifs afin de sélectionner les meilleurs composés pour des tests précliniques sur un modèle murin présentant les manifestations de la NF1. Ce projet de chimie médicinale, financé par le programme ANR PRC CliNeF1, est une collaboration entre trois partenaires : l'ICOA (Institut de Chimie Organique et Analytique), le CBM (Centre de Biophysique Moléculaire) et l'IRBM (Institut Mondor de Recherche Biomédicale). Les molécules ont été synthétisées par notre équipe de synthèse dirigée par le Dr Plé et le Pr Routier, et appuyée par l'équipe de modélisation moléculaire SB&C (Bioinformatique Structurale et Chémoinformatique) de l'ICOA dirigée par le Pr Bonnet et le Dr Aci-Sèche. L'évaluation cellulaire des molécules a ensuite été réalisée par une équipe de biologistes du CBM à Orléans, coordonnée par le Dr Vallée et le Dr Bénédetti. Après une sélection des meilleurs composés, les essais *in vivo* sur un nouveau modèle murin de NF1 ont été effectués par le groupe du Pr Topilko et du Dr Fanny Coulpier de l'IRBM à Créteil.

Le premier chapitre de cette thèse décrira les relations structure-activité établies à partir du meilleur inhibiteur des LIMKs précédemment obtenu : le **AC429**. Afin d'améliorer les activités pour les LIMKs ainsi que les propriétés physico-chimiques, les trois sites de pharmacomodulations seront travaillés successivement (Figure 25). Les constantes d'inhibition pour les LIMKs ainsi que leur sélectivité vis-à-vis des ROCKs seront évaluées pour chaque nouveau composé. Une première sélection sera alors effectuée pour poursuivre avec les tests cellulaires.

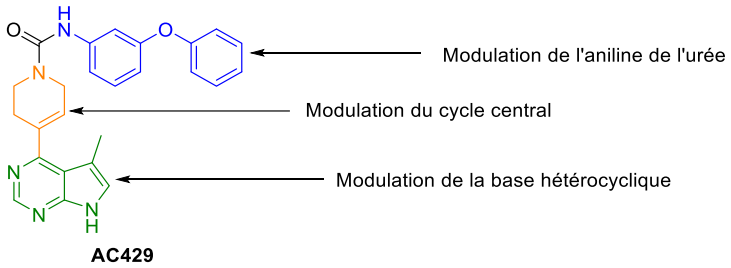


Figure 25 : Sites de pharmacomodulations travaillés au chapitre 1.

Le second chapitre portera sur l'évaluation cellulaire des meilleurs composés sélectionnés au chapitre 1. Les mesures d'inhibition de la phosphorylation de la cofiline, de cytotoxicité et de migration cellulaire mèneront à une sélection plus fine de composés. Une évaluation ADME-tox et des essais sur un modèle murin original KO conditionnel du gène *NF1* dans les cellules des capsules frontières, mis au point par l'équipe du Pr Topilko, seront présentés par la suite.

Le troisième et dernier chapitre portera sur de nouvelles méthodes d'inhibition des LIMKs. Aiguillés par les données de cristallisation de nos composés dans les sites actifs des LIMKs obtenues en milieu de thèse, nous présenterons la synthèse et les résultats biologiques d'un inhibiteur de type VI, dit inhibiteur suicide. En complément de cette nouvelle voie d'inhibition des LIMKs, la synthèse de proteolysis-targeting chimeras (PROTACs) originaux ciblant les LIMKs sera décrite en vue d'induire une dégradation sélective des kinases visées.

Chapitre 1

Conception et Synthèse d'inhibiteurs des LIMKs :

De l'exploration chimique « hit to lead » à la phase d'optimisation « lead optimisation »

I – Introduction

Afin de nous intéresser à l'exploration et à l'amélioration des propriétés physico-chimiques de nos inhibiteurs des LIMKs, il est nécessaire de définir au mieux les sites de modulations. Ainsi, trois sites de pharmacomodulations ont été préalablement mis en évidence dans la thèse du Dr Champiré sur les inhibiteurs de type pyrrolopyrimidine (Figure 26). En prenant l'exemple du composé phare **AC429**, nous pouvons discriminer : la partie aniline (en bleu), la partie cycle centrale (en orange) et la partie hétérocyclique (en vert).

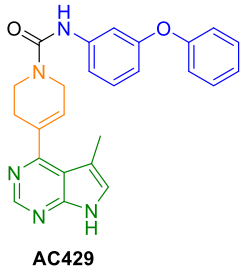


Figure 26 : Sites de pharmacomodulations étudiés sur AC429.

Les travaux antérieurs de l'équipe ont démontré que ces trois zones de la molécule représentent des motifs sur lesquels des études de relations structure-activité (RSA) peuvent être menées. Dans ce chapitre, des études de RSA à partir de **AC429** seront présentées après modulations fines réalisées sur chaque partie de la molécule, jusqu'à l'obtention de composés plus actifs sur les LIMKs et plus sélectifs vis-à-vis d'autres kinases comme les ROCKs.

1. Voies de synthèse des plateformes hétérocycliques

L'obtention des bases hétérocycliques pyrrolopyrimidines substituées en position *C*-4 par une tétrahydropyridine est l'une des étapes clés dans la synthèse de nouveaux inhibiteurs. Pour atteindre cette modification, deux voies de synthèse similaires ont été développées et employées en fonction de la présence d'un méthyle en position *C*-5 ou d'un cyclopentane fusionné en positions [5,6] de la pyrrolopyrimidine.

a) Synthèse de la plateforme méthylée **8**

Le dichlorhydrate de 5-méthyl-4-(1,2,3,6-tétrahydropyridin-4-yl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidine **8** a été obtenu en deux étapes avec un rendement total de 56 % (Schéma 1). La première étape consiste en un couplage de Suzuki-Miyaura entre la 4-chloro-5-methyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidine **9** et l'ester boronique **10** commerciaux, sous irradiation aux micro-ondes à 140 °C pendant 1 h, et catalysée par du tétrakis(triphénylphosphine)palladium(0) [$Pd(PPh_3)_4$]. Dans ces conditions, la taille des réacteurs micro-ondes disponibles limite la montée en échelle à 700 mg. Cette réaction a été optimisée par Mme Front de la plateforme de synthèse de l'ICOA, que je remercie particulièrement puisqu'elle a pu réaliser cette étape sur 2,5 g de substrat en chauffant thermiquement le milieu réactionnel à 80 °C pendant 18 h pour isoler le composé souhaité **11** avec 61 % de rendement. L'amine secondaire a ensuite été déprotégée par de l'acide chlorhydrique 4 M en solution dans le 1,4-dioxane pendant 2 h pour obtenir l'amine **8** sous forme de dichlorhydrate avec un rendement quantitatif.

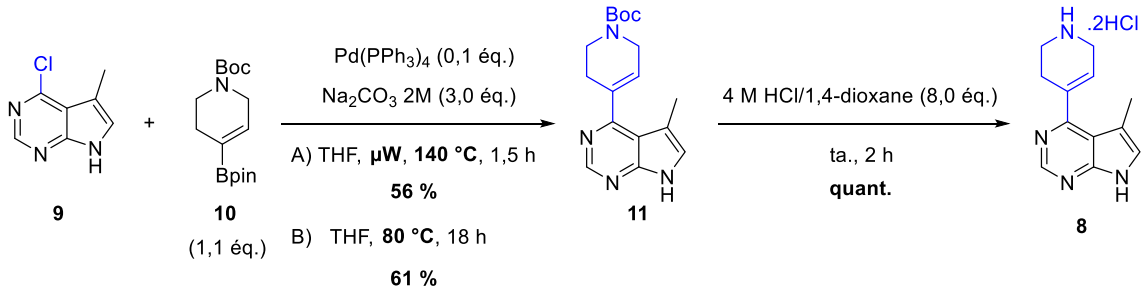


*Schéma 1 : Synthèse de la plateforme méthylée **8**.*

b) Synthèse de la plateforme tricyclique **12**

La formation du dichlorhydrate de 5-méthyl-4-(1,2,3,6-tétrahydropyridin-4-yl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidine **12** a nécessité au préalable de synthétiser la base chlorée **13** en 3 étapes, avant de poursuivre avec la même séquence réactionnelle que précédemment (Schéma 2). La pyrrolopyrimidinone **14** a été obtenue par une synthèse de Fischer entre la 6-hydrazinopyrimidin-4-ol **15** et la cyclopentanone. La cyclisation de l'intermédiaire hydrazone **16** a nécessité des conditions de chauffage très poussées à 260 °C pendant 3 h dans un réacteur scellé pour obtenir la pyrrolopyrimidinone **14** avec 82 % de rendement sur ces deux étapes. La troisième étape est une chloration effectuée à reflux du $POCl_3$ pendant 1 h permettant d'obtenir la base chlorée **13** avec un rendement de 57 %. Malgré de nombreux essais d'optimisation, la montée en échelle de la synthèse du produit **13** est limitée à l'emploi d'une quantité de 1 g lors de cette étape de chloration de la pyrrolopyrimidinone **14**. Au-delà, une chute de rendement due à la formation de sous-produits est observée.

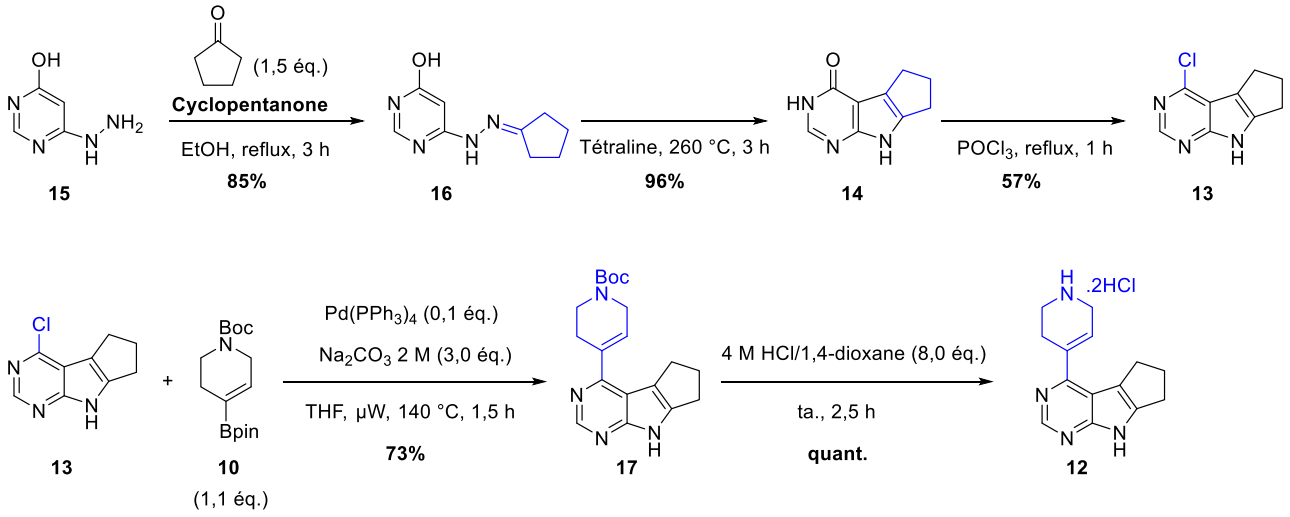


*Schéma 2 : Voie de synthèse de l'amine tricyclique **12**.*

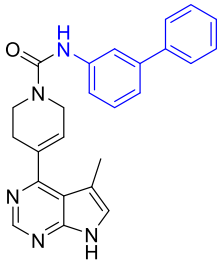
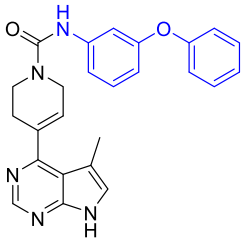
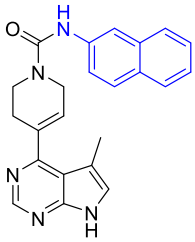
L'étape suivante de couplage de Suzuki-Miyaura pour synthétiser l'intermédiaire **17** est, elle aussi, limitée à 700 mg et ce à cause du volume des tubes micro-ondes utilisés. Un essai de cette réaction avec un chauffage à reflux du THF pendant 18 h a provoqué une chute de rendement de 73 % (micro-ondes, 140 °C, 1 h) à 54 %. Après une dernière étape de déprotection de l'amine, le composé **12** a été obtenu avec un rendement global de 34 % sur 5 étapes. Ainsi, le nombre d'étapes de synthèse et la montée en échelle difficile au-delà de 1 g font de **12** une plateforme de synthèse bien plus difficile à obtenir que son analogue méthylé **8**.

Par conséquent, les optimisations de la partie aniline de l'urée des inhibiteurs ont le plus souvent été réalisées dans un premier temps sur la base hétérocyclique **8**, puis les meilleures combinaisons de substitution ont été transposées en base tricyclique après quantification des effets biologiques *in vitro*.

2. Travaux antérieurs

De précédents résultats ont révélé le fort potentiel que représente l'ajout d'un second cycle aromatique sur l'aniline employée pour former l'urée. Trois types de substitutions ont alors été réalisés : **18** avec un groupement phényle en position *C*-3 de l'aniline, **AC429** porteur d'un éther phénoxyle dans cette même position, amenant une flexibilité supplémentaire, et enfin **19** dont l'aniline a été remplacée par la 2-naphtylamine, plus rigide (Tableau 2). Après avoir évalué *in vitro* ces 3 inhibiteurs sur les LIMKs, **19** a été le moins actif avec des affinités mesurées de 75 et 91 nM pour LIMK1 et LIMK2. De plus, l'évaluation de la sélectivité par rapport aux kinases ROCKs (situées juste en amont des LIMKs dans la voie biologique) a présenté de meilleurs résultats avec **18** et **AC429** ; de l'ordre de 20 à 40 % d'inhibition de ROCK à 1 µM contre 60 à 70 % pour **19**. Les groupes Ph-Ph et Ph-O-Ph semblent donc apporter une efficacité d'inhibition des LIMKs et une sélectivité satisfaisante vis-à-vis des ROCKs.

Tableau 2 : Évaluation in vitro de 3 inhibiteurs avec une urée diaromatique.

Composés		Ki (nM)		% Inhibition (à 1 µM)		% Inhibition de la phosphorylation de la cofiline (HeLa, 25 µM)
		LIMK1	LIMK2	ROCK1	ROCK2	
	**18**	**13**	25	23	21	78
	**AC429**	**19**	**14**	44	24	**92**
	**19**	75	91	73	56	84

Au niveau cellulaire, l'évaluation du taux d'inhibition de la phosphorylation de la cofiline est une valeur qui permet de mesurer *in cellulo* l'inhibition des LIMKs directement sur son substrat, la cofiline. Cette donnée est complémentaire aux constantes d'inhibition (Ki) qui renseignent sur l'affinité des ligands pour les

LIMKs. Les mesures d'inhibition de la phosphorylation de la cofiline ont été réalisées sur des cellules HeLa, traitées à 25 µM pendant 2 h en présence d'inhibiteurs selon le protocole utilisé dans la littérature par le Pr Lafanechère[152] (de plus amples explications sur les tests cellulaires seront données au chapitre 2). L'inhibiteur **AC429**, avec une aniline de type Ph-O-Ph, a présenté le meilleur résultat parmi les 3 composés, avec une excellente inhibition de la phosphorylation de la cofiline de 92 %.

De plus amples résultats biologiques (test de *wound healing*, données pharmacocinétiques et pharmacodynamique, ADME-Tox etc…) ont amené **AC429** à devenir un composé phare sur lequel une optimisation a débuté : *hit to lead*. Une des premières modulations de **AC429** a été la modification de la base pyrrolopyrimidine. En 2016, Amakem Therapeutics a développé une série d'inhibiteurs des LIMKs[157] avec des bases pyrrolopyrimidines tricycliques, substituées en position *C*-5 et *C*-6 par des cycles fusionnés. En s'appuyant sur ces résultats, notre équipe a observé que la présence d'un cycle à 5 chaînons permet d'obtenir une forte sélectivité de l'inhibition des LIMKs par rapport aux ROCKs, ainsi qu'une légère amélioration de leur affinité pour les LIMKs. L'exemple du composé tricyclique **20**, analogue tricyclique de **AC429**, permet de noter de très bonnes affinités pour les LIMKs mais aussi une sélectivité presque parfaite par rapport aux ROCKs (Figure 27).

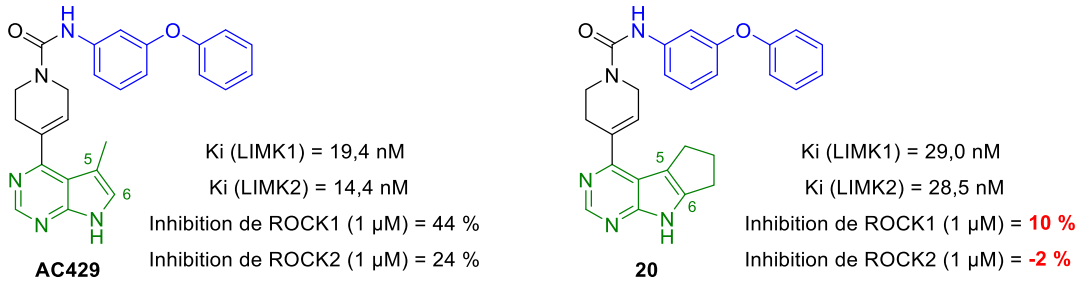


*Figure 27 : Évaluations biologiques in vitro des inhibiteurs **AC429** et **20**.*

II – Modulation de l'aniline de l'urée

1. Relations structure-activité des urées de type phénoxyaryle

a) Synthèse des anilines précurseurs

En s'appuyant sur les bons résultats de **AC429**, liés à la présence d'un phénoxyle en position *C*-3 de l'aniline (Figure 27), des relations structure-activité ont été réalisées avec l'emploi de diverses substitutions sur le second cycle. La pharmacomodulation a débuté par une réaction d'Ullmann selon les conditions décrites par Maiti et Buchwald[160] à partir d'halogénures d'aryles commerciaux et disponibles au laboratoire (Schéma 3).

L'utilisation d'iodure de cuivre(I) et d'acide picolinique dans le couplage du 3-aminophénol **21** avec des iodures d'aryle, a favorisé une *O*-arylation sélective avec d'excellents rendements pour les composés mono et di-halogénés **22-25**. Une baisse de rendement de 20 % a été observée lorsque le fluor est positionné en para pour le composé **23**. De plus, lorsque la 3-bromo-*N*,*N*-diméthylaniline est utilisée, le rendement a chuté à 49 % (**26**). Ceci peut être aussi bien dû au changement d'halogène (le dérivé iodé non commercial a ici été remplacé par un bromure d'aryle) qu'à la présence d'une amine tertiaire sur la molécule. Lors de la

[160] Maiti, D.; Buchwald, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (47), 17423–17429.

réaction entre la 3-iodopyridine et le 3-aminophénol **21**, le composé **27** a été obtenu avec un rendement moyen de 55 %.

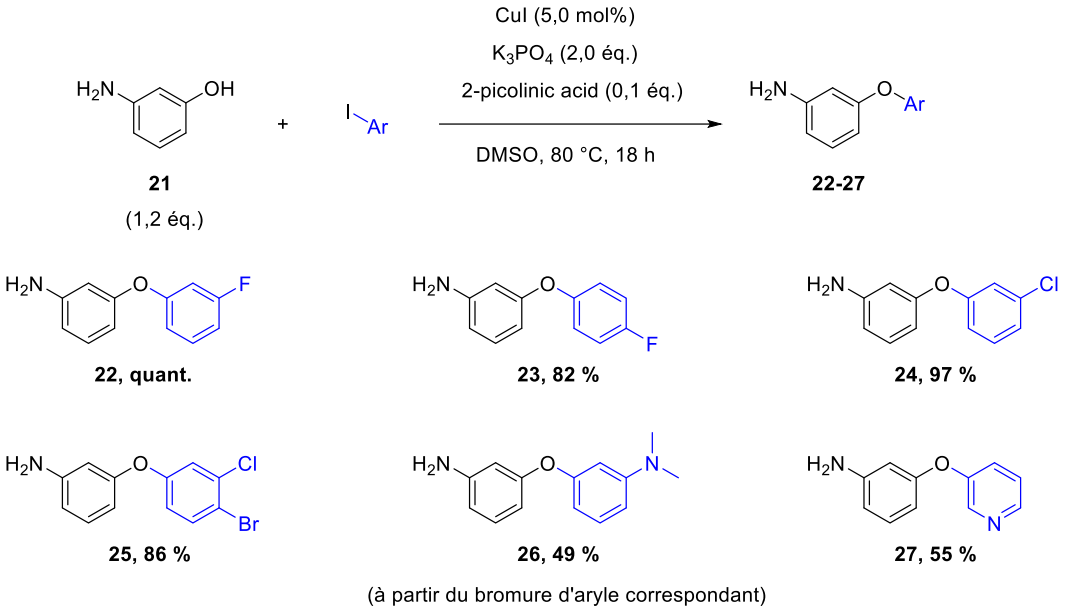


*Schéma 3 : Couplage d'Ullmann via des halogénures d'aryle commerciaux pour mener aux anilines **22** à **27**.*

Afin de poursuivre l'exploration sur cette urée, nous avons recherché dans la librairie des inhibiteurs de kinases disponibles sur le marché, ceux comportant une fonction urée composée d'une partie aniline de type (het)aryloxyle. Ceci nous a permis de commencer des RSA à partir de l'aniline commerciale 4-(4-aminophénoxy)-*N*-méthylpicolinamide (en bleu) présente sur le Sorafénib (Figure 28), un inhibiteur de kinase à effet anticancéreux. L'aniline de ce motif est substituée en position *C*-4 par une 4-hydroxypyridine.

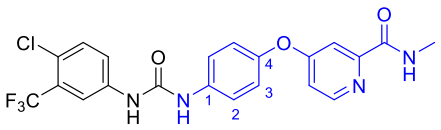


Figure 28 : Structure chimique du Sorafénib.

Comme évoqué en introduction, une substitution en méta sur le premier cycle aromatique est favorable pour une bonne inhibition des LIMKs. Afin de confirmer cette observation, la synthèse du 4-(3-aminophénoxy)-*N*-méthylpicolinamide **28** a été réalisée par une substitution nucléophile aromatique du 4-chloro-*N*-méthylpicolinamide **29** par le 3-aminophénol **21** en présence de *tert*-butylate de potassium[161] (Schéma 4).

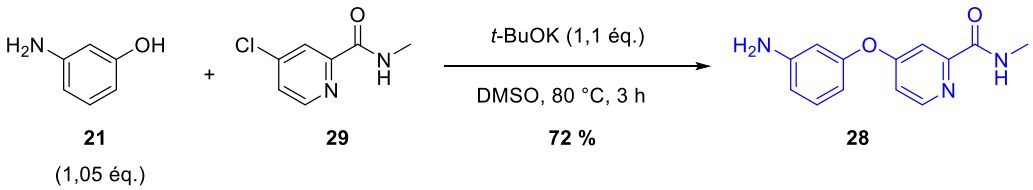


*Schéma 4 : Synthèse de l'aniline **28** dérivée du Sorafénib.*

[161] Lang, H.; Gahman, T. C.; Wash, P. L.; Zhao, C.; Davis, R. L. US2007/0155746, **2007**.

Cette réaction requiert au préalable une déprotonation du 3-aminophénol **21** (pKa ~ 10)[162] par le *tert*-butylate de potassium (pKa ~ 17)[163] pendant 30 min à température ambiante dans le DMSO avant l'ajout de la 4-chloro-*N*-methylpicolinamide **29**. Cette étape permet la formation d'un intermédiaire phénolate avec une densité électronique et un caractère nucléophile plus élevé que l'aniline, engendrant une chimiosélectivité en faveur de la *O*-arylation atteinte avec un rendement de 72 %.

L'étude des relations structure-activité en prenant comme point de modulation l'urée a été poursuivie en synthétisant différents iodures d'aryle substitués en position *C*-3 par des groupements donneurs (DLH), accepteurs (ALH) ou donneurs-accepteurs (DALH) de liaisons hydrogène tels que des amides, des carbamates, des éthers ou des alcools (Schéma 5). Le 3-iodophénol **30** a été utilisé comme plateforme afin d'avoir accès à l'éther benzylique **31**,[164] ainsi qu'au diméthylcarbamate **32** inspiré du **LX7101**. Le 3-iodo-*N*-méthylbenzamide **33** ainsi que son rétroamide **34** ont pu facilement être obtenus respectivement à partir de l'acide 3-iodobenzoïque **35** et de la 3-iodoaniline **36** dans les conditions décrites par la littérature.[165,166]

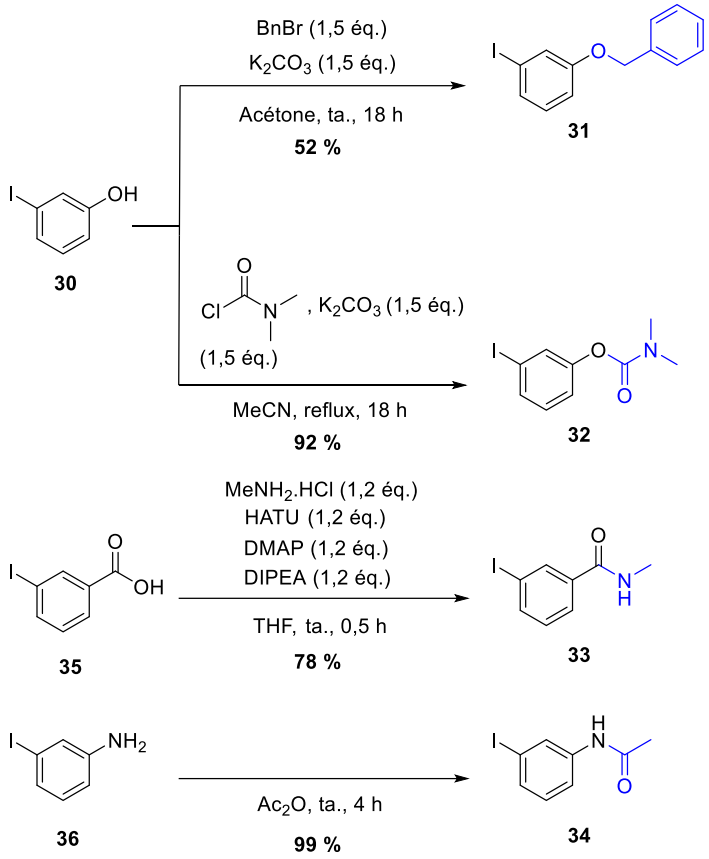


*Schéma 5 : Synthèses des iodures d'aryle **31**-**34**.*

Un couplage d'Ullmann dans les mêmes conditions que précédemment a permis d'obtenir les anilines **37** et **38** (Schéma 6). Une hydrolyse du carbamate de **39** a pu être observée en chauffant à 80 °C

[162] Badea, I. A.; Axinte, L.; Vladescu, L. *Environ. Monit. Assess.* **2013**, *185* (3), 2367–2375.
[163] Tables de pKa d'Evans. http://www.mch.estranky.sk/file/40/evans_pka_table.pdf (accédé le 16/06/2023).
[164] Kutz, S.; Schmidt, A.; Knölker, H.-J. *Synthesis* **2016**, *49* (2), 275–292.
[165] Han, Y.; Zhang, H.; Wang, S.; Li, B.; Xing, K.; Shi, Y.; Cao, H.; Zhang, J.; Tong, T.; Zang, J.; Guan, L.; Gao, X.; Wang, Y.; Liu, D.; Huang, M.; Jing, Y.; Zhao, L. *J. Med. Chem.* **2021**, *64* (18), 13719–13735.
[166] Linstad, E. J.; Vāvere, A. L.; Hu, B.; Kempinger, J. J.; Snyder, S. E.; DiMagno, S. G. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15* (10), 2246–2252.

pendant 18 h. Une diminution du temps de réaction à 3,5 h a permis de limiter cette dégradation et améliorer le rendement, passant ainsi de 30 % à 70 %.

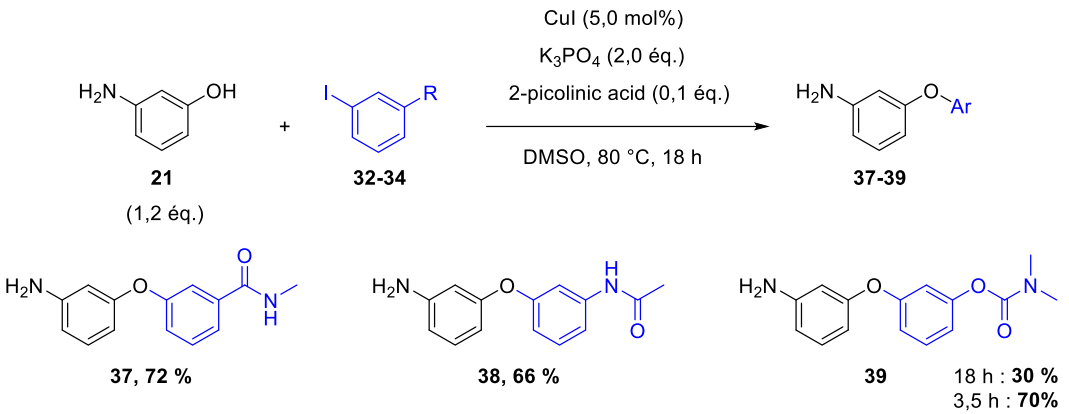


*Schéma 6 : Couplages d'Ullmann à partir des iodures d'aryle synthétisés **32-34**.*

La synthèse du phénol **40** diffère légèrement, due à la présence d'un second groupe hydroxyle qui pourrait intervenir dans le couplage d'Ullmann. Pour contourner ce problème, un couplage entre le 3-aminophénol **21** et l'iodure d'aryle **31** a permis d'obtenir l'éther benzylique **41** avec 76 % de rendement. L'hydrogénation de **41** catalysée par du palladium sur charbon (10%) a mené au phénol **40** avec un rendement de 94 % en 3 h (Schéma 7).

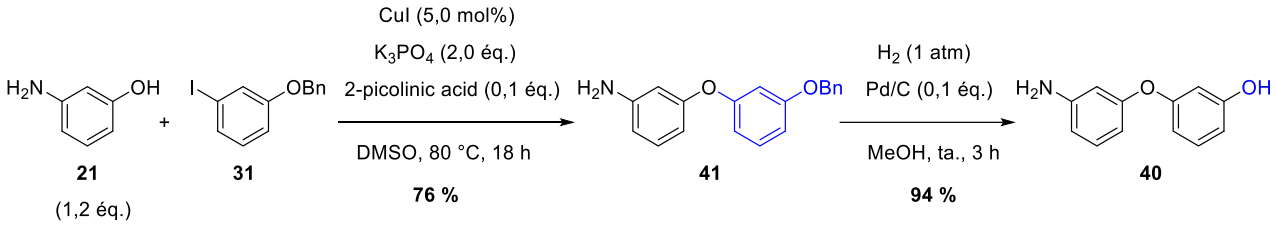


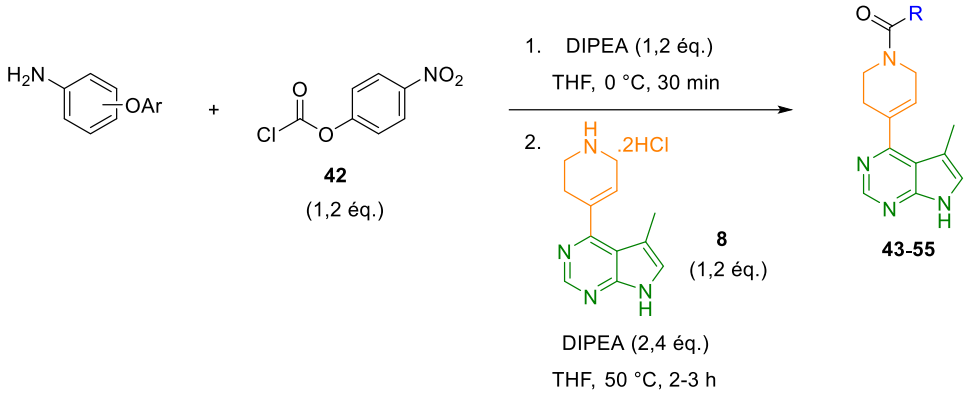
*Schéma 7 : Voie de synthèse du 3-(3-aminophénoxy)phénol **40**.*

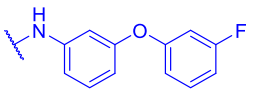
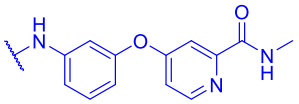
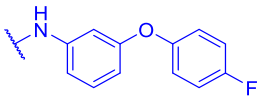
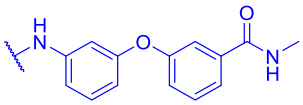
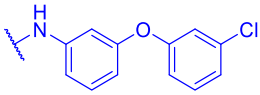
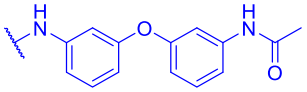
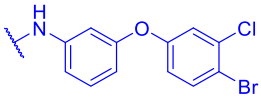
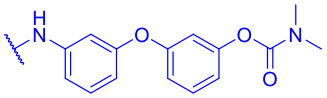
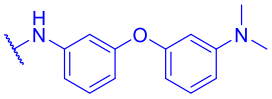
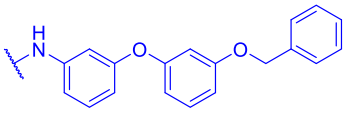
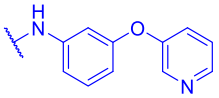
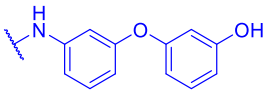
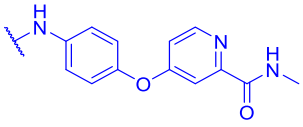
b) Étape finale de formation des urées

Après la synthèse des anilines, la dernière étape vers l'obtention des produits finaux est la formation de l'urée avec l'amine **8** préalablement formée. Les anilines sont activées sous forme de carbamate à l'aide du 4-nitrophénylchloroformate **42** à 0 °C pendant 30 min puis l'amine secondaire **8** est ajoutée au milieu qui est chauffé à 50 °C pendant 2 à 3 h (Tableau 3).[167]

[167] Ladziata, V.; Glunz, P. W.; Hu, Z.; Wang, Y. WO2016010950, **2016**.

*Tableau 3 : Formation des urées **43**-**55** de la série phénoxyaryle.*



Entrée	Produit		Rdt	Entrée	Produit		Rdt
1		**43**	76 %	8		**50**	73 %
2		**44**	74 %	9		**51**	41 %
3		**45**	85 %	10		**52**	24 %
4		**46**	73 %	11		**53**	64 %
5		**47**	78 %	12		**54**	79 %
6		**48**	68 %	13		**55**	46 %
7		**49**	88 %				

Cette voie de synthèse des urées est une alternative non toxique au phosgène et à ses dérivés. La synthèse de 13 molécules finales **43** à **55** a ouvert l'accès à une nouvelle famille de molécules afin d'évaluer les affinités sur les LIMKs et les pourcentages d'inhibition sur ROCK1 et ROCK2.

c) Évaluations *in vitro* sur LIMKs et ROCKs

L'évaluation biologique des composés s'est déroulée en plusieurs phases de sélection dont la première est un test permettant la détermination de constantes d'inhibition (Ki) pour les LIMKs, sur enzymes purifiées. Ces tests standardisés ont été réalisés par la société Life Technologies située aux Etats-Unis.[168] Les

[168] *LanthaScreen Eu Kinase Binding Assay Validation & Reagent Selection Table - FR*. https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/industrial/pharma-biopharma/drug-discovery-development/target-and-lead-identification-and-validation/kinasebiology/kinase-activity-assays/lanthascreentm-eu-kinase-binding-assay/lanthascreen-eu-kinase-binding-assay-validation-table.html (accédé le 04/09/2023).

meilleurs composés présentant de très bonnes affinités pour les LIMKs ainsi qu'une bonne sélectivité par rapport à ROCK1 et ROCK2 ont été sélectionnés pour la suite des tests biologiques. Ces derniers seront présentés et discutés au chapitre 2.

Les constantes d'inhibition des composés sur LIMK ont été obtenues par la technologie Lanthascreen® Eu Binding assay. Le principe repose sur la mesure par FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) qui est une mesure de fluorescence émise par le rapprochement spatial d'un couple de fluorophores.[169] Dans le cas présent, les fluorophores sont : un sel d'europium (fluorophore donneur) fixé sur un anticorps dirigé contre un anti-tag présent sur les LIMKs et l'Alexa Fluor® 647 (fluorophore accepteur) lié à un traceur se fixant dans le site de fixation de l'ATP (Figure 29).

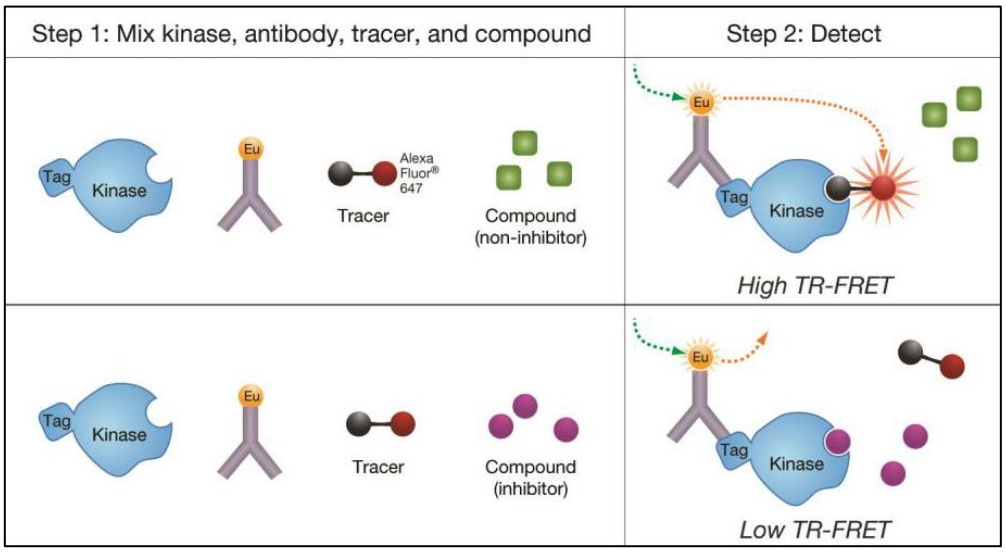


Figure 29 : Principe du test de Lanthascreen® Eu Binding assay par Thermo Fisher Scientific.

Lorsque l'anticorps est fixé sur la kinase d'intérêt et que le traceur s'est positionné dans le site actif alors un signal de fluorescence à 665 nm est émis. Cependant, en présence d'un inhibiteur ayant une affinité supérieure au traceur pour la kinase, l'inhibiteur occupe le site actif de la kinase à la place du traceur qui se retrouve trop éloigné (> 10 nm) du sel d'europium, ce qui entraîne une diminution du signal de FRET. La mesure de fluorescence de l'échantillon permet ainsi de calculer la constante d'affinité de l'inhibiteur pour la kinase cible. Cette méthode, qui utilise le principe de compétition d'un inhibiteur avec le traceur sur un site de fixation de l'ATP, permet d'obtenir des constantes d'affinité sur un large panel de kinases existantes.

L'évaluation biologique de composés sur les kinases ROCK repose sur le même principe de mesure de fluorescence par FRET mais ici, un test Z'-LYTE® mis au point par la même entreprise a été utilisé. À la différence du test de Lanthascreen® Eu Binding assay, le test Z'-LYTE® mesure l'inhibition d'une kinase par un composé et non son affinité. En effet, ce test permet de mesurer le taux de phosphorylation d'un substrat marqué par un couple de fluorophores (Figure 30) et ainsi obtenir un pourcentage d'inhibition à une concentration de travail.

Lors de la première étape, la kinase est incubée avec un peptide substrat marqué à chacune de ses extrémités *C*- et *N*-terminal par un pharmacophore. Un inhibiteur est ensuite ajouté à une concentration fixe de travail. La quantité de peptide substrat phosphorylé est alors corrélée à l'efficacité de l'inhibiteur de la kinase. Par la suite, au cours du développement, une protéase ciblant uniquement les peptides substrats non

[169] Spriet, C.; Kasprowicz, A.; Trinel, D.; Bodart, J.-F.; Rinken, T., Kivirand, K., Eds.; InTech, **2018**.

phosphorylés, les dégrade ce qui éloigne spatialement les fluorophores. L'intensité du signal FRET émis par le substrat permet donc de quantifier l'activité de la kinase en présence de l'inhibiteur. Les pourcentages d'inhibition des kinases ROCK1 et ROCK2 par les composés décrits dans ce manuscrit ont été obtenus en utilisant cette méthode à une concentration de 1 µM.

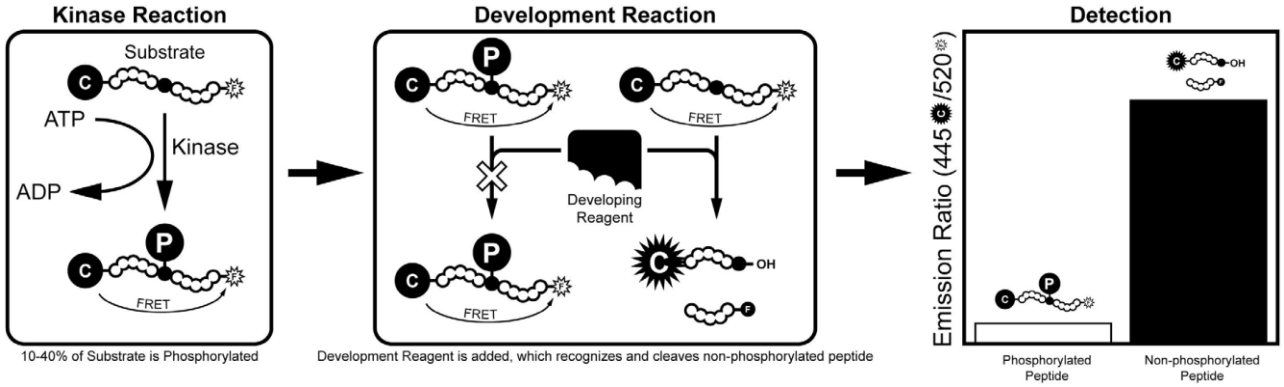
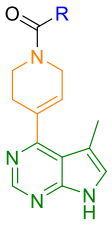
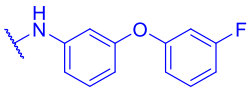
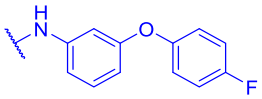
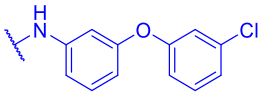
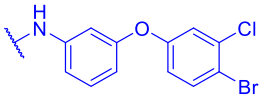
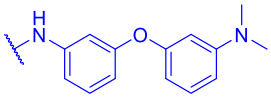
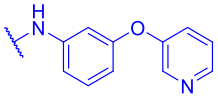


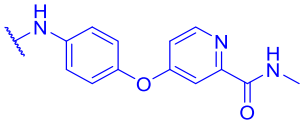
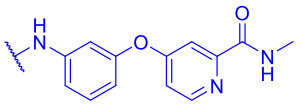
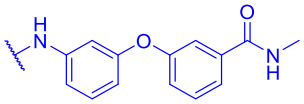
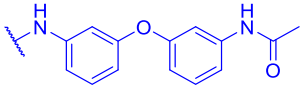
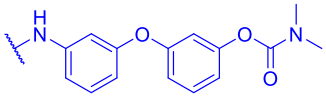
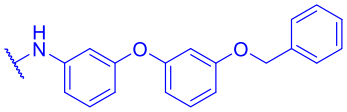
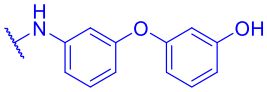
Figure 30 : Principe du test Z'-LYTE par Life Technologies.

Les résultats biologiques de la série de composés phénoxy(hét)aryle ont été rassemblés dans le Tableau 4 ci-dessous.

*Tableau 4 : Évaluation in vitro des composés de type phénoxy(hét)aryle **43**-**55**.*



Entrée	Composé		Ki LIMK1	Ki LIMK2	% inhibition (à 1 µM)	
	R =	N°	(nM)	(nM)	ROCK1	ROCK2
1		**43**	46	10	35	13
2		**44**	70	69	26	15
3		**45**	51	16	71	46
4		**46**	418	676	**13**	**3**
5		**47**	34	150	49	30
6		**48**	37	8	91	72

Entrée	Composé		Ki LIMK1 (nM)	Ki LIMK2 (nM)	% inhibition (à 1 µM)	
	R =	N°			ROCK1	ROCK2
7		**49**	192	49,3	21	12
8		**50**	**3**	**3**	79	65
9		**51**	**5**	**3**	66	48
10		**52**	**5**	**6**	60	37
11		**53**	**5**	**15**	71	56
12		**54**	103	466	**5**	**3**
13		**55**	13	16	55	27

Les résultats biologiques de cette série de composés montrent qu'à l'exception de 3 molécules **46**, **47** et **54** (entrées 4,5 et 12), l'ensemble des composés a des affinités pour les LIMKs inférieures à 100 nM. La substitution du second phényle par un atome de fluor **43** ou de chlore **45** en position *C*-3 est très bien tolérée avec des valeurs de Ki proches de 50 nM sur LIMK1 et de 10-16 nM sur LIMK2 (entrées 1 et 3). L'importance de la position du substituant est à nouveau confirmée puisque les affinités diminuent nettement entre le produit fluoré **43** et son isomère substitué en position *C*-4 **44** (entrées 1 et 2). La présence d'une disubstitution par un atome d'halogène plus volumineux comme le brome n'est pas tolérée dans les sites actifs des LIMKs, avec une chute des affinités à plusieurs centaines de nanomolaires pour **46** (entrée 4).

Lorsqu'un groupe volumineux et riche en électrons tel que la diméthylamine a été inséré (**47**, entrée 5), une discrimination des affinités entre LIMK1 et LIMK2 est observée avec un gain d'affinité à 34 nM sur LIMK1 mais une perte à 150 nM sur LIMK2 par rapport aux composés halogénés. L'appauvrissement en électrons de l'urée semble améliorer les affinités de nos inhibiteurs. Les isomères **49** et **50** ont démontré cela avec un deuxième cycle très électro-attractif, composé d'une pyridine et d'un amide (entrées 7 et 8). À nouveau, la substitution de l'aniline en position *C*-3 (**50**, entrée 8) est mieux tolérée qu'une substitution en position *C*-4 (**49**, entrée 7) puisque pour la première fois, un composé de nos inhibiteurs de type pyrrolopyrimidine est passé sous la barre des 5 nM sur les LIMKs. La pyridine non substituée **48** (entrée 6) possède de très bonnes affinités de 37 nM et 8 nM mais le groupe responsable des affinités de **50** s'est avéré être le groupe méthylamide, puisque des Ki sous 5 nM ont été obtenues avec le composé **51** (entrée 9). Son analogue rétroamide **52** (entrée 10) présente lui aussi des valeurs de Ki pour LIMK1 et LIMK2 de 5 et 6 nM respectivement, ce qui indique que les interactions entre les résidus des sites actifs des LIMKs et un groupe donneur-accepteur de liaisons hydrogène sont favorisées. Dans le cas du carbamate **53**, la constante d'affinité sur LIMK1 reste inchangée (5 nM), mais celle sur LIMK2 (15 nM) est multipliée par 5 par rapport à

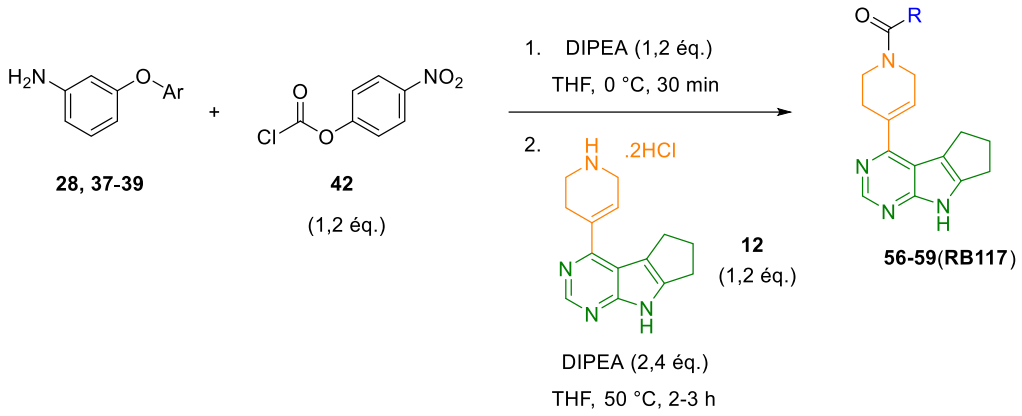
l'amide **51** (entrées 11 et 9). Cette donnée indique qu'un groupe donneur de liaisons hydrogène a moins d'interactions favorables avec les résidus du site actif de LIMK1 que ceux du site actif de LIMK2. De plus, la présence d'un éther benzylique volumineux et hydrophobe sur **54** (entrée 12) a fait chuter fortement les constantes d'affinité au-delà de 100 nM pour LIMK1 et LIMK2. Au contraire, le composé **55,** porteur d'une simple fonction hydroxyle DALH, retrouve quant à lui des valeurs de Ki proche de 15 nM sur les LIMKs (entrée 13).

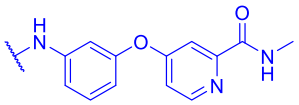
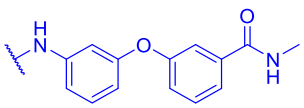
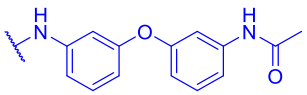
Les résultats d'inhibition des ROCKs ne montrent pas de sélectivité marquée de ces composés à une concentration de 1 µM. La majorité de ces inhibiteurs des LIMKs présente des taux d'inhibition assez élevés à l'exception de 2 composés, **46** et **54** (entrées 4 et 12), dont l'inhibition des ROCKs est inférieure à 10 % à 1 µM. Dans le cas des composés les plus actifs sur les LIMKs (**50**, **51**, **52**, et **53**; entrées 8-11), le manque de sélectivité vis-à-vis des ROCKs pourrait représenter un défaut de ces molécules si les doses employées étaient capables d'inhiber les ROCKs car elles interviennent dans un grand nombre de voies biologiques différentes.

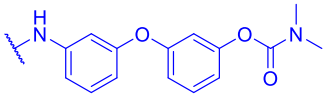
d) Synthèse et résultats cellulaires en base tricyclique des meilleurs composés phénoxyaryle

Comme vu précédemment, la mise en place d'un cycle à 5 chaînons sur la pyrrolopyrimidine apporte naturellement une sélectivité pour les LIMKs par rapport aux ROCKs. En conséquence, les 4 anilines (**28**, **37-39**) présentent sur les meilleurs composés ayant des affinités pour LIMK sous le seuil de 5 nM (**50**, **51**, **52**, et **53**; Tableau 4, entrées 8-11) ont été insérées sur la plateforme pyrrolopyrimidine tricyclique **12** pour mener aux composés **56-59**(**RB117**) (Tableau 5) . Comme attendu, le remplacement du méthyle en position 5 de la pyrrolopyrimidine par un cyclopentane fusionné a eu un effet très prononcé sur la sélectivité, en faisant chuter les pourcentages d'inhibitions à 1 µM de 70 % à moins de 5 %.

Tableau 5 : Formation d'urées avec une base tricyclique et évaluation in vitro des composés.



Entrée	Composé		Rdt	Ki (LIMK1) (nM)	Ki (LIMK2) (nM)	% inhibition (à 1 µM)	
	R =	N°				ROCK1	ROCK2
1		**56**	38 %	2	3	-1	5
2		**57**	47 %	2	4	-1	3
3		**58**	64 %	3	13	-2	5

Entrée	Composé R =	Composé N°	Rdt	Ki (LIMK1) (nM)	Ki (LIMK2) (nM)	% inhibition (à 1 µM) ROCK1	% inhibition (à 1 µM) ROCK2
4		**59 RB117**	66 %	5	21	**-1**	**1**

Les constantes d'affinité pour LIMK ont dans l'ensemble été peu impactées par cette modification. On peut en conclure que l'encombrement stérique de la pyrrolopyrimidine, partie qui se lie au « hinge » de LIMK et de ROCK, empêcherait les composés d'accéder au site actif de ROCK provoquant une perte d'activité sur cette dernière, sans affecter LIMK.

Les 4 composés tricycliques **56-59**(**RB117**) sont les meilleurs inhibiteurs de la série des anilines de type phénoxyaryle, avec de très bonnes affinités sur les LIMKs et une excellente sélectivité vis-à-vis des ROCKs. Ils ont ainsi été sélectionnés pour poursuivre le processus de tests biologiques.

e) Exploration de la topologie des sites actifs

D'après les résultats biologiques du composé **54** (Tableau 4, entrée 12), la présence d'un éther benzylique volumineux n'est pas tolérée dans les sites actifs des LIMKs. Les groupes hydroxyle (**55**) et diméthylcarbamate (**53**) (Tableau 4, entrées 13 et 11), également DLH mais moins volumineux, présentent de meilleures affinités sur les LIMKs. Ainsi, une brève exploration de la forme des sites actifs de LIMK a été réalisée. Pour ce faire, l'éther benzylique a été remplacé par une chaîne propyle fonctionnalisée par un carbamate ou un amide (Schéma 8). L'ajout de ces groupes DALH avait pour objectif d'améliorer les interactions de la chaîne avec les résidus de la poche de LIMK. La synthèse des anilines correspondantes est détaillée dans le Schéma 8 et commence par l'alkylation du 3-iodophénol **30** avec le bromure de 3-(Boc-amino)propyle **60** avec un excellent rendement de 91 % en **61**. Cet iodure d'aryle a été couplé avec le 3-aminophénol par une réaction d'Ullmann pour mener à l'aniline **62** avec un rendement modeste de 54 %.

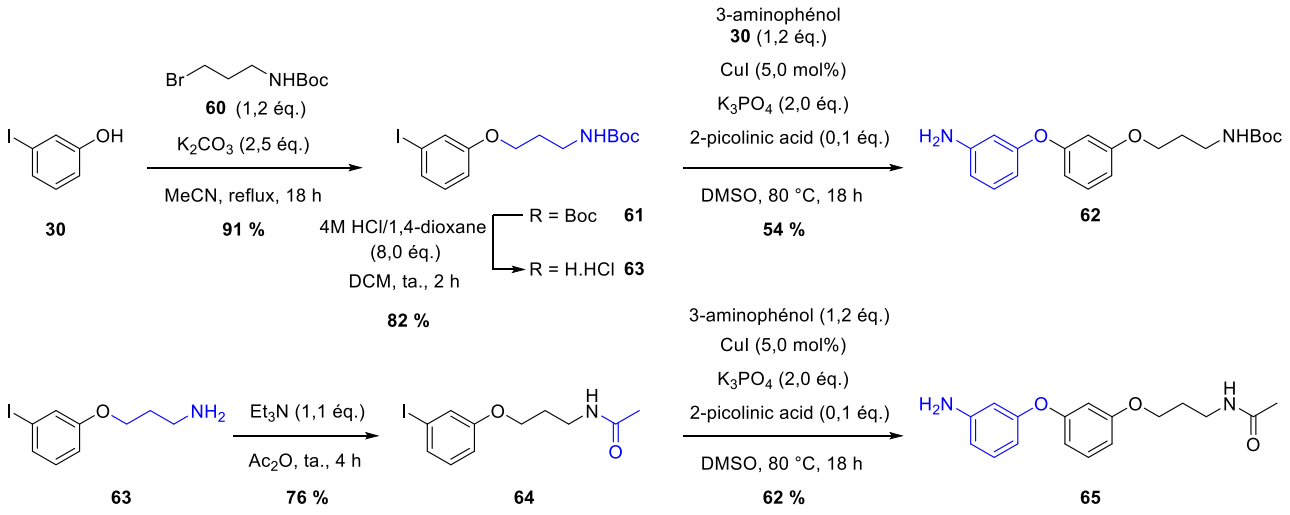
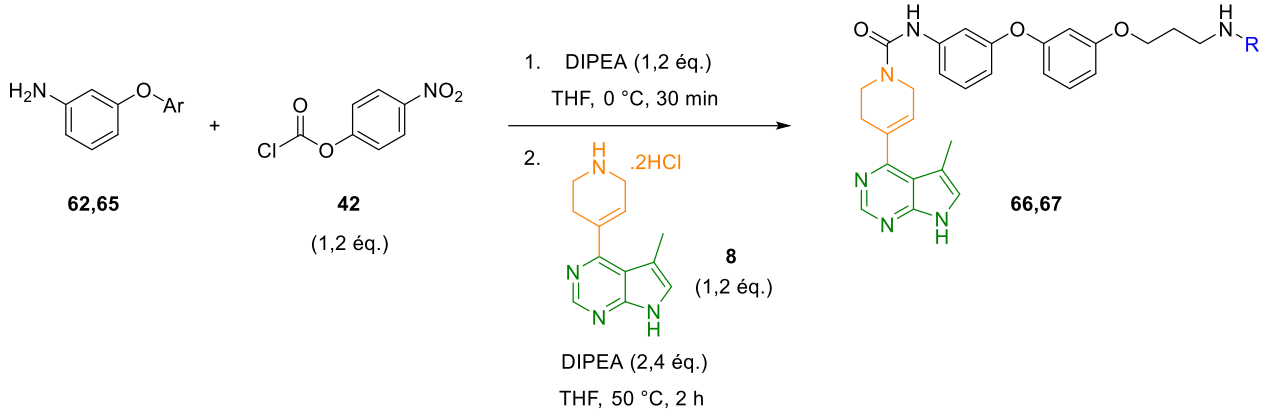


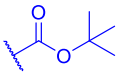
*Schéma 8 : Voies de synthèse des anilines **62** et **65**.*

En parallèle, l'amine de **61** a été déprotégée par l'acide chlorhydrique en amine **63**, puis celle-ci a été acétylée en **64** avec un rendement de 76 %. Un couplage d'Ullmann dans les mêmes conditions que celles utilisées précédemment a mené à l'aniline **65**.

L'étape finale de formation de l'urée a ensuite été réalisée entre les anilines **62** ou **65** et la plateforme hétérocyclique méthylée **8**. Le Tableau 6 résume les rendements obtenus sur cette étape ainsi que les résultats des tests *in vitro* des composés **66** et **67**.

*Tableau 6 : Synthèse et évaluation biologiques des produits finaux **66** et **67**.*



Entrée	Composé		Rdt	Ki (LIMK1) (nM)	Ki (LIMK2) (nM)	% inhibition (à 1 µM)	
	R =	N°				ROCK1	ROCK2
1		**66**	77 %	276	673	**5**	**6**
2		**67**	67 %	**5,5**	72	**52**	**31**

La présence du groupement Boc sur la molécule **66** (entrée 1) n'est pas tolérée dans les sites actifs des LIMKs puisque les constantes d'affinité dépassent plusieurs centaines de nanomolaires. Ces résultats font écho à ceux observés sur l'éther benzylique **54** (Tableau 4, entrée 12). Cependant, la molécule **67** (entrée 2) présente de très bonnes affinités pour LIMK et plus particulièrement pour LIMK1 avec un Ki de 5,5 nM. La présence d'un groupement plus petit que le Boc comme l'acétyle est plus approprié dans les poches de ces kinases. Réduire la taille des substituants sur l'atome d'azote semblait nécessaire pour conserver de bonnes affinités. Cependant, aucune sélectivité sur les ROCKs n'a été observée.

Pour atteindre cette sélectivité sur les ROCKs, nous avons préparé le dérivé **68**, comportant la base tricyclique **12** (Schéma 9). Il est à noter que les urées finales comportant une base tricyclique et une aniline de type phénoxyaryle (Tableau 5-page 51), présentent de faibles solubilités dans les solvants organiques tels que le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle, le méthanol et même pour certains, dans le diméthylsulfoxyde. Il a donc été décidé d'améliorer la solubilité de ces composés en rajoutant un groupement polaire en fin de chaîne propyle. Pour ce faire, l'acétyle présent sur l'inhibiteur **67** a été remplacé par la diméthylamine dans le composé final **68**.

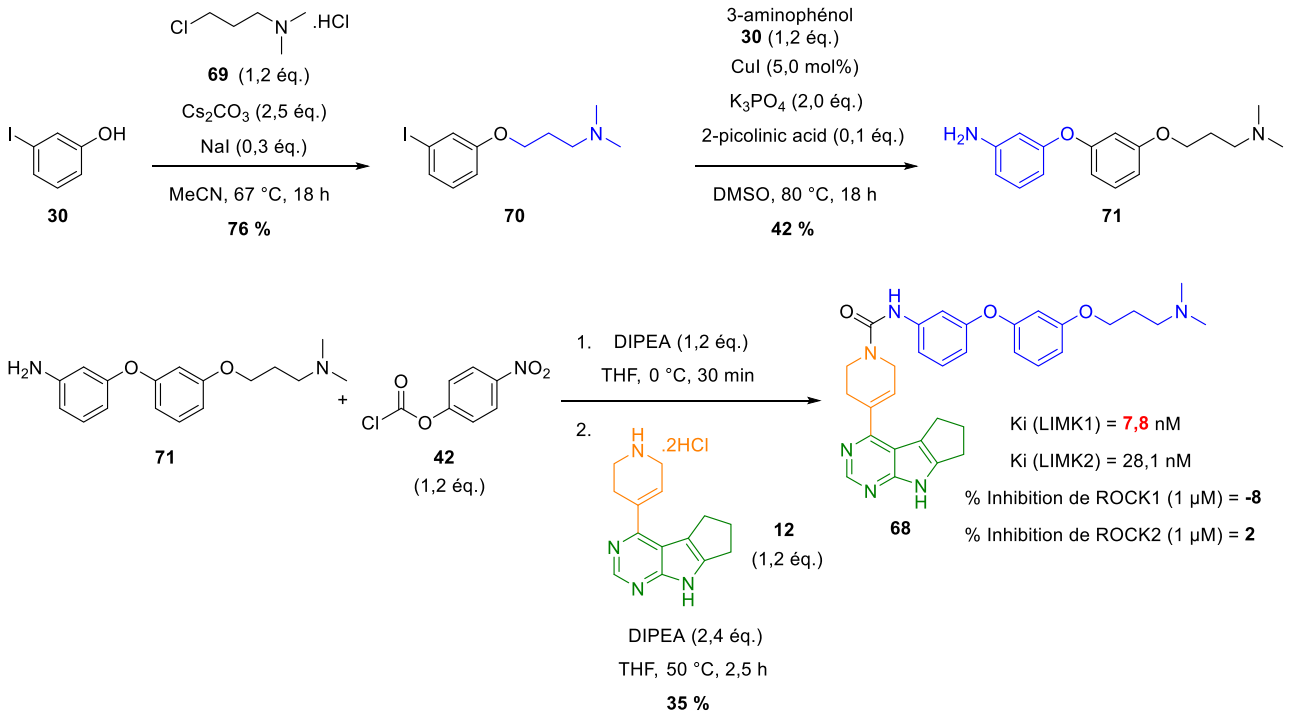


*Schéma 9 : Synthèse et résultats biologiques de **68**.*

Cette synthèse, similaire aux deux dernières, a débuté par la substitution de la 3-chloro-*N*,*N*-diméthylpropylamine chlorhydrate **69** par le 3-iodophénol **30** pour obtenir l'iodure d'aryle **70** avec un bon rendement de 76 % selon les conditions décrites dans la littérature.[170] La synthèse de l'aniline **71** par couplage d'Ullmann suivi de l'étape de formation de l'urée, avec la base tricyclique **12**, a permis d'obtenir le composé **68**. L'évaluation biologique de **68** montre que cette dernière possède de bonnes affinités de 7,8 nM et 28,1 nM sur LIMK1 et LIMK2 respectivement, mais également une très bonne sélectivité par rapport à ROCK.

Ainsi l'exploration des sites actifs des LIMKs, avec la série d'anilines de type phénoxyaryle, s'est conclue avec la molécule **68** qui a présenté de bonnes propriétés biologiques pour pouvoir poursuivre dans la suite des tests biologiques décrits au chapitre suivant.

2. Amélioration de la solubilité des composés

Un rappel sur le développement d'un médicament s'impose ici. Lorsqu'une molécule présente de bonnes activités *in vitro* sur sa cible thérapeutique, les LIMKs en l'occurrence, il doit avoir des propriétés supplémentaires pour devenir un médicament. Son administration à un organisme (voie orale, intraveineuse, inhalation, etc…) doit être réfléchie afin d'atteindre sa cible biologique à une concentration suffisante. Un ensemble de paramètres pharmacocinétiques tels que l'absorption, la distribution, la métabolisation et l'excrétion vont être évalués sous le terme ADME, permettent d'évaluer le devenir du médicament dans un organisme de son administration à son élimination. La dégradation de celui-ci en métabolite est étudiée ainsi que l'activité de ces derniers lors d'étapes de développement ultérieures.

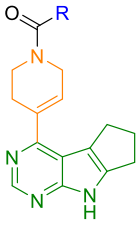
[170] Georgiades, S. N.; Clardy, J. *Org. Lett.* **2006**, *8* (19), 4251–4254.

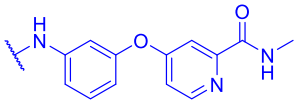
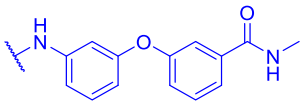
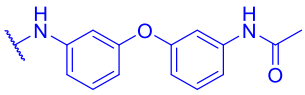
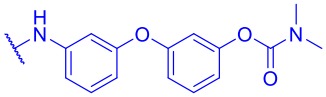
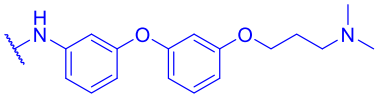
Dans le cas présent, nous nous sommes intéressés au paramètre d'absorption de nos composés en série tricyclique en prenant en compte des règles empiriques décrites par Lipinski.[171] Énoncées en 1997, « la règle des 5 » de Lipinski décrit les critères que doit respecter un composé pour être bien absorbé :

1. Une masse molaire inférieure à 500 g/mol.
2. Un nombre d'accepteurs de liaison hydrogène (ALH) inférieur à 5.
3. Un nombre de donneurs de liaison hydrogène (DLH) inférieur à 10.
4. Un coefficient de partage dans un système octanol/eau ou log P inférieur à 5.

La série d'anilines de type phénoxyaryle a permis d'obtenir des inhibiteurs de LIMK très prometteurs, mais ne respectant pas tous ces critères (Tableau 7). Pour chacune des molécules **56-68**, leur poids moléculaire dépasse légèrement les 500 g/mol. Le nombre d'accepteurs de liaison hydrogène est supérieur à 5 pour les composés **56**, **59**(**RB117**), **68** et le log P pourrait être trop haut pour les molécules **58**, **59**(**RB117**), **68**. À partir de ces résultats, il a été décidé de réduire la taille de nos composés afin de diminuer à la fois leur poids moléculaire et leur nombre d'accepteurs de liaison hydrogène. Le log P a été quant à lui été diminué grâce à la présence d'amines tertiaires hydrophiles.

Tableau 7 : Propriétés physiques des meilleurs inhibiteurs de la série d'aniline de type phénoxyaryle dont le Ki (LIMK) < 5 nM.



Entrée	Composé		Masse molaire (g/mol)	Nb de ALH	Nb de DLH	Log P*
	R =	N°				
1		**56**	**509,6**	**6**	3	4,3
2		**57**	**508,6**	5	3	**4,9**
3		**58**	**508,6**	5	3	**5,5**
4		**59 RB117**	**538,6**	**6**	2	**5,6**
5		**68**	**552,7**	**6**	2	**5,9**

* calculés selon la méthode décrite par Wildman S. A. et Crippen G. M.[172]

a) Modification de l'aniline

Afin de connaître les interactions entre nos composés et les résidus des sites actifs de LIMK, un *docking* de l'un des composés obtenus par l'équipe en 2018 (**18**) dans le site actif de LIMK2 a été réalisé par

[171] Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1997**, *23* (1), 3–25.
[172] Wildman, S. A.; Crippen, G. M. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1999**, *39* (5), 868–873.

l'équipe de modélisation moléculaire de l'ICOA dirigée par le Pr Bonnet et la Dr Aci-Sèche, que je remercie pour leur travail sur ce projet.

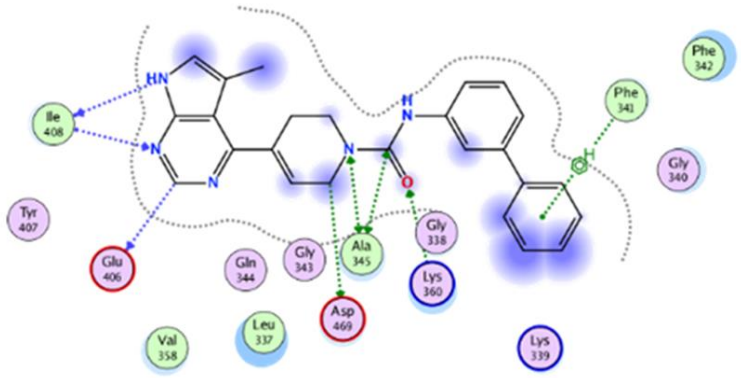


*Figure 31 : Représentation des interactions de **18** dans le site actif de LIMK2.*

Ce modèle des interactions de **18** avec les résidus de la poche de LIMK2 indique la présence d'un π-*stacking* entre le second cycle de l'aniline et la phénylalanine 341. Sur ce modèle, le cycle aromatique de l'aniline ne serait engagé dans aucune liaison avec les résidus de la poche.

En nous basant sur ces hypothèses, nous avons décidé de remplacer le 1er cycle aromatique des anilines de type phénoxyaryles par une chaîne alcane, afin d'apporter plus de flexibilité et diminuer le poids moléculaire. Une chaîne propyle a été choisie afin de respecter l'éloignement spatial du second cycle. Ce sont ainsi 3 composés (**72**-**74**) qui ont été synthétisés afin d'explorer cette série (Figure 32). Les substituants et la nature du cycle phénoxyle ont été modifiés pour observer leurs effets sur les LIMKs.

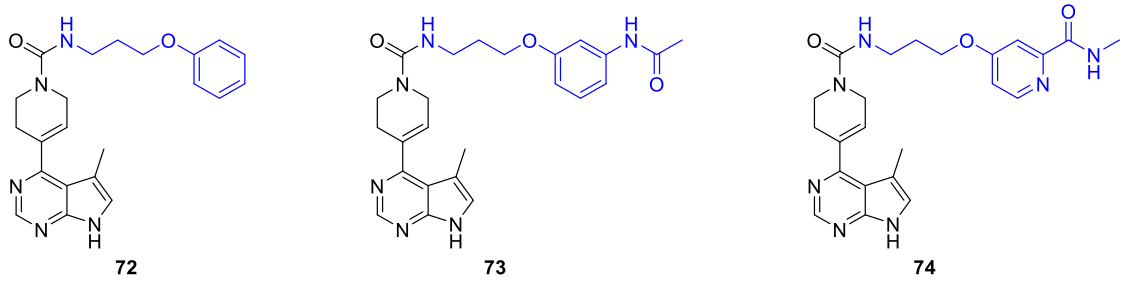


*Figure 32 : Composés de type alkyloxyaryle **72**-**74**.*

Le premier composé synthétisé de cette série a été **72**, comportant un phényl non substitué. Pour cela, l'amine primaire **75** a été obtenue à partir du 1-bromo-3-phénylpropane **76** en 2 étapes. Premièrement, une substitution nucléophile du brome par l'azoture de sodium a mené au composé **77**. La fonction azoture de cet intermédiaire a été réduite en amine **75** par une réaction de Staudinger, avec un rendement de 65 % sur 2 étapes (Schéma 10). Ce travail de synthèse a été réalisé en collaboration avec le Dr Oliver que je remercie grandement pour son travail.

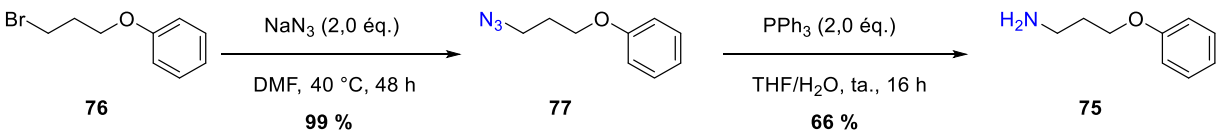


*Schéma 10 : Synthèse de l'amine **75** via une réduction de Staudinger.*

La présence d'un groupement donneur-accepteur de liaison hydrogène a été souhaitée afin de réaliser des liaisons hydrogène avec les résidus des sites actifs. La molécule **73** possédant un groupe acétamide a été synthétisée dans ce but. Une réaction de Mitsunobu entre le 3-acétaminophénol **78** et le 3-(Boc-amino)-1-propanol **79** a mené à l'intermédiaire **80**, dont l'amine a été déprotégée par de l'acide chlorhydrique 4 M dans le 1,4-dioxane pour conduire au produit **81** avec un rendement de 71 % sur 2 étapes (Schéma 11).

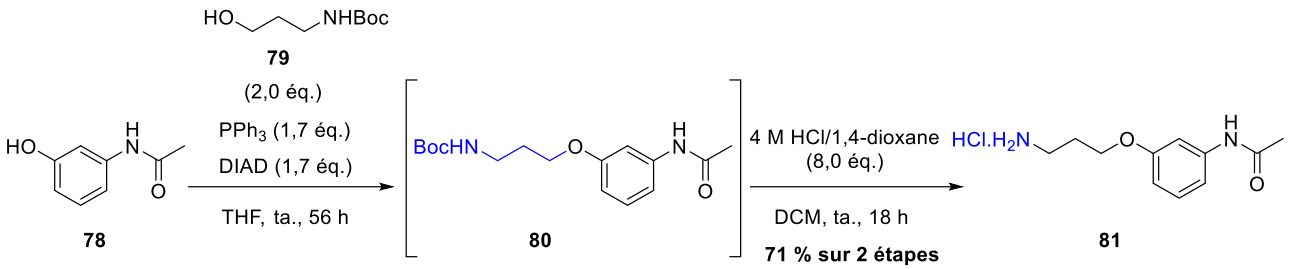


*Schéma 11 : Synthèse de l'amine **81** via une réaction de Mitsunobu.*

En nous inspirant du composé **56** (Tableau 7, entrée 1, page 55) présentant de bonnes affinités sur les LIMKs, nous avons décidé de remplacer le phényle par une 2-acétamidopyridine afin d'obtenir **74**. La première étape de la voie de synthèse de l'amine **82** a été une substitution nucléophile aromatique entre la *N*-méthyl-4-chloropyridine-2-carboxamide **29** et le 3-azido-1-propanol **83** en présence de *t*-BuOK et sous micro-ondes à 100 °C pendant 1 h afin d'obtenir l'azoture **84** avec un rendement de 30 % (Schéma 12). L'étape suivante a été, une nouvelle fois, une réduction de l'azoture **84** en amine primaire en présence de triphénylphosphine afin d'obtenir **82** avec un rendement de 82 %.

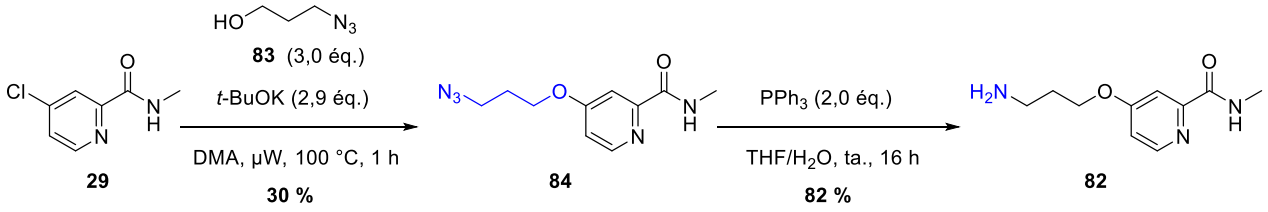


*Schéma 12 : Synthèse de l'amine **82** via une réaction de Staudinger.*

L'étape finale de formation de l'urée a mené aux composés **72** et **74** avec des rendements respectifs de 67 % et 61 % (Schéma 13).

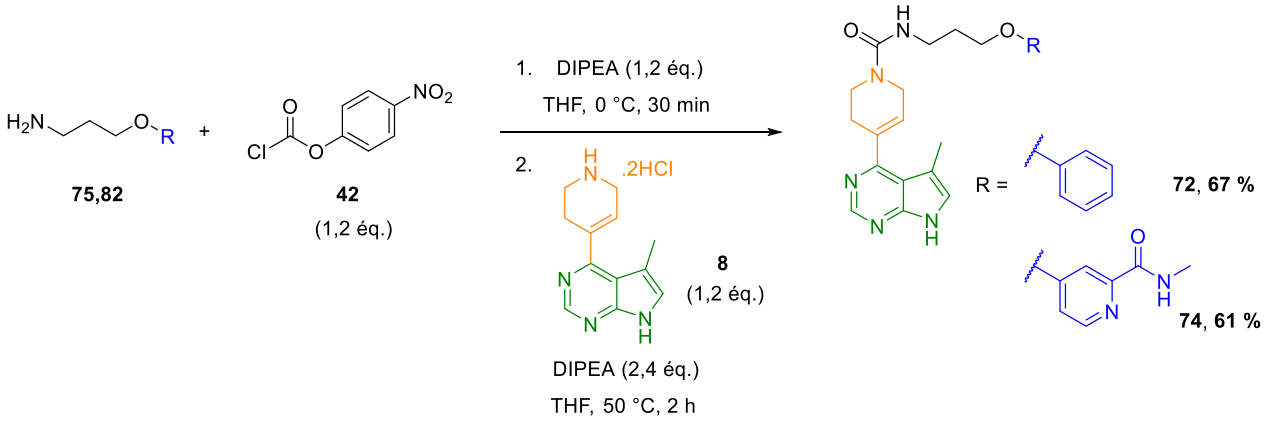


*Schéma 13 : Synthèse des urées **72** et **74** par activation des anilines **75** et **82** sous forme de carbamate.*

Cependant, l'activation de l'amine **81** sous forme de carbamate dans ces conditions n'a pas mené au produit attendu **73** (Schéma 14). La très faible solubilité de **81** dans le tétrahydrofurane nous a poussés à changer de solvant et de conditions opératoires au profit d'une autre méthode de synthèse des urées. Afin d'éviter l'utilisation du triphosgène, l'amine **81** a été activée sous forme de *N*-hydroxysuccinimidyl carbamate **85** par l'utilisation du *N*,*N*'-disuccinimidyl carbonate (DSC) dans un mélange acétonitrile/diméthylformamide, en chauffant le milieu à 70 °C pendant 30 min. Après l'activation de **81**, l'amine **8** a été ajoutée et le milieu réactionnel a été chauffé à 90 °C pour 1 heure additionnelle. La voie de synthèse utilisant le DSC a permis la formation de l'urée **73** avec un rendement de 36 %. Cet agent de couplage est une alternative à l'utilisation combinée du *N*-hydroxysuccinimide (NHS) et du dicyclohexylcarbodiimide (DCC), utilisée communément dans la synthèse d'esters et d'urées.[173]

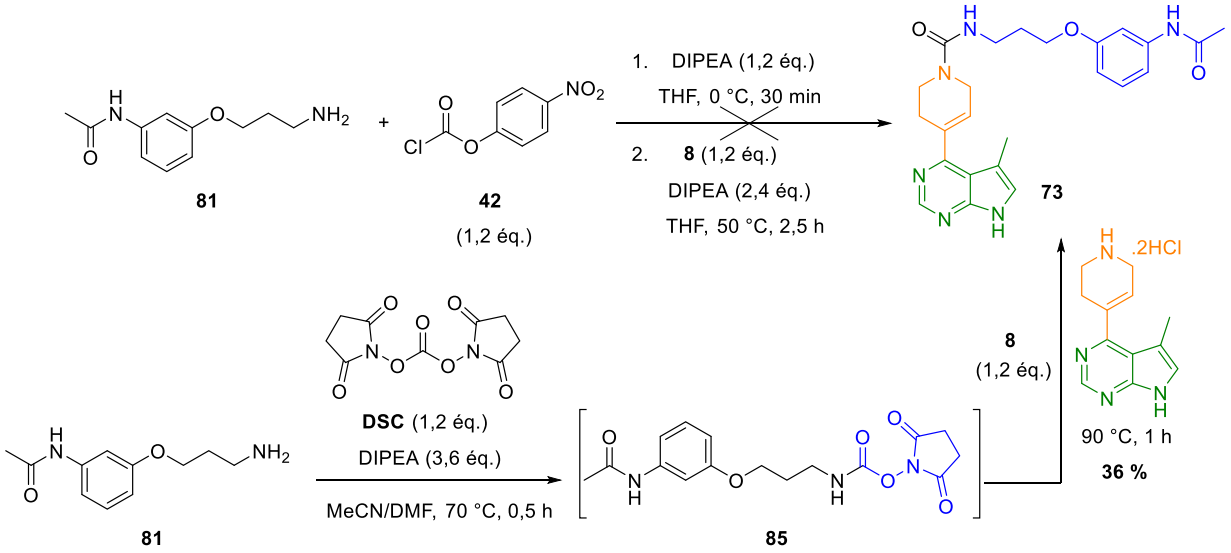
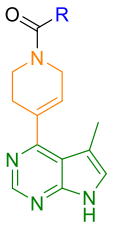
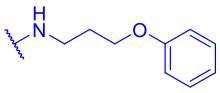


*Schéma 14 : Formation de l'urée **73** par une activation au DSC après l'échec du carbamate.*

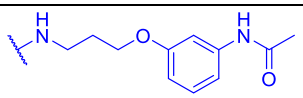
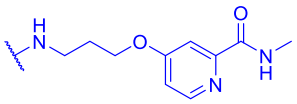
L'évaluation *in vitro* des 3 composés **72**-**74**, compilée dans le Tableau 8, montre une chute drastique des affinités pour les LIMKs, dépassant le seuil du micromolaire pour certains. Ces données nous indiquent que, contrairement à notre hypothèse de départ, le premier cycle aromatique de l'aniline est un élément important du pharmacophore.

*Tableau 8 : Évaluation in vitro des composés de type alkyloxyaryle **72**-**74**.*



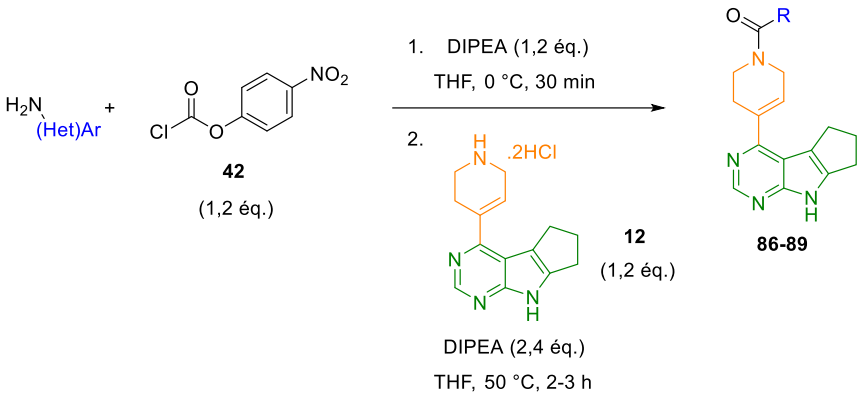
Entrée	Composé		Ki (LIMK1)	Ki (LIMK2)	% inhibition (à 1 µM)	
	R =	N°	(nM)	(nM)	ROCK1	ROCK2
1		**72**	213	728	44	45

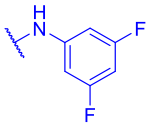
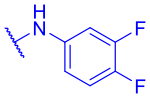
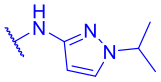
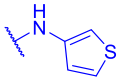
[173] Morpurgo, M.; Bayer, E. A.; Wilchek, M. *J. Biochem. Biophys. Methods* **1999**, *38* (1), 17–28.

2		**73**	806	1390	8	24
3		**74**	1120	1370	4	9

Si le premier cycle aromatique de l'aniline est primordial, alors l'amélioration des propriétés physiques d'absorption telle que la lipophilie doit prendre en compte la présence de ce cycle. Ainsi, dans la série de plateformes tricycliques, nous avons souhaité améliorer la lipophilie par la difluoration de l'aniline en positions 3,5 (**86**; Tableau 9, entrée 1) et en positions *C*-3,4 (**87**; Tableau 9, entrée 2). Par ailleurs, la nature du cycle aromatique de l'aniline a été changée en pyrazole **88** (Tableau 9, entrée 3) et en son bioisostère thiophène **89** (Tableau 9, entrée 4) afin d'évaluer l'effet de cycles hétéroaromatiques sur les affinités (Tableau 9).

*Tableau 9 : Synthèse et résultats biologiques des composés **86-89**.*



Entrée	Composé		Rdt	Ki (LIMK1) (nM)	Ki (LIMK2) (nM)	% inhibition (à 1 µM)	
	R =	N°				ROCK1	ROCK2
1		**86**	67 %	**18**	108	7	2
2		**87**	67 %	**28**	114	2	4
3		**88**	60 %	326	392	6	1
4*		**89**	70 %	**7**	**47**	3	-2

*Obtenu par réaction entre **12** et le 3-isocyanatothiophène dans le DCM à 0 °C pendant 1 h.

La base tricyclique permet une bonne sélectivité des composés vis-à-vis des ROCKs ainsi que de bonnes affinités sur LIMK1 pour **86** et **87** (entrées 1 et 2). Étonnamment, une discrimination de LIMK1 et LIMK2 est marquée par **86** et **87**, avec des valeurs dépassant la centaine de nanomolaires sur LIMK2. La molécule **88** (entrée 3) comporte un motif pyrazine décrit dans un nouvel inhibiteur dual de LIMK et Aurora en 2022 par Rybin *et al.*[113113] Ce composé ne présente pas de bonnes affinités pour LIMK avec des valeurs dépassant 300 nM tandis que le motif thiophène **89** (entrée 4) passe sous le seuil de 50 nM pour LIMK2 et

en dessous de 10 nM pour LIMK1. Ainsi, ce dernier composé a été sélectionné pour passer à la phase de tests biologiques suivante.

b) Remplacement du 2nd cycle aromatique par une chaîne aliphatique

Après avoir démontré que le 1er cycle aromatique est un pharmacophore et donc non remplaçable, nous avons décidé d'adopter la même idée que précédemment en remplaçant cette fois-ci le 2nd cycle aromatique par une chaîne aliphatique. En première intention, des cycles aliphatiques avec de fortes densités électroniques telles que des pipérazine, pipéridine ou difluorocyclohexane ont été positionnés à une distance variable d'un à trois atomes de carbones. La présence d'amines tertiaires permet une meilleure solubilité aqueuse de nos composés. De plus, en nous basant sur les très bons résultats obtenus par la présence de groupes DALH dans les composés **59**(**RB117**) et **58** (Tableau 5, page 51), nous avons décidé de remplacer le 2nd cycle aromatique par une chaîne propyle comportant une amine protégée par un carbamate (NHBoc) en fin de chaîne. L'accès aux différentes anilines s'est effectué à partir des nitroaryles correspondants, obtenus *via* deux voies de synthèse distinctes (Schéma 15).

La première voie (Schéma 15) est une réaction de Williamson entre le 3-nitrophénol **90** et le dibromoéthane ou le dibromopropane pour obtenir les halogénures d'alkyle correspondants **91** et **92**.[174174] La substitution nucléophile du brome par la *N*-méthylpipérazine **93** a permis l'obtention des composés nitroaryles **94** et **95** avec de bons rendements proches de 85 %.

La deuxième voie de synthèse (Schéma 15) mène directement aux composés nitrés souhaités par une réaction de Mitsunobu entre le 3-nitrophénol **90** et l'alcool primaire correspondant en présence de triphénylphosphine (PPh_3) et de l'azodicarboxylate de diisopropyle (DIAD), afin d'obtenir les dérivés **96** et **97** avec de très bons rendements de 89 et 96 %.

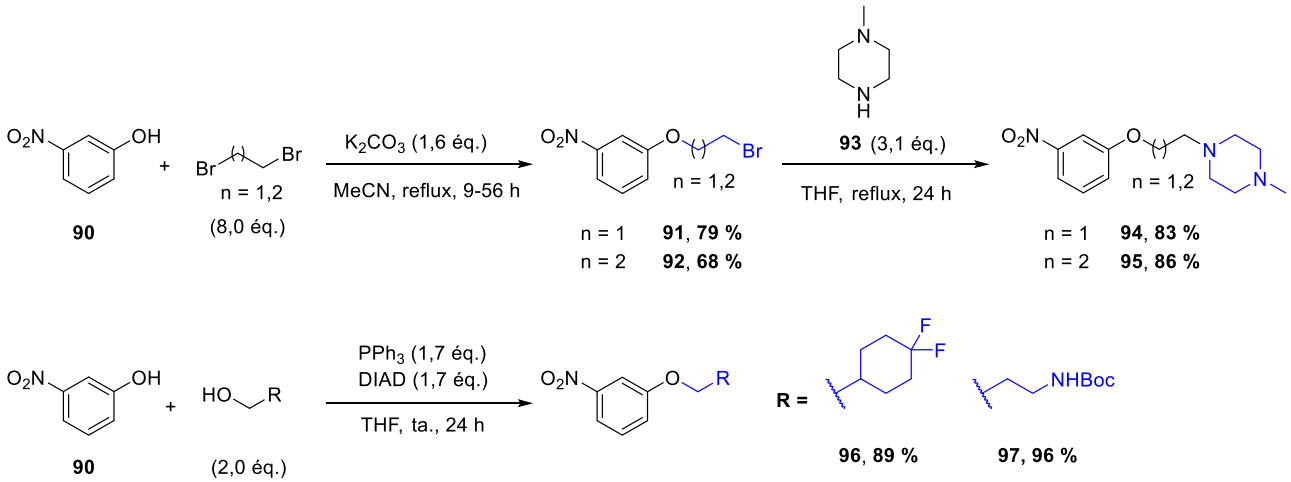


*Schéma 15 : Synthèses des précurseurs nitroaryles **94**-**97**.*

Cependant, l'application de ces mêmes conditions de Mitsunobu avec le 1-méthyl-4-pipéridineméthanol **98** n'a pas permis d'obtenir le composé souhaité **99** (Schéma 16). À la différence des deux autres alcools utilisés, celui-ci présente une amine tertiaire qui semblerait empêcher la formation du produit. Afin de contourner ce problème, l'amine protégée **100** et le 3-nitrophénol **90** ont été couplés avec succès par une réaction de Mitsunobu en présence du couple de réactifs PPh_3/DIAD. La déprotection de l'intermédiaire formée a permis d'obtenir la pipéridine **101** sous forme de base libre, avec un rendement de

[174] Kawamoto, M.; Shiga, N.; Takaishi, K.; Yamashita, T. *Chem. Commun.* **2010**, *46* (44), 8344.

27 % sur 2 étapes. L'intermédiaire **101** a ensuite été méthylé par une réaction d'Eschweiler-Clarke aux micro-ondes en présence de formaldéhyde et d'acide formique à 90 °C en 20 min[175] pour obtenir la molécule **99** avec un rendement de 90 %. Aucune conversion n'est observée sur cette dernière étape si l'amine **101** est utilisée sous forme de sel chlorhydrate.

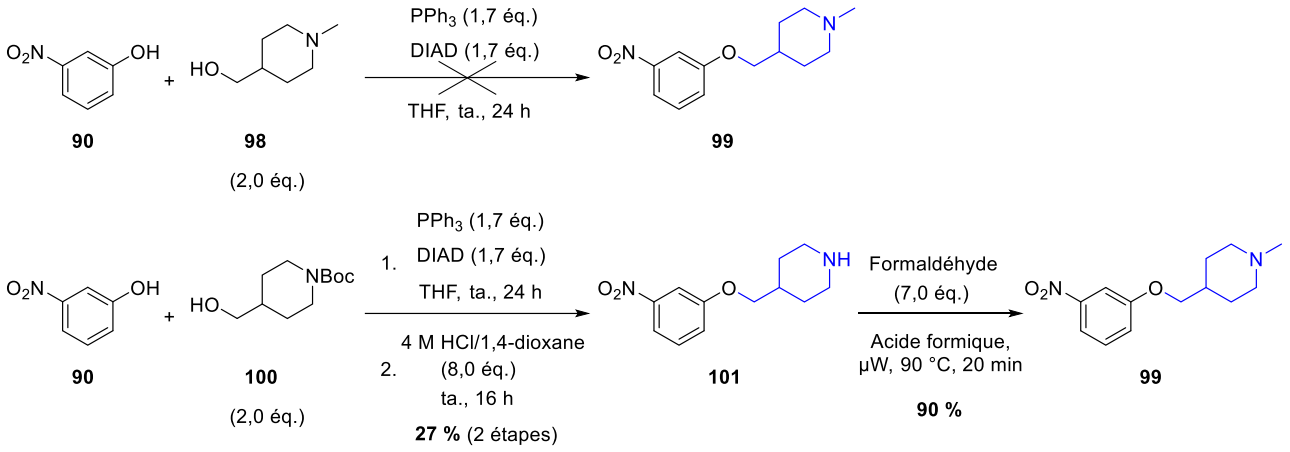


*Schéma 16 : Synthèse du nitroaryle **101**.*

D'autre part, l'amine **97** préalablement obtenue a été déprotégée en milieu acide menant au composé **102** (Schéma 17). Cette amine primaire a été utilisée par la suite comme plateforme de synthèse pour donner accès aux molécules **103** (acétylée) et **104** (mésylée), soit porteuses de deux groupements DALH.

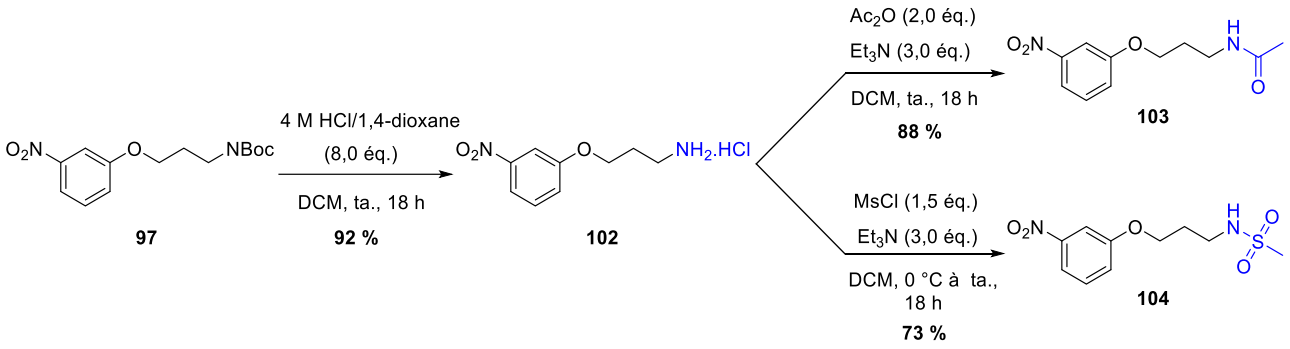


*Schéma 17 : Modulation de l'amine **102** en acétate **103** et en méthylsulfonamide **104**.*

Des amines tertiaires ont également été insérées sur la chaîne propyle, toujours dans l'idée d'améliorer la solubilité de nos composés avec des groupements hydrophiles. Pour cela, le bromure d'alkyle **92** a servi de plateforme synthétique sur laquelle a été greffée la diméthylamine[176] (**105** - amine tertiaire peu encombrée), mais également la pyrrolidine (**106** - petite amine tertiaire cyclique). La pyrrolidine fluorée racémique **107** ainsi que ses couples d'énantiomères **108** (*R*) et **109** (*S*) ont été synthétisés en conséquence pour permettre de décroitre la lipophilie des composés grâce à la présence du fluor.

[175] Marzaro, G.; Guiotto, A.; Pastorini, G.; Chilin, A. *Tetrahedron* **2010**, *66* (4), 962–968.
[176] Lan, J. S.; Pan, L. F.; Xie, S. S.; Wang, X. B.; Kong, L. Y. *MedChemComm* **2015**, *6* (4), 592–600.

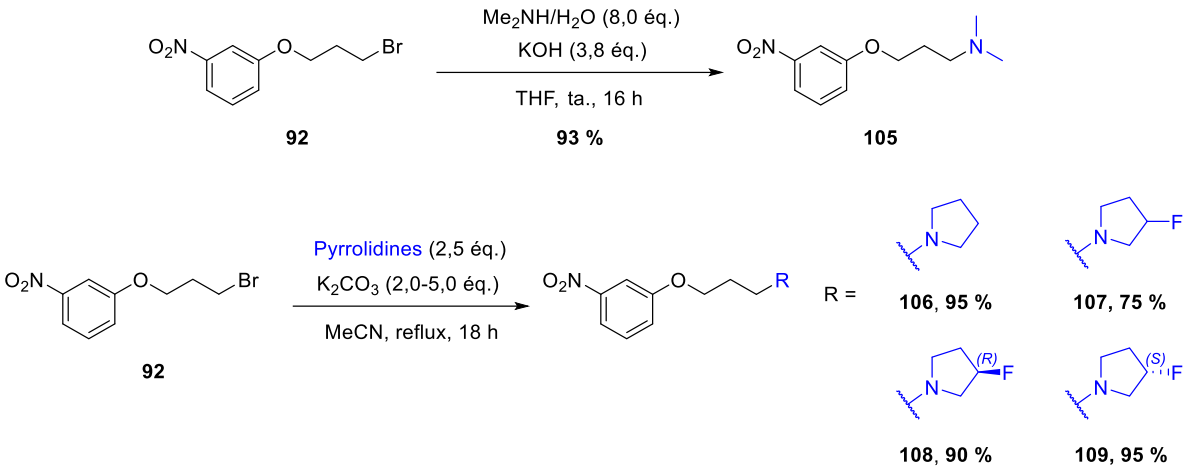


*Schéma 18 : Voie de synthèse des amines tertiaires à partir de l'halogénure d'alkyle **92**.*

Ainsi, la réduction des fonctions nitro en amine a été réalisée pour chaque composé. Pour cela, une hydrogénation à pression atmosphérique catalysée par du palladium sur charbon (10 %) a été une méthode rapide et propre pour obtenir les anilines correspondantes **110-121** (Schéma 19).

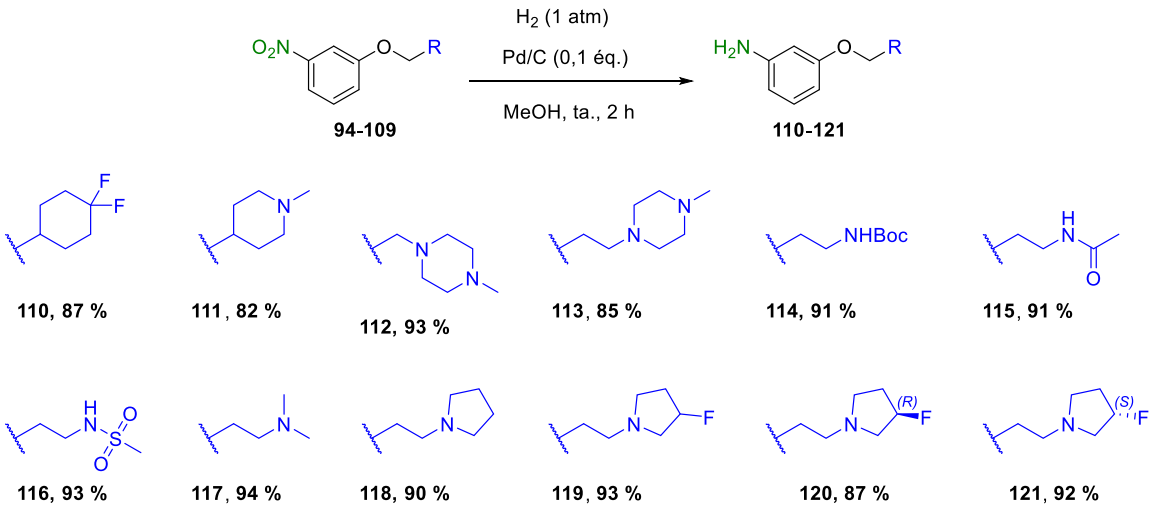
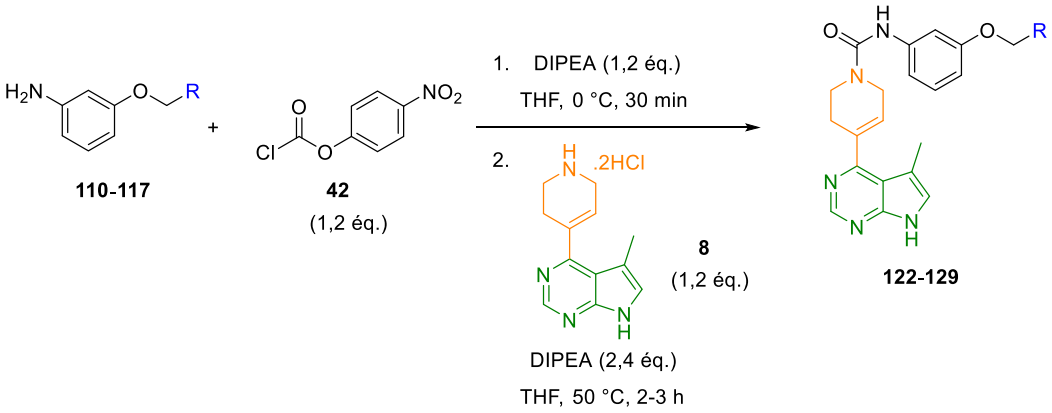
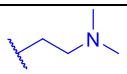
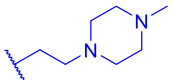
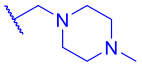
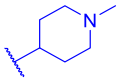
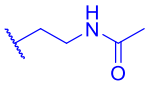
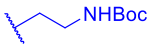
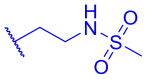


*Schéma 19 : Hydrogénation des nitroaryles **94-109** en anilines **110-121**.*

Comme précédemment, la base hétérocyclique méthylée **8** a dans un premier temps été utilisée dans l'étape finale de formation de l'urée pour obtenir les produits **122-129** afin d'évaluer les affinités des composés monoarylés pour les LIMKs (Tableau 10).

*Tableau 10 : Synthèse et résultats biologiques des composés finaux **122-129** monoarylés avec une base pyrrolopyrimidine méthylée.*



Entrée	Composé		Rdt	Ki (LIMK1) (nM)	Ki (LIMK2) (nM)	% inhibition (à 1 µM)	
	R =	N°				ROCK1	ROCK2
1		**122**	22 %	1620	951	77	60
2		**123**	22 %	669	863	99	97
3		**124**	15 %	710	1470	87	78
4		**125**	34 %	174	189	99	93
5		**126**	59 %	**86**	328	72	57
6		**127**	57 %	451	**66**	57	45
7		**128**	57 %	**65**	**51**	48	33
8		**129**	67 %	**42**	**25**	67	54

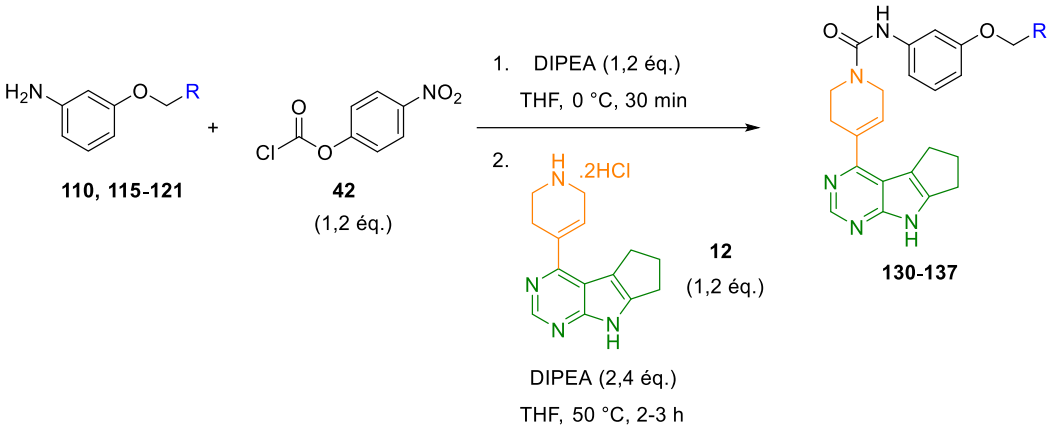
Le composé **122** (entrée 1) comportant une diméthylamine présente une chute d'affinités pour les LIMKs, les valeurs dépassant le micromolaire. Cette baisse d'affinité se poursuit avec des composés basiques et riches en électrons comme les méthylpipérazines **123** et **124** (entrées 2 et 3). Lorsque la méthylpipéridine (cycle légèrement plus hydrophobe que la pipérazine) a été insérée, un gain d'affinité a été observé, avec des Ki avoisinant les 200 nM pour le composé **125** (entrée 4).

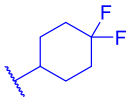
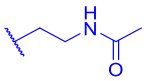
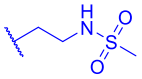
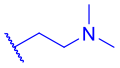
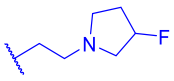
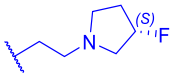
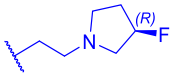
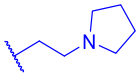
Les groupements hydrophobes et riches en électrons semblent mieux tolérés dans les poches des sites actifs. Les RSA ont donc été poursuivies en remplaçant la pipéridine par le difluorocyclohexane (**126**, entrée 5), cycle hydrophobe et riche en électrons, présentant une activité sous les 100 nM sur LIMK1. De plus lorsqu'un groupe DALH comme l'acétamide est introduit (**127**, entrée 6), un gain d'affinité pour LIMK2 est obtenu avec un Ki de 66 nM. Nous avons donc décidé de combiner ces deux résultats et d'insérer des groupements DALH, riches en électrons et porteurs d'une partie hydrophobe. Ainsi les composés **128** et **129** ont été synthétisés avec la présence des groupes Boc et méthylsulfonamide respectivement (entrées 7 et 8). De très bonnes valeurs d'affinité ont été observées pour ces deux composés et notamment pour le

méthylsulfonamide avec des Ki compris entre 25 et 42 nM. L'acidité de l'hydrogène porté par l'atome d'azote semble être en lien avec ces gains d'affinités, puisqu'elle est plus grande pour un sulfonamide (~ 17,5) que pour un amide (~ 25). Les liaisons hydrogène entre le sulfonamide **129** et des résidus accepteurs de liaisons hydrogène (aspartate, glutamate, lysine, etc…) seront donc plus efficaces qu'avec l'acétamide **127** ou le carbamate **128**.

Ainsi, 4 composés avec des affinités inférieures à 100 nM sur une des LIMKs (**126**-**129**; Tableau 10, entrées 5-8) ont été convertis en analogue tricyclique (**130**-**133** ; Tableau 11, entrées 1-4) à partir des anilines (**110**, **115**-**117** ; Schéma 19) et de la plateforme tricyclique **12**. Leurs résultats biologiques ainsi que les RSA qui en découlent ont été combinés dans le Tableau 11.

*Tableau 11 : Synthèse et résultats biologiques des composés finaux **130**-**137** monoarylés en base tricyclique.*



Entrée	Composé		Rdt	Ki (LIMK1) (nM)	Ki (LIMK2) (nM)	% inhibition (à 1 µM)	
	R =	N°				ROCK1	ROCK2
1		**130**	84 %	58	296	2	0
2		**131**	50 %	15	11	6	5
3		**132**	65 %	4	9	8	7
4		**133**	27 %	76	247	9	9
5		**134**	35 %	15	118	16	6
6		**135**	50 %	24	98	11	9
7		**136**	43 %	17	122	10	9
8		**137**	33 %	36	139	6	8

Un gain très important des affinités pour les LIMK a été observé avec les composés **131** et **132** (entrées 2 et 3), les valeurs passant sous la barre des 20 nM et même sous celle des 5 nM avec la sulfonamide

132. La base tricyclique semble non seulement améliorer la sélectivité vis-à-vis des ROCKs mais aussi modifier les interactions des composés dans les sites actifs. Ainsi, le difluorocyclohexane **130** (entrée 1) possède des constantes d'inhibition plus faibles que son analogue **126** (Tableau 10, entrée 5). Par conséquent, il a été décidé de le remplacer par un cycle plus petit, mais avec une densité électronique élevée telle qu'une 3-fluoropyrrolidine. Le composé racémique **134** ainsi que ses énantiomères **135** (*S*) et **136** (*R*) ont démontré de très bonnes affinités sur LIMK, sans réelle différence entre les énantiomères (entrées 5-7). Cependant, lorsque la densité électronique est diminuée et que des amines tertiaires telles que la pyrrolidine (**137**) et la diméthylamine (**133**) sont insérées, une perte d'affinité est observée (entrées 8 et 4).

En conclusion de cette série d'anilines monoarylées, la présence d'un bras espaceur de 3 atomes de carbones ainsi que des groupements riches en électrons, DALH et hydrophobes sont des paramètres clés dans les urées qui ont permis d'avoir accès à des inhibiteurs des LIMKs sélectifs en s'affranchissant du 2nd cycle aromatique. Six composés (**128**, **126**, **131**, **132**, **134**, **137**) ont été sélectionnés dans cette série pour continuer les tests biologiques cellulaires, et notamment sur la cofiline (substrat des LIMKs). Ces résultats seront présentés au chapitre 2.

3. Changements de structure par la modélisation moléculaire et les données cristallographiques

a) Résultats cristallographiques et modélisation moléculaire

On peut remarquer que la sélectivité vis-à-vis des ROCKs de nos inhibiteurs se fait grâce à la présence de la base tricyclique, malgré les inconvénients de solubilité de ces derniers. La solubilité peut être retrouvée avec des fonctions hydrophiles, protonables ou déprotonables, comme vue précédemment. Une connaissance plus poussée des interactions de nos inhibiteurs dans les sites actifs des LIMKs pourrait aider au développement de composés ciblant plus sélectivement les LIMKs. C'est pourquoi, 4 composés dont **AC429** ont été co-cristallisés dans les sites actifs de LIMK1 ou LIMK2 par l'équipe du Pr Knapp et du Dr Mathea de l'Université Goethe de Francfort, à qui j'adresse mes remerciements. Les données cristallographiques de **AC429** dans le site actif de LIMK1 ont mis en évidence une poche située au niveau de l'oxygène du phénoxyle (Figure 33).

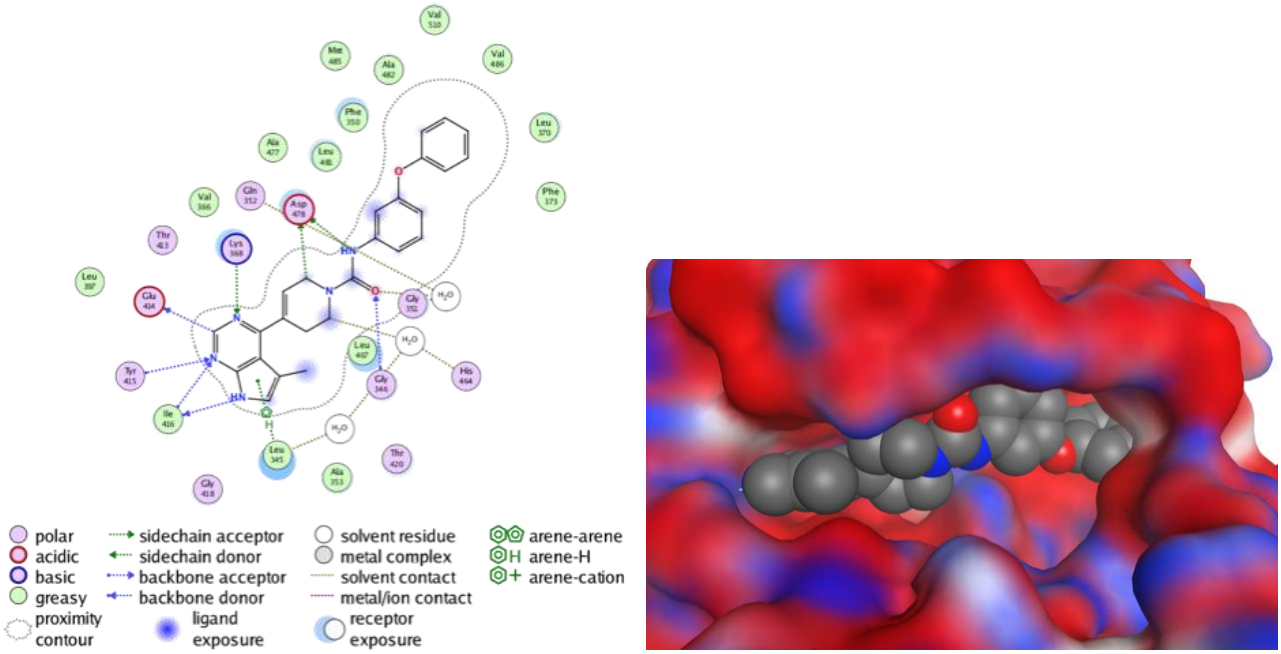


*Figure 33 : Co-cristallisation du composé **AC429** dans le site actif de LIMK1.*

Afin d'interagir avec les résidus de cette nouvelle poche, nous avons décidé de remplacer l'oxygène entre les deux cycles par un azote fonctionnalisé par divers groupes (méthyle, acétyle, phényle etc.).

b) Synthèse d'urées de type diphénylamine

La N^1,N^1-diméthylbenzène-1,3-diamine **138** a été obtenue par hydrogénation catalytique de la *N*,*N*-diméthyl-3-nitro-aniline **139** en présence de palladium sur charbon (10 %) (Schéma 20). Un faible rendement de 20 % a été obtenu après purification sur colonne suite à la formation de plusieurs produits secondaires, probablement due au caractère basique de la diméthylamine en position *C*-3. L'aniline acétylée **140** a été obtenue selon le même protocole d'hydrogénation à partir du nitroaryle **141**, lui-même préparé à partir de la 3-nitroaniline **142**.

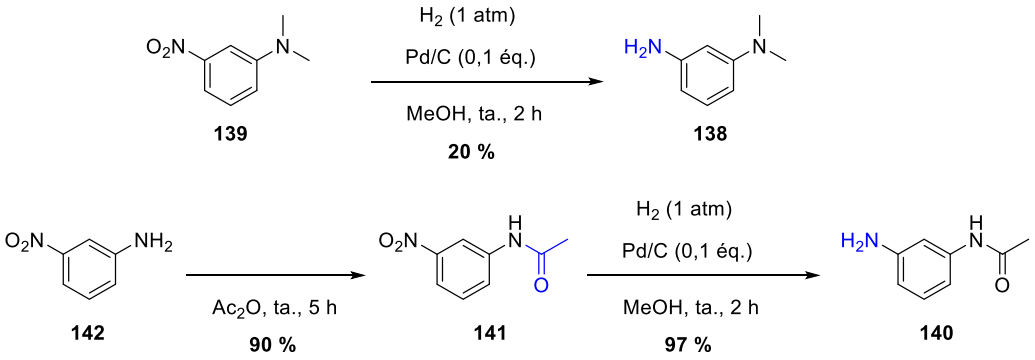


*Schéma 20 : Synthèse des anilines **138** et **140** par hydrogénation.*

Les synthèses des composés *N*-phényl-1,3-benzènediamine **143** et *N*-méthyl-*N*-phénylbenzène-1,3-diamine **144** ont été réalisées par un couplage de Buchwald-Hartwig entre le 1-chloro-3-nitrobenzène **145** et l'aniline ou la *N*-méthylaniline (Schéma 21). Dans les conditions décrites par l'équipe de Buchwald,[177] de très faibles charges de catalyseur Pd_2dba_3 (0,5 mol%) et de ligand XPhos (2,0 mol%) ont été utilisées, tandis que

[177] Huang, X.; Anderson, K. W.; Zim, D.; Jiang, L.; Klapars, A.; Buchwald, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (22), 6653–6655.

les solvants organiques usuels tels que le toluène ou le 1,4-dioxane ont été remplacés par l'eau. Il en résulte l'obtention des composés **146** et **147** avec d'excellents rendements de 90 %. La réduction de la fonction nitro en amine s'est effectuée par hydrogénation catalytique dans les mêmes conditions que précédemment pour mener aux anilines **143** et **144**.

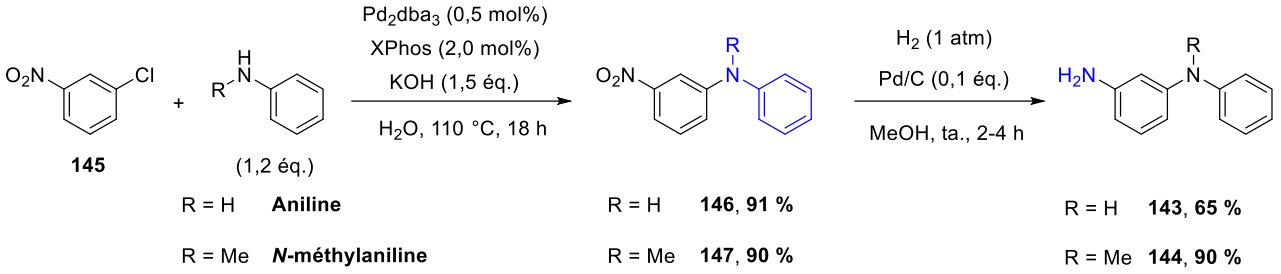


*Schéma 21 : Synthèse des N-phényl-1,3-benzènediamines **143** et **144** par couplage de Buchwald-Hartwig.*

L'exploration de la nouvelle poche a été poursuivie en diversifiant les groupes portés par l'amine située entre les deux phényles du composé **146**. Ainsi, un groupement riche en électrons et ALH tel que l'acétyle a été ajouté par acylation de l'aniline **146** avec du chlorure d'acétyle (Schéma 22). En raison de la faible nucléophilie de cette aniline, dont le doublet est partagé entre les deux cycles aromatiques, l'ajout d'une quantité catalytique de diiode a permis d'obtenir le composé **148** avec un excellent rendement de 91 %.[178178] Le diiode, en tant qu'acide de Lewis, se coordonne à l'oxygène du chlorure d'acétyle augmentant ainsi l'électropositivité du carbonyle et donc sa réactivité.[179,180] Une chaîne propyle avec une amine tertiaire a également été ajoutée pour créer des interactions avec un groupe ALH plus en profondeur dans la poche. Ainsi, le composé **149** a été synthétisé à partir de l'aniline **146,** par alkylation avec le chlorure de 3-(diméthylamino)propyle **150** en présence de NaH, avec un rendement de 88 %.[181] La réduction des composés nitrés **148** et **149** par hydrogénation catalytique en présence de palladium sur charbon (10 %) a mené aux anilines **151** et **152** avec de bons rendements de 86 % et 92 % respectivement.

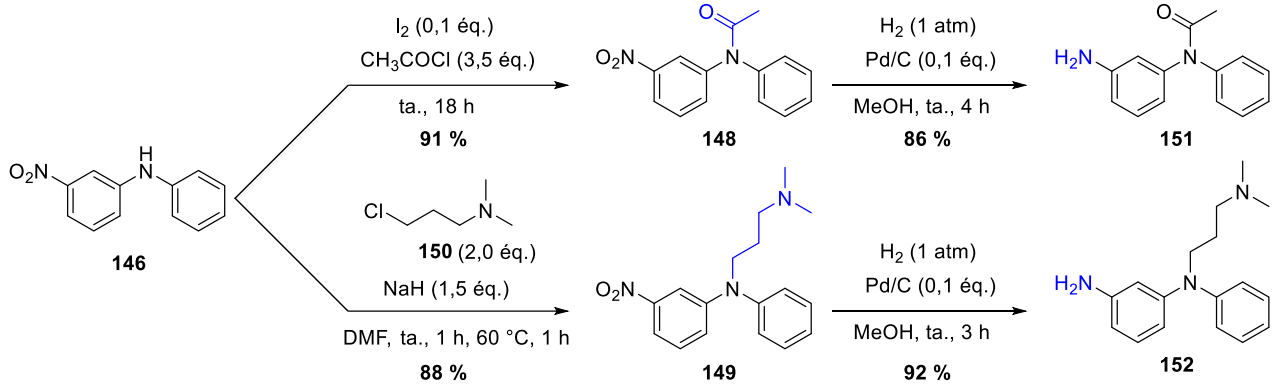


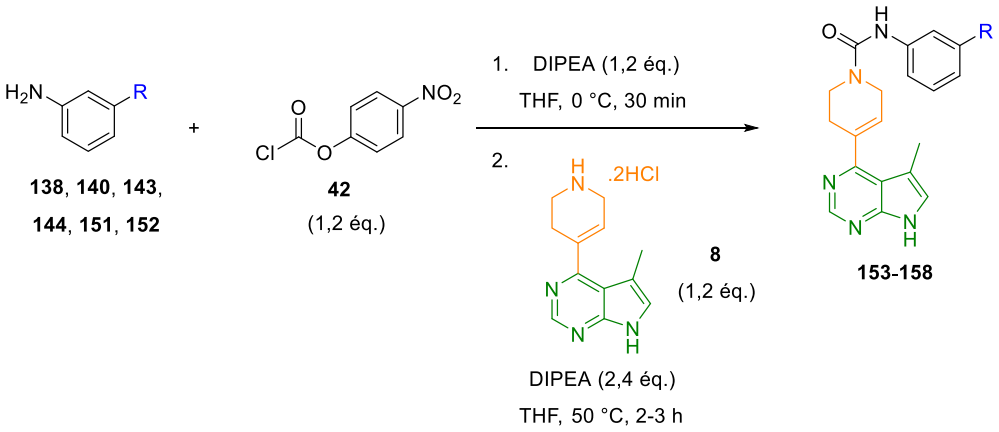
*Schéma 22 : Voies de synthèses des anilines **151** et **152** à partir de l'intermédiaire **146**.*

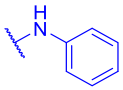
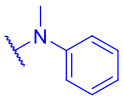
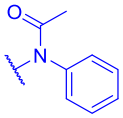
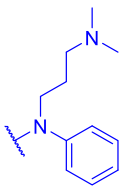
La dernière étape de formation de l'urée s'est effectuée uniquement sur la plateforme hétérocyclique méthylée **8** puisque l'objectif à ce stade était d'explorer la poche tout en gagnant en solubilité et donc, de s'affranchir de l'utilisation de la base tricyclique. Nous avons pensé que ces changements permettraient un gain de sélectivité par la substitution du 1,3-benzènediamine et les interactions spécifiques

[178] Phukan, K.; Ganguly, M.; Devi, N. *Synth. Commun.* **2009**, *39* (15), 2694–2701.
[179] Biswas, A.; Shogren, R. L.; Willett, J. L. *Biomacromolecules* **2005**, *6* (4), 1843–1845.
[180] Breugst, M.; von der Heiden, D. *Chem. - Eur. J.* **2018**, *24* (37), 9187–9199.
[181] Moffett, R. B. *J. Heterocycl. Chem.* **1980**, *17* (2), 341–350.

ainsi créées avec la nouvelle poche trouvée dans LIMK1 par co-cristalisation. Les résultats biologiques et les rendements de l'étape de formation des urées **153-158** sont récapitulés dans le Tableau 12.

*Tableau 12 : Synthèse et évaluations biologiques des composés diaminés **153-158**.*

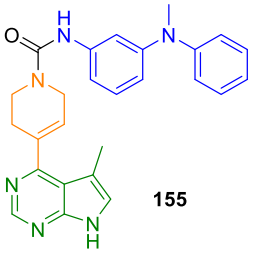


Entrée	Composé		Rdt	Ki (LIMK1) (nM)	Ki (LIMK2) (nM)	% inhibition (à 1 µM)	
	R =	N°				ROCK1	ROCK2
1		**153**	78 %	116	428	**34**	**26**
2		**154**	37 %	186	181	98	95
3		**155**	79 %	**29**	**31**	62	41
4		**156**	69 %	**35**	61	**25**	**13**
5		**157**	73 %	293	172	**23**	**15**
6		**158**	20 %	763	**37**	**31**	**29**

La présence des méthyles hydrophobes sur **153** (entrée 1), entraîne des affinités moyennes de 116 et 428 nM pour LIMK1 et LIMK2. Cependant, on note une certaine sélectivité par rapport aux ROCKs autour de 30 % d'inhibition à 1 µM. La présence d'un groupe plus riche en électrons et ALH, comme l'acétamide **154** (entrée 2), n'a cependant pas d'impact significatif : les affinités pour les LIMKs sont supérieures à 180 nM, et aucune sélectivité pour les ROCKs n'est observée.

L'ajout d'un groupement phényle sur l'aniline (**155**, entrée 3) améliore quant à lui grandement les affinités avec des Ki pour LIMK1 et LIMK2 de 29 et 31 nM respectivement. Les affinités de **155** se révèlent être 3 fois plus élevées que celle de son analogue, le composé phare **AC429** (avec un oxygène à la place de l'azote). La présence d'une amine dans cette position est donc bien supportée dans les sites actifs des LIMKs.

L'ajout d'un méthyle sur cette amine (**156**, entrée 4) permet de garder de bonnes affinités entre 35 et 61 nM et apporte aussi une certaine sélectivité, avec des valeurs d'inhibition des ROCKs inférieures à 25 %. Un *docking* de la molécule **155** dans le site actif de LIMK1, réalisé par le Dr Aouidate de l'équipe SB&C de l'ICOA, indique que le méthyle se positionne dans la poche profonde du site actif, comme désiré (Figure 34).



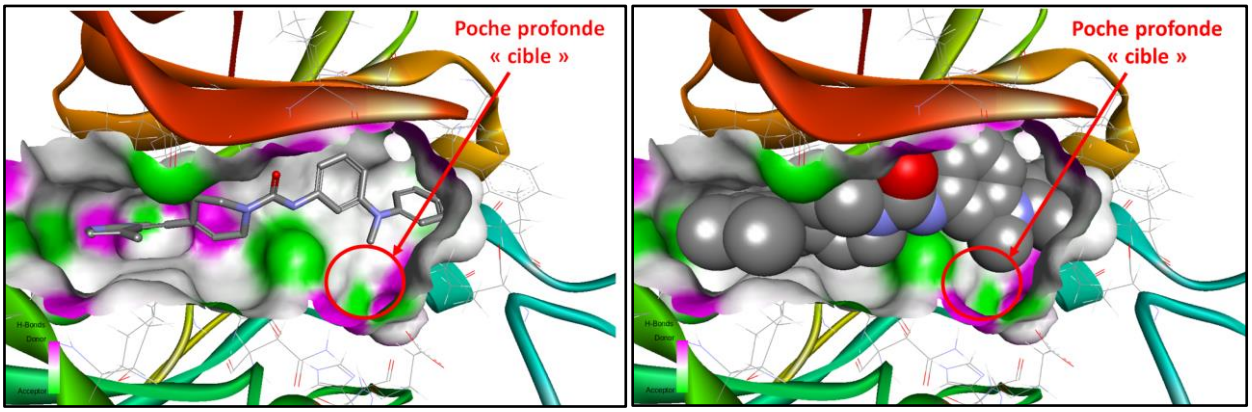


*Figure 34 : Modélisation du composé **155** dans le site actif de LIMK1. À gauche, représentation sous forme de bâtonnets; à droite, représentation de nuages électroniques de chaque atome. Les zones riches en résidus DLH sont marquées en rose et les zones riches en résidus ALH sont marquées en vert.*

La représentation sous forme de nuages électroniques des atomes permet d'avoir une vue plus pertinente de la place occupée par la molécule **155** dans le site actif. On remarque que le méthyle porté par l'aniline rentre en profondeur dans la poche. Les résultats de sélectivité combinés à la modélisation sont en accord avec notre postulat de départ qui était d'occuper cette poche pour gagner en sélectivité vis-à-vis d'autres kinases telles que les ROCKs.

Par conséquent, l'exploration a continué en augmentant la taille et la nature des groupes. Avec la présence de résidus DLH dans le col de la poche, il a été imaginé de placer un groupement accepteur de liaison hydrogène comme l'acétamide de **157** (Tableau 12-page 68, entrée 5). Même si la sélectivité est conservée, les affinités pour les LIMKs chutent au-delà des 160 nM. Une gêne stérique et un manque de flexibilité de la chaîne (hybridation sp^2 du carbonyle) pourraient en être la raison. Par conséquent, une chaîne alkyle plus longue a remplacé le carbonyle. Le fond de la poche étant lui aussi composé de résidus DLH, une amine tertiaire a été insérée au bout de la chaîne alkyle afin de favoriser ces interactions. Le composé **158** (Tableau 12, entrée 6) a de ce fait été synthétisé avec une chaîne propyle et une diméthylamine terminale en tant que groupement ALH. La sélectivité est à nouveau présente, mais une chute importante d'affinité pour LIMK1 a été observée avec un Ki de 763 nM contre seulement 37 nM pour LIMK2. Une discrimination nette d'un facteur de 28 a pour la première fois été obtenue en faveur de LIMK2 avec le composé **155**.

En conclusion de cette partie, concentrée sur l'optimisation des inhibiteurs des LIMKs par modulation de l'aniline de l'urée, 49 nouveaux composés ont été synthétisés. Vingt-quatre molécules ont été sélectionnées pour des tests biologiques plus poussés comme les tests d'inhibition de la phosphorylation de

la cofiline ou de migration cellulaire (*wound healing*) jusqu'à la phase de tests *in vivo* pour les meilleures d'entre elles. Tout ceci sera expliqué au chapitre 2.

Après avoir concentré nos efforts de synthèse sur l'optimisation des anilines de l'urée, nous nous sommes intéressés à la modification du cycle central de nos inhibiteurs dans le but d'améliorer les affinités de nos composés pour les LIMKs.

II – Modulation structurelle du cycle central

1. Introduction d'un cycle acide aminé

a) Rappels bibliographiques

La synthèse d'inhibiteurs des LIMKs de type pyrrolopyrimidine tel que **2** décrit en 2009 par Lexicon Pharmaceuticals a ouvert la voie à une optimisation du squelette et notamment du cycle central. Ainsi, en 2015, Lexicon Pharmaceuticals a décrit un nouveau type d'inhibiteurs après avoir remplacé le cycle central de type pipérazine par un acide aminé pipéridinique. Leur objectif était de remplacer la fonction urée, insuffisamment stable dans leurs formulations aqueuses (traitement du glaucome par gouttes oculaires), par une fonction isostère amino-acide (Figure 35). Le composé **LX7101** a ainsi présenté de bonnes propriétés physico-chimiques et de bonnes activités sur les LIMKs pour atteindre la phase II des essais cliniques sur l'Homme. En s'appuyant sur ces résultats prometteurs, la société Amakem Therapeutics a continué l'optimisation de composés pyrrolopyrimidine comportant un cycle acide aminé en décrivant les composés **159** et **160** [156,157] (Figure 35).

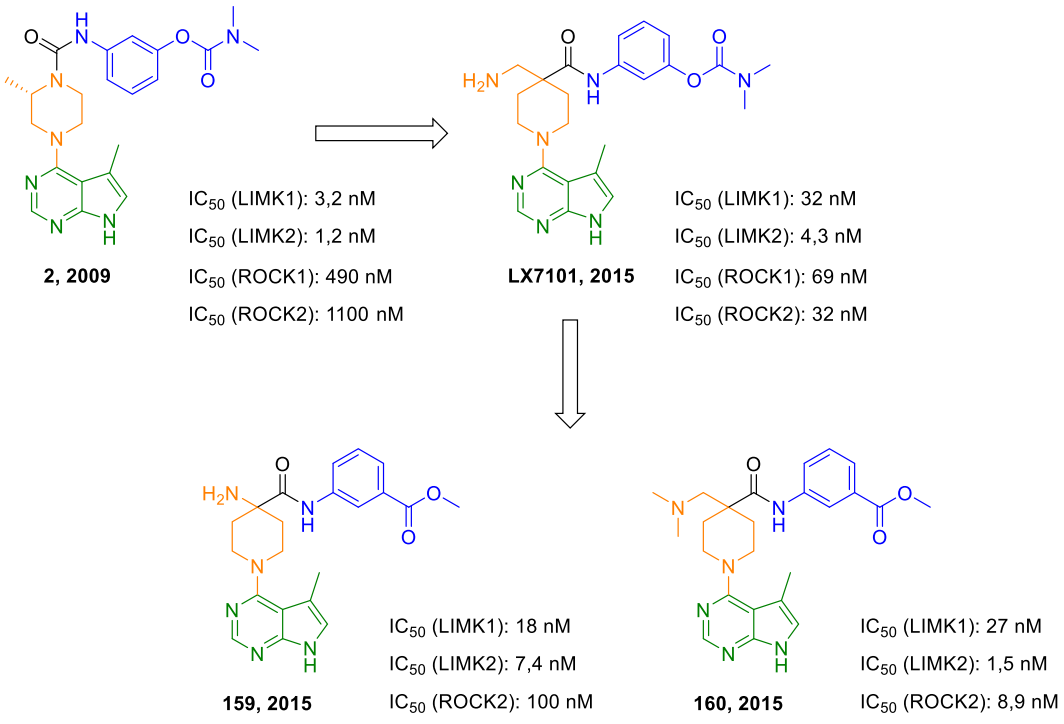


Figure 35 : Changement du cycle central pipérazine par un cycle amino-acide.

En nous appuyant sur ces résultats, nous avons décidé de remplacer le cycle 3,6-dihydropyridine de nos inhibiteurs par des dérivés de l'acide 1-aminocyclohex-3-ène-1-carboxylique, tout en gardant la base pyrrolopyrimidine méthylée (Figure 36). Une diversité moléculaire sera amenée avec l'utilisation des meilleures anilines obtenues jusqu'ici.

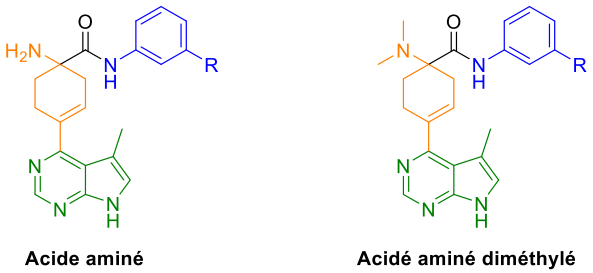


Figure 36 : Structure des inhibiteurs de la série "acide aminé".

b) Rétrosynthèse des inhibiteurs dérivés d'acide aminé

Un schéma rétrosynthétique a été élaboré pour mener à la synthèse des molécules cibles **I** et **II** à partir de l'acide aminé protégé méthyl 1-amino-4-oxocyclohexane-1-carboxylate **III** (Schéma 23). Après conversion de la cétone **III** en nonaflate **IV** puis en ester boronique **V**, un couplage de Suzuki-Miyaura permettrait de créer une liaison carbone-carbone entre la base hétérocyclique méthylée **9** et le carbocycle **V** pour obtenir le composé **VI**. L'ester **VI** devrait ensuite être saponifié en acide carboxylique **VII** avant d'introduire différentes anilines par un couplage peptique **VIII**. Le groupement protecteur de l'amine situé en α de l'acide carboxylique **VII** doit pouvoir résister aux conditions de saponification et devrait être enlevé après le couplage peptique pour donner une première série de composés ciblés **II**. Sur ces composés, une diméthylation par amination réductrice pourrait mener à la seconde série de composés **I**.

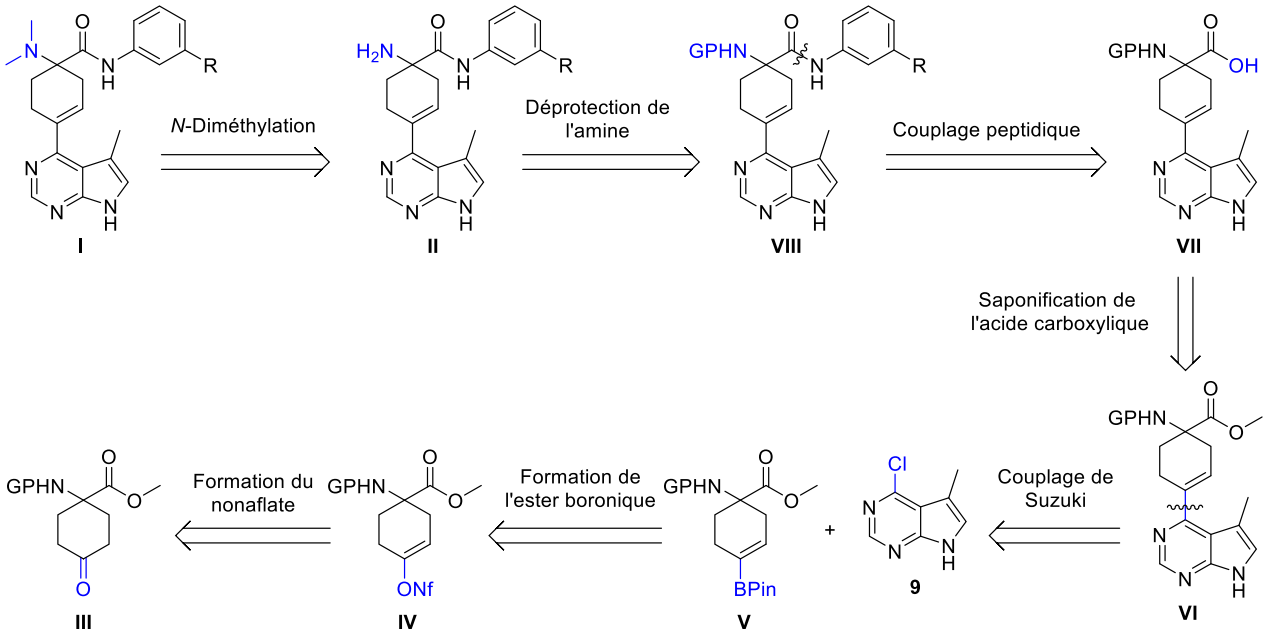


Schéma 23 : Rétrosynthèse des composés de type "acide aminé".

La synthèse de ces molécules composées d'un acide aminé inédit de type acide 1-amino-cyclohex-3-ène carboxylique demande au préalable la synthèse de l'acide aminé **III**.

c) Voie de synthèse de l'acide aminé protégé **III**

Il existe dans la littérature seulement 4 voies de synthèses de l'acide aminé **III**, qui diffèrent par le type de groupement protecteur de l'amine.

La première voie de synthèse de ce type de composé **III** a été décrite par Avenoza *et al.* en 1999, avec une amine protégée par un groupe acétyle **161** (Schéma 24).[182] Cette équipe a formé le méthyl 1-acétamido-4-oxocyclohex-2-ène-1-carboxylate **161** par une réaction de Diels-Alder entre le méthyl 2-acétamidoacrylate **162** et le diène de Danishefsky pour mener au composé cyclique insaturé **163** avec un rendement de 52 %. L'hydrogénation en présence de palladium sur charbon (10 %) a mené au produit désiré **161**.

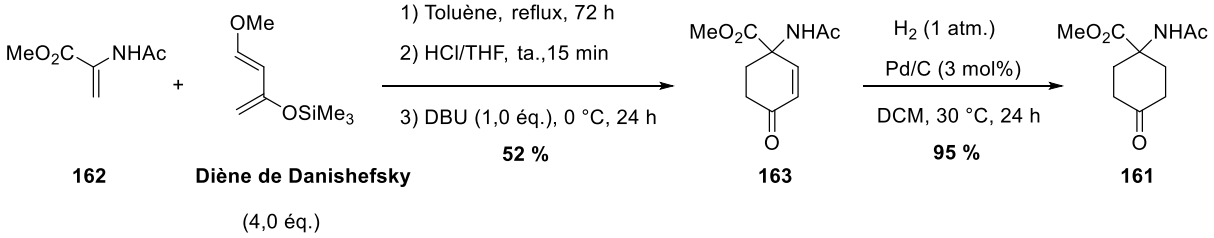


*Schéma 24 : Synthèse de l'acide aminé protégé par un groupe acétyle **161**, décrite par Avenoza et al. en 1999.*

Le diène de Danishefsky, décrit en 1974, est un diène couramment employé dans les réactions de Diels-Alder dû à sa forte réactivité engendrée par la présence des groupements méthoxyle et éther d'énol silylé.[183] La déprotection aisée en milieu acide de l'éther d'énol silylé favorise l'élimination du groupement méthoxyle et conduit ainsi à des composés de type cyclohexènone (Schéma 25).

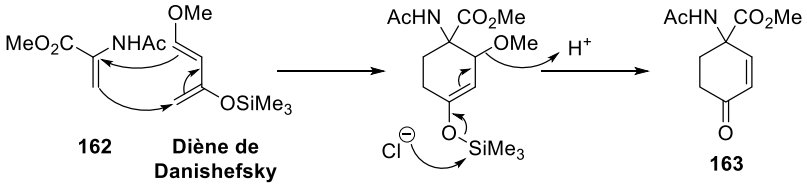


*Schéma 25 : Mécanisme réactionnel de la réaction de Diels-Alder en présence du diène de Danishefsky, suivie d'une élimination en milieu acide pour mener à la molécule **163**.[184]*

La deuxième voie de synthèse de composés similaires à **III** a été décrite de nouveau par la même équipe en 2001 (Schéma 26).[185] L'amine a été, cette fois-ci, protégée par un groupement benzoyle **164** au lieu de la fonction acétyle du composé **161**. Ces travaux décrivent 2 voies de synthèse du composé **165** par réaction de Diels-Alder. La première voie est similaire à celle décrite précédemment, avec une réaction entre le diène **164** et le diène de Danishefsky, suivie d'une hydrogénation de l'intermédiaire **166** pour conduire au dérivé **165**. Afin d'améliorer le rendement de la réaction de Diels-Alder et de réduire le nombre d'étapes, les auteurs ont décidé de remplacer le diène de Danishefsky dans la seconde voie de synthèse, par le 2-trimethylsilyloxy-1,3-butadiene **167**. Le manque de réactivité du diène, provoqué par l'absence du groupe méthoxyle (électrodonneur), a été comblé par l'ajout d'un acide de Lewis (ZnI_2) qui augmente la réactivité du diénophile **164**. Dans ces conditions, le composé **165** a pu être synthétisé avec un rendement de 94 %, tout en s'affranchissant de l'étape d'hydrogénation.

[182] Avenoza, A.; Cativiela, C.; Fernández-Recio, M. A.; Peregrina, J. M. *J. Chem. Soc. Perkin 1* **1999**, 22, 3375–3379.
[183] Danishefsky, S.; Kitahara, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96* (25), 7807–7808.
[184] Danishefsky, S.; Kitahara, T.; Yan, C. F.; Morris, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101* (23), 6996–7000.
[185] Avenoza, A.; Cativiela, C.; Busto, J. H.; Fernández-Recio, M. A.; Peregrina, J. M.; Rodríguez, F. *Tetrahedron* **2001**, *57* (3), 545–548.

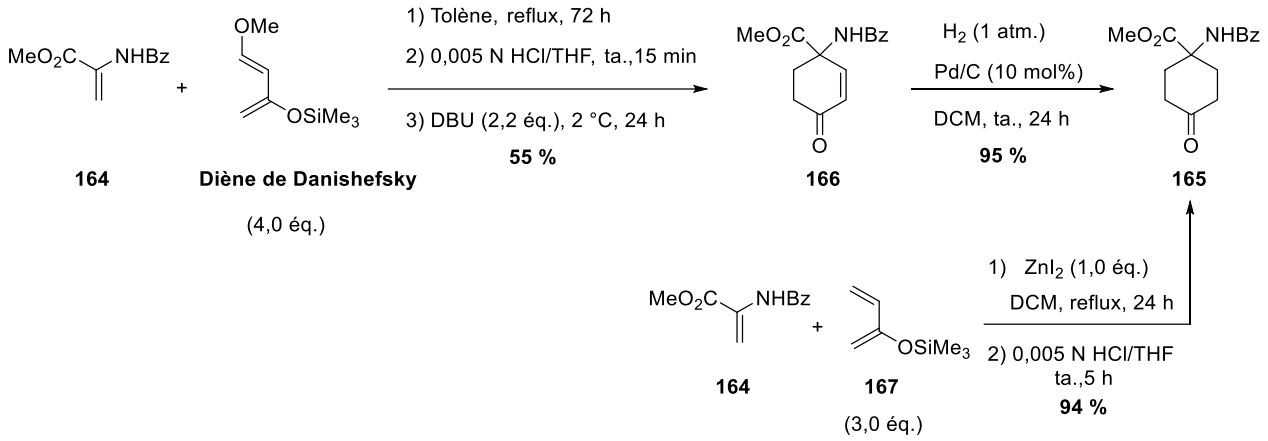


*Schéma 26 : Synthèse de l'acide aminé protégé par un groupe benzoyle **165**, décrite par Avenoza et al. en 2001.*

La troisième voie de synthèse de l'acide aminé **III** protégé par un groupement carboxybenzyle (Cbz), a été décrite en 2013 par Oba *et al.* (Schéma 27).[186] Le cyclohexane-1,4-dione monoéthylène acétal **168** a été converti en hydantoïne **169** par une réaction de Bucherer-Bergs avec du cyanure de potassium et du carbonate d'ammonium.[187] Après une protection des deux azotes par un carbamate (Boc), l'hydantoïne **170** a été ouverte par hydrolyse, l'amine primaire formée a été protégée par un groupement Cbz, et l'acide carboxylique a été estérifié. Enfin, la cétone a été déprotégée en milieu acide pour obtenir l'acide aminé protégé **171** avec un rendement de 34 % sur ces 4 étapes.

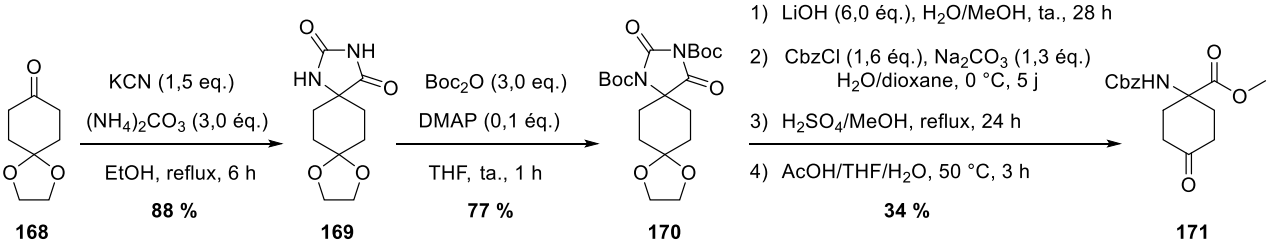


*Schéma 27 : Synthèse de l'acide aminé protégé par un groupe carboxybenzyle **171**, décrite par Oba et al. en 2013.*

Similaire à la réaction de Strecker qui permet de synthétiser des acides α-aminés en présence d'ammoniaque et d'une source de cyanure, la réaction de Bucherer-Bergs remplace l'ammoniaque par du carbonate d'ammonium. Il en résulte une libération de CO_2, qui subit une attaque nucléophile de l'amine et forme ainsi l'hydantoïne (Schéma 28).

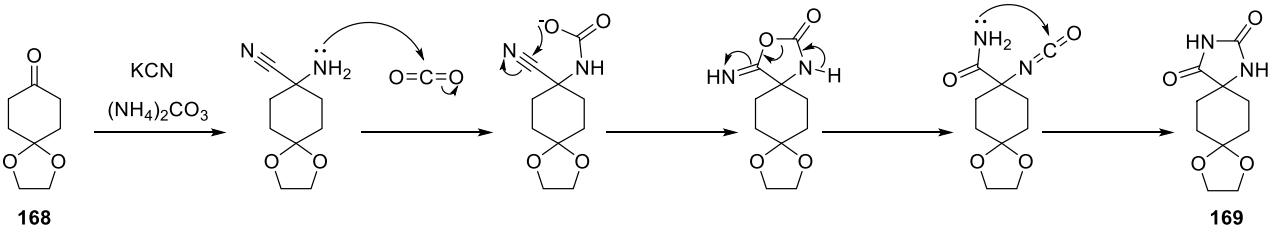


*Schéma 28 : Mécanisme réactionnel de la réaction de Bucherer-Bergs pour mener à l'hydantoïne **169**.*

La quatrième et dernière voie de synthèse décrite dans un brevet de l'Université Emory permet d'obtenir le composé **III** dont l'amine est protégée par un groupement Boc. Plus longue que les 3 synthèses

[186] Oba, M.; Ishikawa, N.; Demizu, Y.; Kurihara, M.; Suemune, H.; Tanaka, M. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, *2013* (34), 7679–7682.
[187] Konnert, L.; Lamaty, F.; Martinez, J.; Colacino, E. *Chem. Rev.* **2017**, *117* (23), 13757–13809.

précédentes, cette synthèse en 9 étapes de l'acide aminé nécessite à nouveau de passer par un intermédiaire hydantoïne **172** comme précurseur de l'acide aminé **173**.[188]

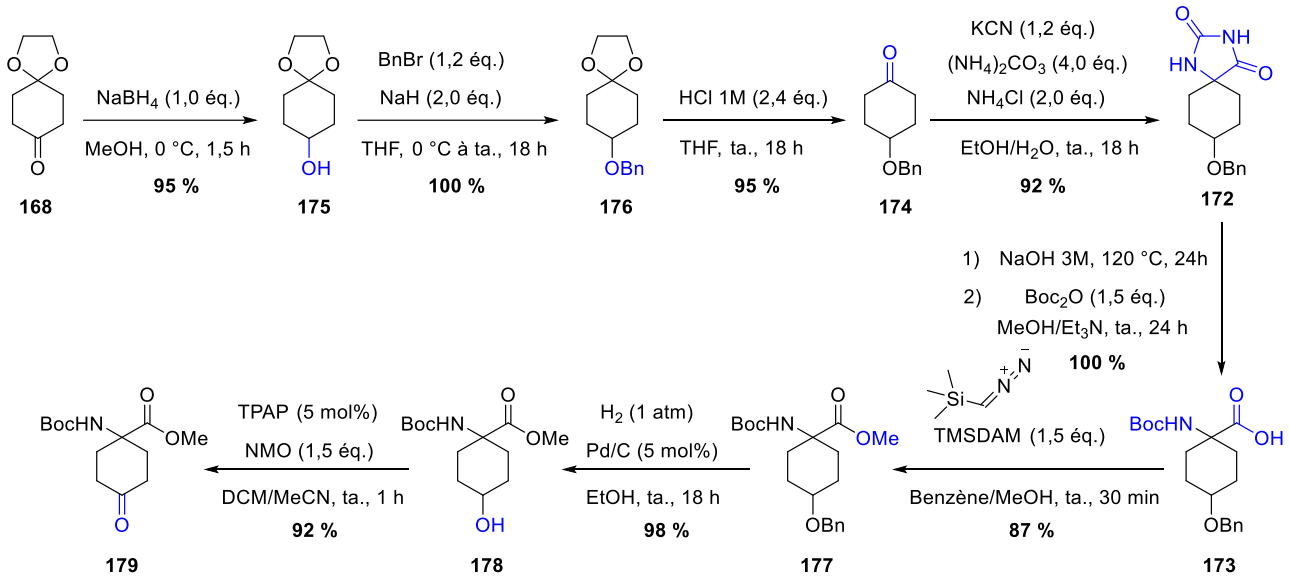


*Schéma 29 : Voie de synthèse de l'acide aminé protégé par un groupe Boc **179**, décrite par l'Université Emory en 2006.*

Au cours des 3 premières étapes, un changement de groupement protecteur de l'acétal présent sur le composé **168** a été réalisé au profit d'un éther benzylique **174**. Pour cela, la cétone **168** a été réduite en alcool **175**, puis ce dernier a été protégée sous forme d'éther benzylique **176**. La cétone **174**, obtenue par hydrolyse acide du composé **176**, a été ensuite convertie en acide aminé mono-protégé **173** par l'ouverture de l'hydantoïne formée **172** suivie d'une protection au Boc_2O de l'acide aminé intermédiaire. Après l'estérification de l'acide carboxylique **173**, l'éther benzylique présent sur le produit obtenu **177** a été enlevé par hydrogénation catalytique pour mener à l'alcool **178**. L'oxydation de ce dernier a finalement été réalisée pour obtenir la cétone désirée **179**.

2. Synthèse de la plateforme hétérocyclique méthylée composée d'un cycle central acide aminé

a) Essais préliminaires

Des essais de synthèse du composé **I** (Schéma 23, page 71) ont été initiés dans l'équipe avant le début de ma thèse à partir du cyclohexane-1,4-dione monoéthylène acétal **168**. Pour cela, une réaction de Bucherer-Bergs réalisée sur la cétone **168** a mené à l'hydantoïne **180** avec 34 % de rendement (Schéma 30). Un essai d'hydrolyse de l'hydantoïne avec une solution de soude caustique n'a cependant pas mené au produit attendu. Une seconde hydrolyse avec une autre base, l'hydroxyde de barium $Ba(OH)_2$ (pka ~14), a mené à l'acide carboxylique **181** après 6 h à 150 °C pour un rendement de 64 %. À partir de ce composé très peu soluble dans les solvants organiques et aqueux, plusieurs voies de synthèse ont été testées pour diméthyler l'amine et estérifier l'acide carboxylique, sans déprotéger la cétone. L'une d'elles est présentée ci-dessous (Schéma 30) : l'acide carboxylique a été estérifié avec du diazométhane pour mener à l'ester méthylique **182**, puis une amination réductrice a permis la synthèse de la molécule **183.** L'acétal **183** n'a

[188] Goodman, M. M.; Yu, W. US20060292073, **2006**.

jamais pu être hydrolysé en cétone **184**, une hydrolyse concomitante de l'ester en acide carboxylique est certainement une des causes de ce revers.

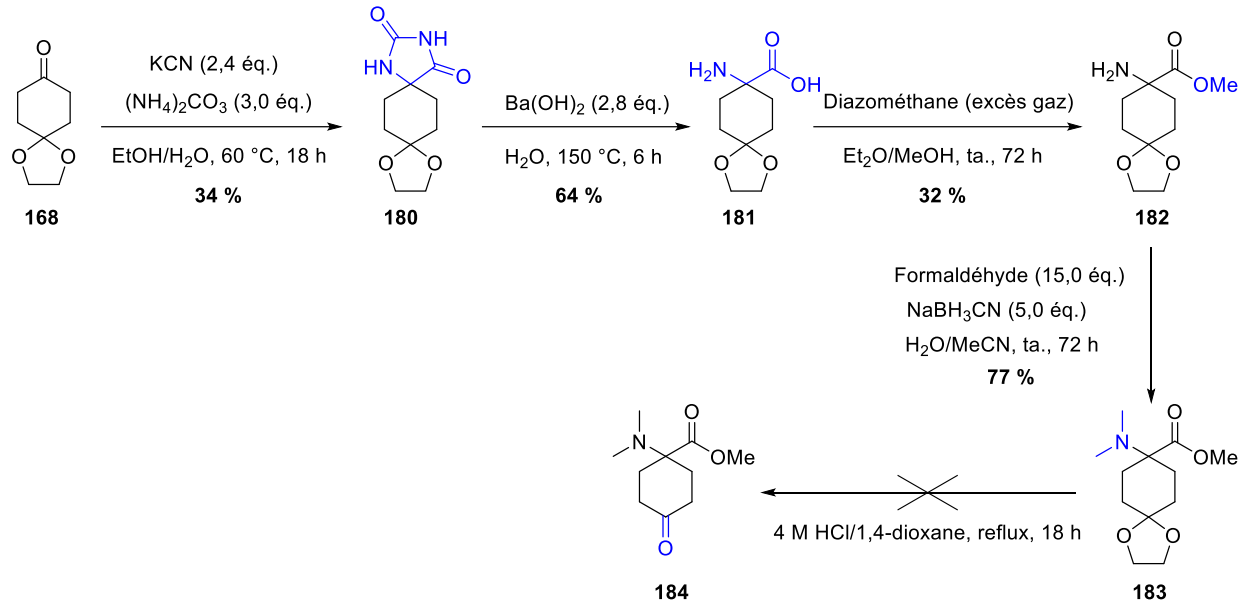


*Schéma 30 : Essai de synthèse de l'acide aminé **184**.*

b) Synthèse de l'acide aminé protégé par un Boc **179**

Ces résultats préliminaires ont prouvé l'importance d'un choix de groupements protecteurs orthogonaux des fonctions carbonyle, carboxyle en présence d'une amine sans affecter les réactivités. Parmi les voies de synthèses décrites des cétones de type **III**, seule la quatrième voie, présentée par l'Université Emory convient à la synthèse de nos composés (Schéma 29, page 74). La présence sur le composé **179** d'un groupement Boc, labile en milieu acide, permet une déprotection orthogonale de l'amine sans affecter les deux autres fonctions : ester et éther benzylique. La présence d'un éther benzylique permet une déprotection aisée de l'alcool correspondant par hydrogénation, tout en facilitant également le suivi de réaction par l'ajout d'un chromophore.

La synthèse de l'hydantoïne **172** a ainsi été réalisée sur une échelle de 10 g, à partir du cyclohexane-1,4-dione monoéthylène acétal **168** (Schéma 31). La réduction de la cétone **168** en alcool **175**, suivi de sa protection sous forme d'éther benzylique, a permis d'obtenir le dérivé **176** avec un rendement de 69 % sur ces 3 étapes. L'acétal a ensuite été hydrolysé en milieu acide pour conduire à la cétone **174** avec 90 % de rendement. Enfin, l'étape de formation de l'hydantoïne a mené au produit **172** avec un rendement optimisé de 75 %.

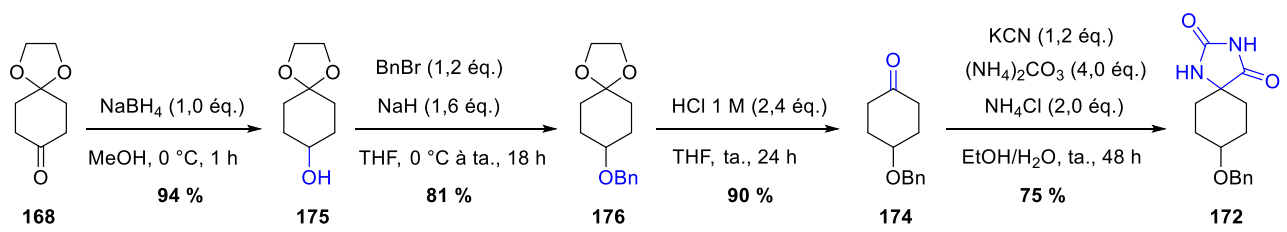


*Schéma 31 : Synthèse de l'hydantoïne **172**.*

Les 3 étapes suivantes ont cependant dû être modifiées par rapport à la voie de synthèse du Schéma 29 décrite dans la littérature, afin d'obtenir l'acide aminé di-protégé **177** avec de bons rendements sur grande échelle (Schéma 32). Ainsi, l'ouverture de l'hydantoïne en acide aminé s'est effectuée dans un réacteur micro-ondes en présence d'une solution de soude caustique à 120 °C pendant 20 h pour obtenir l'intermédiaire **185**. En suivant le protocole décrit dans le brevet de l'Université Emory, la protection de l'amine au Boc_2O dans un mélange MeOH/Et_3N a conduit à l'acide carboxylique **173** avec de faibles rendements et de nombreuses impuretés. La séquence réactionnelle a donc été optimisée en réalisant l'ouverture de l'hydantoïne puis la protection de l'amine *one-pot*. Après la première étape, le milieu réactionnel a été dilué avec du 1,4-dioxane puis le Boc_2O a été ajouté en large excès.[189] Après 18 h de réaction, l'acide carboxylique **173** obtenu a été extrait du milieu réactionnel puis estérifié.

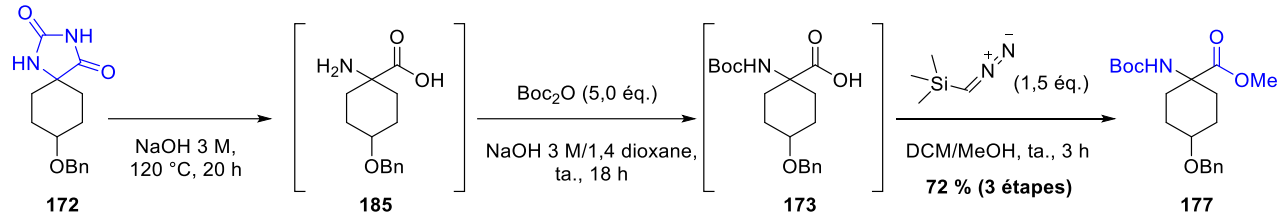


*Schéma 32 : Synthèse optimisée de l'acide aminé di-protégé **177**.*

La présence d'un Boc, sensible en milieu acide, a nécessité de trouver des conditions d'estérification non acides. Un essai de couplage entre **173** et le méthanol avec de dicyclohexylcarbodiimide (DCC) a conduit à de nombreux sous-produits et impuretés. Au vu de ces résultats, nous avons recherché des méthodes de méthylation de l'acide carboxylique, avec l'utilisation notamment d'iodométhane ou de diazométhane. Cependant, leur très haute toxicité et explosivité nous ont conduits à choisir le triméthylsilyldiazométhane (TMSDAM) comme alternative. Ce réactif présent à l'état liquide est plus stable et plus aisé à manipuler que le diazométhane, qui est un gaz. Shioiri et ses collaborateurs[190] ont été les premiers à élaborer une procédure d'estérification d'acides carboxyliques avec du TMSDAM et du méthanol. En 2007, un mécanisme détaillé (Figure 37) de cette réaction a été décrit par l'équipe de Slaughter[191] de l'Université de Bristol. Cette équipe a démontré que la réaction entre le TMSDAM, l'acide carboxylique et le méthanol génère du diazométhane *in situ*, ce dernier étant responsable de la méthylation de l'acide carboxylique. L'excès de TMSDAM est neutralisé en fin de réaction par l'ajout de quelques gouttes d'acide acétique.

[189] Pettersson, M.; Quant, M.; Min, J.; Iconaru, L.; Kriwacki, R. W.; Waddell, M. B.; Guy, R. K.; Luthman, K.; Grøtli, M. *PLOS ONE* **2015**, *10* (10), e0137867.
[190] Hashimoto, N.; Aoyama, T.; Shioiri, T. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1981**, *29* (5), 1475–1478.
[191] Kühnel, E.; Laffan, D. D. P.; Lloyd-Jones, G. C.; Martínez del Campo, T.; Shepperson, I. R.; Slaughter, J. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46* (37), 7075–7078.

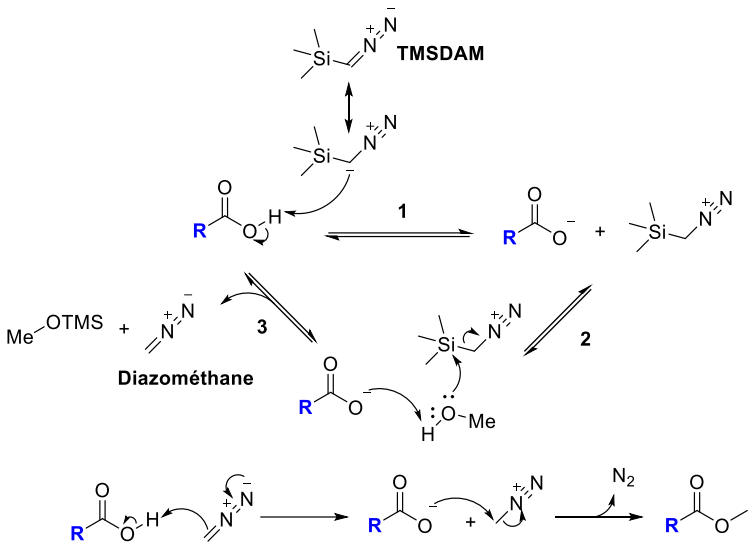


Figure 37 : Mécanisme d'estérification en présence de triméthylsilyldiazométhane (TMSDAM) proposé par Slaughter et coll.

En utilisant des conditions similaires décrites dans la littérature,[192] l'acide carboxylique **173** a été méthylé en 3 h pour mener à l'ester **177**, avec un rendement global de 72 % sur 3 étapes.

Après avoir synthétisé l'amino-acide di-protégé **177**, l'éther benzylique a été enlevé par hydrogénation catalytique en présence de palladium sur charbon (10 %) pendant 2 h pour mener à l'alcool **178** avec un rendement de 98 % (Schéma 33). Enfin, la dernière étape d'oxydation a été effectuée en utilisant un oxydant peu toxique : le périodinane de Dess-Martin (DMP). Ce composé à base d'iode hypervalent a permis d'oxyder l'alcool **178** en cétone **179** avec un très bon rendement de 88 %.[193]

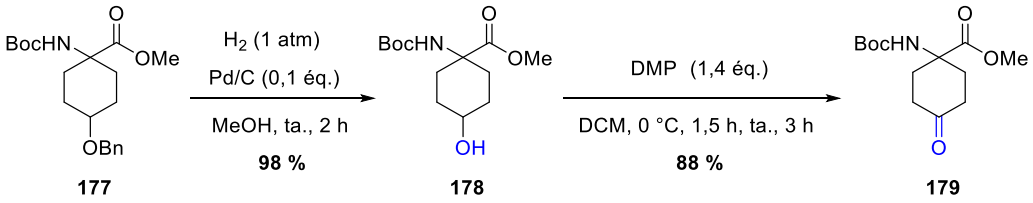


*Schéma 33 : Synthèse de la cétone **179** à partir de l'éther benzylique **177**.*

En utilisant cette voie de synthèse optimisée, plusieurs grammes de l'onéreuse cétone **179** (450 €/g) ont pu être synthétisés afin de poursuivre la synthèse des inhibiteurs des LIMKs de type acide aminé.

La suite de la synthèse nécessite un couplage de Suzuki-Miyaura entre la base hétérocyclique méthylée **9** et l'ester boronique **186** pour obtenir la plateforme **187**, comme décrit dans le Schéma 34. Pour cela, la cétone **179** a été convertie en ester boronique **186** par une borylation de Miyaura de l'intermédiaire nonaflate d'énol **188**.

[192] Galemmo, JR. R.; Holland, R.; Hum, G.; Pajouhesh, H.; Chahal, N.; Seid-Bagherzadeh, M.; Girard, A. US2009270394A1, **2009**.
[193] Kesteleyn, B. R. R.; Berke, J. M.; Coesemans, E.; Grosse, S. C.; Jacoby, E.; Jonckers, T. H. M.; Last, S. J.; Verschueren, W. G.; Obringer, M.; Doebelin, C. C. C. WO2020225230A1, **2020**.

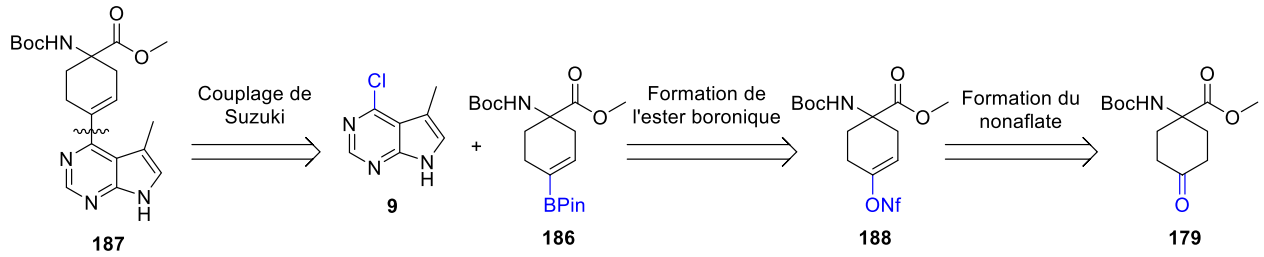


*Schéma 34 : Rétrosynthèse du composé **187** à partir de la cétone **179**.*

En s'appuyant sur les résultats décrits dans la thèse du Dr Champiré, l'activation de la cétone en nonaflate d'énol à l'aide du fluorure de perfluorobutanesulfonyle (Nf-F) permet de meilleurs rendements que son analogue triflate.[194] En plus d'avoir une réactivité similaire (voir meilleure) que le triflate,[195] le nonaflate est plus stable et moins coûteux à préparer, avec un coût 5 fois moins important du Nf-F par rapport au *N*-phényl triflimide. Ainsi, nous avons décidé d'adapter les conditions précédemment optimisées dans l'équipe pour la synthèse du composé **187** (Schéma 35). Après la formation du nonaflate d'énol **188** à partir de la cétone **179**, en présence de DBU, celui-ci a été immédiatement transformé en ester boronique **186** par une réaction de Miyaura avec du bis(pinacolato)diboron (B_2pin_2), catalysée par du Pd(dppf)Cl_2.[196] Finalement, un couplage de Suzuki-Miyaura a été réalisé entre la 4-chloro-5-methyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidine **9** et **186**, à 120 °C sous micro-ondes pendant 1,5 h et en présence de $Pd(PPh_3)_4$ pour conduire au composé **187** avec un rendement de 72 % sur 3 étapes.

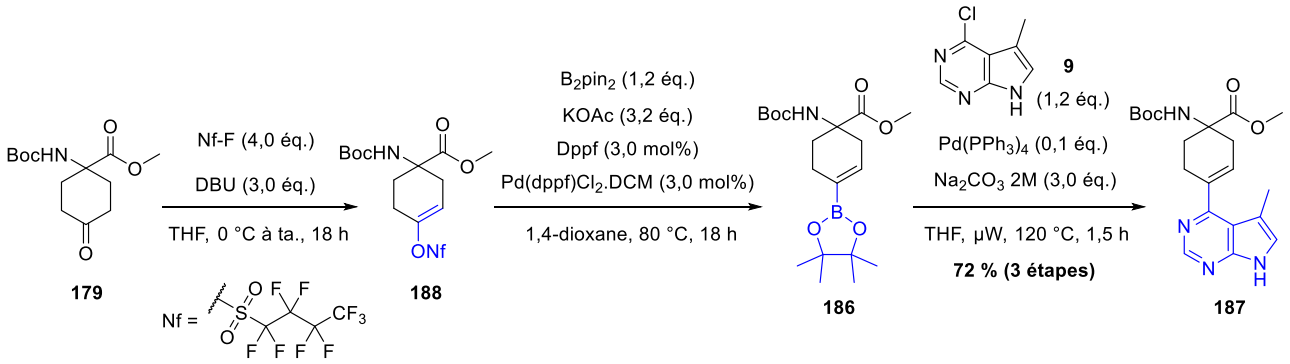


*Schéma 35 : Synthèse du composé **187** à partir de la cétone **179**.*

La synthèse de cette nouvelle plateforme de type amino-acide **187** a permis d'apporter une diversité moléculaire avec différentes anilines par amidification. Afin d'éviter une étape de saponification, un essai de conversion de l'ester en amide a été réalisé selon les conditions décrites par Dubois *et al.* en présence de DABAL-Me_3.[197] Cet adduit du 1,4-diazobicyclo[2.2.2]octane (DABCO) et du triméthylaluminium ($AlMe_3$), se présente sous forme d'une poudre stable à l'air et représente une bonne alternative au $AlMe_3$ pyrophorique.[198] Ce réactif permet la conversion directe d'ester en amide, en activant l'amine sous forme d'amidure d'aluminium.[199] Au regard du nombre d'étapes nécessaires à l'obtention du composé **187**, un essai d'amidification au DABAL-Me_3 a été réalisé entre la *N*-(Boc)glycine méthyl ester **189**, dont le motif est proche

[194] Routier, S.; Buron, F.; Suzenet, F.; Rodrigues, N.; Chalon, S.; Vercouillie, J.; Guilloteau, D.; Emond, P.; Marzag, H. WO2022106714, **2022**.
[195] Rottländer, M.; Knochel, P. *J. Org. Chem.* **1998**, *63* (1), 203–208.
[196] Eastwood, P. R. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41* (19), 3705–3708.
[197] Dubois, N.; Glynn, D.; McInally, T.; Rhodes, B.; Woodward, S.; Irvine, D. J.; Dodds, C. *Tetrahedron* **2013**, *69* (46), 9890–9897.
[198] Biswas, K.; Prieto, O.; Goldsmith, P. J.; Woodward, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44* (15), 2232–2234.
[199] Novak, A.; Humphreys, L. D.; Walker, M. D.; Woodward, S. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47* (32), 5767–5769.

du composé **187,** et la 3-fluoroaniline **190** (Schéma 36). Une faible conversion des réactifs **189** et **190** a été observée tandis qu'aucune trace d'amide **191** n'a été détectée par LC-MS. Néanmoins, la formation de l'hydantoïne **192** a pu être constatée. D'après les résultats de Dubois *et al.*, la proximité du groupement Boc et de l'amide présents sur le composé **191** aurait engendré une cyclisation intramoléculaire activée par le DABAL-Me_3, pour mener au produit **192**.

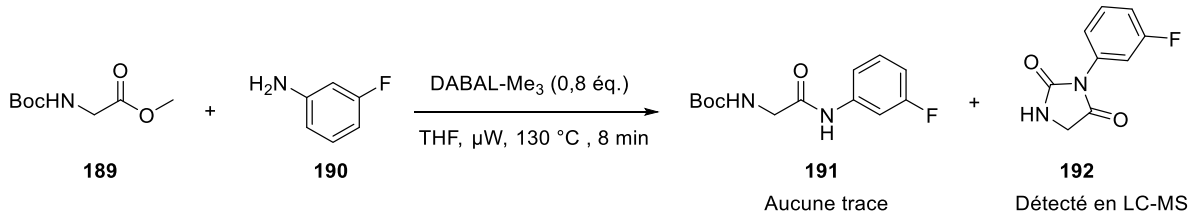
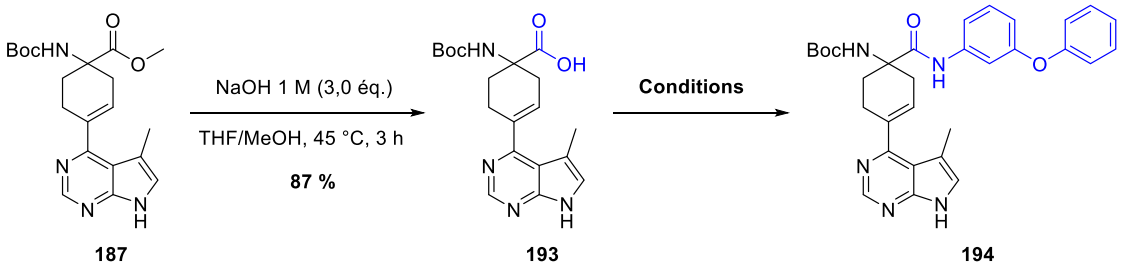


*Schéma 36 : Essai d'amidification de l'ester **189** avec l'aniline **190** en présence de DABAL-Me_3.*

Avec ces résultats en main, l'utilisation du DABAL-Me_3 a été abandonnée pour privilégier des méthodes plus classiques de couplage peptidique. La saponification de l'ester **187** a été réalisée en amont en présence d'une solution de soude caustique, puis a été suivie par différents essais de couplage peptidique entre l'acide carboxylique **193** obtenu et la 3-phénoxyaniline pour former l'amide **194** (Tableau 13).

*Tableau 13 : Essais de couplage peptidique entre l'acide carboxylique **193** et la 3-phénoxyaniline.*



Entrée	Aniline (éq.)	Conditions	Rdt
1	3-phénoxyaniline (2,0 éq.)	HATU (2,0 éq.), DIPEA (3,0 éq.), DMF, ta., 18 h	-
2	3-phénoxyaniline (1,0 éq.)	EDCI (1,0 éq.), DMAP (1,0 éq.), HOBt (0,1 éq.), DIPEA (5,0 éq.), MeCN, ta., 40 °C, 56 h	-
3	3-phénoxyaniline (1,2 éq.)	T3P 50%/AcOEt (1,5 éq.), DIPEA (4,0 éq.), DMF, ta., 18 h	5 %
4	3-phénoxyaniline (1,1 éq.)	1) NHS (1,2 éq.), EDC (1,2 éq.), DCM/DMF, ta., 24 h 2) 3-phénoxyaniline, **Et_3N** (2,5 éq.), DCM, ta., 72 h	-
5	3-phénoxyaniline (1,1 éq.)	1) NHS (1,2 éq.), EDC (1,2 éq.), DCM/DMF, ta., 24 h 2) 3-phénoxyaniline, **NaH** (1,15 éq.), THF, ta., 18 h	-

L'utilisation d'un agent de couplage de type guanidinium comme le HATU (entrée 1) n'a pas permis la formation du produit **194**. Pour pallier la faible nucléophilie de l'aniline, un second essai de couplage a été réalisé selon les conditions décrites par Ghosh *et al.* (entrée 2). L'acide carboxylique **193** a été activé par de l'EDCI et du HOBt, suivi de la DMAP. L'ion acyliminium ainsi obtenu est décrit comme étant plus nucléofuge

que le HOBt, ce qui améliorerait la réactivité vis-à-vis des amines pauvres en électrons comme les anilines.[200] Malgré cette activation, aucune trace de l'amide **194** n'a été observée. Un nouvel essai de couplage a donc été réalisé en modifiant la nature de l'agent de couplage, le HATU a été remplacé par l'anhydride propylphosphonique (T3P). L'acide carboxylique est ainsi activé sous forme d'anhydride mixte puis converti en amide par l'attaque de l'aniline. En utilisant les conditions de l'entrée 3, le composé **194** a été formé avec un faible rendement de 5 %.

Nous avons ensuite choisi de changer de méthode, en couplant l'acide carboxylique avec le *N*-hydroxysuccinimide (NHS) à l'aide de l'EDC pour former un ester de succinimidyle.[201] Cet ester activé présente l'avantage de pouvoir être isolé avant de réagir avec la 3-phénoxyaniline. L'emploi de triéthylamine comme base (entrée 4) n'a mené à aucun produit. Pour améliorer la nucléophilie de l'aniline, celle-ci a été déprotonée en amidure (plus nucléophile) à l'aide d'hydrure de sodium (entrée 5). De nouveau, aucune réaction n'a été observée. Il semblerait que la faible nucléophilie, due aux effets électroniques induits par le groupe phénoxyle, empêche l'approche et l'attaque de l'aniline sur le carbonyle.

Par conséquent, la 3-chloroaniline a été choisie pour remplacer la 3-phénoxyaniline. L'amide **195** a ainsi pu être obtenu en activant l'acide carboxylique **193** avec le HATU dans le DMF pendant 18 h (Schéma 37). À la suite de cette étape, l'amine du composé **195** a été déprotégée avec de l'acide chlorhydrique en solution dans le 1,4-dioxane. Après conversion totale, le sel d'ammonium obtenu a été neutralisé sous forme de base libre par traitement avec 1 % de NH_4OH dans un système DCM/MeOH durant la colonne chromatographique. Le composé final **196** a ainsi été synthétisé avec un rendement de 37 % sur 2 étapes.

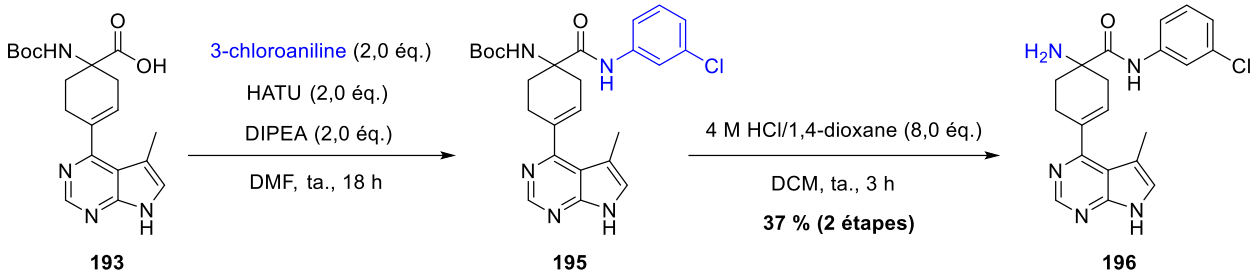
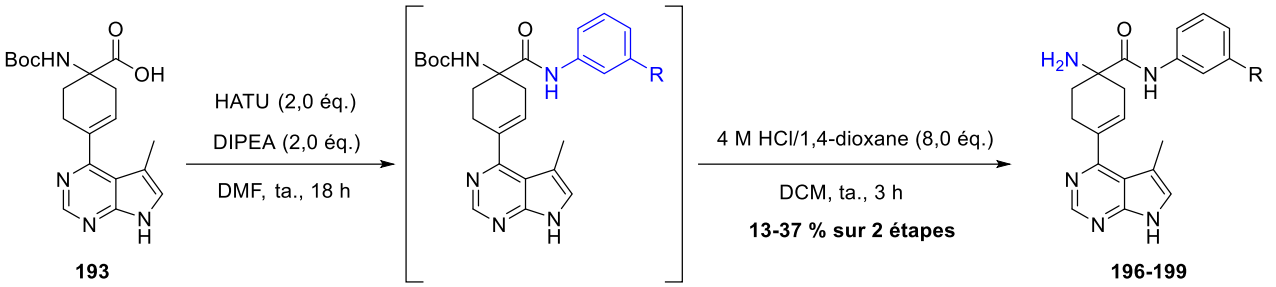


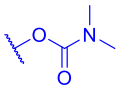
*Schéma 37 : Synthèse du composé final **196** à partir de l'acide carboxylique **193**.*

Par la suite, plusieurs anilines ont été utilisées afin d'amorcer une étude de relations structure-activité sur ce nouveau type d'inhibiteurs (Tableau 14). L'atome de chlore du composé **196** (entrée 1) a été remplacé par des atomes de fluor (**197**, entrée 2) ou de brome (**198**, entrée 3), en utilisant les anilines correspondantes. En complément des atomes d'halogène, le composé **199** (entrée 4) a été synthétisé, comportant le même motif diméthylcarbamate (ALH) présent sur le composé de référence **LX7101**.

[200] Ghosh, A. K.; Brindisi, M. Urea Derivatives in Modern Drug Discovery and Medicinal Chemistry. *J. Med. Chem.* **2020**, *63* (6), 2751–2788.
[201] Ge, J.; Zhang, C.-W.; Ng, X. W.; Peng, B.; Pan, S.; Du, S.; Wang, D.; Li, L.; Lim, K.-L.; Wohland, T.; Yao, S. Q. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55* (16), 4933–4937.

*Tableau 14 : Synthèse et évaluations biologiques des inhibiteurs de type acide aminé **196-199**.*



Entrée	Composé		Rdt	Ki (LIMK1) (nM)	Ki (LIMK2) (nM)	% inhibition (à 1 µM)	
	R =	N°				ROCK1	ROCK2
1		**196**	37 %	255	257	62	51
2		**197**	24 %	336	667	61	47
3		**198**	29 %	127	153	60	44
4		**199**	13 %	251	103	**20**	**15**

La synthèse de cette nouvelle famille d'inhibiteurs de type acide aminé a mené aux composés **196-199** avec de faibles rendements sur les deux dernières étapes, allant de 13 à 37 %. Bien que la structure de ces 4 composés se rapproche du **LX7101**, les affinités pour les LIMKs des composés halogénés dépassent la centaine de nanomolaires. Le composé **199** quant à lui, présente la meilleure affinité de la série sur LIMK2 avec 103 nM et 251 nM sur LIMK1. De plus, il présente une grande sélectivité par rapport à ROCK, avec une inhibition de 20 % et 15 % à 1 µM de ROCK1 et ROCK2 respectivement.

Pour conclure sur cette série d'inhibiteurs de type acide aminé, une voie de synthèse en 15 étapes (Annexe 1) a été mise au point et optimisée, pour mener à des composés avec une structure inédite du cycle central composé de l'acide 1-aminocyclohex-3-ène carboxylique. Quatre composés ont ainsi pu être synthétisés et l'un d'entre eux, le composé **199**, a présenté des résultats biologiques intéressants sur enzymes purifiées pour continuer dans les phases de tests supplémentaires (chapitre 2). Au vu de la difficulté d'accès à ces nouveaux composés (environ 20 mg de chaque molécule) et des affinités moyennes pour les LIMKs, l'étape de diméthylation n'a pas été effectuée au profit du développement d'une autre série de composés plus prometteurs.

III – Modulation de la base hétérocyclique

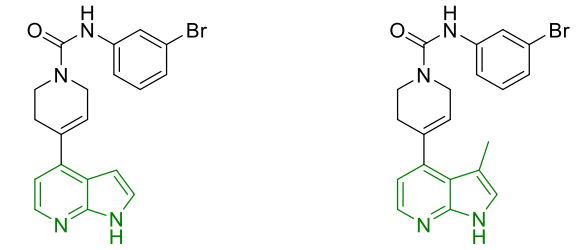
1. Travaux antérieurs

a) Modélisation moléculaire

Jusqu'ici, les modifications structurelles de nos inhibiteurs ont été effectuées d'abord au niveau de l'urée avec une modulation de l'aniline, puis sur la nature du cycle central. La dernière partie non modifiée de ces composés est la base hétérocyclique pyrrolopyrimidine. Nous avons alterné jusqu'à présent entre la 5-méthyl-7H-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidine (Schéma 1, page 41), appelée base méthylée, et la 5,6,7,8-tétrahydrocyclopenta[4,5]pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidine (Schéma 2, page 41), décrite comme la base tricyclique,

afin d'optimiser les affinités pour les LIMKs puis leur sélectivité par rapport aux ROCKs. Cependant, la nature pyrrolopyrimidine n'a pas encore été modifiée.

Des travaux antérieurs de modélisation moléculaires réalisés par le Dr Braka ont mis au point un modèle dans lequel la présence de l'atome d'azote *N*-3 de la pyrrolopyrimidine interagirait avec un résidu du site actif de LIMK2 *via* une molécule d'eau. Émise par la modélisation, cette hypothèse a été confirmée par la chute drastique des affinités des composés 7-azaindoliques **200** et **201** pour LIMK2 (Figure 38).



200 Ki (LIMK2) = 2780 nM

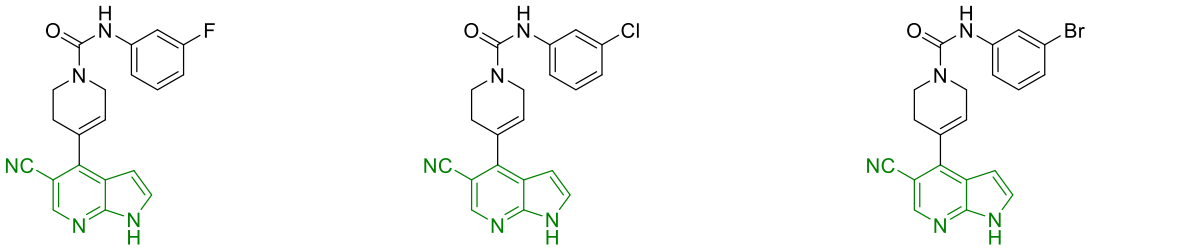
201 Ki (LIMK2) = 3520 nM

Figure 38 : Évaluation in vitro de composés 7-azaindolique.

Pour pallier la perte d'interaction provenant de l'atome d'azote *N*-3, et en accord avec la littérature[202], une fonction nitrile a été introduite en position *C*-5 de l'azaindole pour conduire à une nouvelle série inédite de composés de type 1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carbonitrile.

b) Évaluation biologique des premiers composés de type 1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carbonitrile (série cyano)

Trois composés de cette série cyano ont été synthétisés par le Dr Champiré, puis testés *in vitro* sur les LIMKs et les ROCKs (Figure 39). Les composés **202**, **203** et **204** ont montré des affinités pour les LIMKs encourageantes de l'ordre de 150-480 nM et surtout une excellente sélectivité vis-à-vis des ROCKs. Cette nouvelle série cyano représente donc une alternative à la série pyrrolopyrimidine tricyclique.



202
Ki (LIMK1) = 479 nM
Ki (LIMK2) = 413 nM
% inhib ROCK1 (1 µM) = 28
% inhib ROCK2 (1 µM) = 3
% inhib phospho cofiline HeLa (25 µM) = 79

203
Ki (LIMK1) = 179 nM
Ki (LIMK2) = 318 nM
% inhib ROCK1 (1 µM) = 10
% inhib ROCK2 (1 µM) = 3
% inhib phospho cofiline HeLa (25 µM) = 79

204
Ki (LIMK1) = 166 nM
Ki (LIMK2) = 202 nM
% inhib ROCK1 (1 µM) = 10
% inhib ROCK2 (1 µM) = 2
% inhib phospho cofiline HeLa (25 µM) = 81

*Figure 39 : Évaluation in vitro des premiers composés synthétisés **202-204** avec une base 1H-pyrrolo[2,3-b]pyridine-5-carbonitrile.*

[202] Fleming, F. F.; Yao, L.; Ravikumar, P. C.; Funk, L.; Shook, B. C. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (22), 7902–7917.

Ces composés ont également été évalués sur une lignée cellulaire MPNST 88-14 (Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors), cellules tumorales associées à la NF1.[203] Les résultats d'inhibition de la phosphorylation de la cofiline dans ces cellules se sont avérés prometteurs, avec des inhibitions de l'ordre de 80 % à 25 µM.

2. Exploration de la série cyano

a) Relations structure-activité sur les anilines de la série 1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carbonitrile

Nous avons ainsi décidé de continuer l'exploration de la série 1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carbonitrile en modifiant les groupements positionnés en méta de l'aniline de l'urée, tout en gardant le cycle central 3,6-dihydropyridine. La synthèse de ces composés débute par un couplage de Suzuki-Miyaura entre l'onéreux 4-chloro-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carbonitrile **205** commercial et le *N*-boc,1,2,3,6-tétrahydropyridine-4-boronic acid pinacol ester **10** pour conduire au produit **206** avec 81 % de rendement. La déprotection de l'amine de ce composé en milieu acide a permis d'obtenir la plateforme de synthèse **207** (Schéma 38).

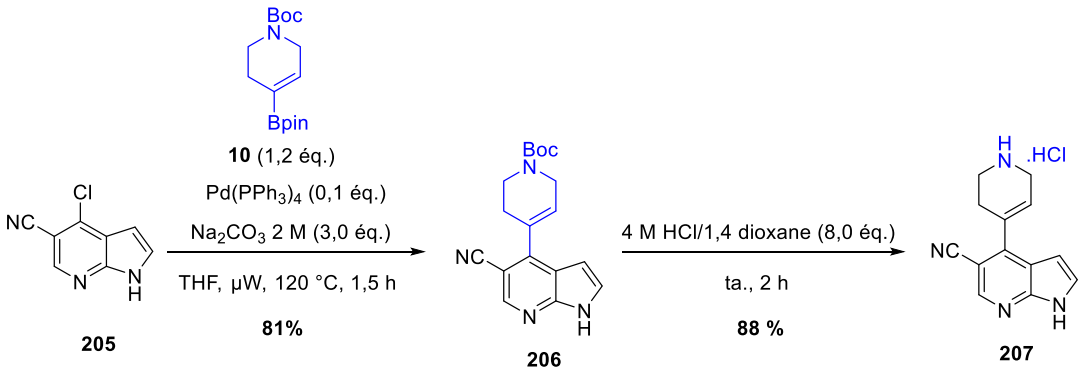


*Schéma 38 : Synthèse de l'intermédiaire **207**.*

La dernière étape de formation de l'urée a été réalisée selon 2 méthodes de synthèse : la méthode **A** passe par l'activation de l'aniline sous forme de carbamate tandis que dans la méthode **B** utilise des isocyanates commerciaux (Schéma 39).

[203] Wu, Y.; Cheng, W.; Zhang, X.; Li, Z.; Liu, Y.; Bai, W. *Arch. Med. Sci.* **2020**, *16* (6), 1476–1482.

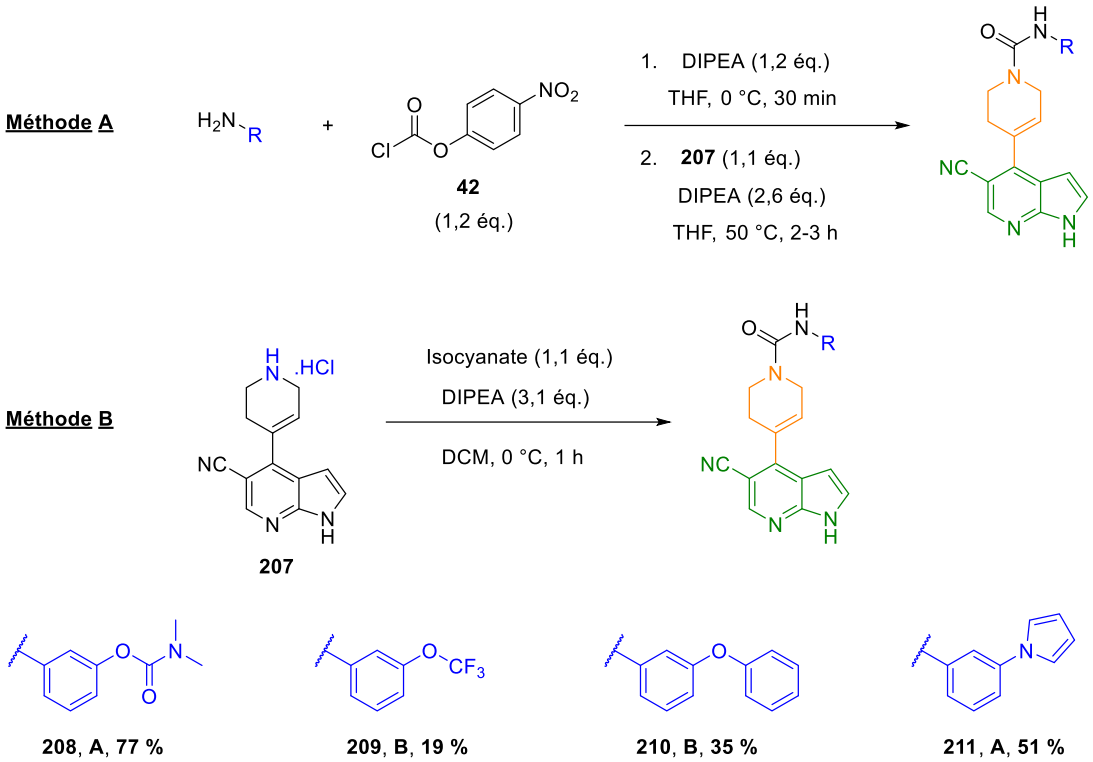
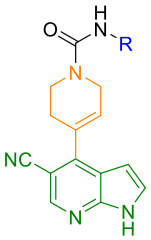
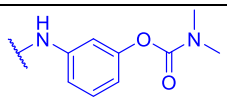


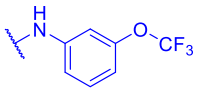
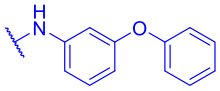
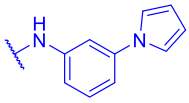
*Schéma 39 : Méthodes de synthèse des inhibiteurs **208-211** de type cyano.*

Les composés **208-211** ont été synthétisés avec les anilines les plus actives sur la série analogue pyrrolopyrimidine, puis, ces derniers ont été évalués *in vitro* sur les LIMKs et ROCKs (Tableau 15). Le composé **210** (entrée 3) comportant un groupe phénoxyle en position méta de l'aniline, et dérivé du composé phare **AC429** ne présente pas une grande affinité pour les LIMKs avec des valeurs de Ki proche de 200 nM. Lorsqu'un pyrrole est introduit (**211**, entrée 4), une légère amélioration des affinités est observée. Elle est de surcroît accompagnée d'une faible perte de sélectivité par rapport aux ROCKs. Le composé **209** (entrée 2) portant un groupe trifluorométhoxyle, très électro-attracteur, entraîne une chute d'affinités avec des Ki vers 300 à 560 nM sur LIMK1 et LIMK2 respectivement. Finalement, le seul composé de cette série présentant des valeurs d'affinité en dessous du seuil de 50 nM est le composé **208** (entrée 1), dont le motif carbamate est identique à celui de **LX7101**. Ce dernier présente une affinité de 21 nM pour LIMK2 ainsi qu'une très bonne sélectivité par rapport aux ROCKs.

*Tableau 15 : Évaluations biologiques des composés cyano-dihydropyridine **208-211**.*



Entrée	Composé		Ki (LIMK1)	Ki (LIMK2)	% inhibition (à 1 µM)	
	R =	N°	(nM)	(nM)	ROCK1	ROCK2
1		**208**	185	**21**	**8**	**6**

2		**209**	300	556	**8**	**10**
3		**210**	184	199	**-1**	**3**
4		**211**	116	181	19	29

b) Modification du cycle central dihydropyridine en pipérazine

Dans l'idée d'explorer la série cyano et d'améliorer les affinités des composés pour les LIMKs, nous avons décidé au vu des précédents résultats, de remplacer le cycle central dihydropyridine par son bioisostère : la pipérazine. Ainsi, la synthèse de cette nouvelle famille de composés débute par l'addition de la pipérazine sur la 4-chloro-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carbonitrile **205**. Seule la société Pfizer a décrit la substitution de composés 7-azaindoliques par une pipérazine dans deux brevets.[204,205] Des étapes de protection et de déprotection de la pipérazine ont été nécessaires à chaque fois pour obtenir ou isoler les produits attendus.

En nous appuyant sur ces conditions, nous avons réalisé la substitution du 4-chloro-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carbonitrile **205** par la pipérazine aux micro-ondes à 100 °C et pendant 30 min (Schéma 40). La *N*-méthyl-2-pyrrolidinone (NMP) initialement utilisée comme solvant par Pfizer, a été remplacée ici par l'isopropanol. Son évaporation plus aisée permet de purifier facilement le composé **212** obtenu avec 95 % de rendement, sans passer par des étapes de protection/déprotection de l'amine secondaire comme décrit initialement.[205]

La synthèse des urées a été réalisée en utilisant l'une des méthodes explicitées dans le Schéma 39, afin d'obtenir les composés **213-216** dans la série cyano-pipérazine.

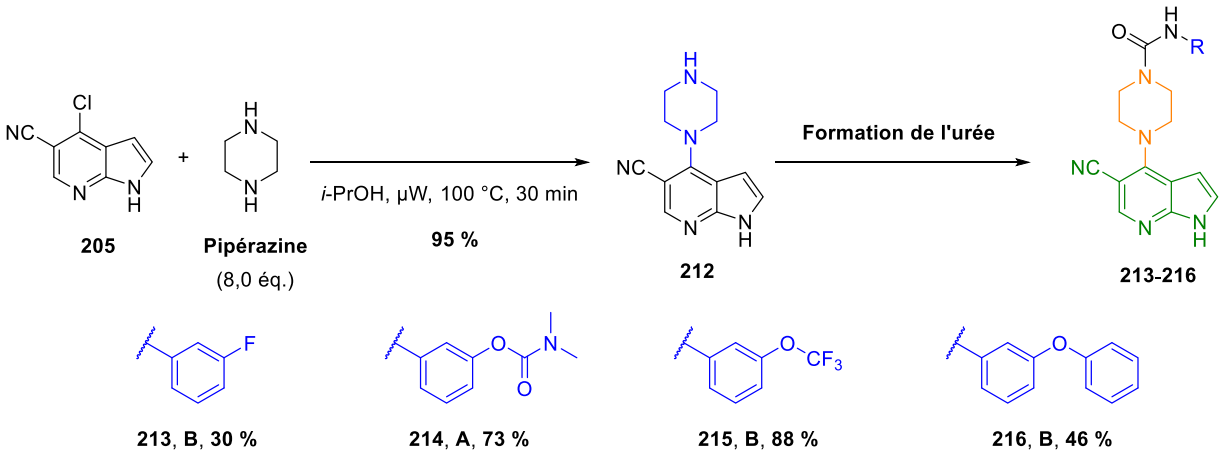


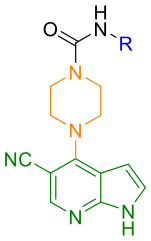
*Schéma 40 : Synthèse des composés **213-216**.*

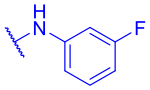
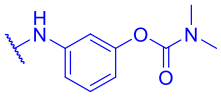
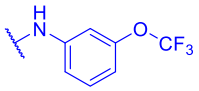
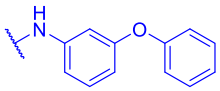
La comparaison des résultats biologiques de la série cyano-pipérazine (Tableau 16) avec ceux de la série cyano-dihydropyridine (Tableau 15) montre une baisse des affinités des composés cyano-pipérazine

[204] Mitchell, I.; Spencer, K. L.; Stengel, P.; Han, Y.; Kallan, N. C.; Munson, M.; Vigers, G. P. A.; Blake, J.; Josey, J.; Miller, S.; Xiao, D.; Xu, R.; Rao; Wang, B.; Bernacki, A. L. WO2005051304, **2005**.
[205] Blake, J.; Gunawardana, I. W.; Le Huerou, Y.; Mohr, P. J.; Wallace, E. M.; Wang, B. WO2009089352, **2009**.

213, **214** et **216** (Tableau 16, entrées 1, 2 et 4) par rapport à leurs analogues cyano-dihydropyridine **202** (Figure 39, page 82), **210** et **208** (Tableau 15, entrées 1 et 4). Ces valeurs nous ont conduits à garder le cycle central 3,6-dihydropyridine pour poursuivre les relations structure-activité sur cette série de composés de type 1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carbonitrile.

*Tableau 16 : Évaluations biologiques des composés de la série cyano-pipérazine **213**-**216**.*



Entrée	Composé		Ki (LIMK1) (nM)	Ki (LIMK2) (nM)	% inhibition (à 1 µM)	
	R =	N°			ROCK1	ROCK2
1		**213**	440	1340	**19**	**15**
2		**214**	601	**60**	**8**	**4**
3		**215**	279	455	**14**	**2**
4		**216**	186	402	**6**	**5**

3. Optimisation chimique de la base 7-azaindolique

a) Synthèse de composés de type 3-chloro-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carbonitrile

D'après les résultats d'optimisation de la base pyrrolopyrimidine obtenus lors des travaux du Dr Champiré, l'insertion d'un groupe tel qu'un méthyle ou un atome de chlore en position *C*-5 permet une amélioration des affinités pour les LIMKs. Par conséquent, nous avons décidé de transposer ces résultats à la série actuelle de type 1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carbonitrile.

Un atome de chlore a été inséré en position *C*-5 de l'intermédiaire **206** par substitution électrophile aromatique avec du *N*-chlorosuccinimide (NCS) pour mener au produit **217**, avec un rendement de 75 % (Schéma 41). La déprotection de l'amine en milieu acide a permis la synthèse de la plateforme hétérocyclique chlorée **218** à partir de laquelle les produits finaux ont été obtenus.

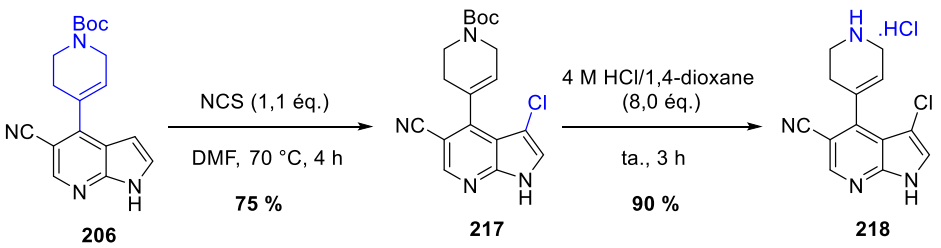
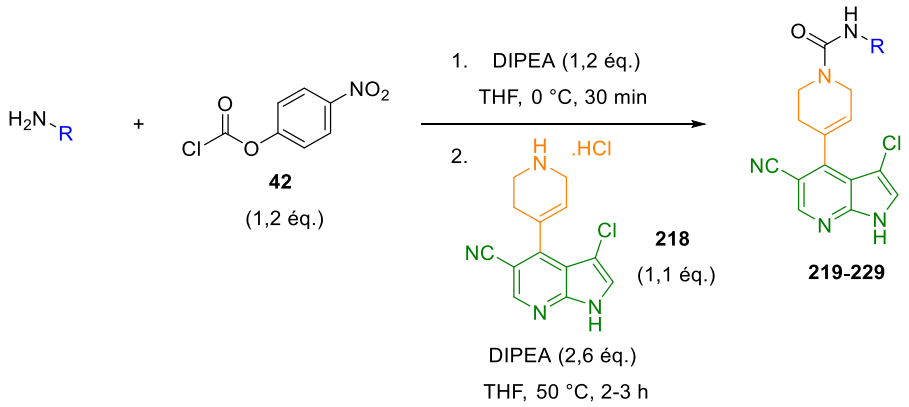
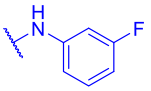
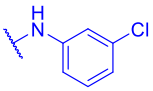
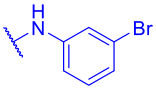
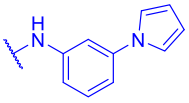
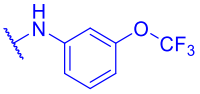
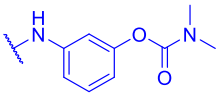
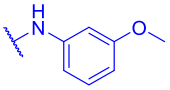
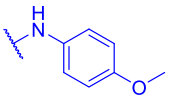
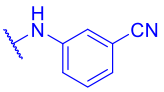


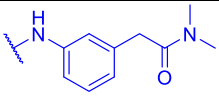
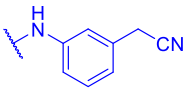
*Schéma 41 : Synthèse de la plateforme chlorée **218**.*

La dernière étape de formation des urées **219-229** a été réalisée selon les deux méthodes décrites dans le Schéma 39 à partir du composé **218** et d'anilines ou d'isocyanates correspondants (Tableau 17). Les synthèses des intermédiaires nitroaryles acide 2-(3-nitrophényl)acétique **230** et *N*,*N*-diméthyl-2-(3-nitrophényl)acétamide **231**, ainsi que des anilines 2-(3-aminophényl)-*N*,*N*-diméthylacétamide **232** et 2-(3-aminophényl)acétonitrile **233**, utilisées pour la formation des urées **228** et **229**, sont décrites dans la partie expérimentale.

Tableau 17 : Synthèse et évaluations biologiques des composés de la série cyano-chloré.



Entrée	Composé			Ki (LIMK1)	Ki (LIMK2)	% inhibition (à 1 µM)	
	R =	N°	Rdt	(nM)	(nM)	ROCK1	ROCK2
1		**219**	**64 %**	213	210	**5**	**9**
2		**220**	**48 %**	279	190	**-5**	**7**
3		**221**	**30 %**	250	178	**2**	**6**
4		**222**	**22 %**	204	145	**4**	**13**
5		**223**	**42 %***	257	483	**-4**	**6**
6		**224**	**53 %**	92	**11**	**11**	**7**
7		**225**	**74 %**	255	230	**-1**	**5**
8		**226**	**48 %**	526	134	**7**	**6**
9		**227**	**17 %**	680	482	**4**	**7**

Entrée	Composé			Ki (LIMK1) (nM)	Ki (LIMK2) (nM)	% inhibition (à 1 µM)	
	R =	N°	Rdt			ROCK1	ROCK2
10		**228**	**21 %**	1760	81	**3**	**4**
11		**229**	**66 %**	1110	81	**3**	**5**

* 1-Isocyanato-3-(trifluoromethoxy)benzène (1,1 éq.), DIPEA (3,1 éq.), DCM, 0 °C, 1 h.

En comparant les entrées 1 à 6 du Tableau 17 avec les données de la série cyano sans chlore en position *C*-5 (Figure 39 et Tableau 15), les valeurs des affinités pour les LIMKs sont assez similaires à l'exception de deux composés : **219** et **224** dont les Ki ont été divisés par 2 par rapport aux composés **202** et **208**. De plus, la présence du groupe diméthylcarbamate (entrée 6) permet une amélioration des affinités de **224** qui se situent à 92 nM pour LIMK1 et de 11 nM pour LIMK2, tout en gardant d'excellentes sélectivités pour ROCK. L'étude de l'influence de ce groupement a montré que les composés électrodonneurs **225** et **226** (entrées 7 et 8) ou électroattracteur **227** (entrée 9) présentent une perte d'affinités modérée pour les LIMKs. Une chute drastique des activités est observée sur LIMK1 pour les molécules substituées en position benzylique par des groupements ALH, non conjugués au cycle aromatique (**228**, **229** ; entrées 10 et 11), tandis que les affinités pour LIMK2 sont conservées. En plus de la perte de conjugaison des électrons présente initialement sur le diméthylcarbamate, les composés **228** et **229** ont perdu la planéité présente initialement sur le composé **224**. Ainsi, la présence d'un groupe plan, ALH et conjugué à l'aniline est nécessaire pour améliorer l'affinité des composés dans les sites actifs des LIMKs. Les molécules **228** et **229** induisent une discrimination très prononcée entre les LIMKs puisqu'elles atteignent 81 nM sur LIMK2 mais dépassent le seuil du micromolaire sur LIMK1.

b) Remplacement du groupement nitrile en son bioisostère fluoré

Dans l'idée de continuer l'exploration de la base 7-azaindole substituée en position *C*-5, le remplacement du groupement nitrile par un bioisostère a été réalisé. Ce dernier a été remplacé par un atome de fluor, étant lui aussi hydrophobe, riche en électrons et ALH. La synthèse de composés de type 5-fluoro-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine a été réalisée à partir de la 4-chloro-5-fluoro-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine **234**. Après un couplage de Suzuki-Miyaura entre l'azaindole **234** et l'ester boronique **10**, l'intermédiaire **235** a été isolé avec 58 % de rendement. La déprotection de l'amine secondaire a mené à la synthèse de la plateforme fluorée **236** (Schéma 42).

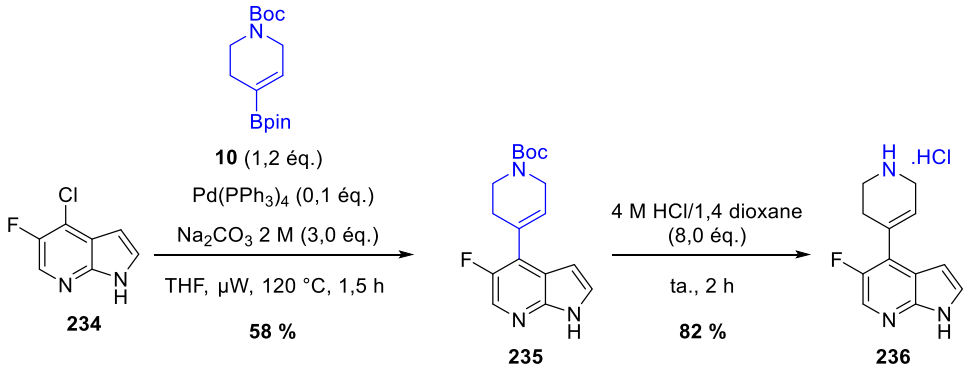


*Schéma 42 : Synthèse de l'amine **235**.*

En nous basant sur les bons résultats obtenus dans la série 3-chloro-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carbonitrile, l'insertion d'un atome de chlore en position *C*-3 de l'azaindole a été réalisée. L'azaindole **235** a été chloré avec du NCS, menant au composé **237** avec un rendement de 72 % au bout 4 h. L'amine a finalement été déprotégée pour obtenir, cette fois-ci, la plateforme 3-chloro-5-fluoro-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine **238** (Schéma 43).

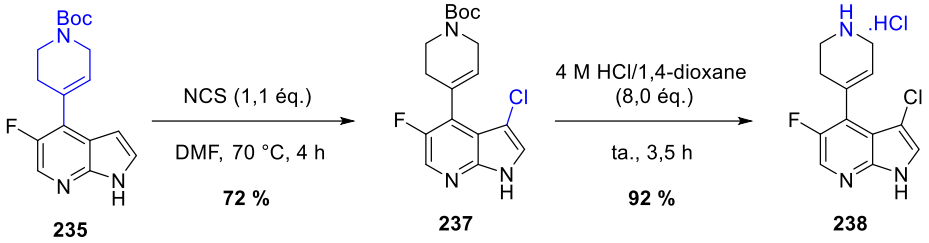


*Schéma 43 : Synthèse de l'amine **238**.*

La formation de l'urée a été réalisée sur chacune des deux plateformes, **236** et **238**, avec la meilleure aniline de la série précédente *i.e.* la 3-aminophenyl *N*,*N*-diméthylcarbamate **239** (Schéma 44). Les composés **240** et **241** ont ainsi été obtenus avec des rendements autour de 65 %. Après leur évaluation biologique, les affinités pour les LIMKs sont de l'ordre de plusieurs centaines de nanomolaires, largement au-dessus de la série précédente 1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carbonitrile. Seule la constante d'inhibition de **241** pour LIMK2 de 34 nM passe en dessous du seuil de la centaine de nanomolaires. De plus, le changement du nitrile par un fluor fait chuter les sélectivités de ces nouveaux composés par rapport aux ROCKs, situées entre 55 et 86 % d'inhibition à 1 µM. En dépit de la richesse en électrons du fluor en position *C*-5, cet atome n'est probablement pas assez gros pour occuper l'espace du nitrile. L'insertion d'un groupe difluoro- ou trifluorométhane en position *C*-5 de l'azaindole pourrait être une bonne alternative.

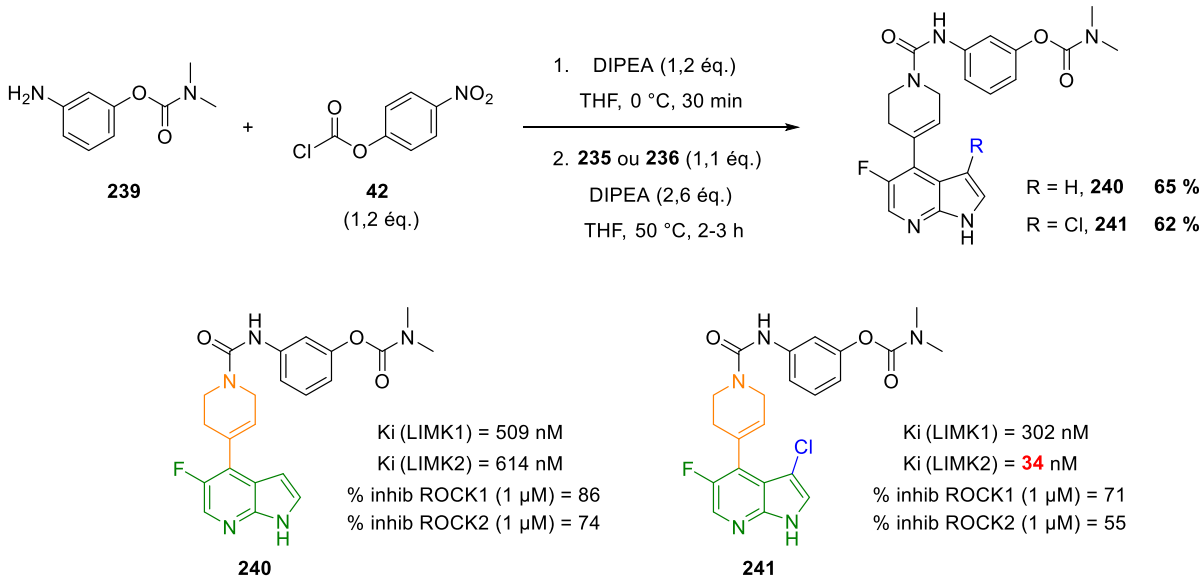


*Schéma 44 : Synthèse des composés de type 3-chloro-5-fluoro-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine **240** et **241**.*

c) Modélisation moléculaire de la série « cyano »

D'après les résultats précédents, un changement de conformation de nos molécules dans les sites actifs des LIMKs a semblé s'opérer lorsque la base pyrrolopyrimidine a été remplacée par la base 1*H*-

pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carbonitrile. Afin de connaître la raison exacte de ce changement, des *docking* du composé **224** ont été réalisés dans les sites actifs de LIMK1 et de LIMK2 à partir de la structure cristalline obtenue avec **AC429** (Figure 40). On remarque que la présence du nitrile en position *C*-3 de l'azaindole induit un décalage de la molécule **224** dans le site actif et engendre la création de nouvelles interactions avec une lysine située dans la *hinge*. Les changements de position de l'urée et de l'aniline pourraient justifier les différences d'activité des séries cyano et pyrrolopyrimidine.

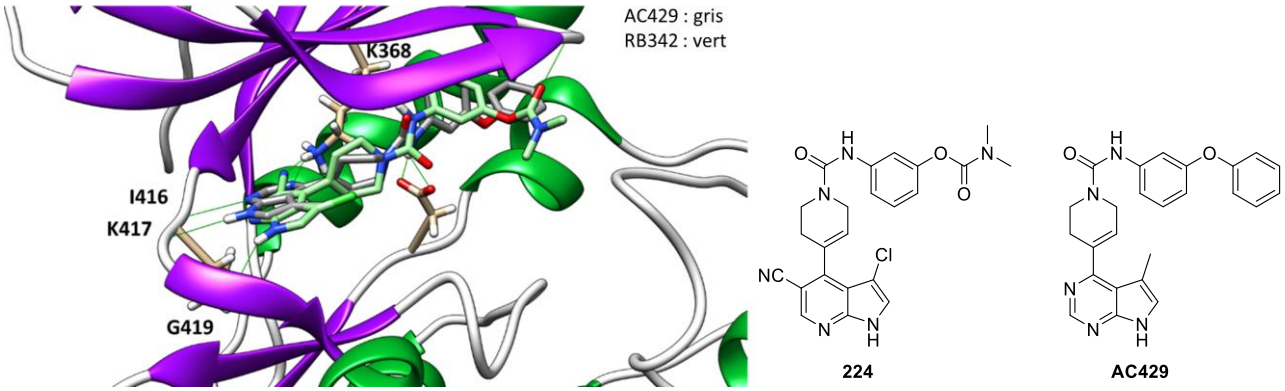


*Figure 40 : Docking des composés **224** et **AC429** dans le site actif de LIMK1.*

De plus, le *docking* du composé **224** (série cyano) a mis en évidence une interaction entre l'hydrogène de l'aniline et un résidu aspartate. Afin d'améliorer la force de cette liaison hydrogène, l'acidité de l'hydrogène de l'urée a été améliorée en remplaçant cette fonction par une cyanoguanidine.

La synthèse de deux composés **242** et **243** a été réalisée à partir de la 3-bromoaniline et de la 3-aminophenyl dimethylcarbamate (Schéma 45). Les anilines ont été activées en isourées avec du diphényl *N*-cyanocarbonimidate **244**, puis les intermédiaires obtenus ont été engagés immédiatement dans la deuxième étape de formation de la cyanoguanidine en présence de l'amine **218**. Après 1 à 2 h de réaction, les composés **242** et **243**, analogues des urées **221** et **224** (Tableau 17, page 87), ont été obtenus avec des rendements de 42 % et 31 % respectivement. Leurs évaluations sur kinases ont montré une nette diminution des constantes d'inhibition, passant sous le seuil de 50 nM sur LIMK2 pour **242** et sous le seuil de 10 nM sur la même kinase pour **243**.

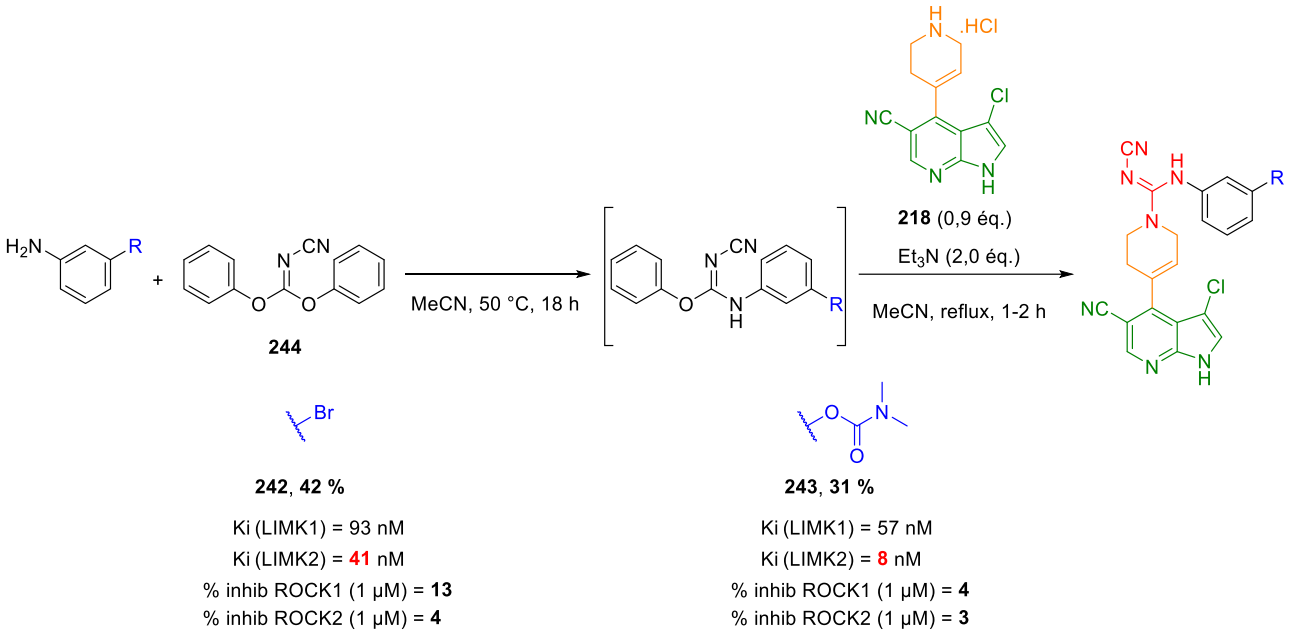


*Schéma 45 : Synthèse et évaluation biologique des composés de type cyanoguanidine **242** et **243**.*

Le remplacement de la fonction urée par une fonction cyanoguanidine a provoqué comme visé une amélioration des affinités pour les LIMKs des composés **242** et **243** par rapport à leurs analogues **221** et **224** (Figure 41). Cette modification pourrait dès lors être envisagée sur d'autres composés, telles que les molécules sélectives de LIMK2 par rapport à LIMK1 **228** et **229** (Tableau 17, page 87) dans le but d'optimiser l'affinité de ces derniers pour LIMK2.

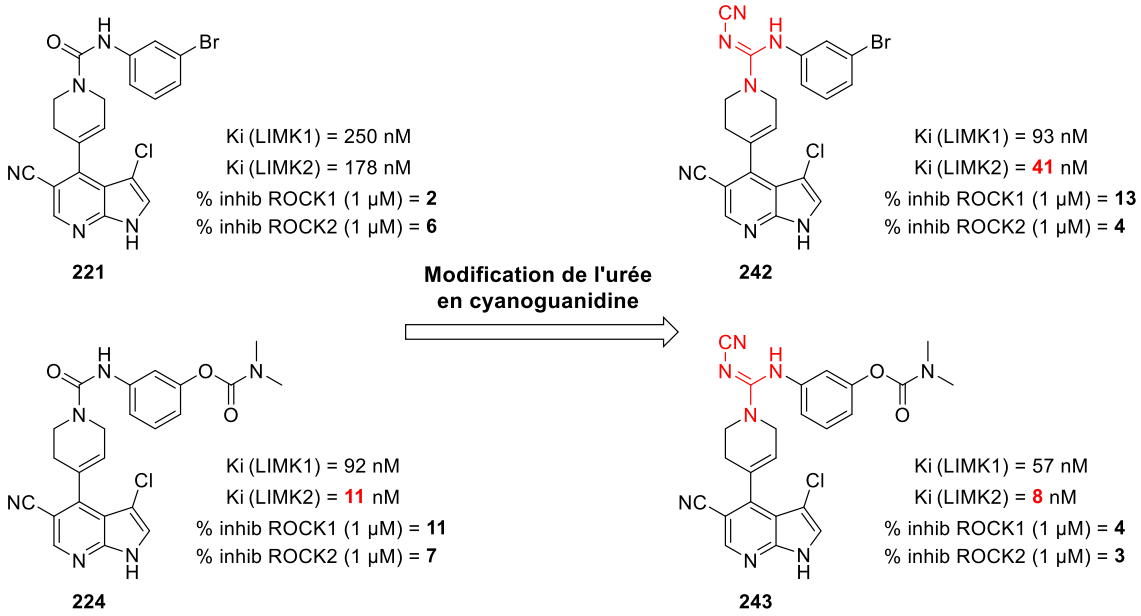


Figure 41 : Influence de la modification de l'urée en cyanoguanidine sur les affinités pour les LIMKs.

En conclusion, la modification de la base hétérocyclique pyrrolopyrimidine par une base du type 1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carbonitrile nous a permis de développer une nouvelle série de 23 inhibiteurs qui ont montré une bonne sélectivité pour les LIMKs par rapport aux ROCKs. L'exploitation des RSA, complétée par des résultats de modélisation moléculaire, ont permis la diminution des constantes d'inhibition sous le

seuil de 100 nM pour les LIMKs. Le remplacement de la fonction urée par une fonction cyanoguanidine a mené aux composés **242** et **229**, présentant de bonnes affinités pour LIMK2 de 41 et 8 nM respectivement.

IV – Conclusion

À travers ce chapitre, nous avons décrit la synthèse et l'optimisation de nouveaux inhibiteurs des LIMKs en réalisant des RSA sur les 3 sites de pharmacomodulations du composé phare pyrrolopyrimidine **AC429**.

Dans un premier temps, l'optimisation de la partie aniline de l'urée sur la base pyrrolopyrimidine méthylée a permis la synthèse de 32 composés répartis majoritairement dans 4 séries : Ph-O-Ph, Alk-O-Ph, Ph-O-Alk et Ph-N-Ph (Figure 42).

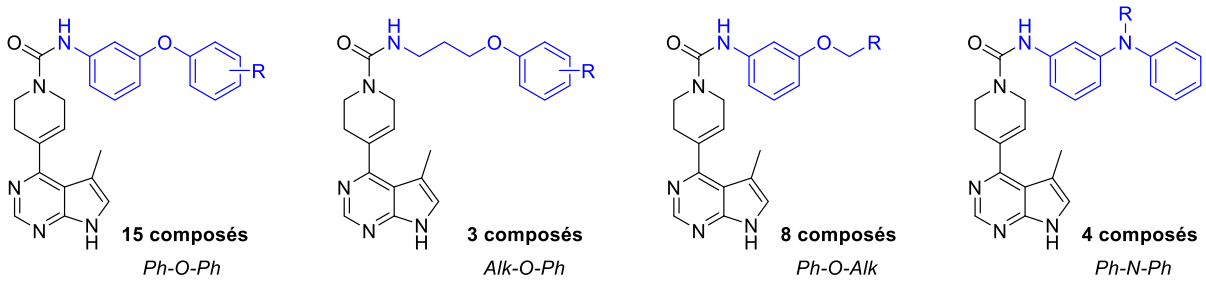


Figure 42 : Bilan des inhibiteurs obtenus après des RSA sur la partie aniline de l'urée avec une base pyrrolopyrimidine méthylée.

Les anilines des composés les plus affins des LIMKs ont été réutilisées pour enrichir les RSA réalisées cette fois-ci avec une base pyrrolopyrimidine tricyclique et ainsi améliorer la sélectivité pour les LIMKs vis-à-vis des ROCKs (Figure 43).

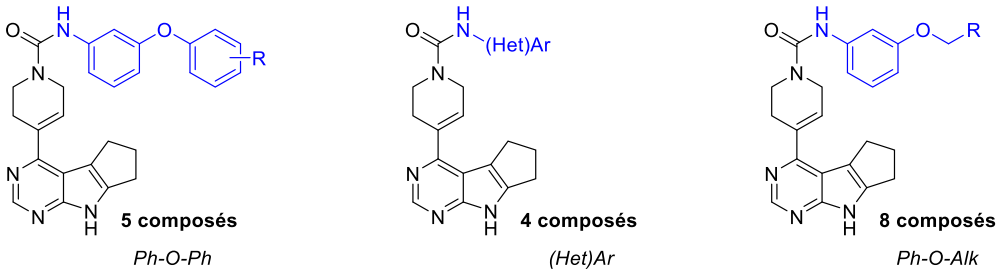


Figure 43 : Bilan des inhibiteurs synthétisés avec une base pyrrolopyrimidine tricyclique.

Les modulations de l'aniline de l'urée ont permis de synthétiser 49 composés inédits avec des constantes d'inhibition pour les LIMKs ne dépassant pas les 100 nM pour la majorité. Il est à noter que parmi les 16 composés ayant des Ki pour les LIMKs inférieurs à 20 nM, 10 d'entre eux présentent d'excellentes affinités avec des Ki plus bas que 5 nM.

Dans un second temps, la modification du cycle central 3,6-dihydropyridine par un dérivé de l'acide 1-aminocyclohex-3-ène-1-carboxylique à mener à 4 composés présentant des Ki de plusieurs centaines de nanomolaires pour les LIMKs. Ces données nous ont conduits à fixer le cycle 3,6-dihydropyridine pour la modification du dernier site de pharmacomodulation : la base hétérocyclique.

Finalement, 23 produits ont été synthétisés en modifiant la base hétérocyclique de type 7H-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidine. Les plus affins des LIMKs sont répartis en 3 familles de type 1*H*-pyrrolo[2,3-

b]pyridine-5-carbonitrile (Figure 44). Ces nouvelles bases hétérocycliques ont notamment induit de très bonnes améliorations de la sélectivité des LIMKs vis-à-vis des ROCKs.

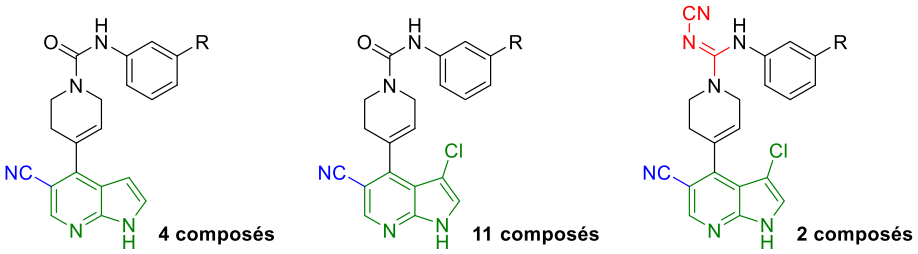


*Figure 44 : Familles de composés les plus affins des LIMKs de type 1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carbonitrile.*

Ainsi, après avoir effectué une sélection sur enzymes purifiées des composés les plus affins des LIMKs et les plus sélectifs vis-à-vis de ROCK, les meilleures molécules des différentes séries ont été évaluées sur plusieurs lignées cellulaires.

Chapitre 2

Évaluations *in cellulo* et *in vivo* des inhibiteurs des LIMKs

I – Objectifs

Dans le chapitre précédent, l'affinité et l'activité *in vitro* de nombreuses molécules ont été évaluées sur les LIMKs et sur les ROCKs, certaines d'entre elles ont présenté de très bons résultats sur enzymes purifiées. Pour aller plus loin dans la caractérisation des effets biologiques provoqués par ces composés, l'équipe de biologistes du Dr Bénédetti et du Dr Vallée du CBM a quantifié de façon quasi systématique les effets cellulaires induits par nos meilleurs inhibiteurs sur les cellules HeLa, une lignée cellulaire issue d'un cancer du col de l'utérus très fréquemment utilisée dans les laboratoires de biologie cellulaire. Cela a permis d'avoir une première caractérisation du comportement des composés (toxicité et efficacité sur la phosphorylation de la cofiline, substrat des LIMKs) sur des cellules tumorales.

L'objectif premier de cette thèse a été de synthétiser et sélectionner les meilleurs candidats pour une validation préclinique sur un modèle murin de NF1. Pour cette pathologie, l'idéal aurait été de tester les composés potentiellement intéressants sur les lignées cellulaires à l'origine de la manifestation la plus fréquente de la NF1 (98 % des patients en sont atteints) : les neurofibromes cutanés (tumeurs bénignes se développant au niveau des terminaisons nerveuses de la peau). Malheureusement, à l'époque de ce travail, des lignées immortalisées de telles cellules (cellules de Schwann mutées pour les deux exemplaires du gène *NF1*) n'étaient pas encore disponibles pour la communauté scientifique. Une autre possibilité aurait été de travailler sur des cellules des capsules frontières KO pour les deux exemplaires du gène *NF1* issues du modèle murin de NF1 sur lequel nous allons travailler, mais ces dernières ne sont pas immortalisées et sont difficiles à isoler et cultiver. C'est la raison pour laquelle, en ce qui concerne la NF1, il n'y a pas eu de tests sur d'autres lignées cellulaires que les cellules HeLa.

Après avoir quantifié l'affinité de nos inhibiteurs pour les LIMKs puis l'inhibition de la phosphorylation de la cofiline (activité enzymatique), des tests de migration cellulaire ont été réalisés pour déterminer l'effet cellulaire induit par ces molécules sur le cytosquelette et par conséquent, sur la migration cellulaire. Une comparaison avec des références comme le **LX7101** et le **LIMKi3** a permis d'affiner la sélection des composés intéressants à 2 composés. La sélectivité de ces derniers a été évaluée ensuite sur un panel de 482 kinases afin de confirmer que ces effets cellulaires sont liés à la seule inhibition des LIMKs et non à celle d'une *off target*.

Enfin, après la réalisation d'études d'ADME-tox (Absorption, Distribution, Métabolisme, Élimination, Toxicité) sur ces 2 composés, leur évaluation préclinique a pu être effectuée par l'équipe du Pr Topilko sur un modèle murin inédit de NF1 présentant des neurofibromes cutanés (Figure 45).

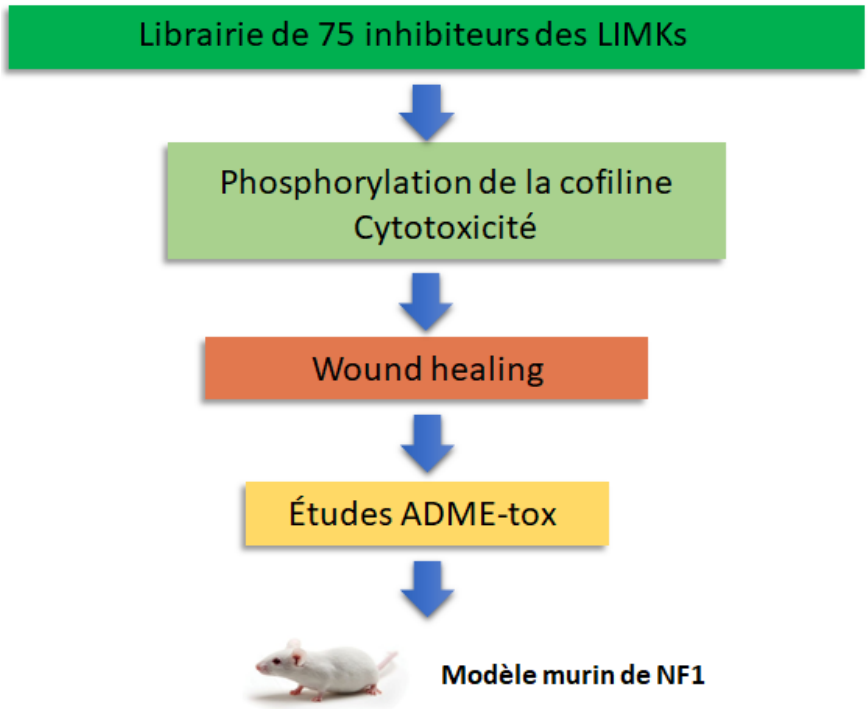
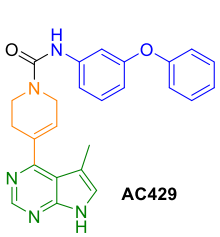
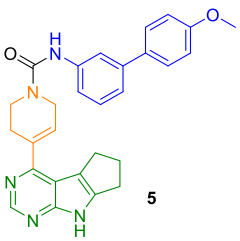
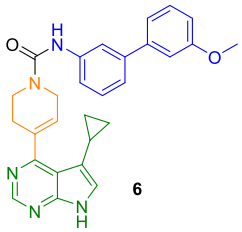
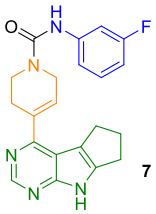


Figure 45 : Résumé des tests biologiques jusqu'à la sélection des meilleurs composés pour une validation préclinique sur un modèle murin de NF1.

Par ailleurs, au cours de ma 1ère année, un projet de maturation co-financé par la Région Centre-Val de Loire (C-Valo) et le Fonds européen de développement régional (FEDER) a été accordé au Dr Bénédetti et au Pr Routier. Ce projet porte sur la validation préclinique d'inhibiteurs des LIMKs dans le traitement du glioblastome dont les traitements actuels sont peu efficaces. Les quatre molécules les plus prometteuses, obtenues par l'équipe entre 2018 et 2020, dont le composé **AC429**, ont été le point de départ de ce projet de recherche (Tableau 18). Pour valider l'utilisation de nos inhibiteurs dans le traitement du glioblastome, nous avons d'abord déterminé si ces quatre composés étaient capables de passer la barrière hémato-encéphalique (BHE) de souris saines. On estime que des molécules passent efficacement la BHE lorsque le ratio cerveau/plasma est supérieur à 10 %. Pour nos 4 molécules, le ratio cerveau/plasma est supérieur à 0,1 donc nos composés arrivent à passer la BHE avec succès.

Tableau 18 : Résultats des tests du passage de la BHE, sur souris saines, au bout de 3 h des 4 composés sélectionnés en 2020.

	 AC429	 5	 6	 7
Ratio cerveau/plasma (3 h)	0,13	0,23	0,20	0,38

Ces résultats encourageants nous ont poussés à rechercher parmi nos inhibiteurs des LIMKs les plus affins, ceux qui inhibaient le plus fortement l'activité kinase de ces dernières dans des lignées cellulaires de glioblastome : les cellules U251 et DBTRG (provenant d'un glioblastome multiforme).

Ainsi, les mesures des taux de phosphorylation de la cofiline, substrat des LIMKs, ont été réalisées par nos partenaires du CBM sur 3 lignées cellulaires : HeLa, U251 et DBTRG.

L'inhibition d'une cible biologique et en particulier des LIMKs peut s'accompagner d'une cytotoxicité non désirée de nos composés du fait de l'importance de ces dernières dans la régulation de la vie cellulaire. Si dans la recherche d'anticancéreux (ex : glioblastome) cette cytotoxicité ne représente pas automatiquement un frein important, elle devient cependant un facteur à prendre en compte pour d'autres pathologies comme la NF1, pour lesquelles l'effet sur la dynamique du cytosquelette d'actine est le seul à être recherché. Ainsi, la cytotoxicité de nos composés a été évaluée sur deux lignées cellulaires : HeLa et DBTRG.

II – Évaluation des paramètres cellulaires des inhibiteurs des LIMKs

1. Détermination de la cytotoxicité des composés

a) Principe du test

La mesure de la cytotoxicité de nos inhibiteurs sur les lignées cellulaires HeLa et DBTRG a été réalisée par l'équipe de biologistes du CBM, grâce au test CellTiter-Glo® commercialisé par l'entreprise Promega. Le but de ce test est de déterminer le nombre de cellules viables après incubation avec un composé grâce à une réaction bioluminescente qui mesure la concentration d'ATP. L'ATP étant produite par les cellules vivantes, la mesure de l'intensité lumineuse permet de quantifier le nombre de cellules viables et renseigne donc sur la cytotoxicité des composés testés.

Les cellules (HeLa ou DBTRG) ont été incubées avec un inhibiteur pendant 48 h à diverses concentrations de travail. Après incubation, deux réactifs sont ajoutés : la luciférine de luciole (substrat) et l'Ultra-Glo Recombinant Luciferase (enzyme). En présence d'ATP provenant de cellules vivantes, d'oxygène et du co-facteur Mg^{2+}, la luciférase transforme son substrat en oxyluciférine avec une émission de photons (Schéma 46).

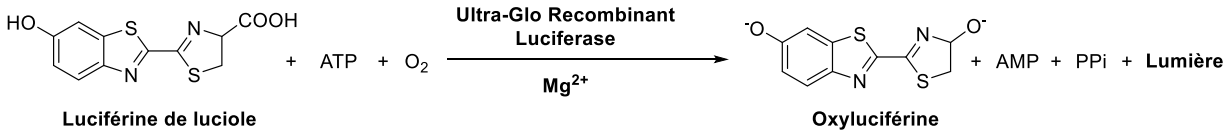


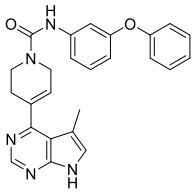
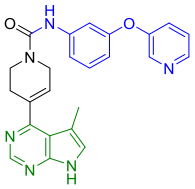
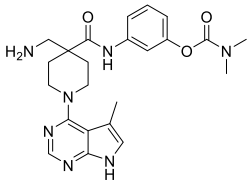
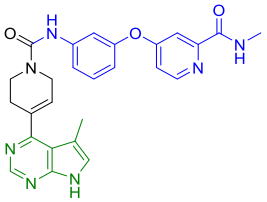
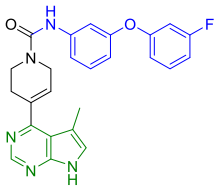
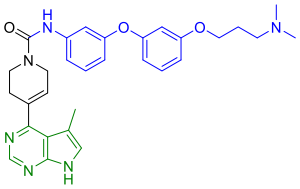
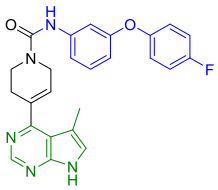
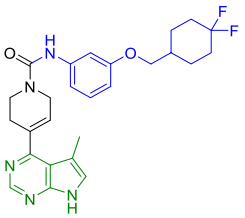
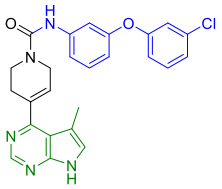
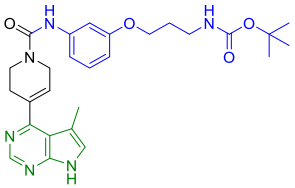
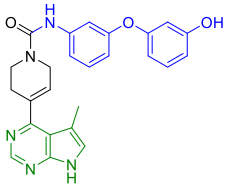
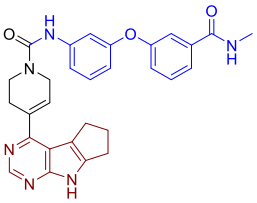
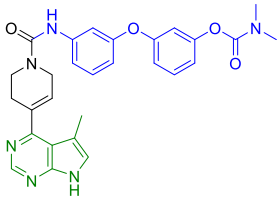
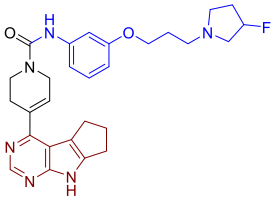
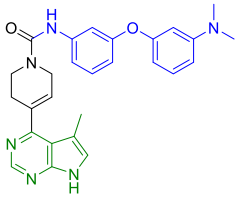
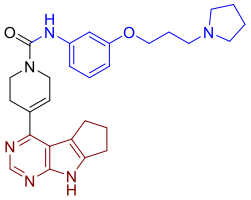
Schéma 46 : Réaction bioluminescente du test CellTiter-Glo®.

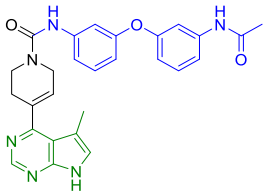
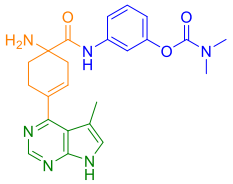
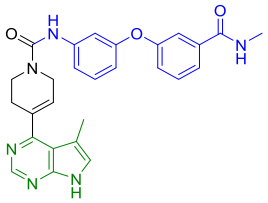
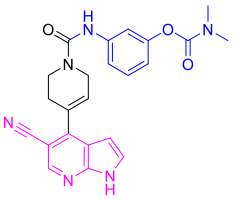
Le test a été réalisé pour chaque inhibiteur à 10 concentrations différentes, de 10 à 100 µM, et en duplicata afin d'établir une courbe dose-réponse et de mesurer la concentration médiane effective (EC_{50}) de cytotoxicité de nos inhibiteurs des LIMKs.

b) Résultats de cytotoxicité (HeLa)

L'évaluation de la cytotoxicité sur les cellules HeLa a été réalisée, selon le protocole évoqué plus haut, sur 18 composés. Le temps d'incubation de 48 h a été choisi afin de permettre aux composés de pénétrer les cellules et d'observer les effets provoqués suite à une exposition à long terme. Cette durée permet entre autres de prendre en compte certains processus biologiques tels que la métabolisation des composés, ce qui n'aurait pas été possible sans une longue incubation. Ces données de cytotoxicité sont rassemblées dans le Tableau 19 avec les références **AC429** et **LX7101** à titre de comparaison. Les composés peuvent être classés en deux familles : les composés cytotoxiques avec des EC_{50} inférieures à 10 µM (en rouge) et les composés très peu cytotoxiques dont les EC_{50} sont supérieures à 20 µM (en vert).

Tableau 19 : Évaluation de la cytotoxicité sur cellules HeLa, incubées pendant 48 h en présence d'inhibiteurs.

Entrée	Composé R =	Composé N°	EC_{50} (µM)	Entrée	Composé R =	Composé N°	EC_{50} (µM)
1		**AC429**	5	9		**48**	40
2		**LX7101**	45	10		**50**	37
3		**43**	4	11		**68**	10
4		**44**	5	12		**126**	25
5		**45**	2	13		**128**	15
6		**55**	23	14		**57**	>100
7		**53**	25	15		**134**	30
8		**47**	5	16		**137**	35

Entrée	Composé R =	N°	EC_{50} (µM)	Entrée	Composé R =	N°	EC_{50} (µM)
17		**52**	32	19		**199**	40
18		**51**	38	20		**208**	5

Dans la famille des inhibiteurs cytotoxiques en plus du **AC429** (entrée 1), on trouve 5 composés, dont 4 de type phénoxyaryle : les composés **43**, **44**, **45** et **47** (entrées 3-5 et 8) avec des EC_{50} comprises entre 2 et 5 µM. La substitution du second cycle aromatique de l'urée avec un atome d'halogène semble provoquer cette toxicité, peu importe la position de cet atome (méta ou para, entrées 3-5). La présence d'une diméthylamine sur ce second cycle induit également une cytotoxicité (**47**, entrée 8) avec une EC_{50} de 5 µM. Le composé **208** (entrée 20), seul exemple ici de la série cyano, induit lui-aussi une toxicité avérée pour les cellules HeLa avec une EC_{50} de 5 µM.

Parallèlement, 13 inhibiteurs ont montré peu ou pas de cytotoxicité. Parmi eux, on retrouve les composés **53**, **50**, **52** et **51** et (entrées 7, 10, 17, 18) qui avaient présenté dans le chapitre précédent d'excellentes affinités pour les LIMKs, avec des Ki inférieurs à 5 nM sur LIMK1 et inférieurs à 15 nM sur LIMK2. La modification de la base hétérocyclique méthylée en base tricyclique semble diminuer la cytotoxicité des inhibiteurs pour les cellules HeLa. On peut ainsi comparer le composé **51** (entrée 18) avec un EC_{50} de 38 µM avec son analogue tricyclique **57** (entrée 16) qui a un EC_{50} de plus de 100 µM. Trois autres composés tricycliques ont été testés sur les cellules HeLa (**57**, **134**, **137** ; entrées 14-16) et aucun d'eux ne présente de cytotoxicité. De même, les composés **199** et **LX7101** dont le cycle central a été modifié par un acide aminé cyclique ne présentent pas de toxicité importante (entrées 19 et 2).

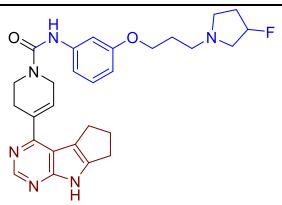
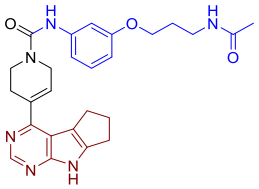
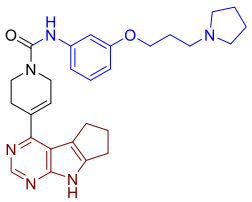
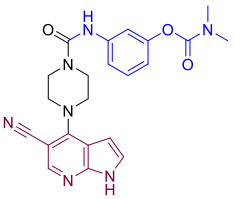
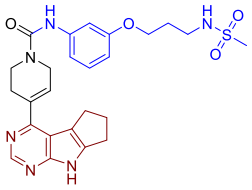
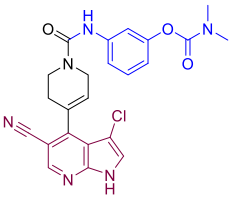
Ces résultats de cytotoxicité sur cellules HeLa ont montré que dans l'ensemble, les inhibiteurs développés dans la partie précédente sont peu cytotoxiques et plus particulièrement ceux comportant une base hétérocyclique tricyclique. Pour rappel, ce 3ème cycle induit une sélectivité d'inhibition des LIMKs vis-à-vis de ROCK. Ces résultats laissent à penser que l'inhibition sélective des LIMKs vis-à-vis des ROCKs, qui sont situées en amont de la voie de signalisation et impliquées dans un très grand nombre de processus biologiques, permettrait de limiter les effets délétères dus à des actions cellulaires multiples, et par conséquent, de diminuer la cytotoxicité des composés.

c) Résultats de cytotoxicité (DBTRG)

Dans le cadre du projet secondaire sur le traitement du glioblastome, les cytotoxicités de 6 composés ont été mesurées sur les cellules DBTRG par nos partenaires du CBM selon le même protocole que celui évoqué ci-dessus (Tableau 20). Comme précédemment, les quatre composés tricycliques testés (**134**, **137**, **132**, **131** ; entrées 1-4) ont induit peu de toxicité après 48 h d'incubation, avec des EC_{50} supérieures à 35 µM. Les inhibiteurs **132** et **131** (entrées 3 et 4), qui font partie des inhibiteurs les plus affins des LIMKs avec des Ki

inférieurs à 15 nM, ont dépassé le seuil du test avec des EC_{50} dépassant les 100 µM après 48 h. Ces résultats concordent avec ceux obtenus précédemment sur les cellules HeLa : l'inhibition sélective de l'activité des LIMKs de ces composés ne semble pas diminuer la viabilité des cellules DBTRG. Cette absence de cytotoxicité a également été retrouvée pour les composés **214** et **224** (entrées 5 et 6), deux membres de la série cyano.

Tableau 20 : Évaluation de la cytotoxicité sur cellules DBTRG, incubées pendant 48 h en présence d'inhibiteurs.

Entrée	Composé R =	N°	EC_{50} (nM)	Entrée	Composé R =	N°	EC_{50} (nM)
1		**134**	35	4		**131**	>100
2		**137**	35	5		**214**	>100
3		**132**	>100	6		**224**	>100

Les évaluations de viabilité cellulaire sur un échantillon total de 22 molécules ont montré qu'une faible part (6 molécules, dont **AC429**) présentait une toxicité pour les cellules HeLa, tandis que la majorité des autres composés possède des EC_{50} supérieures à 25 µM. Les mesures de cytotoxicité sur les cellules DBTRG de 6 composés très sélectifs des LIMKs par rapport aux ROCKs, ont montré une très faible voir une absence de cytotoxicité.

La mesure de l'efficacité, dans les cellules, des inhibiteurs synthétisés a été réalisée par la suite, et pour cela, l'effet de l'inhibition des LIMKs a été mesuré en regardant le taux de phosphorylation de la cofiline.

2. Mesure des taux de phosphorylation de la cofiline

a) Principe de la mesure

Comme vu en introduction, les LIMKs inhibent la cofiline en phosphorylant son résidu Ser3, ce qui mène à une stabilisation des filaments d'actine et la formation de fibres de stress. Dans le chapitre précédent, nous avons déterminé les constantes d'inhibition (Ki) de chaque composé, *via* un test sur LIMKs purifiées, ce qui nous renseigne sur leur affinité. Afin d'observer la capacité des inhibiteurs à passer la membrane cellulaire, atteindre les LIMKs et inhiber leur activité catalytique dans les cellules, les taux de phosphorylation de la cofiline ont été mesurés sur trois lignées cellulaires : HeLa et U251/DBTRG (glioblastome).

En suivant un protocole décrit par l'équipe du Pr Lafanechère[152] pour évaluer l'activité de leur inhibiteur des LIMKs **Pyr1**, les cellules sont incubées pendant une courte période de 2 h en présence d'un inhibiteur à une concentration de 25 µM puis lysées. Cette concentration élevée permet de raccourcir le

temps d'expérience, ce qui accélère la caractérisation d'une quantité importante de composés. De plus, le temps court évite d'avoir un effet sur une *off target* qui altérerait l'expression génique des LIMKs ou de la cofiline, ce qui aurait un effet indirect sur les mesures réalisées. Une détection semi-quantitative de la cofiline phosphorylée (P-cofiline) a été réalisée par western blot, en utilisant comme révélateur un anticorps dirigé contre le site de phosphorylation Ser3 de cette dernière (Figure 46). Le DMSO est utilisé comme contrôle et la phosphorylation de la cofiline est normalisée par rapport à la cofiline totale grâce à un anticorps anti-cofiline. Cela permet de calculer le rapport de la quantité P-cofiline/cofiline et d'obtenir un pourcentage d'inhibition de la phosphorylation de la cofiline pour chaque inhibiteur. L'actine est ici utilisée comme contrôle de charge et de transfert du western blot.

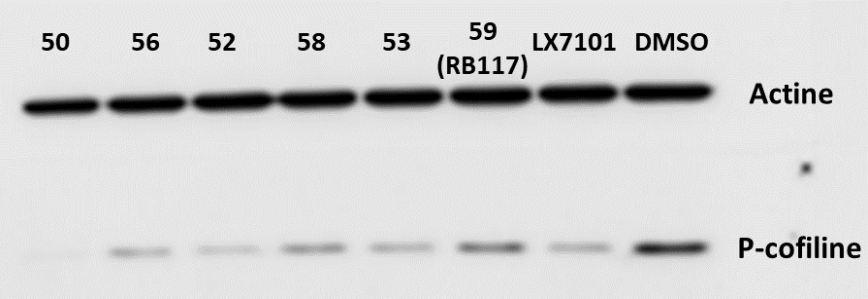
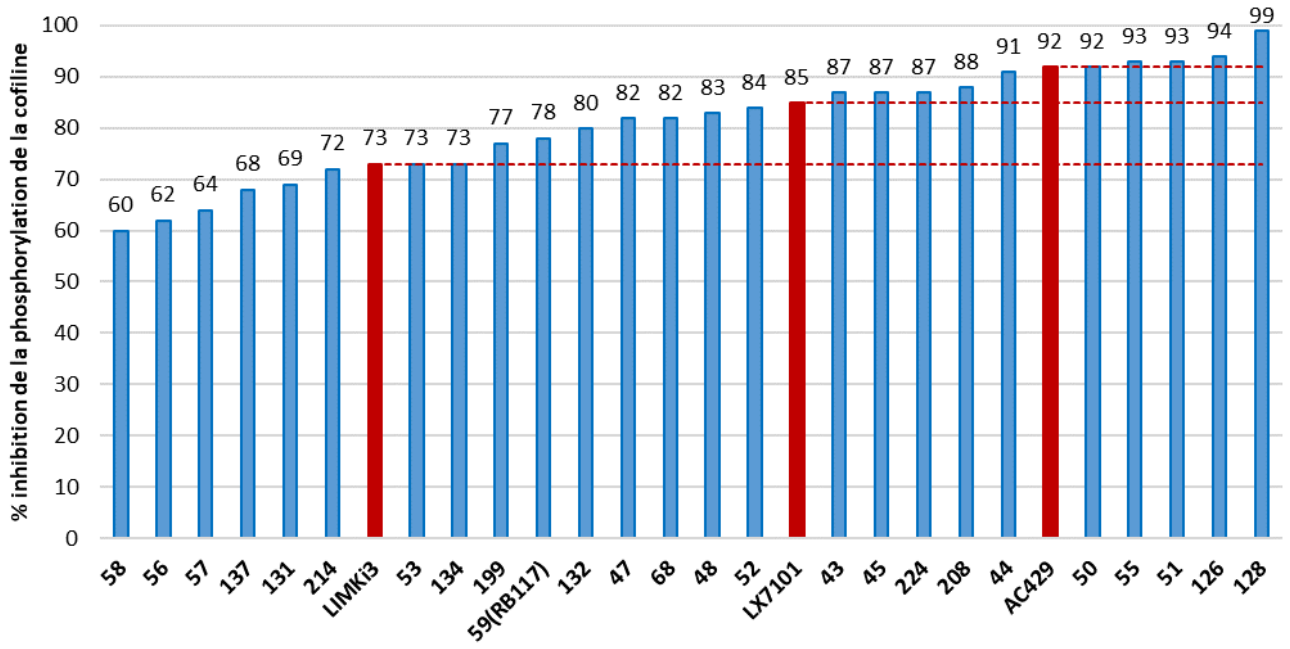


*Figure 46 : Western Blot quantifiant les effets de 7 inhibiteurs, dont **LX7101**, avec le DMSO comme contrôle. L'actine est repérée sur la ligne du haut et la cofiline phosphorylée (P-cofiline) sur celle du dessous. L'actine est normalisée entre chaque composé pour pouvoir comparer les valeurs de P-cofiline.*

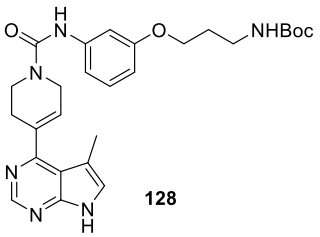
b) Lignée HeLa

Parmi les 76 inhibiteurs synthétisés au chapitre 1, les mesures d'inhibition de la phosphorylation de la cofiline sur les cellules HeLa ont été effectuées, par nos partenaires du CBM, sur 25 composés les plus affins en plus de trois références : les molécules **LIMKi3** et **LX7101** issues de la littérature ainsi que l'inhibiteur **AC429** (Graphe 1). Sur les 25 produits, 19 ont montré des efficacités supérieures à **LIMKi3** (73 % d'inhibition) et 10 d'entre eux ont montré une meilleure inhibition de la phosphorylation de la cofiline que **LX7101** (85 % d'inhibition). De très bonnes inhibitions de la phosphorylation de la cofiline supérieures à 92 % (**AC429**) ont même pu être mesurées sur 4 composés (**128**, **126**, **55** et **51** ; Figure 47).



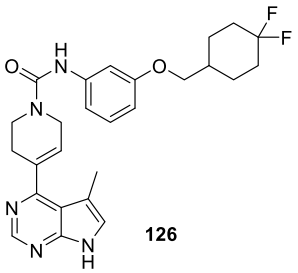
Graphe 1 : Pourcentages d'inhibition de la phosphorylation de la cofiline sur les cellules HeLa de 25 inhibiteurs

Les 4 produits les plus efficaces sur l'inhibition de la phosphorylation de la cofiline comportent tous une base hétérocyclique méthylée avec une urée de type phénoxyaryle (**55** et **51**) ou phénoxyalkyle (**128** et **126**). On remarque que la sélectivité de ces composés pour les LIMKs par rapport aux ROCKs est modérée, voire faible. Les composés plus sélectifs des LIMKs, comme les 2 produits de la série cyano (**208** et **224**), atteignent plus de 87 % d'inhibition et se classent parmi les composés plus actifs que **LX7101**. Parmi les 8 composés de la série tricyclique testés, seule la molécule **59**(**RB117**) (Figure 47), avec 78 % d'inhibition, surpasse la référence **LIMKi3**. L'unique composé de la série acide aminé testé (**199**) présente également une valeur proche de l'inhibiteur **59**(**RB117**) avec 77 % d'inhibition.



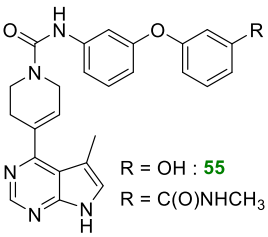
128

Ki (LIMK1) = 65 nM
Ki (LIMK2) = 51 nM
% inhib ROCK1 (1 µM) = 48
% inhib ROCK2 (1 µM) = 33
% inhib phospho cofiline HeLa (25 µM) = 99



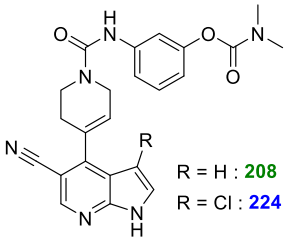
126

Ki (LIMK1) = 86 nM
Ki (LIMK2) = 217 nM
% inhib ROCK1 (1 µM) = 72
% inhib ROCK2 (1 µM) = 57
% inhib phospho cofiline HeLa (25 µM) = 94



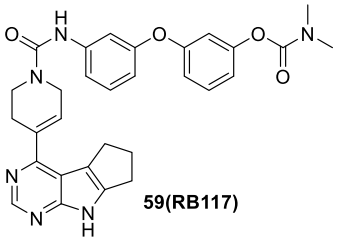
R = OH : **55**
R = C(O)NHCH$_3$: **51**

Ki (LIMK1) = 13 et 5 nM
Ki (LIMK2) = 16 et 3 nM
% inhib ROCK1 (1 µM) = 55 et 66
% inhib ROCK2 (1 µM) = 27 et 48
% inhib phospho cofiline HeLa (25 µM) = 93 et 93



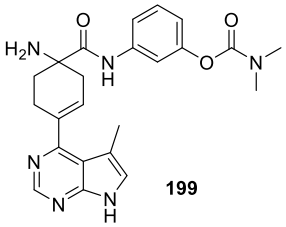
R = H : **208**
R = Cl : **224**

Ki (LIMK1) = 185 et 92 nM
Ki (LIMK2) = 21 et 11 nM
% inhib ROCK1 (1 µM) = 8 et 11
% inhib ROCK2 (1 µM) = 6 et 7
% inhib phospho cofiline HeLa (25 µM) = 88 et 87



59(RB117)

Ki (LIMK1) = 5 nM
Ki (LIMK2) = 21 nM
% inhib ROCK1 (1 µM) = -1
% inhib ROCK2 (1 µM) = 1
% inhib phospho cofiline HeLa (25 µM) = 78



199

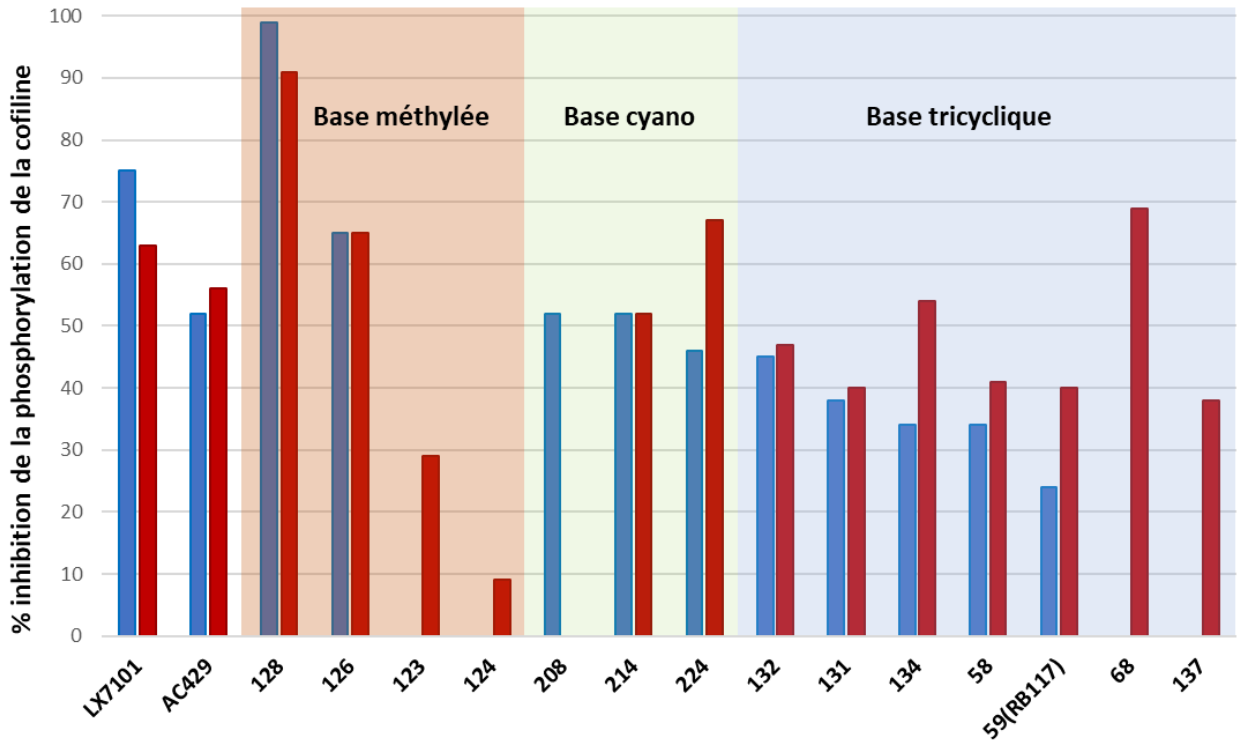
Ki (LIMK1) = 251 nM
Ki (LIMK2) = 103 nM
% inhib ROCK1 (1 µM) = 20
% inhib ROCK2 (1 µM) = 15
% inhib phospho cofiline HeLa (25 µM) = 77

Figure 47 : Résultats sur les LIMKs et ROCKs des composés les plus efficaces sur l'inhibition de la phosphorylation de la cofiline (HeLa).

Après nous être intéressés à la lignée HeLa, certains de ces composés ont été testés pour une application contre le glioblastome sur des cellules U251 et DBTRG.

c) Lignées U251 et DBTRG

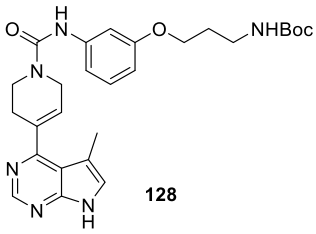
L'inhibition de la phosphorylation de la cofiline a été mesurée sur 10 composés pour la lignée U251 et 13 pour la lignée DBTRG (Graphe 2). Trois séries de molécules ont été évaluées : 4 composés de la série pyrrolopyrimidine méthylée (les molécules **128**, **126**, **123**, **124**), 3 autres de la série cyano (les produits **208**, **214**, **224**) et enfin, 7 inhibiteurs de la série pyrrolopyrimidine tricyclique (les composés **132**, **131**, **134**, **58**, **59**(**RB117**), **68**, **137**). À titre de comparaison, les valeurs des références **LX7101** et **AC429** ont été rajoutées sur le graphe.



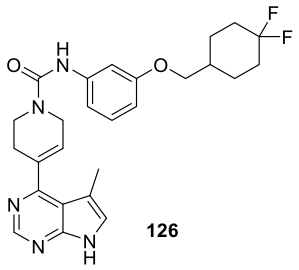
Graphe 2 : Pourcentages d'inhibition de la phosphorylation de la cofiline, après 2 h d'incubation à une concentration de 25 µM en inhibiteur, dans les cellules U251 (en bleu) et dans les cellules DBTRG (en rouge).

Pour la lignée U251 (en bleu sur le graphe), 4 composés ont des valeurs comparables ou supérieures à **AC429** (52 % d'inhibition) : les composés **128** et **126** de la série pyrrolopyrimidine méthylée et les molécules **208** et **214** de la série cyano (Figure 47). Le composé **128**, qui présentait une très bonne efficacité sur HeLa avec 99 % d'inhibition, est également classé en tête de série sur U251. C'est aussi le seul composé de ce lot d'inhibiteurs dont l'efficacité est supérieure à la référence **LX7101** (75 % d'inhibition).

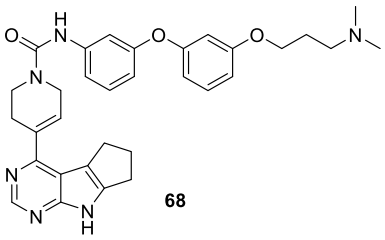
Concernant la lignée DBTRG, l'inhibiteur **128** reste le plus efficace de tous avec 91 % d'inhibition de la phosphorylation de la cofiline. Trois autres composés dépassent les valeurs mesurées avec les composés **LX7101** et **AC429** : les molécules **126** (65 % d'inhibition) et **224** (67 % d'inhibition), ainsi qu'un inhibiteur tricyclique **68** (69 % d'inhibition) non évalué sur U251 (Figure 48), ont été retrouvés comme les plus efficaces sur l'inhibition de la phosphorylation de la cofiline.



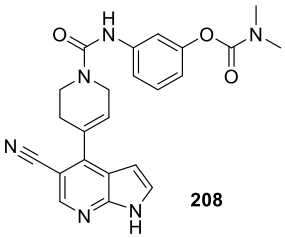
Ki (LIMK1) = 65 nM
Ki (LIMK2) = 51 nM
% inhib ROCK1 (1 µM) = 48
% inhib ROCK2 (1 µM) = 33
% inhib phospho cofiline U251 (25 µM) = 99
% inhib phospho cofiline DBTRG (25 µM) = 91



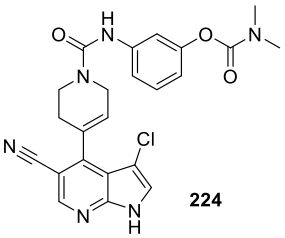
Ki (LIMK1) = 86 nM
Ki (LIMK2) = 217 nM
% inhib ROCK1 (1 µM) = 72
% inhib ROCK2 (1 µM) = 57
% inhib phospho cofiline U251 (25 µM) = 65
% inhib phospho cofiline DBTRG (25 µM) = 65



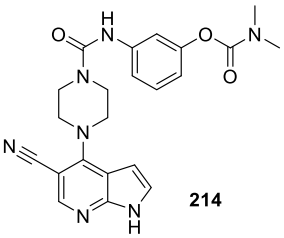
Ki (LIMK1) = 8 nM
Ki (LIMK2) = 28 nM
% inhib ROCK1 (1 µM) = -8
% inhib ROCK2 (1 µM) = 2
% inhib phospho cofiline U251 (25 µM) = ND
% inhib phospho cofiline DBTRG (25 µM) = 64



Ki (LIMK1) = 185 nM
Ki (LIMK2) = 21 nM
% inhib ROCK1 (1 µM) = 8
% inhib ROCK2 (1 µM) = 6
% inhib phospho cofiline U251 (25 µM) = 52
% inhib phospho cofiline DBTRG (25 µM) = ND



Ki (LIMK1) = 92 nM
Ki (LIMK2) = 11 nM
% inhib ROCK1 (1 µM) = 11
% inhib ROCK2 (1 µM) = 7
% inhib phospho cofiline U251 (25 µM) = 46
% inhib phospho cofiline DBTRG (25 µM) = 67



Ki (LIMK1) = 601 nM
Ki (LIMK2) = 60 nM
% inhib ROCK1 (1 µM) = 8
% inhib ROCK2 (1 µM) = 4
% inhib phospho cofiline U251 (25 µM) = 52
% inhib phospho cofiline DBTRG (25 µM) = 52

Figure 48 : Résultats sur les LIMKs et ROCKs des composés efficaces sur l'inhibition de la phosphorylation de la cofiline (U251 et DBTRG).

Après avoir évalué l'efficacité des inhibiteurs des LIMKs sur l'inhibition de la phosphorylation de la cofiline dans les cellules, l'étape suivante a consisté à mesurer l'effet des composés sur un processus cellulaire dépendant de la polymérisation/dépolymérisation de l'actine qui est impacté par la phosphorylation de la cofiline : la migration cellulaire. Pour cela, des tests de cicatrisation ont été réalisés sur une sélection d'inhibiteurs.

III – Effet des inhibiteurs sur la migration cellulaire

1. Principe du test de cicatrisation

Le test de cicatrisation ou *wound healing* est un test biologique qui permet d'observer l'effet d'un composé sur la migration cellulaire. Le principe est le suivant : une population de cellules formant un tapis cellulaire est divisée en 2 en faisant une blessure à l'aide d'un grattoir ou d'une pipette, puis le temps nécessaire aux cellules pour migrer et fermer la blessure (cicatriser) est mesuré (Figure 49). Le milieu sur lequel sont cultivées les cellules est appauvri en sérum de veau fœtal, ce qui diminue leur apport en facteur de croissance. Ceci a pour effet de limiter la prolifération cellulaire afin que seule la migration soit responsable de la cicatrisation.

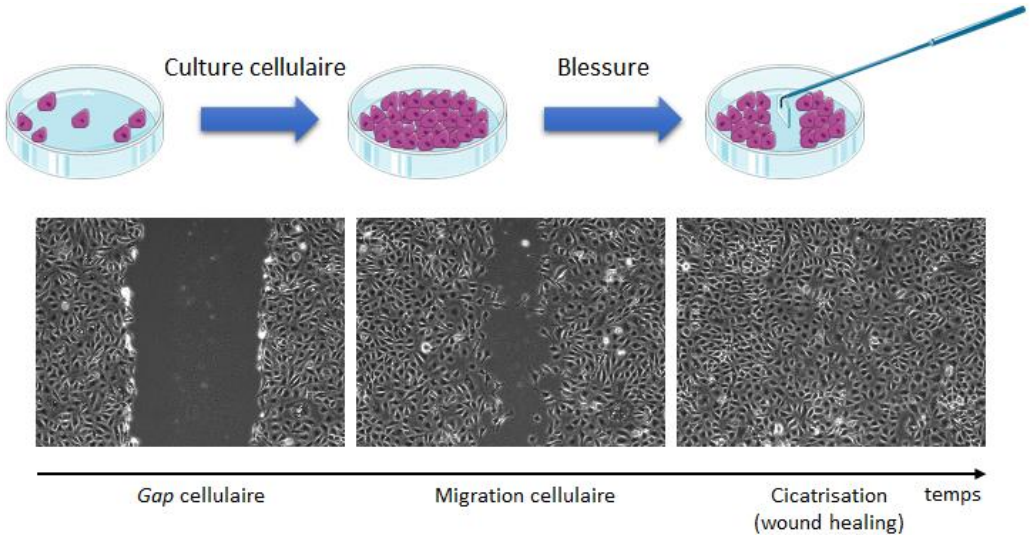


Figure 49 : Représentation du test de cicatrisation.

D'après les résultats précédents, 3 molécules (**128**, **126**, et **224** ; Figure 48) ont été sélectionnées pour des tests de migration cellulaire sur les lignées de glioblastome U251 et DBTRG. En parallèle, l'équipe du Dr Ruchaud de la Station Biologique de Roscoff, que je remercie grandement pour sa contribution à ce projet, a réalisé les tests de cicatrisation sur 15 composés sur des cellules U2OS (cellules d'ostéosarcome), car cette équipe les utilise de façon standard pour ce type d'études puisqu'elles migrent rapidement et sont faciles à cultiver.

2. Exploitation des résultats des tests de cicatrisation

a) Lignée U251 et DBTRG

L'équipe du CBM a réalisé les tests de migration cellulaire sur les cellules U251 et DBTRG sur les 3 composés **128**, **126**, **224** et avec le composé **LX7101** en tant que référence. Pour les cellules U251, celles-ci ont été traitées par 25 µM d'inhibiteur puis l'évolution de la cicatrisation a été suivie pendant 72 h (Figure 50, à gauche) en vidéomicroscopie. Le DMSO a été utilisé comme contrôle et chaque manipulation a été effectuée en duplicata. La durée d'expérience a été raccourcie à 48 h sur la lignée des DTBRG (Figure 50, à droite).

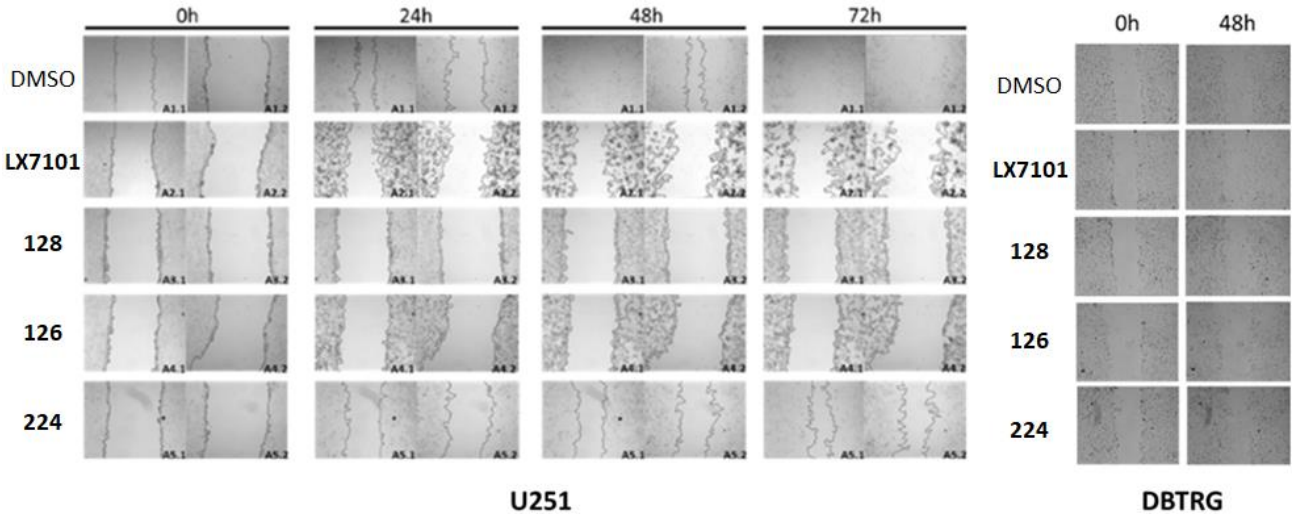


Figure 50 : Clichés des tests de migration cellulaire sur les cellules U251 et DBTRG de 4 inhibiteurs à une concentration de 25 µM.

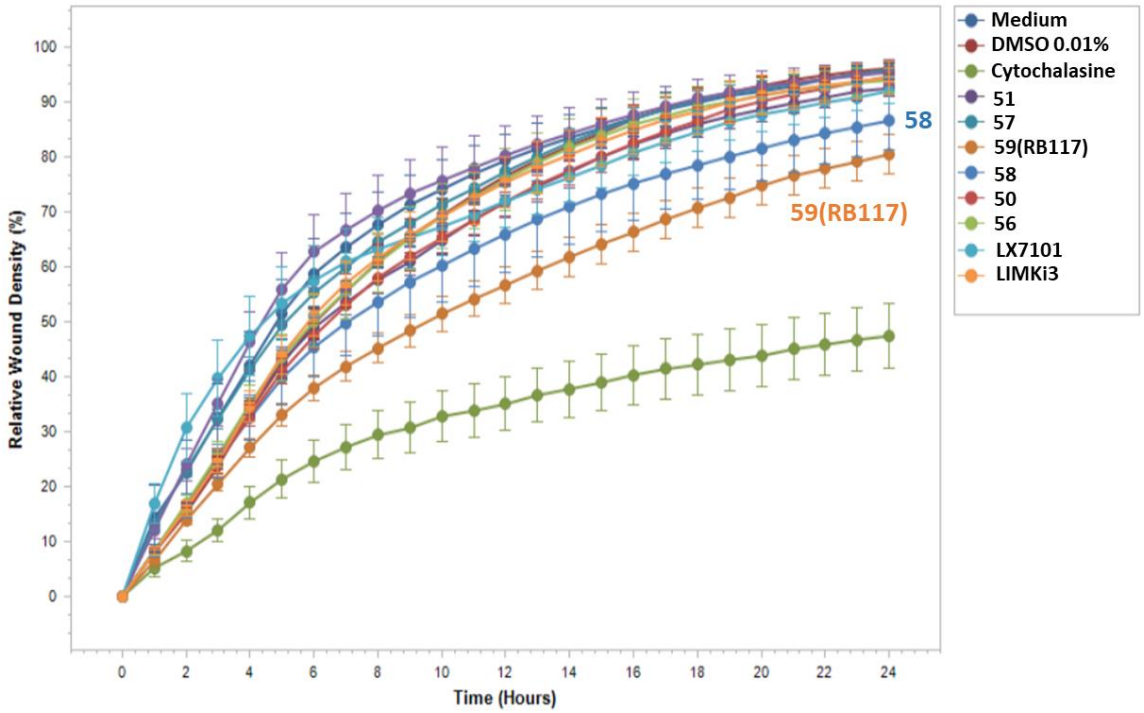
Au bout de 24 h, la blessure des cellules U251 a presque entièrement été refermée dans l'expérience de contrôle tandis qu'aucune migration n'a été observée en présence des inhibiteurs **128** et **126**. Un début de cicatrisation a été constaté pour le **LX7101** et **224**. Après 48 h et 72 h, si la blessure a complètement été refermée dans le contrôle, aucun changement notable n'a été observé en présence d'inhibiteurs des LIMKs. La migration cellulaire des cellules U251 a été inhibée complètement pour deux produits : **128** et **126**. L'expérience sur la lignée DBTRG, plus difficile à interpréter, montre une inhibition de la migration cellulaire de **126** supérieure aux autres composés et au contrôle.

Ainsi, les deux composés avec une base pyrrolopyrimidine méthylée, les molécules **128** et **126**, ont montré des résultats cellulaires probants sur la dynamique du cytosquelette d'actine dans des cellules U251 et DBTRG.

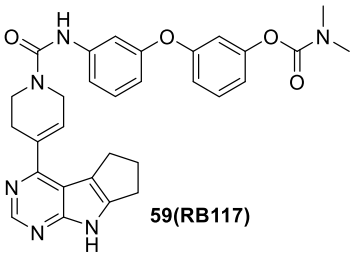
b) Lignée U2OS

Ce protocole diffère légèrement du précédent ; les cellules sont traitées à une concentration de 2,5 µM en inhibiteur pendant 24 h. Chaque expérience est reproduite en 6 exemplaires pour fournir un graphe présentant l'évolution de la densité cellulaire dans la blessure en fonction du temps. Le DMSO est utilisé comme contrôle et les inhibiteurs **LX7101** et **LIMKi3** ainsi que la cytochalasine (molécule naturelle qui inhibe fortement la polymérisation de l'actine) sont utilisés comme références. Deux lots d'expériences ont été réalisés, les molécules sélectionnées pour ces tests faisaient partie des meilleures selon les critères décrits plus haut (affinité pour les LIMKs et/ou sélectivité, cytotoxicité, inhibition de la phosphorylation de la cofiline). La migration cellulaire est suivie le système d'imagerie cellulaire automatisé Incucyte®.

Le premier lot était composé de 6 molécules : 2 appartenant à la série pyrrolopyrimidine méthylée (les composés **50** et **51**) et 4 molécules à la série pyrrolopyrimidine tricyclique (les inhibiteurs **57**, **59**(**RB117**), **58**, **56**) (Graphe 3). Le profil de migration cellulaire de la majorité des composés est similaire aux références **LX7101** et **LIMKi3** à l'exception de 2 molécules : **59**(**RB117**) et **58** (Figure 51). Ces dernières induisent une inhibition de la migration cellulaire plus efficace que les autres au cours des 24 h d'expérience, avec une cicatrisation finale autour de 80 % contre plus de 90 % pour le reste des composés testés.

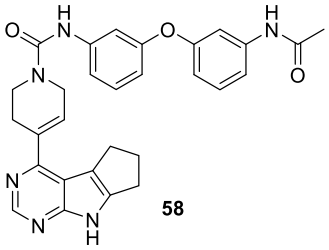


Graphe 3 : Résultats de wound healing sur cellules U2OS, en présence d'une solution de 2,5 µM d'inhibiteur sur 24 h.



59(RB117)

Ki (LIMK1) = 5 nM
Ki (LIMK2) = 21 nM
% inhib ROCK1 (1 µM) = -1
% inhib ROCK2 (1 µM) = 1
% inhib phospho cofiline HeLa (25 µM) = 78
% inhib phospho cofiline U251 (25 µM) = 24
% inhib phospho cofiline DBTRG (25 µM) = 40



58

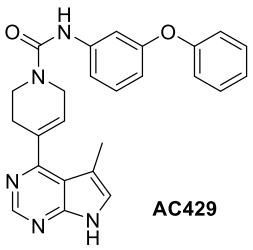
Ki (LIMK1) = 3 nM
Ki (LIMK2) = 13 nM
% inhib ROCK1 (1 µM) = -2
% inhib ROCK2 (1 µM) = 5
% inhib phospho cofiline HeLa (25 µM) = 60
% inhib phospho cofiline U251 (25 µM) = 34
% inhib phospho cofiline DBTRG (25 µM) = 41

Figure 51 : Données biologiques des meilleurs composés inhibant la migration cellulaire des cellules U2OS.

Suite à des problèmes de reproductibilité, les résultats associés au second lot de molécules composé de 7 produits n'ont pas permis de tirer une conclusion. Les expériences ont été refaites et sont toujours en cours à l'heure où sont écrites ces lignes.

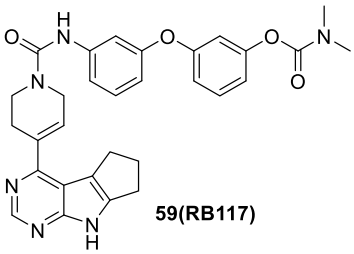
IV – Évaluation préclinique sur un modèle murin de NF1

Après l'exploitation de l'ensemble des données biologiques présentées ci-dessus, deux composés ont été sélectionnés pour être testés *in vivo* sur un modèle murin de NF1 : **AC429** et **59**(**RB117**) (Figure 52).



AC429

Ki (LIMK1) = 19 nM
Ki (LIMK2) = 14 nM
% inhib ROCK1 (1 µM) = 44
% inhib ROCK2 (1 µM) = 24
IC_{50} (ROCK1) = 1,5 µM
IC_{50} (ROCK2) = 3,8 µM
% inhib phospho cofiline HeLa (25 µM) = 92



59(RB117)

Ki (LIMK1) = 5 nM
Ki (LIMK2) = 21 nM
% inhib ROCK1 (1 µM) = -1
% inhib ROCK2 (1 µM) = 1
IC_{50} (ROCK1) = ND
IC_{50} (ROCK2) = ND
% inhib phospho cofiline HeLa (25 µM) = 78

Figure 52 : Formules et données biologiques des deux composés sélectionnés pour des tests murins de NF1.

Le composé pyrrolopyrimidine méthylé **AC429**, composé phare découvert durant la thèse du Dr Champiré (2014-2018), a déjà montré de très bons résultats sur un modèle murin d'ostéosarcome (voir introduction). En plus d'avoir de très bonnes affinités pour les LIMKs, inférieures à 20 nM, et une inhibition modérée des ROCKs, la molécule **AC429** reste l'un des meilleurs composés capables d'inhiber la phosphorylation de la cofiline de cellules HeLa (92 % à 25 µM). Le second composé sélectionné est l'inhibiteur pyrrolopyrimidine tricyclique **59**(**RB117**), qui est également très affin pour les LIMKs et aussi très sélectif vis-à-vis des ROCKs. Si son inhibition de la phosphorylation de la cofiline des cellules HeLa (78 % à 25 µM) est

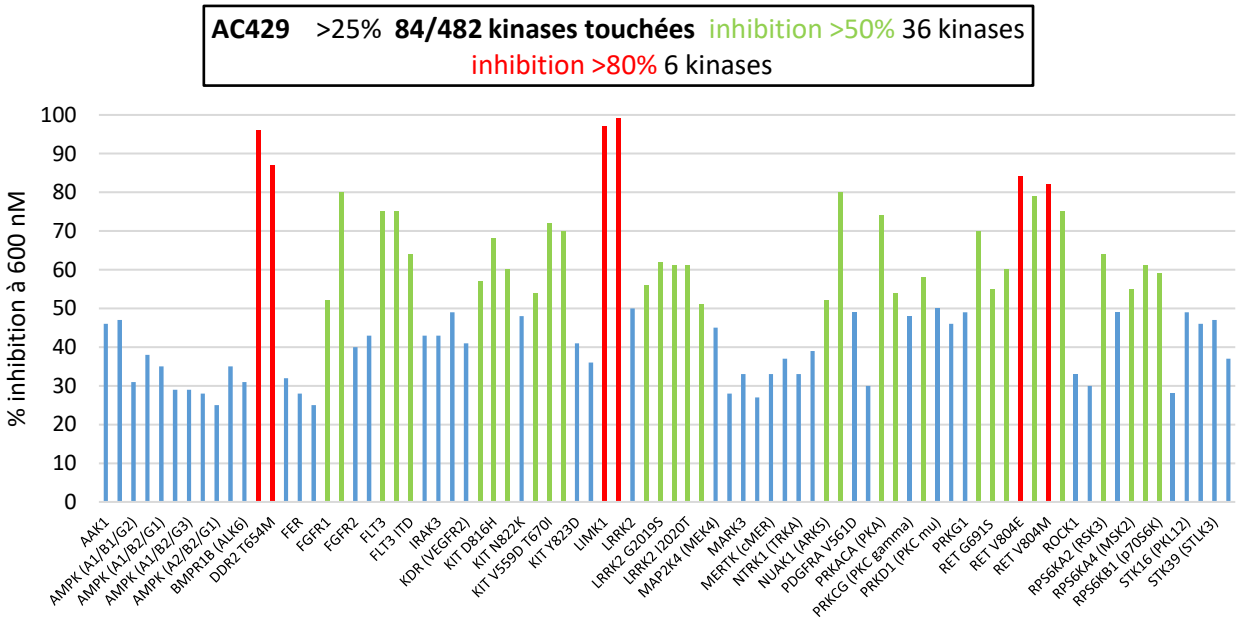
inférieure à celle du composé phare **AC429**, la molécule **59**(**RB117**) présente cependant les meilleurs résultats sur la migration cellulaire parmi toutes les molécules testées en migration cellulaire durant ma thèse.

Des caractérisations biologiques plus poussées de ces deux inhibiteurs ont été réalisées en amont des essais précliniques. La recherche d'éventuelles *off target* a été effectuée grâce à des tests de sélectivité sur kinases puis des études d'ADME-tox ont été réalisés afin de nous aider à déterminer à quelle dose et à quelle fréquence d'administration ces composés seront utilisés chez la souris.

1. Études de sélectivité des composés **AC429** et **59**(**RB117**)

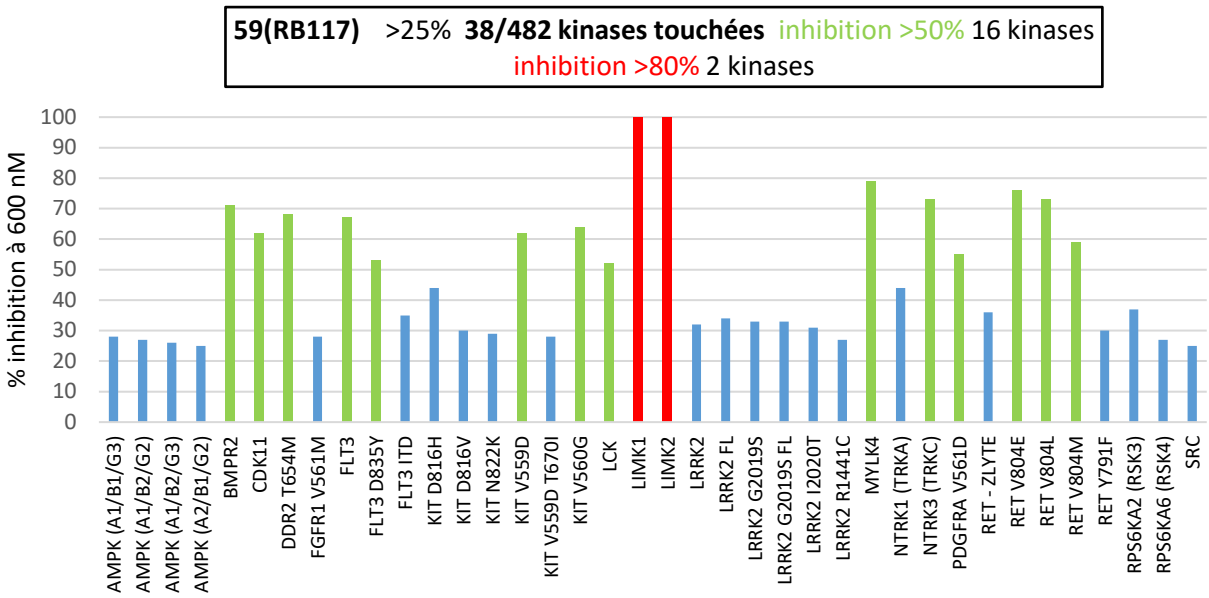
Pour confirmer que les effets cellulaires induits par les molécules **AC429** et **59**(**RB117**) proviennent bien de l'inhibition des LIMKs et non d'une autre kinase inconnue. Des tests de sélectivité (*kinome scan*) de ces composés ont été réalisés par la société Life Technologies sur un panel de 482 kinases à une concentration de 600 nM.

Les résultats de sélectivité de **AC429** sont très corrects, seules 84 kinases sur 482 sont inhibées à plus de 25 % (Graphe 4) et 30 d'entre elles ont plus de 50 % d'inhibition de leur activité, dont les ROCKs. En plus des LIMKs, seulement 4 autres kinases, régulant des mécanismes de prolifération, de différenciation ou d'adhésion, sont inhibées à plus de 80 % (BMPR1, DDR2, RET V804E, RET V804M).



*Graphe 4 : Test de sélectivité de **AC429** sur un panel de 482 kinases.*

En plus d'avoir montré une bonne sélectivité vis-à-vis des LIMKs par rapport aux ROCKs, l'inhibiteur **59**(**RB117**) a montré de très bons résultats sur le *kinome scan* (Graphe 5), avec seulement 38 kinases inhibées à au moins 25 % et parmi elles, 16 ont des inhibitions comprises entre 50 et 80 %. Au-delà de 80 % d'inhibition de l'activité enzymatique, seules LIMK1 et LIMK2 sont inhibées à 100 % par le composé **59**(**RB117**).



*Graphe 5 : Test de sélectivité de **59(RB117)** sur un panel de 482 kinases.*

Les deux molécules **AC429** et **59**(**RB117**) ont ainsi montré de bonnes sélectivités vis-à-vis des LIMKs par rapport aux autres kinases testées. Seulement 4 autres kinases ont été inhibées à plus de 80 % à une concentration de 600 nM par le composé **AC429** tandis que l'inhibiteur pyrrolopyrimidine tricyclique **59**(**RB117**) reste le plus sélectif avec deux fois moins de kinases inhibées à 25 et 50 %, et uniquement les LIMKs inhibées à plus de 80 %. Ainsi, la possibilité d'inhiber une *off target* responsable des effets cellulaires induits par ces deux inhibiteurs semble faible au vu des résultats des tests de sélectivité.

2. Études ADME-tox

Une étape essentielle dans la recherche pharmaceutique consiste à évaluer la toxicité et le devenir d'un médicament dans l'organisme par une étude d'ADME (Absorption, Distribution, Métabolisme, Élimination). L'ensemble de ces paramètres permet, entre autres, de définir la dose et la fréquence optimales de substance à injecter. La concentration de cette dernière dans le tissu à traiter doit être à la fois suffisante pour induire l'effet cellulaire voulu, mais également en dessous de son seuil de toxicité. Nous avons donc réalisé une étude préliminaire d'ADME-tox sur la molécule **59**(**RB117**) dans le but de mesurer ces différentes valeurs et justifier la dose choisie pour le modèle murin de NF1. Concernant **AC429**, des études similaires avaient été réalisées en amont des essais précliniques sur ostéosarcome.

a) Généralités

Absorption

L'absorption désigne le passage d'un médicament, depuis son site d'administration vers le sang, à travers les diverses barrières biologiques comme l'estomac, le foie, les poumons, la peau, etc… Il existe un grand nombre de modes d'administration comme la voie orale, les voies d'injection (sous-cutanés, intraveineuse, intramusculaire, etc…), la voie nasale ou encore l'inhalation pour ne citer qu'eux. Chacun d'entre eux présente des avantages et des inconvénients qui doivent être pris en compte en fonction de la pathologie à traiter ainsi que des propriétés physico-chimiques du médicament pour faciliter son absorption.

Par exemple, dans le cas de l'administration la plus répandue, par voie orale (*per os)*, l'absorption du médicament se fait le plus souvent au travers de la paroi gastro-intestinale, pour atteindre la veine porte

hépatique puis le système cave après un premier passage par le foie (Figure 53). Cet organe est le principal site de métabolisation de l'organisme et permet d'éliminer les toxines présentes dans le sang grâce à des séries de réactions enzymatiques.[206]

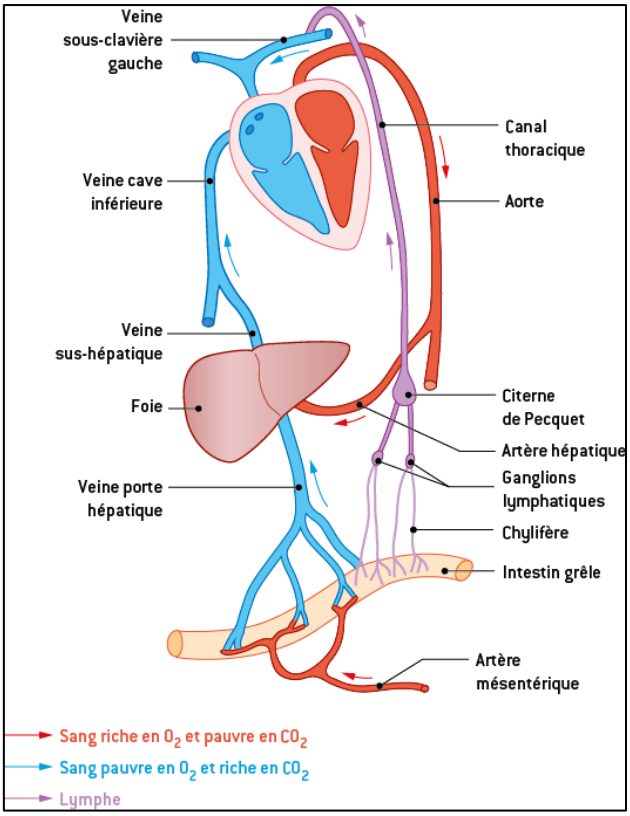


Figure 53 : Schéma de la circulation sanguine montrant le transport du sang de l'intestin par la veine porte hépatique à la veine cave inférieure avec un passage par le foie.[207]

Afin d'éviter cet "effet de premier passage", qui caractérise la première métabolisation d'un médicament par le foie, d'autres modes d'administration comme les injections comme l'injection intraveineuse, constituent une bonne alternative. Dans le cas de cette dernière, les substances atteignent ainsi directement la circulation systémique sans passer par le foie, pour atteindre une biodisponibilité de 100 %. L'injection intrapéritonéale (IP) est également un mode d'administration rapide, peu stressant pour les animaux et couramment utilisée dans l'industrie pharmaceutique.[208]

En conséquence, afin de limiter l'effet de premier passage hépatique, l'administration de nos composés aux souris a été réalisée par IP.

Distribution

Après l'administration d'un médicament, ce dernier est transporté par la circulation sanguine dans les différents tissus et organes. Durant cette étape, une part importante du principe actif se lie de manière réversible aux molécules lipophiles contenues dans le plasma (albumine, l'alpha-1-glycoprotéine acide, lipoprotéines, etc…) tandis qu'une fraction reste sous forme libre menant à un équilibre entre ces deux états. La fraction libre du médicament est la seule qui puisse sortir de la circulation sanguine pour atteindre sa cible

[206] Patel, M.; Taskar, K. S.; Zamek-Gliszczynski, M. J. *J. Clin. Pharmacol.* **2016**, *56*, S23–S39.
[207] La physiologie de l'absorption. https://www.digischool.fr/cours/la-physiologie-de-l-absorption (accédé le 17/07/2023)
[208] Al Shoyaib, A.; Archie, S. R.; Karamyan, V. T. *Pharm. Res.* **2020**, *37* (1), 12.

biologique dans les tissus par diffusion ou par transport actif. Au fur et à mesure de la disparition de la forme libre, l'équilibre est déplacé ce qui conduit à un passage de la forme liée à la forme libre. Pour connaître la fraction de forme liée, le taux de fixation aux protéines plasmatiques ou *protein plasma binding* (PPB) d'une molécule est mesuré. Cette valeur, exprimée en pourcentage, augmente lorsqu'un composé a de grandes affinités pour les protéines plasmatiques. Si un médicament à une forte valeur de PPB, alors une grande partie de ce dernier est fixée aux protéines du sang et est donc sous une forme inactive. Une étude de 2012 portant sur 222 médicaments disponibles sur le marché a montré que 50 % d'entre eux ont un taux de PPB supérieur à 90 %.[209] L'efficacité de ces molécules thérapeutiques repose alors sur une faible proportion de fractions libres disponibles.

Métabolisation et Élimination

Les médicaments, qui sont souvent des molécules lipophiles, subissent une série de réactions enzymatiques dans le foie (oxydation, réduction, hydrolyse, conjugaison) rassemblées sous le terme de métabolisation pour les convertir en molécules hydrosolubles (métabolites) afin de faciliter leur élimination par les reins. Les cytochromes P450 sont une famille d'enzymes localisées dans le microsome des cellules hépatiques et jouent un rôle majeur dans la métabolisation des médicaments. Ils détoxifient l'organisme en oxydant les molécules endogènes ou exogènes par une réaction d'oxydo-réduction en présence de NADPH.[210,211] L'élimination d'un composé peut ainsi être caractérisée par deux paramètres pharmaco-cinétiques que sont la clairance intrinsèque (Cl_{int})et le temps de demi-vie $t_{1/2}$.

La clairance intrinsèque exprimée en µL/min/kg représente la capacité de l'organisme à éliminer une substance médicamenteuse au cours du temps. Elle comprend les vitesses de métabolisation et d'élimination des différents organes (foie, reins, poumons, etc…) des fractions libres du médicament. Il est donc nécessaire de prendre en compte la valeur de PPB de ce dernier dans l'exploitation de la clairance intrinsèque.[212]

Le temps de demi-vie correspond à la durée au bout de laquelle la concentration plasmatique d'un médicament diminue de 50 %. Cette valeur est liée à la clairance intrinsèque et les variations de cette dernière influent sur la demi-vie. Par exemple, si la clairance hépatique est réduite suite à une pathologie du foie, alors la demi-vie de la substance active est augmentée. L'évaluation du temps de demi-vie d'un médicament permet de déterminer l'intervalle de temps nécessaire entre chaque dose pour atteindre un état d'équilibre, qui correspond en moyenne à 4-5 fois le temps de demi-vie, dans laquelle la concentration en substance active est stabilisée (Figure 54). L'objectif est alors d'adapter la posologie pour maintenir la concentration dans la fenêtre thérapeutique où l'effet biologique désiré est obtenu. En dessous de ce seuil, la concentration est insuffisante pour induire un effet, tandis qu'au-dessus des signes de toxicité peuvent être observés.

[209] Zhang, F.; Xue, J.; Shao, J.; Jia, L. *Drug Discov. Today* **2012**, *17* (9–10), 475–485.
[210] Thèse du Dr Amélie Mathis soutenue à Nancy le 31 août 2012.
[211] Guengerich, F. P. *ACS Catal.* **2018**, *8* (12), 10964–10976.
[212] Baker, M.; Parton, T. *Xenobiotica* **2007**, *37* (10–11), 1110–1134.

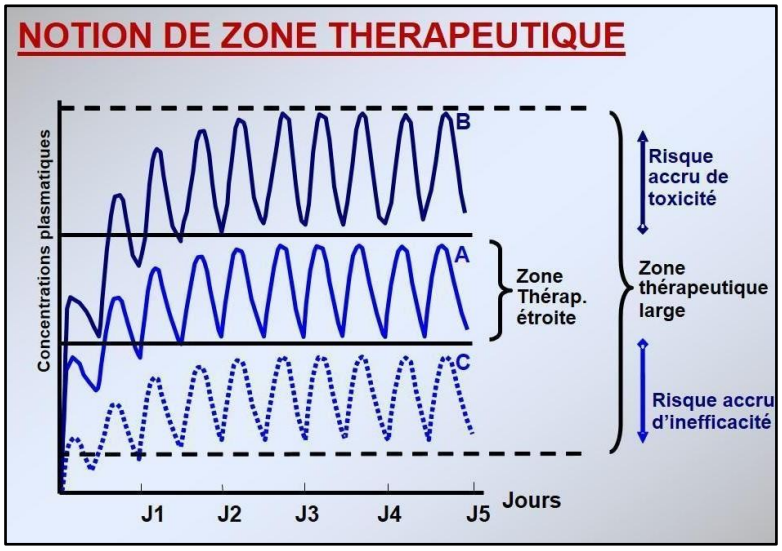
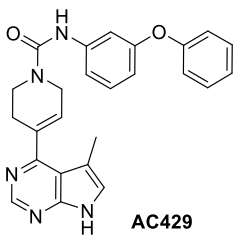
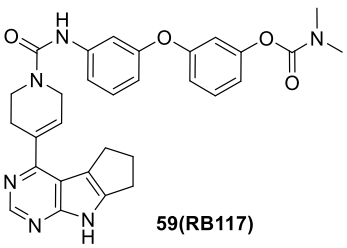


Figure 54 : Intervalles thérapeutiques d'un médicament.[213]

b) Résultats ADME

Certains paramètres ADME des composés **AC429** et **59**(**RB117**) ont été évalués par la société Eurofins afin de nous guider sur la posologie à retenir lors des essais précliniques (Tableau 21). La solubilité de ces deux molécules a été mesurée dans une solution tampon à un pH de 7,4. De faibles solubilités de 1,1 µmol/L pour **AC429** et 0,56 µmol/L pour **59**(**RB117**) ont été observées, ce qui indique un caractère lipophile très marqué de nos composés. Ces données sont en adéquation avec la mesure du taux de molécules liées aux protéines du plasma (PPB) où nous avons observé la prédominance de la forme liée avec 99,7 % pour **AC429** et même 100 % pour **59**(**RB117**). La clairance intrinsèque de **AC429** a été mesurée à 63 µL/min/mg chez la souris, valeur dans la moyenne, ni trop haute (élimination du médicament très rapide, Cl_{int} > 71,1 µL/min/mg) et ni trop basse (accumulation dans la circulation sanguine, Cl_{int} < 13,1 µL/min/mg). Au contraire, la clairance intrinsèque de **59**(**RB117**) atteint les 462 µL/min/mg, ce qui indique une métabolisation et une élimination très rapides. Cependant, la raison de cette clairance peut être due à une diffusion rapide de la molécule dans les tissus, ce qui diminue sa concentration plasmatique. De plus, la forte valeur de PBB de **59**(**RB117**) indique que la libération des molécules liées aux protéines du plasma du sang est très lente. Ces deux arguments peuvent expliquer cette valeur de clairance intrinsèque.

*Tableau 21 : Résultats des études ADME sur **AC429** et **59**(**RB117**).*

	 AC429	 59(RB117)
Solubilité aqueuse (µM) pH 7.4	**1.1**	**0.56**
Protein plasma binding (PPB) Homme **(% lié)**	**99.7 %**	**100 %**

[213] *Pharmacocinétique*. https://pharmacomedicale.org/pharmacologie/pharmacocinetique/38-parametres-pharmacocinetiques (accédé le 19/07/2023).

Clairance intrinsèque CL_{int} souris (µL/min/mg)	**63**	**462**
Demi-vie ($t_{1/2}$) souris	**ND**	**49 min**

La demi-vie de **59**(**RB117**) chez la souris mâle a été déterminée par la plateforme ARIADNE – ADME de l'Institut Pasteur de Lille. Après une injection par voie IP d'une dose de 15 mg/kg, une courte demi-vie de 49 min a été mesurée. Après avoir atteint une concentration maximale de 10,2 µM en 10 min, une concentration plasmatique de 0,2 µM a été mesurée en fin d'expérience, au bout de 4 h. Cette conclusion, en accord avec les résultats de clairance intrinsèque, indique une métabolisation rapide de **59**(**RB117**) chez la souris. La fréquence d'administration peut dès lors atteindre plusieurs doses par jour afin d'éviter un creux de concentration et rester dans la zone thérapeutique, dont le seuil supérieur a été déterminé par des études de toxicité décrites ci-dessous.

c) Études de toxicité

Une première évaluation de la toxicité aigüe du composé **59**(**RB117**) a été réalisée par l'entreprise Eurofins. Le produit **59**(**RB117**) a été administré à des souris mâles par voie IP, sous 3 formulations différentes à une concentration de 15 mg/kg (Tableau 22). Pendant 12 jours, la surveillance d'éventuels effets secondaires a été réalisée par l'observation de la variation de poids ainsi que de signes externes de douleur (piloérection, dos vouté, hanches creusées). En fin d'expérience, une autopsie de différents organes (cœur, poumons, cerveau, reins, rate, foie) a été réalisée sur chaque souris. Si les véhicules 1 et 2 n'ont présenté aucun problème de solubilité et n'ont pas induit d'effet secondaire, le véhicule 3 n'a pas permis une solubilisation totale de **59**(**RB117**). De plus, sur une des souris testées, un léger rétrécissement du rein droit a été noté en tant qu'effet secondaire majeur.

*Tableau 22 : Toxicité aigüe de **59**(**RB117**) à 15 mg/kg avec 3 véhicules différents.*

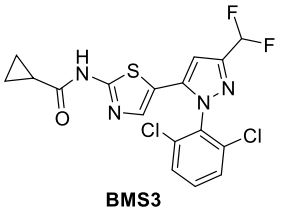
Composé	Véhicule	Solubilité[(a)]	Couleur	Concentration mg/kg	Observations
59(**RB117**)	**Véhicule 1 - DMSO/PEG 300/Eau**	**S**	**Incolore**	**15**	**Pas d'effet secondaire**
59(**RB117**)	**Véhicule 2 - 20% cyclodextrine/Eau**	**S**	**Incolore**	**15**	**Pas d'effet secondaire**
59(**RB117**)	**Véhicule 3 - 1% CMC et 0,05% Tween 20 dans 0,9% NaCl**	**PS**	**Blanc pâle**	**15**	**Petit rétrécissement du rein droit sur une souris**

[(a)] S : Soluble, PS : Peu soluble, I : Insoluble (suspension ou précipitation)

Dans l'ensemble, la dose de 15 mg/kg a été bien tolérée par les souris. Une seconde étude a alors été réalisée par le laboratoire Typage et Archivage Animaux Modèles (TAAM) situé à Orléans, afin d'évaluer la toxicité aigüede **59**(**RB117**) à des doses plus importantes (15, 30 et 50 mg/kg) en utilisant le véhicule 2 (20 % de cyclodextrine). Le composé a été injecté en dose unique à deux souris, puis l'apparition d'éventuels effets secondaires a été surveillée pendant 7 jours avant de passer à la dose suivante sur deux nouvelles souris. Les souris ont été sacrifiées au jour 7 puis comme précédemment, une autopsie est réalisée pour observer l'état

des organes. Après 7 jours suivant l'injection de **59**(**RB117**), aucun signe d'intolérance n'a été observé aux différentes concentrations de 15, 30 et 50 mg/kg.

Ces données ont permis une meilleure appréciation des doses et des fréquences à injecter lors de l'étude préclinique sur NF1. Au vu du faible temps de demi-vie, de la clairance élevée de **59**(**RB117**), et de l'absence de toxicité aigüe de 15 à 50 mg/kg, deux injections par jour semblaient judicieuses. Il est intéressant de noter que plusieurs inhibiteurs des LIMKs tels que le **Pyr1** (Figure 19, page 34) ont été testés en phase préclinique à une dose de 10 mg/kg/j par voie IP. D'autres inhibiteurs ont été testés à des doses plus conséquentes comme le composé **BMS3** (Figure 55) qui a été utilisé sur un modèle murin de cancer du sein à une dose de 20 mg/kg/j.[147147]



BMS3

*Figure 55 : Structure de l'inhibiteur des LIMKs **BMS3**.*

3. Résultats des tests *in vivo* sur un modèle murin de NF1

a) Contexte et présentation du modèle murin

Les neurofibromes cutanés (NFc) sont les tumeurs les plus caractéristiques et les plus répandues de la NF1. À la puberté, une très grande majorité des malades commence à développer des NFc puis leur nombre croît au fil des années, pouvant atteindre plusieurs centaines.[214,215] À la différence des neurofibromes plexiformes (NFp) qui sont présents dès la naissance, localisés le long des nerfs périphériques et qui peuvent se transformer en tumeurs malignes (MPNST) dans 10 % des cas, les NFc sont des protubérances bénignes localisées à la surface de la peau.[216] Le développement des NFc est initié suite à la perte du deuxième allèle de NF1 dans des cellules de Schwann. En plus des cellules de Schwann mutées, les NFc sont composés de fibroblastes, de cellules endothéliales et périvasculaires, de macrophages, de mastocytes et d'autres types de cellules immunitaires, l'ensemble appelé communément le microenvironnement tumoral (MET).[217,218] À ce jour, en dehors de la chirurgie et des traitements par lasers, il n'existe aucun traitement pour les neurofibromes cutanés. Depuis 2020, le selumetinib (inhibiteur des kinases MEK) est le seul traitement approuvé par la FDA pour les formes inopérables de NFp chez les enfants âgés de plus de 3 ans, mais comporte de nombreux effets secondaires.[143] La recherche de nouvelles solutions thérapeutiques efficaces avec peu d'effets néfastes est donc actuellement au cœur de cette problématique.[219]

---

[214] Guiraud, M.; Bouroubi, A.; Beauchamp, R.; Bocquet, A.; Grégoire, J.-M.; Rauly-Lestienne, I.; Blanco, I.; Wolkenstein, P.; Schmitt, A.-M. *Orphanet J. Rare Dis.* **2019**, *14* (1), 286.
[215] Maguiness, S.; Berman, Y.; Rubin, N.; Dodds, M.; Plotkin, S. R.; Wong, C.; Moertel, C. *Neurology* **2021**, *97*, S25–S31.
[216] Ozarslan, B.; Russo, T.; Argenziano, G.; Santoro, C.; Piccolo, V. *Cancers* **2021**, *13* (3), 463.
[217] Oguievetskaia, K.; Cifuentes-Diaz, C.; Girault, J.-A.; Goutebroze, L. *Med Sci (Paris)* **2005**, *21* (2), 162–169.
[218] Ortonne, N.; Wolkenstein, P.; Blakeley, J. O.; Korf, B.; Plotkin, S. R.; Riccardi, V. M.; Miller, D. C.; Huson, S.; Peltonen, J.; Rosenberg, A.; Carroll, S. L.; Verma, S. K.; Mautner, V.; Upadhyaya, M.; Stemmer-Rachamimov, A. *Neurology* **2018**, *91*, S5–S13.
[219] Blakeley, J. O.; Le, L. Q.; Lee, S. Y.; Ly, I.; Rhodes, S. D.; Romo, C. G.; Sarin, K. Y.; Staedtke, V.; Steensma, M. R.; Wolkenstein, P.; Largaespada, D.; Serra, E.; Haniffa, M.; Bakker, A.; McCormick, F.; Cagan, R. L.; Ju, W.; Stemmer-Rachamimov, A.; Grimes, K.; Topilko, P.; Kornacki, D.; Kelly, K. M.; Gottesman, S.; York, Z.; Epps, R. *J. Invest. Dermatol.* **2023**, *143* (8), 1351–1357.

C'est dans ce contexte que notre troisième partenaire du projet ANR PRC CliNeF1, l'équipe du Pr Topilko du laboratoire IMRB à Paris, a mis au point un modèle murin qui récapitule fidèlement toutes les manifestations de la NF1 dont le développement de NFc.[220]

Dans ce modèle, l'inactivation bi-allélique de *NF1* ainsi que l'expression d'un gène codant pour le rapporteur fluorescent Tomato (Tom) ont été introduites dans une population particulière des cellules gliales, les capsules frontières (CF). Les CF, présentent transitoirement pendant le développement embryonnaire à l'interface entre le système nerveux central et le système nerveux périphérique, donnent naissance aux précurseurs des cellules de Schwann qui migrent dans les racines des nerfs ainsi que dans des terminaisons nerveuses de peau (Figure 56).

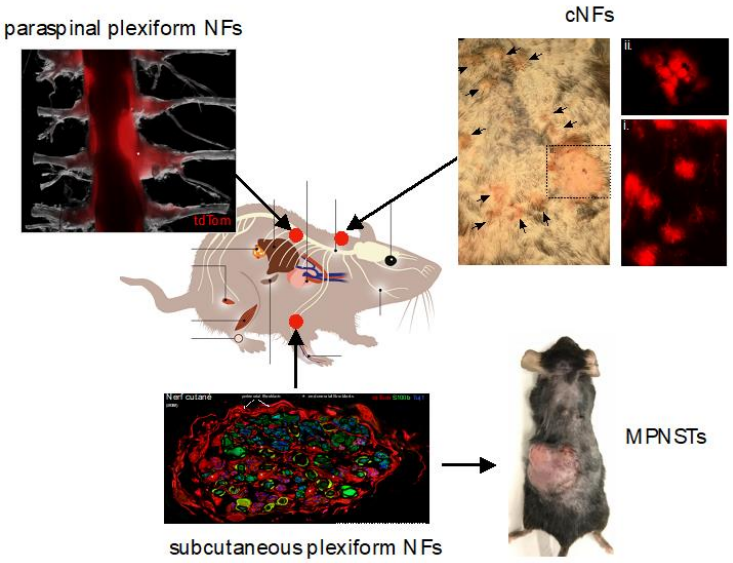


Figure 56 : Modèle de souris KO-NF1 exprimant le gène Tom+ responsable de la fluorescence des neurofibromes plexiformes et cutanés.

L'identification et la caractérisation des NFc qui se développent chez les souris KO-*NF1* au bout d'un an ont été facilitées grâce à l'expression du gène Tom. Toutefois, l'équipe du Pr Topilko a découvert que le développement des NFc est accéléré par des lésions de la peau causées lors de morsures chroniques que s'infligent naturellement les souris mâles lorsqu'elles sont élevées ensemble. Cette découverte a permis d'obtenir un modèle inductible avec une pénétrance de 100 % (toutes les souris présentent le même phénotype, Figure 57).

[220] Radomska, K. J.; Coulpier, F.; Gresset, A.; Schmitt, A.; Debbiche, A.; Lemoine, S.; Wolkenstein, P.; Vallat, J.-M.; Charnay, P.; Topilko, P. *Cancer Discov.* **2019**, *9* (1), 130–147.

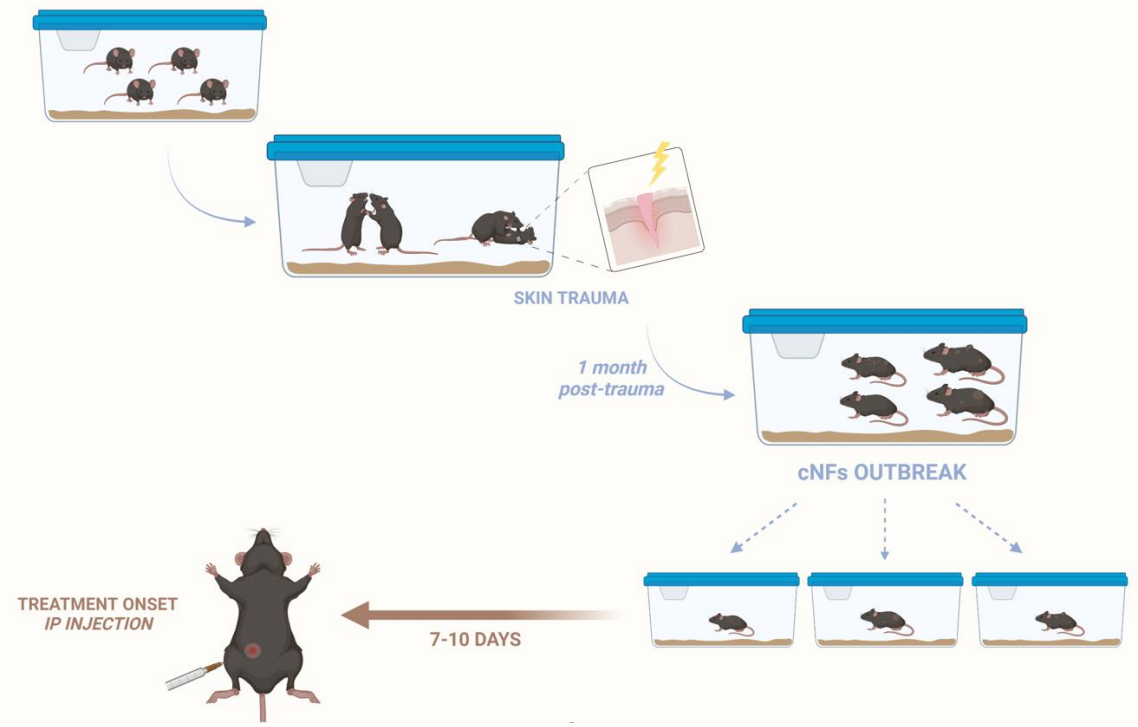


Figure 57 : Préparation des souris KO-NF1 avant le début du traitement par les inhibiteurs des LIMKs.

Le développement des NFc, chez l'Homme comme chez la souris, est caractérisé par 3 phases, chacune caractérisée par des changements de proportions et de compositions cellulaires des cellules de Schwann tumorales et de leur microenvironnement (Figure 58) :

- La phase de pré-initiation entre la naissance et la puberté (1,5-2 mois chez la souris mâle) dans laquelle les NFc sont quiescents *i.e* ne prolifèrent pas. Cet état est caractérisé par l'inactivation des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase), une famille de kinases de la voie Ras fortement impliquée dans la croissance, la division et la différenciation cellulaire dans les cellules de Schwann KO-*NF1*, exprimant la protéine fluorescente tomato, qui sont à l'origine des NFc.[221]
- Les phases d'initiation et de progression dans lesquelles les NFc se développent de manière significative, mais transitoire. Elles sont caractérisées par une prolifération des cellules de Schwann tumorales et une suractivation des MAPK dans ces mêmes cellules.
- La phase de stabilisation, dernière étape dans laquelle la progression des neurofibromes se stabilise avec une majorité de NFc quiescents et une forte diminution de l'activité de la voie Ras/MAPK dans les cellules tumorales.

[221] Molina, J. R.; Adjei, A. A. *J. Thorac. Oncol.* **2006**, *1* (1), 7–9.

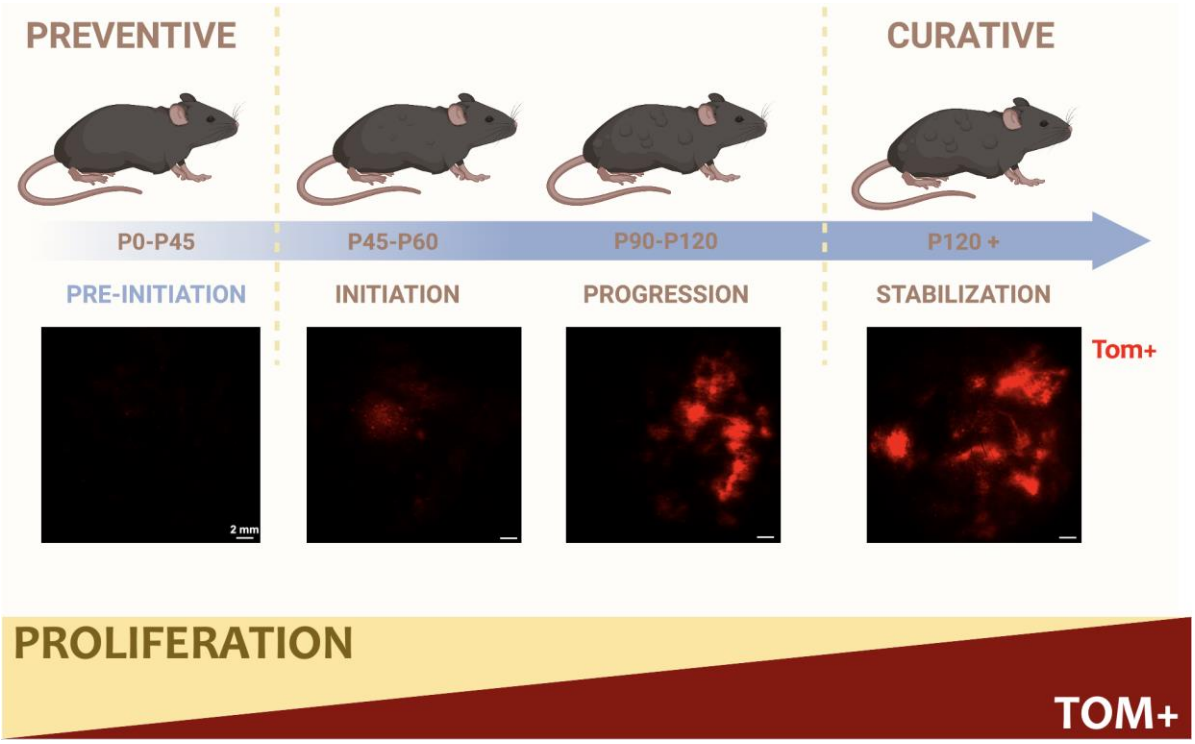


Figure 58 : Évolution de la croissance des NFc, observée par la fluorescence des protéines tomato, au cours du temps.

L'objectif principal des expériences réalisées sur ce modèle murin KO-*NF1* a été de tester l'effet des molécules **AC429** et **59**(**RB117**) sur la régression des NFc. Pour cela, les souris avec des NFc matures en phase de stabilisation ont été traitées ces deux inhibiteurs des LIMKs.

b) Résultats *in vivo* du composé **AC429**

Le premier inhibiteur à avoir été utilisé dans cette expérience *in vivo* a été le composé phare **AC429**. Un total de 16 souris, 6 placebos et 10 traitées, ont reçu une dose quotidienne de 15 mg/kg (en utilisant 20 % de cyclodextrine comme véhicule) par injection IP pendant 28 jours. Durant l'expérience, aucun signe de toxicité (posture, inflammation, infection) n'a été observé et le poids des souris, relevé quotidiennement, est resté constant sur toute la durée du traitement. Un début d'effet sur les NFc a été observé vers la fin de cette période, ce qui a conduit l'équipe de biologistes à poursuivre le traitement pendant deux semaines de plus, pour atteindre une durée totale de 46 jours de traitement.

Les souris ont été anesthésiées puis rasées et épilées afin d'observer l'évolution des NFc sur leur dos entre le début de l'expérience (J0), après 28 jours de traitement (J27) et à la fin du traitement (J46) grâce à une loupe à épifluorescence, qui permet de visualiser les cellules de Schwann tumorales Tom+ (Figure 59). L'analyse macroscopique des souris traitées montre une tendance d'une légère diminution du nombre et/ou de l'intensité de la fluorescence sur l'ensemble des souris traitées comparées au groupe placebo.

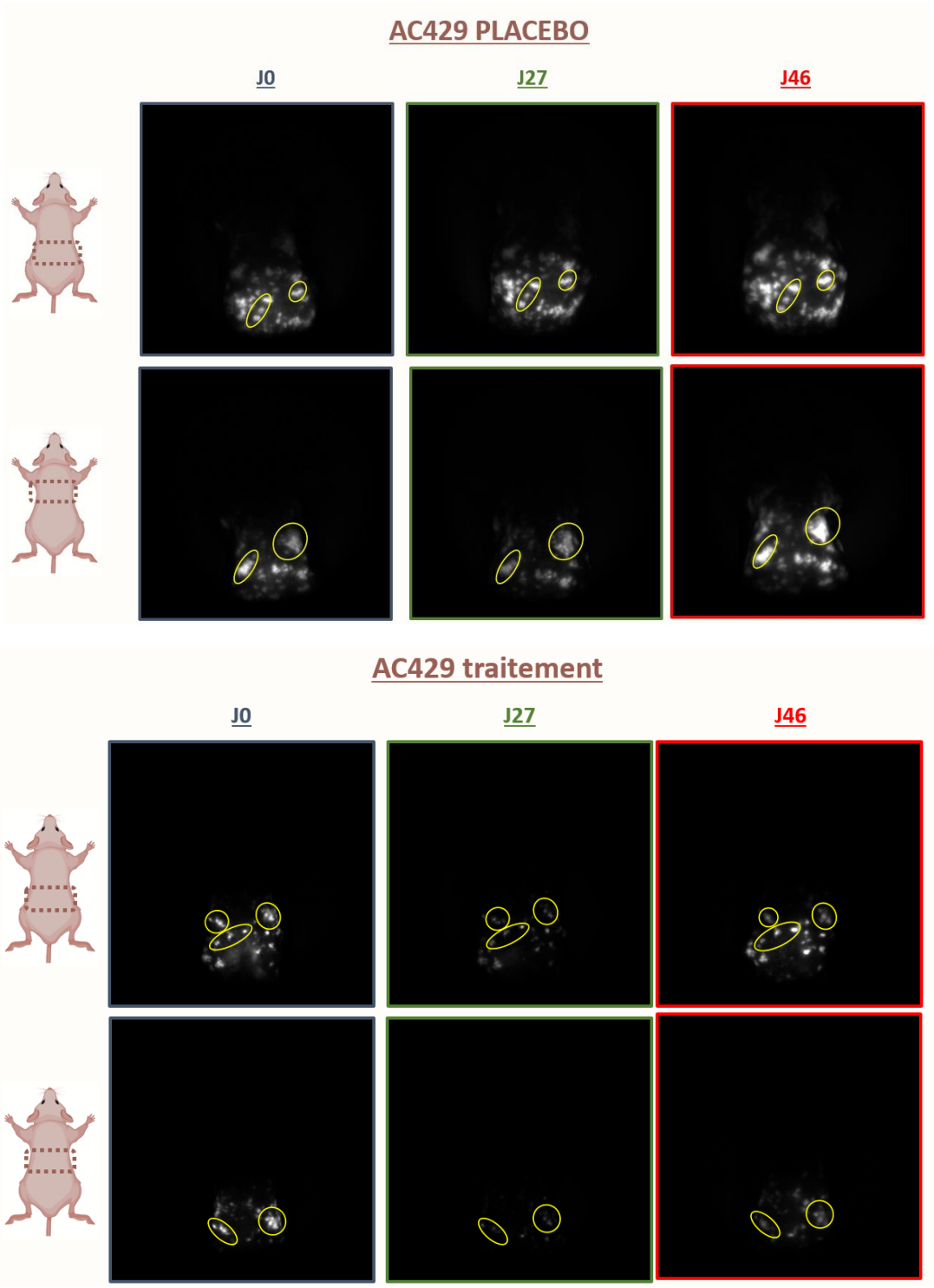


*Figure 59 : Évolution des NFc sur deux souris : une souris placebo (au-dessus) traitée avec le véhicule et une souris traitée avec **AC429** (15 mg/kg/j) (en dessous).*

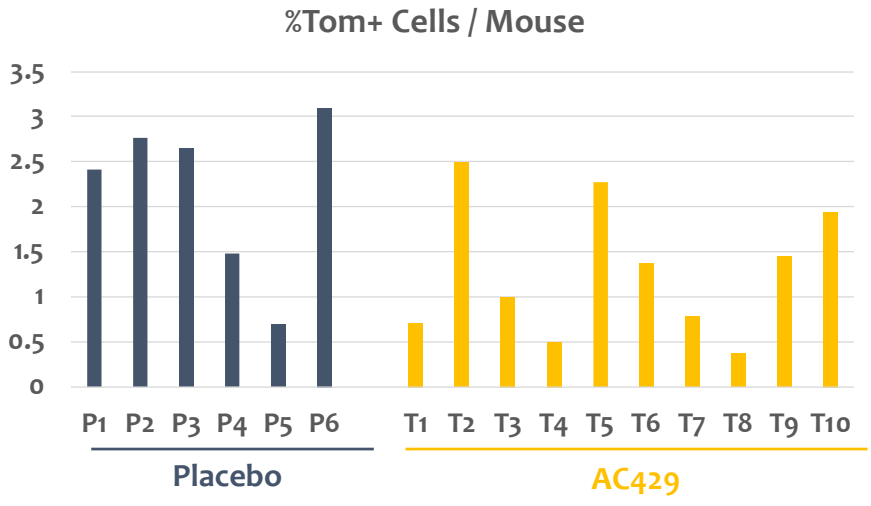
Si cette technique a l'avantage d'être simple à réaliser et sans stress pour l'animal, elle présente l'inconvénient de ne montrer que les NFc superficiels et ne donne aucune indication sur leur structure 3D (volume et profondeur des neurofibromes), sur la morphologie des cellules tumorales et sur leur MET. Les composés testés peuvent en outre avoir un effet direct sur les cellules tumorales (réduction de la taille, morphologie), et avoir également un effet sur le MET. Il est donc nécessaire de réaliser des études plus poussées pour tirer une conclusion sur l'efficacité de **AC429** à diminuer le nombre et la taille des NFc.

Pour cela, les animaux sont sacrifiés à la fin du traitement, puis la peau du dos de chaque souris est disséquée. Trois à quatre NFc sont prélevés en vue de faire des analyses immunohistochimiques (IHC) semi-quantitatives avec un panel de marqueurs de chaque composant cellulaire des NFc (Tableau 23).

Tableau 23 : Panel de marqueurs des principales populations cellulaires formant des NFc.

Cellules Tumorales	
Cellules tumorales Nf1-/-	Tomato
Toutes les cellules de Schwann	Sox10
Activité MAPK	pErk1/2
Activité LIMKs	Cofilin
Proliferation	Ki67
Microenvironnement	
Fibroblastes	PDGFRa
Activité fibrotique	Periostin
Toutes les cellules immunitaires	Cd45
Macrophages	F4/80
Innervation	PGP9.5

Le reste de la peau est dissocié, en vue d'une part de quantifier manuellement le nombre de cellules tumorales Tom+ (Graphe 6), puis d'autre part de faire des analyses quantitatives en cytométrie en flux (FACS), pour les composants majeurs de NFc (cellules tumorales Tom+, fibroblastes et cellules immunitaires). Sur le Graphe 6, une légère diminution du nombre de cellules comportant le gène muté Tom+ a été détectée dans les cellules traitées par **AC429** par rapport au groupe placebo. Cependant, une forte hétérogénéité a été relevée dans ce dernier groupe, ce qui rend difficile toute conclusion basée sur la quantification manuelle par fluorescence des cellules Tom+.



*Graphe 6 : Proportions des cellules comportant le gène muté TOM+ (NFc) chez les 16 souris utilisées dans l'expérience, dont 10 traitées avec **AC429** (15 mg/kg/j).*

L'ensemble de ces analyses actuellement en cours nous renseignera davantage sur les effets que nos inhibiteurs engendrent sur les NFc ainsi que sur leur MET.

c) Résultats *in vivo* du composé **59**(**RB117**)

L'étude des effets de la molécule **59**(**RB117**) sur les NFc a débuté après les résultats obtenus avec le composé **AC429**. En prenant en compte les résultats toxicologiques et d'ADME présentés précédemment (page 114-115), les souris ont été traitées 2 fois par jour, à des doses de 30 mg/kg espacées par un intervalle de temps de 6 heures entre chaque injection, et ce pour une durée totale de 28 jours. Le nombre de souris traitées a atteint 13 individus, tandis que le groupe placebo de 6 souris est resté inchangé.

De nouveau, aucun signe de toxicité n'a été observé pendant toute la durée de l'essai. Une quantification manuelle a été réalisée à J0 et J26 afin d'observer l'impact de la molécule **59**(**RB117**) sur les NFc (Figure 60). Les observations macroscopiques sont semblables à celles obtenues avec **AC429**, une diminution de la taille et du nombre de NFc semble être observée, mais nécessite des analyses quantitatives IHC et FACS pour pouvoir aller plus loin dans la caractérisation de l'effet de **59**(**RB117**).

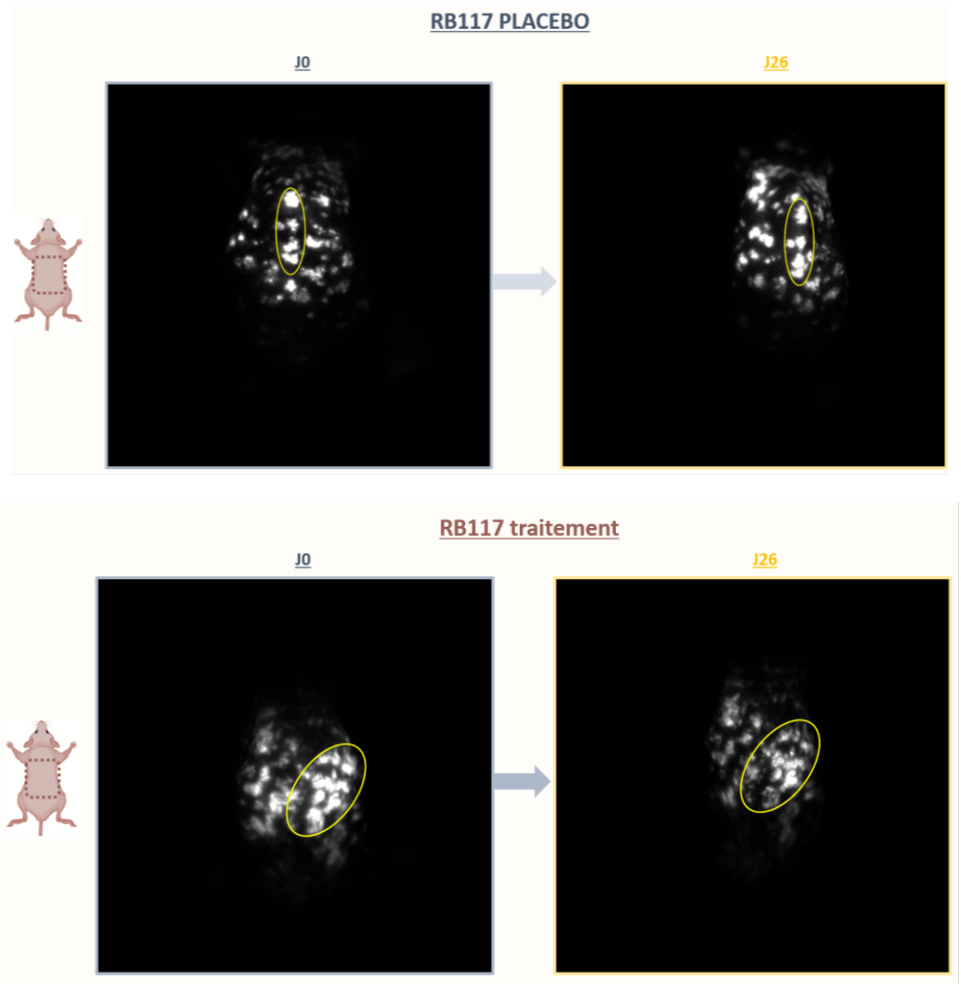
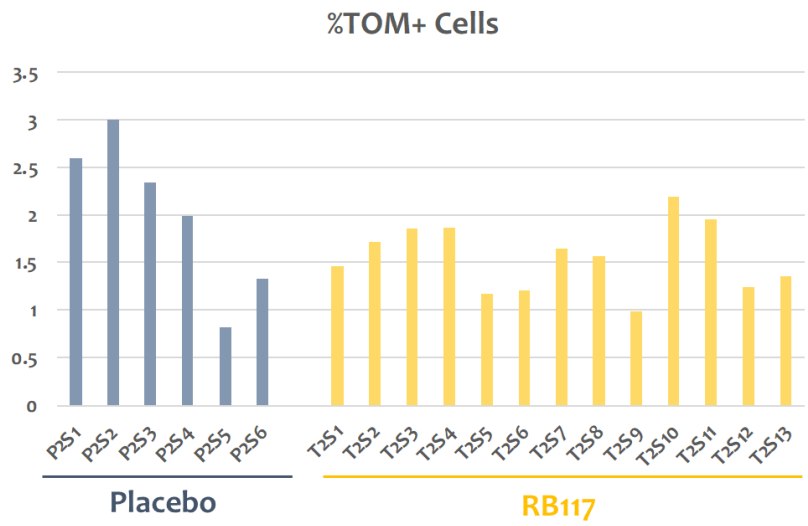


*Figure 60 : Évolution des NFc sur deux souris : une souris placebo (au-dessus) traitée avec le véhicule et une souris traitée avec **59**(**RB117**) (30 mg/kg, 2 fois par jour) (en dessous).*

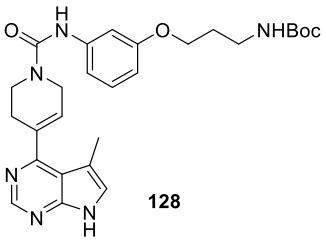
Une proportion moyenne de cellules Tom+ plus faible dans l'échantillon des 13 souris traitées par **59**(**RB117**) comparée au groupe placebo (Graphe 7) a été retrouvée. Ce résultat concorde avec une tendance à la baisse du nombre de NFc.



*Graphe 7 : Proportions des cellules comportant le gène muté Tom+ (NFc) chez les 19 souris utilisées dans l'expérience, dont 13 traitées avec **59(RB117)** (30 mg/kg, 2 fois par jour).*

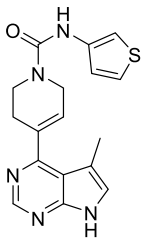
C'est sur ces résultats d'essais préliminaires sur un modèle murin KO-*NF1* que s'achève ce chapitre dédié aux tests et résultats biologiques pour la sélection des meilleurs inhibiteurs des LIMKs contre la NF1. Après avoir sélectionné les composés les plus affins des LIMKs, avec la détermination des constantes d'inhibition sur enzymes purifiées, l'inhibition de l'activité enzymatique de ces kinases a été quantifié *in cellulo*, en mesurant les taux de phosphorylation de la cofiline. Un échantillonnage de molécules a été choisi pour observer les effets cellulaires induits par ces dernières grâce à un test de cicatrisation et migration cellulaire. Des études ADME-tox ont alors été réalisées sur les deux meilleurs candidats (**AC429** et **59**(**RB117**)) afin d'optimiser les doses et les fréquences d'injection pour l'ultime étape : la phase d'essais précliniques.

Dans les quelques mois qui restent avant la fin du projet ANR PRC CliNeF1, dans lequel ma thèse s'inscrit, 2 composés supplémentaires seront testés sur ce modèle de souris. Le processus de sélection continue, et à ce jour 5 candidats sont en lice : les composés **128** et **245** de la série pyrrolopyrimidine méthylée, la molécule **89** de la série pyrrolopyrimidine tricyclique, l'inhibiteur **224** de la série cyano et un composé inédit, l'inhibiteur covalent **246(OM145)** (Figure 61).



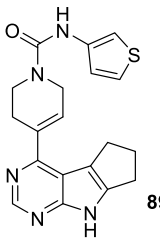
128

Ki (LIMK1) = 65 nM
Ki (LIMK2) = 51 nM
% inhib ROCK1 (1 µM) = 48
% inhib ROCK2 (1 µM) = 33
% inhib phospho cofiline HeLa (25 µM) = 99



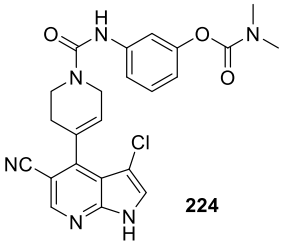
245

Ki (LIMK1) = 50 nM
Ki (LIMK2) = 186 nM
% inhib ROCK1 (1 µM) = 96
% inhib ROCK2 (1 µM) = 87
% inhib phospho cofiline HeLa (25 µM) = 84



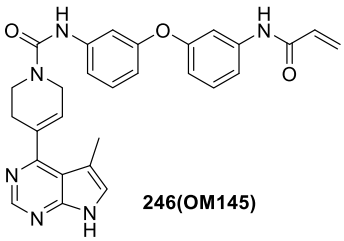
89

Ki (LIMK1) = 7 nM
Ki (LIMK2) = 47 nM
% inhib ROCK1 (1 µM) = 3
% inhib ROCK2 (1 µM) = -2
% inhib phospho cofiline HeLa (25 µM) = ND



224

Ki (LIMK1) = 92 nM
Ki (LIMK2) = 11 nM
% inhib ROCK1 (1 µM) = 11
% inhib ROCK2 (1 µM) = 7
% inhib phospho cofiline HeLa (25 µM) = 87



246(OM145)

Ki (LIMK1) = 3 nM
Ki (LIMK2) = 8 nM
% inhib ROCK1 (1 µM) = 47
% inhib ROCK2 (1 µM) = 28
% inhib phospho cofiline HeLa (25 µM) = ND

Figure 61 : Inhibiteurs candidats pour entrer dans la phase d'essai in vivo sur un modèle murin KO-NF1.

Si les profils toxicologiques et ADME de ces composés sont semblables aux molécules **AC429** et **59**(**RB117**), une augmentation de la dose injectée est envisagée pour observer un effet *in vivo* plus marqué de l'inhibition des LIMKs.

Tous les inhibiteurs des LIMKs présentés jusqu'à présent avaient un mode d'inhibition de type I (ATP-compétitif). En recherchant d'autres modes d'inhibition de la voie LIMK/cofiline, nous avons pour la première fois dans cette série décrit un inhibiteur de type VI **246(OM145)** ciblant l'une des deux LIMKs. La synthèse ainsi que les résultats biologiques de ce composé font partie du chapitre suivant dédié aux nouveaux modes d'inhibition des LIMKs.

Chapitre 3

Modes d'inhibition alternatifs des LIMKs

I – Généralités

1. Inhibiteurs covalents

Les inhibiteurs des LIMKs décrits dans ce manuscrit au chapitre 1 sont des inhibiteurs réversibles de type 1. Ce type d'inhibiteurs se lie au site actif des kinases par la formation de liaisons non covalentes de faibles énergies (5-125 kJ/mol)[222] par le biais de liaisons hydrogène, d'interactions hydrophobes, d'empilements π-π etc… L'affinité d'un inhibiteur réversible pour sa kinase, définie par sa constante d'inhibition (Ki), détermine son temps de séjour sur cette dernière et par conséquent, influe sur l'inhibition de son activité enzymatique. Afin d'augmenter le temps de séjour sur l'enzyme, les inhibiteurs de type VI, formant des liaisons covalentes de fortes énergies (250-350 kJ/mol),[223] ont connu un essor important durant ces 30 dernières années.[224]

a) Historique

La découverte des premiers inhibiteurs covalents par sérendipité remonte à la fin du XIXème siècle, avec la synthèse de l'aspirine par l'entreprise Bayer.[225] Cet anti-inflammatoire non stéroïdien couramment utilisé dans le traitement de la douleur, de l'inflammation, de la fièvre ou en prévention de maladies cardiovasculaires a été l'un des premiers médicaments à être classés sur la liste des médicaments essentiels selon l'OMS.[226] En 1978, soit presque un siècle plus tard, une étude de Rioth et Sioke[227] démontra que l'aspirine transfère son groupement acétyle au résidu Ser530 de la cyclooxygenase-2 (COX-2), menant ainsi à une inhibition irréversible de cette enzyme essentielle à la biosynthèse de prostaglandines (Schéma 47).

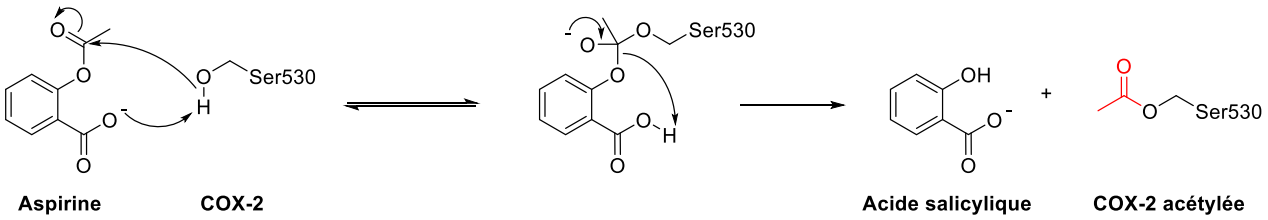


Schéma 47 : Mécanisme de l'acétylation irréversible du résidu Ser530 de la COX-2 par l'aspirine.[228]

D'autres médicaments couramment employés tels que les dérivés de la pénicilline se sont révélés plus tard être eux aussi des inhibiteurs irréversibles (Figure 62). La présence de groupements électrophiles sur ces composés actifs favorise l'attaque d'un résidu nucléophile (activé) présent sur leurs protéines cibles. En outre, divers défauts/inconvénients ont été attribués aux inhibiteurs irréversibles comme leur toxicité accrue (corrélée à leur manque de sélectivité), la difficulté à choisir une fonction électrophile judicieuse et la nécessité de cibler une protéine qui ne soit pas rapidement dégradée ou renouvelée par les cellules.[229]

---

[222] Scheiner, S. *J. Chem. Phys.* **2020**, *153* (14), 140901.
[223] Covalent Bond Energies. https://gchem.cm.utexas.edu/data/section2.php?target=bond-energies-table4.php (accédé le 02/08/2023)
[224] Boike, L.; Henning, N. J.; Nomura, D. K. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2022**, *21* (12), 881–898.
[225] Miner, J.; Hoffhines, A. *Tex. Heart Inst. J.* **2007**, *34* (2), 179–186.
[226] *Listes modèles des médicaments essentiels de l'OMS*. https://syntheticdrugs.unodc.org/syntheticdrugs/fr/access/pharmaceutical/selection--model-list-of-essential-medicines.html (accédé le 02/08/2023).
[227] Roth, G. J.; Siok, C. J. *J. Biol. Chem.* **1978**, *253* (11), 3782–3784.
[228] Lei, J.; Zhou, Y.; Xie, D.; Zhang, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (1), 70–73.
[229] Sutanto, F.; Konstantinidou, M.; Dömling, A. *RSC Med. Chem.* **2020**, *11* (8), 876–884.

On distingue 2 classes d'inhibiteurs covalents : les molécules très réactives qui sont le plus souvent des électrophiles (aspirine, paracétamol, pénicilline etc…) et les inhibiteurs covalents spécifiques à une cible ou *targeted covalent inhibitors* (TCI). La raison du peu d'intérêt des inhibiteurs covalents provient de la première classe d'inhibiteurs, découverts par sérendipité, qui permet facilement l'alkylation ou l'acylation d'un grand nombre de protéines sans sélectivité.

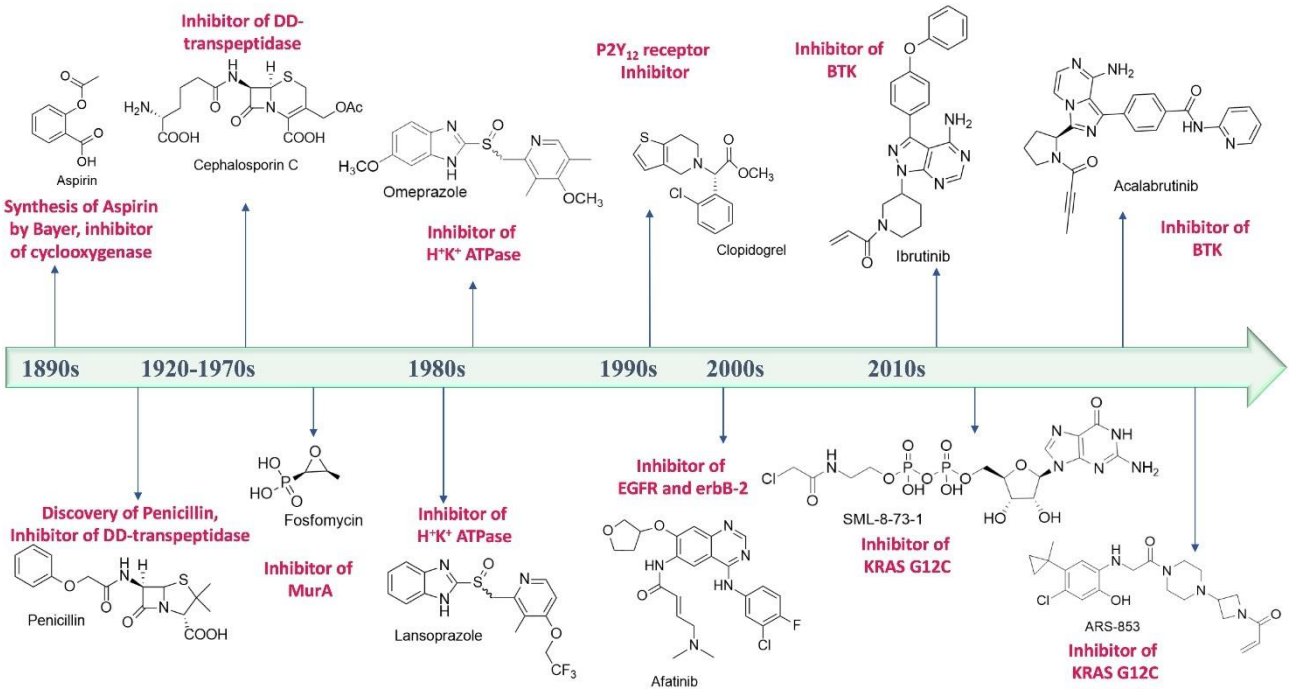


Figure 62 : Résumé chronologique de quelques inhibiteurs covalents mis sur le marché depuis la découverte de l'aspirine.[230]

Néanmoins, un regain d'intérêt pour les inhibiteurs covalents a été observé depuis une trentaine d'années grâce au développement de la seconde classe d'inhibiteurs covalents spécifiques à une cible, les TCI.[231] L'un des TCI les plus connus est l'oméprazole (Figure 62), premier inhibiteur de la pompe à protons découvert dans les années 1980 et qui est toujours utilisé contre les ulcères à l'estomac et les troubles gastro-œsophagiens.[232] Plus récemment en 2013, l'ibrutinib (Figure 62) a été le premier inhibiteur de la tyrosine kinase de Burton (BTK) à être approuvé par la FDA dans le traitement de la leucémie lymphoïde chronique et de certains lymphomes.[233] En 2017, l'acalabrutinib (Figure 62), un nouveau TCI plus sélectif de la BTK et engendrant moins d'effets secondaires que l'ibrutinib, a reçu une autorisation de mise sur le marché de la part de la FDA.[234] De nouveaux inhibiteurs covalents comme l'ARS-853 (Figure 62) permettent l'inactivation de la petite GTPase K-RAS de la voie Ras, une cible surexprimée dans de nombreux cancers et considérée jusque-là comme difficile, voire impossible à inhiber.[235,236,237] En 2020, une cinquantaine d'inhibiteurs irréversibles avaient reçu une autorisation de mise sur le marché de la part de la FDA dans des applications

[230] Ghosh, A. K.; Samanta, I.; Mondal, A.; Liu, W. R. *ChemMedChem* **2019**, *14* (9), 889–906.
[231] Singh, J.; Petter, R. C.; Baillie, T. A.; Whitty, A. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2011**, *10* (4), 307–317.
[232] Olbe, L.; Carlsson, E.; Lindberg, P. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2* (2), 132–139.
[233] Burger, J. A.; Buggy, J. J. *Leuk. Lymphoma* **2013**, *54* (11), 2385–2391.
[234] Barf, T.; Covey, T.; Izumi, R.; Van De Kar, B.; Gulrajani, M.; Van Lith, B.; Van Hoek, M.; De Zwart, E.; Mittag, D.; Demont, D.; Verkaik, S.; Krantz, F.; Pearson, P. G.; Ulrich, R.; Kaptein, A. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2017**, *363* (2), 240–252.
[235] Yin, G.; Huang, J.; Petela, J.; Jiang, H.; Zhang, Y.; Gong, S.; Wu, J.; Liu, B.; Shi, J.; Gao, Y. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2023**, *8* (1), 212.
[236] Huang, L.; Guo, Z.; Wang, F.; Fu, L. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2021**, *6* (1), 386.
[237] Ostrem, J. M.; Peters, U.; Sos, M. L.; Wells, J. A.; Shokat, K. M. *Nature* **2013**, *503* (7477), 548–551.

variées telles que des anticancéreux, des antibiotiques, des troubles gastro-intestinaux ou des maladies du système nerveux central.[229]

b) Mode d'action des inhibiteurs covalents spécifiques à une cible (TCI)

Contrairement aux premiers inhibiteurs irréversibles, très réactifs et non sélectifs, le mode de conception des TCI a changé ces dernières décennies en adoptant une approche plus rationnelle. Grâce aux connaissances acquises sur les toxicophores (fonctions chimiques pouvant être métabolisées en sites fortement électrophiles), l'élaboration d'inhibiteurs irréversibles s'est orientée vers des fonctions moins réactives.[231] Afin de gagner en sélectivité, les TCI sont conçus comme des inhibiteurs réversibles avec une fonction modérément électrophile. La liaison des TCI pour leur cible s'opère alors en 2 étapes (Figure 63) : ils s'ancrent d'abord dans le site actif de l'enzyme afin de s'orienter, comme le ferait un inhibiteur réversible, puis une liaison covalente est créée entre leur fonction électrophile et un résidu judicieusement choisi situé à proximité du site actif. Ainsi, la connaissance du site actif d'une cible biologique permet d'élaborer des TCI ciblant spécifiquement un résidu de ce dernier et de gagner ainsi en sélectivité.[238]

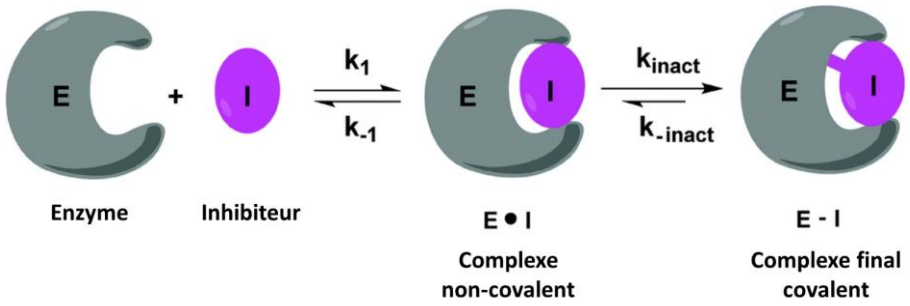
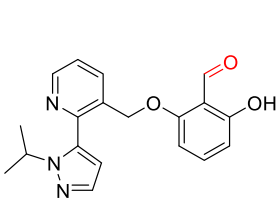


Figure 63 : Étapes d'une inhibition covalente. Un équilibre s'établit entre l'enzyme et l'inhibiteur ($Ki = k_{-1}/k_1$) puis une liaison covalente est créée pour mener au complexe final E-I.[239] a) inhibition irréversible covalente $k_{inact} = 1$, $k_{-inact} = 0$; b) inhibition réversible covalente $k_{inact} < 1$ et $k_{-inact} > 0$.

Malgré le regain d'intérêt des inhibiteurs irréversibles covalents grâce à des efforts de recherche intenses[240], certains défauts persistent toujours comme leur toxicité ou leur manque de sélectivité vis-à-vis d'*off targets*. Face à cette problématique, un nouveau type d'inhibiteurs covalents a émergé, ils sont appelés inhibiteurs covalents réversibles (Figure 63). Ces derniers présentent une fonction électrophile qui permet la création d'une liaison covalente réversible, ce qui place ce mode d'action à la frontière entre les inhibiteurs covalents irréversibles et les inhibiteurs réversibles (Figure 64). Dans le cas où l'inhibiteur se serait lié à une *off target*, ce type de liaison réversible permet au composé d'être relargué dans le milieu et évite ainsi une activation non désirée de cette dernière, souvent synonyme de toxicité.[241] Le temps de séjour des inhibiteurs covalents réversibles dans les sites actifs dépend des interactions réversibles qui stabilisent le complexe enzyme-inhibiteur. La structure de ces inhibiteurs est alors optimisée pour avoir un temps de séjour dans la cible biologique équivalent à la durée nécessaire à son renouvellement.[242]

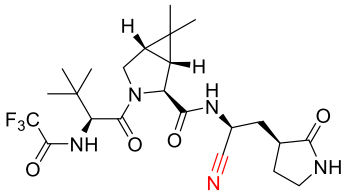
[238] Ray, S.; Murkin, A. S. *Biochemistry* **2019**, *58* (52), 5234–5244.
[239] Cheng, S.-S.; Yang, G.-J.; Wang, W.; Leung, C.-H.; Ma, D.-L. *J Hematol Oncol* **2020**, *13* (1), 26.
[240] Singh, J. *J. Med. Chem.* **2022**, *65* (8), 5886–5901.
[241] Bandyopadhyay, A.; Gao, J. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2016**, *34*, 110–116.
[242] Bradshaw, J. M.; McFarland, J. M.; Paavilainen, V. O.; Bisconte, A.; Tam, D.; Phan, V. T.; Romanov, S.; Finkle, D.; Shu, J.; Patel, V.; Ton, T.; Li, X.; Loughhead, D. G.; Nunn, P. A.; Karr, D. E.; Gerritsen, M. E.; Funk, J. O.; Owens, T. D.; Verner, E.; Brameld, K. A.; Hill, R. J.; Goldstein, D. M.; Taunton, J. *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11* (7), 525–531.



Voxélotor

Inhibiteur polymérisation hémoglobline S (drépanocytose)

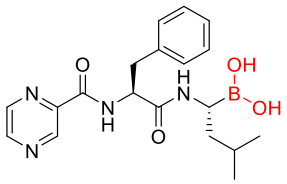
Global Blood Therapeutics (2019)



Nirmatrelvir

Antiviral (SARS-CoV-2)

Pfizer (2022)



Bortézomib

Inhibiteur du protéasome (anticancéreux)

Millennium Pharmaceuticals Inc. (2003)

Figure 64 : Exemples d'inhibiteurs covalents réversibles mis sur le marché, avec leur fonction électrophile marquée en rouge.

c) Types de fonctions électrophiles utilisées

Au fil des années, de nombreuses fonctions électrophiles ont été utilisées dans le but d'affiner la sélectivité des TCI en fonction des résidus ciblés. La majorité des TCI cible des cystéines, l'un des acides aminés les plus nucléophiles et surtout l'un des moins abondants, ce qui permet une plus grande sélectivité.[243] Les fonctions thiols (-SH) peuvent être activées par la présence d'un groupe carboxylate adjacent (aspartate, glutamate, etc…) ce qui augmente leur nucléophilie et favorise la création de liaison carbone-soufre. D'autres résidus peuvent créer des liaisons covalentes avec les TCI comme la lysine (-NH_2), les sérine/thréonine/tyrosine (-OH) et l'histidine (imidazole), selon les fonctions électrophiles choisies.[241,244] On distingue alors les fonctions électrophiles irréversibles, les plus courantes, et les fonctions électrophiles réversibles utilisées pour la création de liaisons covalentes temporaires.

Fonctions électrophiles irréversibles

Les carbonyles α,β-insaturés font partie des fonctions les plus utilisées dans la conception de TCI irréversibles (Figure 65). Ces accepteurs de Michael permettent une attaque nucléophile 1,4 par une cystéine et conduisent à la création d'une liaison thioéther.[245] La fonction acrylamide (**a**) et ses dérivés (**b** et **c**) font partie des motifs électrophiles les plus courants retrouvés dans les TCI mis sur le marché comme l'ibrutinib, l'acalabrutinib, l'afratinib (Figure 62, page 127) pour ne citer qu'eux. En 2018, Zhao *et al.*[246] ont classé les inhibiteurs covalents selon le type de motif électrophile qu'ils présentaient. Sur 202 molécules, la fonction acrylamide (**a**) apparait dans 94 cas, suivie du motif (**b**) avec 32 composés (Figure 65). En tout, les espèces réactives **a**, **b**, **c**, **d** représentent 80 % des fonctions électrophiles retrouvées sur les inhibiteurs covalents.

[243] Lu, X.; Smaill, J. B.; Patterson, A. V.; Ding, K. *J. Med. Chem.* **2022**, *65* (1), 58–83.
[244] Gambini, L.; Baggio, C.; Udompholkul, P.; Jossart, J.; Salem, A. F.; Perry, J. J. P.; Pellecchia, M. *J. Med. Chem.* **2019**, *62* (11), 5616–5627.
[245] Jackson, P. A.; Widen, J. C.; Harki, D. A.; Brummond, K. M. *J. Med. Chem.* **2017**, *60* (3), 839–885.
[246] Zhao, Z.; Bourne, P. E. *Drug Discov. Today* **2018**, *23* (3), 727–735.

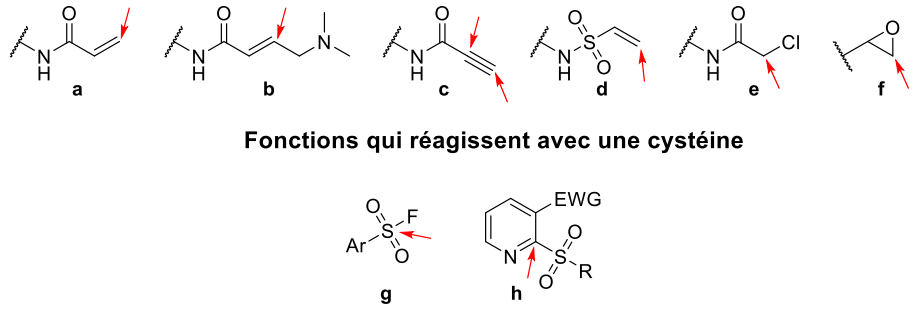


Figure 65 : Principales fonctions électrophiles d'inhibiteurs covalents irréversibles selon les résidus ciblés. Les sites sur lesquels s'effectue l'attaque nucléophile sont marqués par des flèches rouges.

Le motif α-chloroacétamide (**e**) est également utilisé dans les inhibiteurs irréversibles en tant que cible de cystéines, malgré sa faible sélectivité due à son fort caractère électrophile. Des inhibiteurs covalents ciblant l'enzyme MurA , responsable de la biosynthèse de la barrière peptidoglycane des bactéries, ont récemment été décrits avec ce motif.[247] Cette même enzyme est également la cible d'un TCI naturel, la fosfomycine (Figure 62, page 127) découverte dans les années 1970, comportant une fonction époxyde (**f**) qui est un autre type de fonction électrophile couramment utilisée.[248]

Des fonctions spécifiques à base de soufre ont été développées comme les fluorosulfates d'aryle (**g**) ou des sulfones hétéroaromatiques telle que la 2-sulfonylpyridine (**h**) pour cibler d'autres résidus que les cystéines (lysine, sérine, thréonine, tyrosine, histidine).[249,250] Malgré le récent développement de ces fonctions électrophiles, la quasi-totalité des TCI ont pour cible une cystéine d'après les arguments cités plus haut.

Fonctions électrophiles réversibles

Une autre classe de fonctions électrophiles a été développée afin de permettre une liaison covalente entre une enzyme et un inhibiteur, mais de façon transitoire. L'une des fonctions les plus utilisées est dérivée du motif carbonyle α,β-insaturé, c'est la fonction α-cyanoacrylamide (Schéma 48). La présence du groupe électro-attracteur nitrile permet d'accélérer la réaction de Michael, mais aussi de stabiliser le carbanion formé ce qui permet une réversibilité de la réaction.[251,252]

[247] Grabrijan, K.; Hrast, M.; Proj, M.; Dolšak, A.; Zdovc, I.; Imre, T.; Petri, L.; Ábrányi-Balogh, P.; Keserű, G. M.; Gobec, S. *Eur. J. Med. Chem.* **2022**, *243*, 114752.
[248] Huang, F.; Han, X.; Xiao, X.; Zhou, J. *Molecules* **2022**, *27* (22), 7728.
[249] Kim, H.; Hwang, Y. S.; Kim, M.; Park, S. B. *RSC Med. Chem.* **2021**, *12* (7), 1037–1045.
[250] Mortenson, D. E.; Brighty, G. J.; Plate, L.; Bare, G.; Chen, W.; Li, S.; Wang, H.; Cravatt, B. F.; Forli, S.; Powers, E. T.; Sharpless, K. B.; Wilson, I. A.; Kelly, J. W. *Am. Chem. Soc.* **2018**, *140* (1), 200–210.
[251] Serafimova, I. M.; Pufall, M. A.; Krishnan, S.; Duda, K.; Cohen, M. S.; Maglathlin, R. L.; McFarland, J. M.; Miller, R. M.; Frödin, M.; Taunton, J. *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8* (5), 471–476.
[252] Krishnan, S.; Miller, R. M.; Tian, B.; Mullins, R. D.; Jacobson, M. P.; Taunton, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (36), 12624–12630.

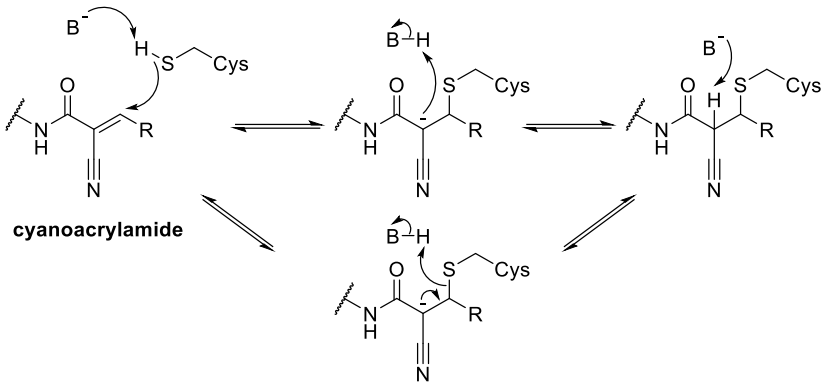


Schéma 48 : Mécanisme de la réaction de Michael réversible entre une cystéine et une fonction α-cyanoacrylamide.

Selon la forme du site actif, un encombrement stérique engendré par la présence d'un groupement volumineux sur le carbone β rend plus difficile la déprotonation du carbone α et par conséquent, augmente le temps de séjour de l'inhibiteur sur l'enzyme (Figure 66).[242]

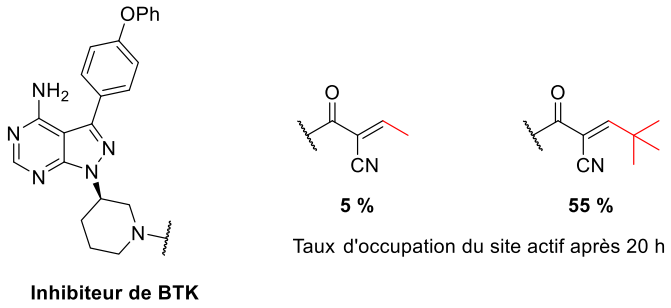


Figure 66 : Influence du groupement situé sur le carbone β sur le temps de séjour dans le site actif d'un inhibiteur de BTK.

En plus de la fonction α-cyanoacrylamide, divers motifs permettant une réversibilité de l'inhibition covalente ont été décrits dans la littérature (Figure 67).[253] On peut citer les fonctions :

- Nitriles (**a**), qui par une réaction réversible de Pinner permettent la formation d'intermédiaires imino ester, imidate ou thioimidate, plus ou moins stables.[254]
- Cétones et aldéhydes (**b**), qui permettent la formation réversible d'hémiacétal ou d'hémiaminal avec les résidus lysine, sérine, thréonine et tyrosine.
- Acides boroniques (**c**), l'attaque réversible de résidus nucléophiles, en particulier les sérines, engendre une espèce boronique tétravalente chargée.[255]
- α-Chlorofluoroacétamide (**d**), la substitution de l'atome de chlore par une cystéine engendre une espèce fluorée pouvant être hydrolysée, ce qui conduit à la rupture de la liaison carbone-soufre formée.[256]

[253] De Cesco, S.; Kurian, J.; Dufresne, C.; Mittermaier, A. K.; Moitessier, N. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *138*, 96–114.
[254] Faridoon; Ng, R.; Zhang, G.; Li, J. J. *Med. Chem. Res.* **2023**, *32* (6), 1039–1062.
[255] Song, S.; Gao, P.; Sun, L.; Kang, D.; Kongsted, J.; Poongavanam, V.; Zhan, P.; Liu, X. *Acta Pharm. Sin. B* **2021**, *11* (10), 3035–3059.
[256] Shindo, N.; Fuchida, H.; Sato, M.; Watari, K.; Shibata, T.; Kuwata, K.; Miura, C.; Okamoto, K.; Hatsuyama, Y.; Tokunaga, K.; Sakamoto, S.; Morimoto, S.; Abe, Y.; Shiroishi, M.; Caaveiro, J. M. M.; Ueda, T.; Tamura, T.; Matsunaga, N.; Nakao, T.; Koyanagi, S.; Ohdo, S.; Yamaguchi, Y.; Hamachi, I.; Ono, M.; Ojida, A. *Nat. Chem. Biol.* **2019**, *15* (3), 250–258.

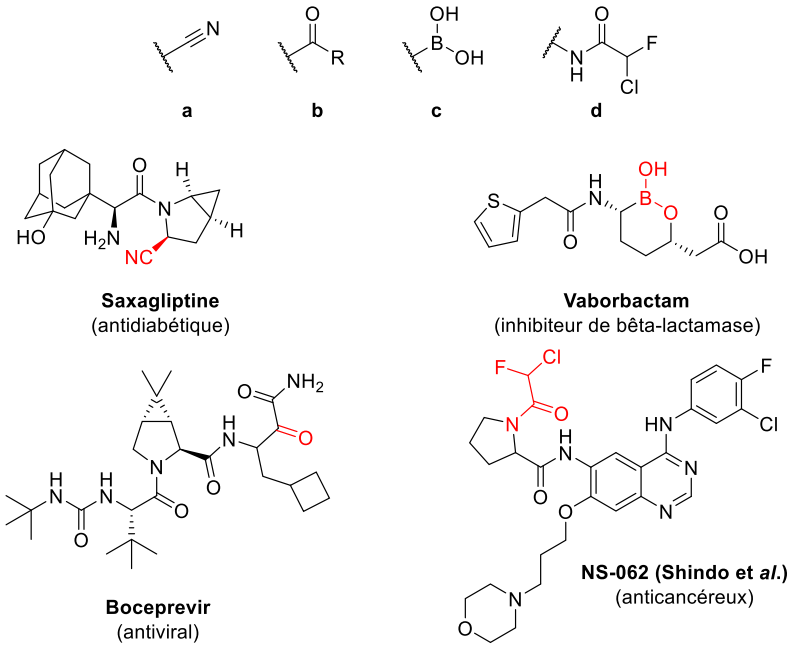


Figure 67 : Exemples de fonctions électrophiles utilisées dans des inhibiteurs covalents réversibles.

Les inhibiteurs covalents présentent un attrait particulier dans l'inhibition continue d'une cible thérapeutique. Une connaissance plus poussée du site actif de l'enzyme ciblée, combinée à des études de relations structure-activité, permettent l'élaboration de TCI plus sélectifs pour la cible, ce qui en font des candidats médicaments intéressants pour atteindre les phases cliniques. L'intérêt principal des inhibiteurs covalents réside dans l'inactivation complète d'une protéine jusqu'à la rupture de la liaison covalente formée ou jusqu'au renouvellement de la cible par biosynthèse. Les TCI irréversibles sont donc également appelés « inhibiteurs suicide » en raison de la liaison covalente que crée la protéine avec l'inhibiteur et qui conduit à son inactivation permanente.

Ces dernières années, un autre type d'inhibiteurs a été développé avec un mécanisme d'action différent qui permet une inactivation permanente d'une cible biologique (comme les inhibiteurs irréversibles) mais par un mode de fixation réversible qui leur confère la capacité d'être relargués dans le milieu après l'inhibition. Ce sont les composés chimériques induisant la protéolyse de leur cible appelés *proteolysis-targeting chimeras* (PROTACs).

2. *Proteolysis-targeting chimeras* (PROTACs)

a) Définition

Les PROTACs sont des molécules hétérobifonctionnelles composées de 3 parties : un ligand ciblant une protéine d'intérêt (POI) relié par une succession d'atomes (linker) à un ligand d'une E3 ubiquitine ligase. Ces molécules permettent la dégradation d'une POI par le système ubiquitine-protéasome d'une cellule.[257] Les E3 ubiquitine ligases sont les enzymes responsables du déclenchement de cette voie biologique par l'ubiquitinylation *i.e* le transfert d'une protéine d'ubiquitine sur une ou plusieurs lysines de la POI. Après une cascade de réactions enzymatiques, une E3 ubiquitine ligase recrute une enzyme de conjugaison à l'ubiquitine, E2, qui est liée à l'ubiquitine. Une interaction entre l'E3 ubiquitine ligase et son substrat permet un transfert de l'ubiquitine sur ce dernier ; le processus peut s'effectuer alors plusieurs fois, c'est la

[257] Ciechanover, A.; Schwartz, A. L. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1998**, *95* (6), 2727–2730.

polyubiquitinylation.[258] Le substrat ubiquitinylé est ensuite repéré par des protéines composant le protéasome, un gigantesque assemblage macromoléculaire de plusieurs millions de daltons, puis dégradé en petits peptides (2 à 22 acides aminés) par ce dernier.[259] Le système ubiquitine-protéasome est essentiel pour la cellule puisque c'est l'une des voies biologiques qui permet le renouvellement des protéines. Les PROTACs permettent de détourner cette voie de dégradation afin de cibler une POI dont l'inhibition est désirée.

Pour cela, les PROTACs forment un complexe ternaire POI-PROTAC-E3 ubiquitine ligase en se liant successivement à une POI et à une E3 ubiquitine ligase (Figure 68). Le rapprochement spatial de ces deux protéines permet la polyubiquitinylation de la POI par l'E3 ubiquitine ligase. Le complexe ternaire se rompt alors et la POI ubiquitinylée est repérée puis dégradée par le protéasome. Au terme de ces étapes, le PROTAC est relâché dans le milieu cellulaire et disponible pour se lier à une nouvelle POI.[260] Un cycle catalytique est alors réalisé par le PROTAC, à la différence des inhibiteurs irréversibles.

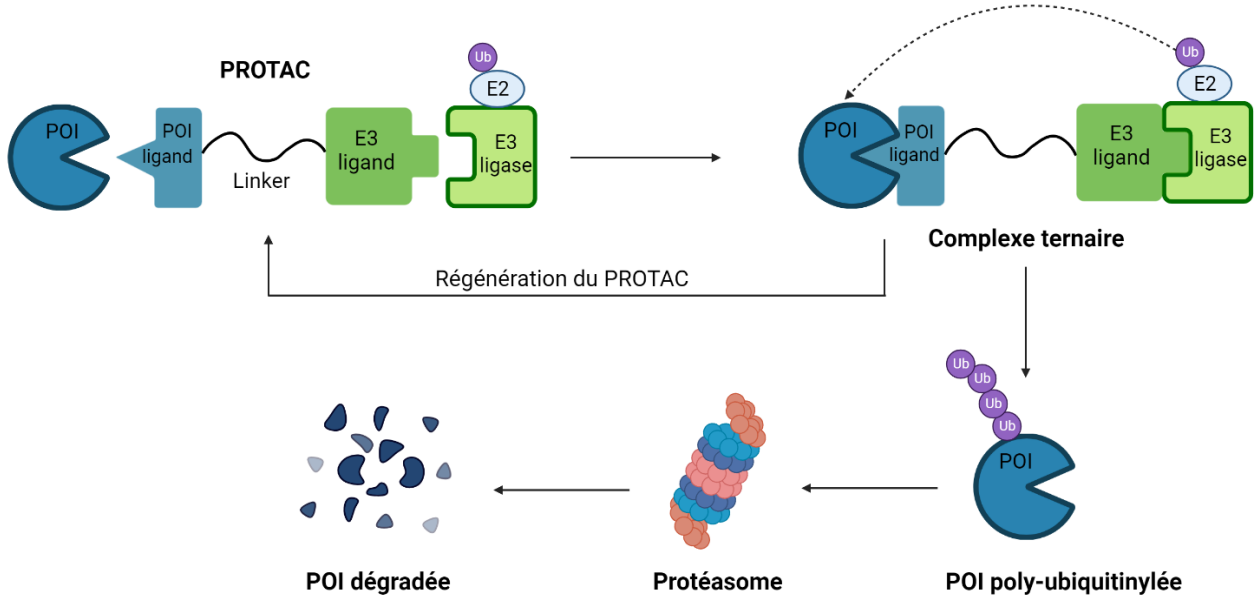


Figure 68 : Mécanisme de dégradation d'une protéine cible (POI) par l'action d'un PROTAC. Illustration tirée de Rodríguez[261] et réalisée sur BioRender.com

b) Historique

En 2001, Crews et Deshaies ont décrit pour la première fois la synthèse de PROTACs ciblant la méthionyl-aminopeptidase 2 (MetAP-2) pour bloquer l'angiogenèse de cellules tumorales.[262] Ceux-ci sont composés d'une partie ovalicine, ligand de la MetAP-2[263], reliée par un linker au phospholipide IκBα qui sert de ligand à l'E3 ubiquitine ligase $SCF^{\beta\text{-}TRCP}$ (Figure 69).[264] Même si ces PROTACs ne présentaient qu'une faible perméabilité cellulaire, due à leur composante polypeptide, et une activité de l'ordre du micromolaire, ils

[258] Yang, Q.; Zhao, J.; Chen, D.; Wang, Y. *Mol. Biomed.* **2021**, *2* (1), 23.
[259] Benaroudj, N. *Med Sci (Paris)* **2005**, *21* (2), 115–116.
[260] Liu, Z.; Hu, M.; Yang, Y.; Du, C.; Zhou, H.; Liu, C.; Chen, Y.; Fan, L.; Ma, H.; Gong, Y.; Xie, Y. *Mol. Biomed.* **2022**, *3* (1), 46.
[261] Rodríguez, A. *Novel PROTAC has a two-front improvement*. Baylor College of Medicine Blog Network. https://blogs.bcm.edu/2020/09/03/from-the-labs-novel-protac-has-a-two-front-improvement/ (accédé le 28/06/2023).
[262] Sakamoto, K. M.; Kim, K. B.; Kumagai, A.; Mercurio, F.; Crews, C. M.; Deshaies, R. J. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, *98* (15), 8554–8559.
[263] Griffith, E. C.; Su, Z.; Turk, B. E.; Chen, S.; Chang, Y.-H.; Wu, Z.; Biemann, K.; Liu, J. O. *Chem. Biol.* **1997**, *4* (6), 461–471.
[264] Yaron, A.; Hatzubai, A.; Davis, M.; Lavon, I.; Amit, S.; Manning, A. M.; Andersen, J. S.; Mann, M.; Mercurio, F.; Ben-Neriah, Y. *Nature* **1998**, *396* (6711), 590–594.

ont permis d'ouvrir la voie au développement d'un nouveau mode d'inhibition d'une cible biologique par le système ubiquitine-protéasome.

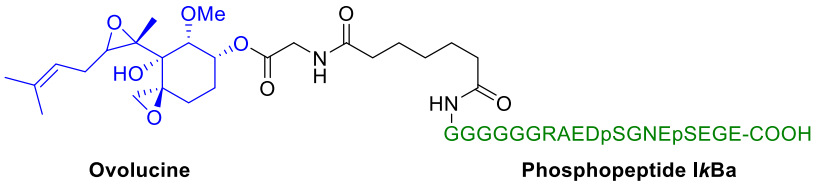


Figure 69 : Structure du premier PROTAC avec le phosphopeptide IκBα comme ligand pour l'E3 ligase $SCF^{\beta\text{-}TRCP}$.

Une avancée majeure est apparue est 2008 avec la création de la première « petite molécule » PROTAC en utilisant le motif nutline-3a pour recruter l'E3 ubiquitine ligase MDM2 à la place d'une chaîne polypeptidique (Figure 70). Le motif nutline-3a est relié par un linker PEG à un ligand des récepteurs des androgènes pour conduire à leur dégradation pour un traitement contre le cancer de la prostate.[265] Ce nouveau PROTAC avec une activité nanomolaire (IC_{50} = 90 nM)[266], a présenté une bonne perméabilité cellulaire et a induit une dégradation des récepteurs aux androgènes au bout de 7 h à une concentration de 10 µM.

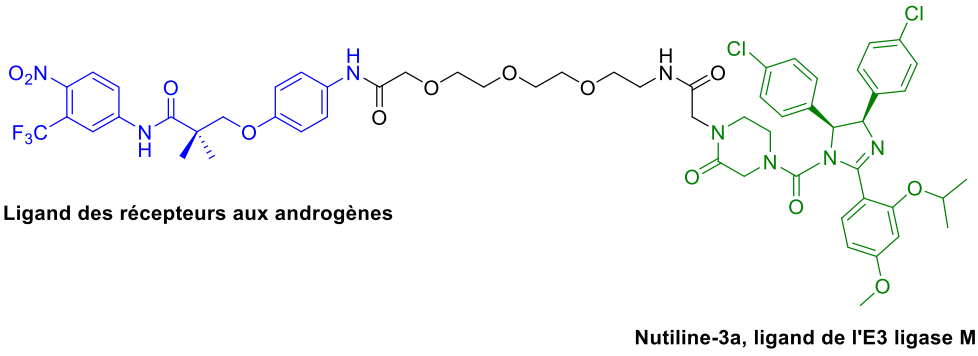


Figure 70 : Première « petite molécule » PROTAC ciblant les récepteurs aux androgènes par le recrutement de l'E3 ligase MDM2.

Le développement des PROTACs s'est alors centré sur la recherche de nouveaux ligands d'E3 ubiquitine ligases, plus affins et sélectifs afin d'améliorer l'activité de ces derniers. En 2010, le groupe du Pr Hashimoto a présenté la synthèse de PROTACs recrutant l'E3 ubiquitine ligase cIAP1 (protéine inhibitrice de l'apoptose cellulaire 1) avec un ligand de type bestatine.[267] Les PROTACs constitués de la méthyl-bestatine liée par un linker PEG à l'acide tout-trans rétinoïque (ATRA), ligand des protéines acide rétinoïque cellulaire (CRABPs), ont montré une dégradation des CRABPs par le système ubiquitine-protéasome (Figure 71). L'optimisation de la longueur du linker a permis d'améliorer l'activité des PROTACs et de conduire à une dégradation significative de la cible pour une concentration de l'ordre du micromolaire.

[265] Schneekloth, A. R.; Pucheault, M.; Tae, H. S.; Crews, C. M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18* (22), 5904–5908.
[266] Vassilev, L. T.; Vu, B. T.; Graves, B.; Carvajal, D.; Podlaski, F.; Filipovic, Z.; Kong, N.; Kammlott, U.; Lukacs, C.; Klein, C.; Fotouhi, N.; Liu, E. A. *Science* **2004**, *303* (5659), 844–848.
[267] Itoh, Y.; Ishikawa, M.; Naito, M.; Hashimoto, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (16), 5820–5826.

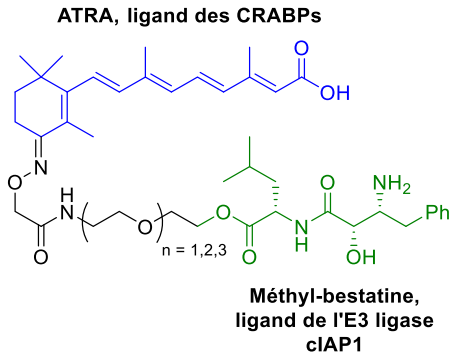


Figure 71 : Structure des PROTACs ciblant les CRABPs en recrutant l'E3 ligase cIAP1.

En 2010 toujours, une étude a démontré que le thalidomide, un médicament anciennement utilisé dans les années 1950-1960 comme sédatif ainsi que pour calmer les nausées des femmes enceintes, dont l'énantiomère (*S*) a causé de nombreuses malformations congénitales, était un ligand de l'E3 ubiquitine ligase Cereblon (CRBN).[268] L'effet tératogène du thalidomide a alors été lié à l'inhibition du CRBN. Des études datant de 2014 ont montré que tout comme le thalidomide, les phtalimides tels que le lenalidomide et le pomalidomide sont eux aussi des ligands du CRBN avec des constantes de dissociation (Kd) comprises entre 157 et 249 nM (Figure 72).[269,270,271]

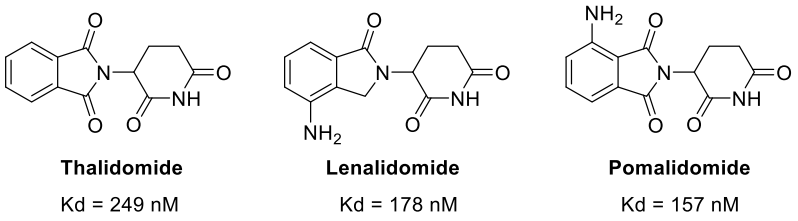
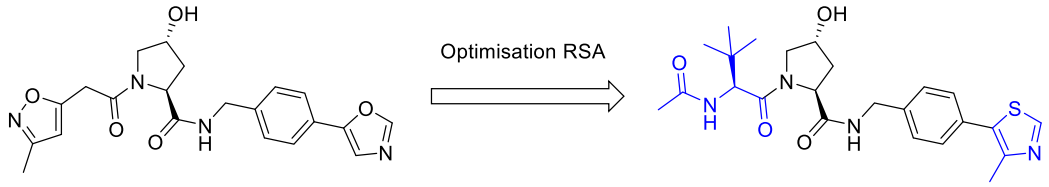


Figure 72 : Ligands l'E3 ligase CRBN de type phtalimide avec leur constante de dissociation pour celle-ci.

En 2012, des recherches intensives de petites molécules ciblant l'E3 ubiquitine ligase von Hippel-Lindau (VHL) ont conduit à l'élaboration de ligands du VHL de 1ère génération comme la molécule **I** (Figure 73).[272272] Cette E3 ubiquitine ligase avait auparavant montré des résultats prometteurs en tant que cible de certains PROTACs, composés de peptides polyarginines pour recruter le VHL.[273] Après de nombreuses études de relations structure-activité conduites sur le composé **247**, le ligand **248** a présenté une nette amélioration des constantes de dissociation passant de 5,3 µM pour **247** à 185 nM pour **248** (Figure 73).[274] Le motif (2*S*,4*R*)-hydroxyproline est crucial dans la liaison au site actif de l'E3 ubiquitine ligase VHL et une inversion de la stéréochimie diminue drastiquement l'affinité du ligand pour le VHL.

[268] Ito, T.; Ando, H.; Suzuki, T.; Ogura, T.; Hotta, K.; Imamura, Y.; Yamaguchi, Y.; Handa, H. *Science* **2010**, *327* (5971), 1345–1350.
[269] Lu, G.; Middleton, R. E.; Sun, H.; Naniong, M.; Ott, C. J.; Mitsiades, C. S.; Wong, K.-K.; Bradner, J. E.; Kaelin, W. G. *Science* **2014**, *343* (6168), 305–309.
[270] Gandhi, A. K.; Kang, J.; Havens, C. G.; Conklin, T.; Ning, Y.; Wu, L.; Ito, T.; Ando, H.; Waldman, M. F.; Thakurta, A.; Klippel, A.; Handa, H.; Daniel, T. O.; Schafer, P. H.; Chopra, R. *Br. J. Haematol.* **2014**, *164* (6), 811–821.
[271] Fischer, E. S.; Böhm, K.; Lydeard, J. R.; Yang, H.; Stadler, M. B.; Cavadini, S.; Nagel, J.; Serluca, F.; Acker, V.; Lingaraju, G. M.; Tichkule, R. B.; Schebesta, M.; Forrester, W. C.; Schirle, M.; Hassiepen, U.; Ottl, J.; Hild, M.; Beckwith, R. E. J.; Harper, J. W.; Jenkins, J. L.; Thomä, N. H. *Nature* **2014**, *512* (7512), 49–53.
[272] Buckley, D. L.; Van Molle, I.; Gareiss, P. C.; Tae, H. S.; Michel, J.; Noblin, D. J.; Jorgensen, W. L.; Ciulli, A.; Crews, C. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (10), 4465–4468.
[273] Schneekloth, J. S.; Fonseca, F. N.; Koldobskiy, M.; Mandal, A.; Deshaies, R.; Sakamoto, K.; Crews, C. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (12), 3748–3754.
[274] Galdeano, C.; Gadd, M. S.; Soares, P.; Scaffidi, S.; Van Molle, I.; Birced, I.; Hewitt, S.; Dias, D. M.; Ciulli, A. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (20), 8657–8663.



Ligand du VHL 247, 2012
Kd = 5,3 µM

Ligand du VHL 248, 2014
Kd = 185 nM

Figure 73 : Optimisation des ligands de l'E3 ubiquitine ligase VHL.

Les découvertes du ligand du VHL **248** et du thalidomide, ligand du CRBN, ont permis une avancée majeure dans le développement des PROTACs. En 2015, l'équipe du Pr Crews a publié 2 PROTACs basés sur le ligand VHL **248** (Figure 74),[275] l'un a pour cible les récepteurs alpha des œstrogènes (ERα) qui a une activité nucléaire de transcription des gènes et est la cible de thérapies anticancéreuses hormonales,[276] tandis que le second PROTAC dégrade les récepteurs sérine/thréonine kinase 2 (RIPK2) dérégulés dans des pathologies auto-inflammatoires comme le syndrome de Blau.[277] Ces deux PROTACs ont montré une bonne sélectivité pour leurs cibles ainsi que de très bonnes activités puisque les dégradations de ERα et RIPK2 ont été observées à des concentrations de quelques dizaines de nanomolaires. L'efficacité du PROTAC des ERα a également été confirmée lors d'essais *in vivo* avec une diminution des taux de ERα mesurés dans différents organes de souris.

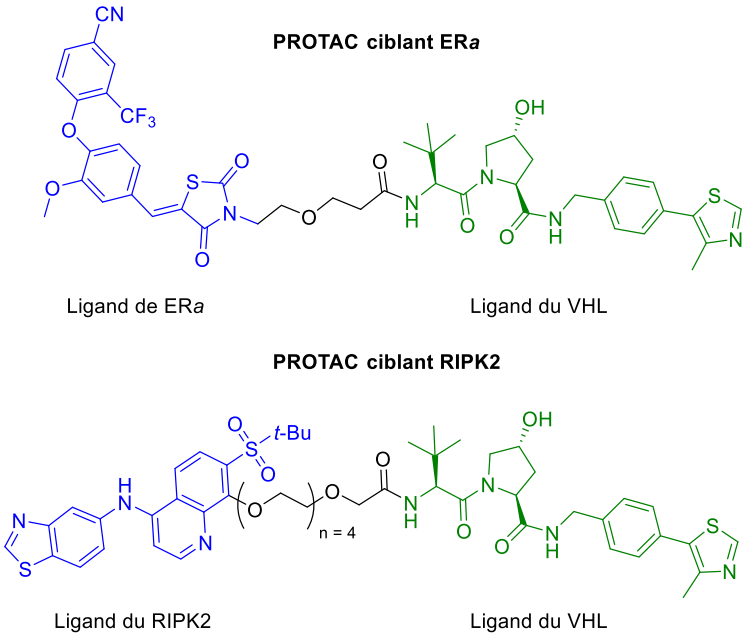


Figure 74 : Premiers PROTACs ciblant l'E3 ubiquitine ligase VHL à être testés in vivo.

En 2015 toujours, l'équipe du Pr Bradner a décrit un autre PROTAC (**dBET1**) dont les résultats biologiques se sont avérés très prometteurs avec une efficacité à des concentrations de quelques

[275] Bondeson, D. P.; Mares, A.; Smith, I. E. D.; Ko, E.; Campos, S.; Miah, A. H.; Mulholland, K. E.; Routly, N.; Buckley, D. L.; Gustafson, J. L.; Zinn, N.; Grandi, P.; Shimamura, S.; Bergamini, G.; Faelth-Savitski, M.; Bantscheff, M.; Cox, C.; Gordon, D. A.; Willard, R. R.; Flanagan, J. J.; Casillas, L. N.; Votta, B. J.; Den Besten, W.; Famm, K.; Kruidenier, L.; Carter, P. S.; Harling, J. D.; Churcher, I.; Crews, C. M. *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11* (8), 611–617.
[276] Adlanmerini, M.; Fabre, A.; Boudou, F.; Riant, É.; Fontaine, C.; Laurell, H.; Gourdy, P.; Lenfant, F.; Arnal, J.-F. *Med Sci (Paris)* **2015**, *31* (12), 1083–1091.
[277] Pham, A.-T.; Ghilardi, A. F.; Sun, L. *Front. Pharmacol.* **2023**, *14*, 1127722.

nanomolaires.[278] Ayant pour cible la protéine BRD4 (*bromodomain-containing protein* 4), une protéine impliquée dans la transcription génique qui joue un rôle important dans le développement et la survie des cellules cancéreuses,[279] le PROTAC **dBET1** a provoqué sa dégradation en recrutant l'E3 ubiquitine ligase CRBN grâce à un motif thalidomide, relié à un inhibiteur de BRD4 **JQ1(S)** par un linker de type alkyle (Figure 75).

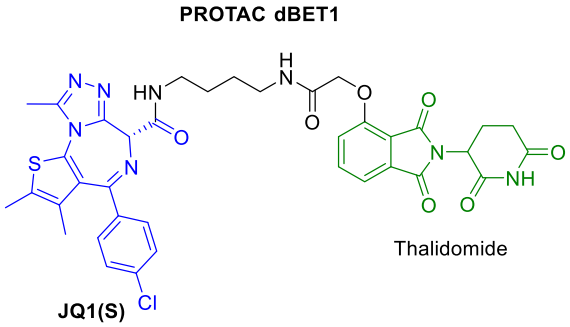


*Figure 75 : Structure du PROTAC **dBET1** dégradant la BRD4 en recrutant l'E3 ubiquitine ligase CRBN.*

Ces PROTACs recrutant le VHL ou le CRBN avec de petites molécules ont prouvé leur efficacité et développé l'intérêt pharmaceutique pour ces composés, dont le mode d'inhibition permet d'inactiver des cibles qui étaient considérées jusqu'alors inatteignables par de petites molécules.[280] En 2019, la société Arvinas, fondée par le pionnier des PROTACs, le Pr Crews, a réussi à développer deux PROTACs (**ARV-110** et **ARV-471**) qui sont entrés en phase clinique (Figure 76). Les PROTACs **ARV-110** (Essai clinique : NCT03888612) et **ARV-471** (Essai clinique : NCT04072952) ciblent respectivement les récepteurs des androgènes ou les récepteurs des œstrogènes pour une application anticancéreuse contre les cancers de la prostate ou du sein, respectivement.[281] Tous deux recrutent l'E3 ubiquitine ligase CRBN avec des ligands de type phtalimide, reliés par un linker hétérobicyclique (identique pour les deux PROTACs), aux ligands des POI.

[278] Winter, G. E.; Buckley, D. L.; Paulk, J.; Roberts, J. M.; Souza, A.; Dhe-Paganon, S.; Bradner, J. E. *Science* **2015**, *348* (6241), 1376–1381.
[279] Donati, B.; Lorenzini, E.; Ciarrocchi, A. *Mol. Cancer* **2018**, *17* (1), 164.
[280] Samarasinghe, K. T. G.; Crews, C. M. *Cell Chem. Biol.* **2021**, *28* (7), 934–951.
[281] Békés, M.; Langley, D. R.; Crews, C. M. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2022**, *21* (3), 181–200.

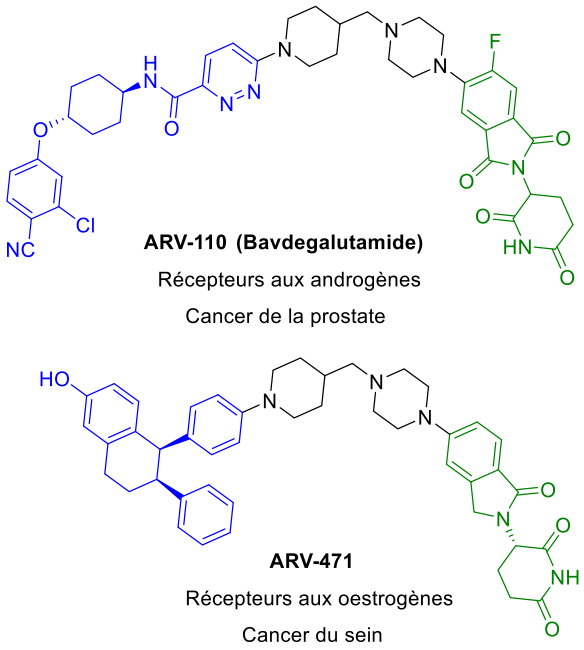


*Figure 76 : Structures des premiers PROTACs ayant atteint les phases cliniques **ARV-110** et **ARV-471**. En vert, le ligand de l'E3 ubiquitine ligase, en noir le linker et en bleu le ligand de la POI.*

En 2022, les effets thérapeutiques des molécules **ARV-110** et **ARV-471** sont confirmés puisqu'ils sont entrés en phase 2 des essais cliniques. L'intérêt pour les PROTACs ayant grandi ces 5 à 10 dernières années, de nouveaux PROTACs sont entrés en phase clinique, développés par divers laboratoires pharmaceutiques comme Bristol Myers Squibb, Kymera ou Nuris Therapeutics entre autres. À ce jour, 18 PROTACs ont atteint les phases cliniques, 11 d'entre eux (67 %) recrutent l'E3 ubiquitine ligase CRBN tandis qu'un seul recrute l'E3 ubiquitine ligase VHL.

En résumé, une vingtaine d'années après la découverte des premiers PROTACs polypeptidiques, d'intenses recherches ont mené à la création de molécules plus petites dans le but d'induire une dégradation efficace des protéines cibles tout en limitant l'inhibition d'*off targets* afin de réduire leur toxicité (Figure 77). Après 22 ans, de nombreux PROTACs sont entrés en essais cliniques à visée oncologique, 5 d'entre eux ont atteint la phase 2. Le PROTAC **ARV-471** a récemment atteint la phase 3 dans le traitement des formes métastatiques du cancer du sein à une dose journalière de 200 mg, chez les patients ayant reçu une ligne de traitement d'inhibiteur de CDK4/6 (ex : le palbociclib) en association avec une thérapie endocrinienne (ex : le létrozole) (Essai clinique : NCT05654623).[282]

[282] Chirnomas, D.; Hornberger, K. R.; Crews, C. M. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2023**, *20* (4), 265–278.

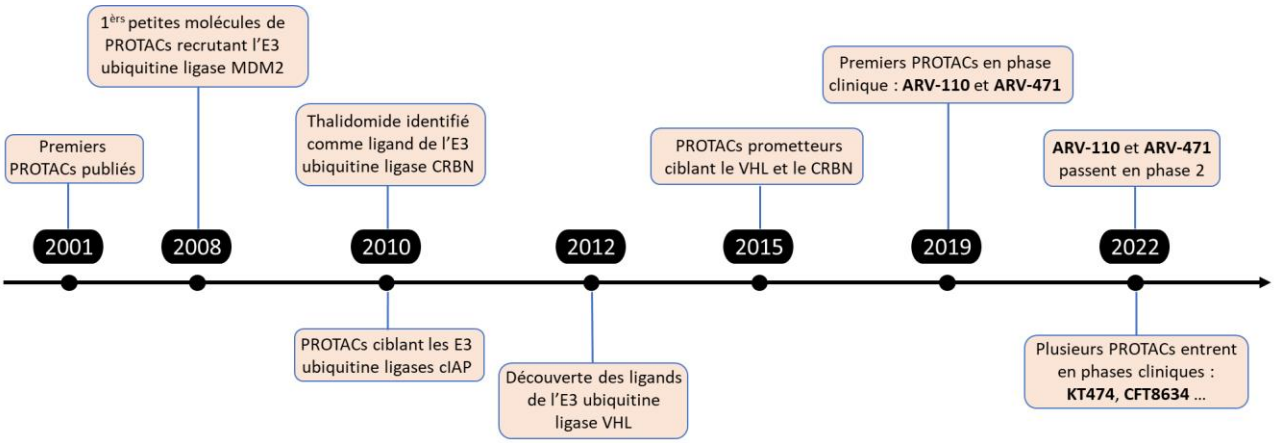


Figure 77 : Chronologie des étapes clés dans le développement des PROTACs.

c) Conception de PROTACs

Pour développer des PROTACs visant une protéine d'intérêt (POI), il est nécessaire d'optimiser ses 3 composantes : le ligand de la POI, le linker et le choix du ligand de l'E3 ubiquitine ligase. Le ligand de la POI est le plus souvent un inhibiteur de celle-ci décrit dans la littérature ou développé en interne, son optimisation chimique n'est donc plus à faire, mais le choix du site de fonctionnaliation par le linker est important. La nature et la longueur de ce dernier est l'un des paramètres primordiaux à évaluer pour pouvoir gagner en activité. Enfin, un choix judicieux de l'E3 ubiquitine ligase à recruter permet de sélectionner son ligand parmi les motifs décrits dans la littérature.[283]

Choix de l'E3 ubiquitine ligase et de son ligand

Comme vu précédemment, l'efficacité d'un PROTAC est définie, entre autres, par sa capacité à recruter une E3 ubiquitine ligase afin d'induire une dégradation de la POI par le système ubiquitine-protéasome de la cellule. Le choix de l'E3 ubiquitine ligase ainsi que de son ligand associé est donc un paramètre essentiel dans la conception de PROTACs. Bien qu'il existe plus de 600 E3 ubiquitine ligases codées par le génome humain, la très grande majorité reste peu caractérisée au niveau de leur fonction et de leur mode d'action.[284] Le développement de ligands ciblant une douzaine d'E3 ubiquitine ligases a conduit les chimistes médicinaux à les privilégier en tant que cible à recruter pour leurs PROTACs. Les E3 ubiquitine ligases les plus ciblées par les PROTACs décrits dans la littérature sont le CRBN et le VHL, qui représentent à elles deux 90 % des PROTACs. Elles sont suivies par l'E3 ubiquitine ligase ciAP1 (6 %) et enfin les E3 ubiquitine ligases restantes, telles que la MDM2, ne sont ciblées que par 4 % des PROTACs (Figure 78).[285]

[283] Troup, R. I.; Fallan, C.; Baud, M. G. J. *Ther.* **2020**, *1* (5), 273–312.
[284] Belcher, B. P.; Ward, C. C.; Nomura, D. K. *Biochemistry* **2023**, *62* (3), 588–600.
[285] Cao, C.; He, M.; Wang, L.; He, Y.; Rao, Y. *Chem. Soc. Rev.* **2022**, *51* (16), 7066–7114.

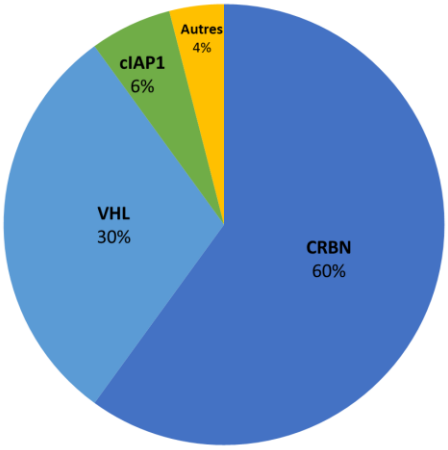


Figure 78 : Proportions des E3 ubiquitine ligases les plus utilisées dans la conception de PROTACs.

La sélectivité des PROTACs vis-à-vis d'un type de tissu ou de cellule peut être améliorée en ciblant des E3 ubiquitine ligases exprimées ou surexprimées spécifiquement dans ces dernières. Ainsi, en préambule de la synthèse de PROTACs, la mesure du taux d'expression des E3 ubiquitine ligases potentiellement utilisables dans les cellules choisies est nécessaire pour définir le type de ligand approprié.[286]

Choix du linker

Si le choix du ligand de l'E3 ubiquitine ligase est restreint à quelques ligands décrits dans la littérature et souvent disponibles commercialement, celui du linker nécessite un travail de chimie médicinale conséquent pour améliorer la dégradation de la POI par le PROTAC. En effet, la longueur et le type de linker doivent être modifiés selon la cible à dégrader et l'accessibilité de son site actif.[283] Il n'y a pas de règle spécifique qui aiguillent l'optimisation de linkers, mais 3 points clés semblent devoir être respectés :

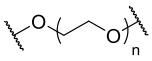
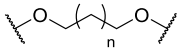
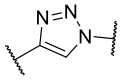
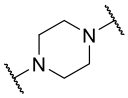
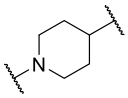
1. La position du linker sur le ligand de la POI ne doit pas empêcher des interactions essentielles au bon ancrage de ce dernier dans la protéine à dégrader.
2. Le linker doit être placé sur une face exposée au solvant afin de pouvoir diriger le ligand de l'E3 ubiquitine ligase vers l'extérieur de la poche plus aisément et d'améliorer ainsi les interactions protéine-protéine.
3. Il ne doit pas être placé sur un pharmacophore essentiel au ligand de la POI pour garder son affinité avec sa cible.

Au fil des années, les PROTACs ont été synthétisés avec les mêmes types de linker que l'on peut classer en 7 familles (Tableau 24). Les linker de types PEG et alkyle sont les plus communs, car plus faciles à utiliser et à synthétiser, ils permettent une grande flexibilité de leur chaîne tout en gardant un caractère hydrophobe. D'après une étude quantitative réalisée par Maple *et al.*, plus de 64 % des PROTACs décrits dans la littérature sont composés de ces deux types de linkers.[287] Ils sont suivis par ceux comportant des motifs dérivés du glycol (14 %) puis motifs apportant une plus grande rigidité comme des d'alcynes (7 %) ou des linkers de type pipérazine (4 %) et pipéridine (4 %). Les linkers à base de triazole (6 %) sont également utilisés

[286] Kannt, A.; Đikić, I. *Cell Chem. Biol.* **2021**, *28* (7), 1014–1031.
[287] Maple, H. J.; Clayden, N.; Baron, A.; Stacey, C.; Felix, R. *MedChemComm* **2019**, *10* (10), 1755–1764.

dans la synthèse de PROTACs grâce à leur facilité d'accès par une cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen, ou plus communément appelée réaction click.[288,289]

Tableau 24 : Occurrence des 7 principales familles de linker qui apparaissent dans les PROTACs. La combinaison de plusieurs types de linkers au sein d'un même PROTAC explique que le total dépasse 100 %.[283]

Structure	Type de linker	Occurrence (en %)
	PEG	54
	Alkyle	31
	Autres glycol	14
	Alcyne	7
	Triazole	6
	Pipérazine	4
	Pipéridine	4

La longueur des linkers est également un paramètre important qui dépend de la géométrie du site d'interaction entre le ligand de la POI et sa cible. Un linker trop court empêchera la formation d'un complexe ternaire dû aux effets stériques des deux protéines. Au contraire, un linker trop long diminuera la perméabilité cellulaire tout en augmentant le poids moléculaire du PROTAC. Il perdra également en efficacité à cause de l'éloignement spatial de la POI et de l'E3 ubiquitine ligase.[290]

Évaluation biologique des PROTACs

Contrairement aux inhibiteurs traditionnels qui impliquent la création d'un complexe binaire entre une protéine et un ligand, les PROTACs forment des complexes ternaires après leur liaison à leur POI et à leur E3 ubiquitine ligase. De plus, la caractérisation des PROTACs diffère selon la nature de leur mode d'inactivation : la mesure de la constante d'affinité (Ki) ne suffit plus pour évaluer l'efficacité d'un PROTAC. En effet, cette grandeur fournit une information sur l'affinité du PROTAC pour la POI mais ne renseigne pas sur la capacité de ce dernier à recruter une E3 ubiquitine ligase pour former le complexe ternaire, ni sur l'ubiquitinylation de la POI par l'E3 ubiquitine ligase. Pour cela, de nombreuses techniques peuvent être utilisées pour caractériser les interactions protéine-protéine, les différentes constantes d'affinité ainsi que la dégradation de la POI par le protéasome.[291]

L'immunodétection par western blot reste la méthode la plus rapide pour caractériser l'efficacité d'un PROTAC. Elle permet de mesurer la quantité de POI restante après le traitement des cellules par ce dernier. Le western blot renseigne non seulement sur la capacité du PROTAC à former un complexe ternaire,

[288] P. Wurz, R.; Dellamaggiore, K.; Dou, H.; Javier, N.; Lo, M.-C.; D. McCarter, J.; Mohl, D.; Sastri, C.; Russell Lipford, J.; J. Cee, V. *J. Med. Chem.* **2017**, *61* (2), 453–461.
[289] Xia, L.-W.; Ba, M.-Y.; Liu, W.; Cheng, W.; Hu, C.-P.; Zhao, Q.; Yao, Y.-F.; Sun, M.-R.; Duan, Y.-T. *Future Med. Chem.* **2019**, *11* (22), 2919–2973.
[290] Zagidullin, A.; Milyukov, V.; Rizvanov, A.; Bulatov, E. *Explor. Target. Anti-Tumor Ther.* **2020**, *1* (5), 381–390.
[291] Liu, X.; Zhang, X.; Lv, D.; Yuan, Y.; Zheng, G.; Zhou, D. *Future Med. Chem.* **2020**, *12* (12), 1155-1179.

mais aussi sur sa capacité à traverser la membrane plasmique des cellules qui est un paramètre important dû aux poids moléculaires de ces nouveaux composés.

Lors de la caractérisation des PROTACs, un effet crochet ou effet *hook* peut être observé selon les concentrations de travail (Figure 79) : les PROTACs perdent en efficacité lorsque la concentration augmente. Lorsque la concentration en PROTACs dans le milieu croît, elle s'accompagne d'une augmentation de la formation du complexe ternaire POI-PROTAC-E3. Cependant, si les interactions protéine-protéine entre la POI et l'E3 ubiquitine ligase sont répulsives et ne mènent pas à une stabilisation du complexe ternaire, des complexes binaires se forment (POI-PROTAC et PROTAC-E3) au détriment du complexe ternaire, lorsqu'une concentration maximale en PROTAC est atteinte.[292,293]

Pour éviter cet effet qui apparaît selon les molécules entre 1 et 10 µM,[294] il est nécessaire de tester les PROTACs à différentes concentrations afin de déterminer la concentration maximale d'efficacité.[295]

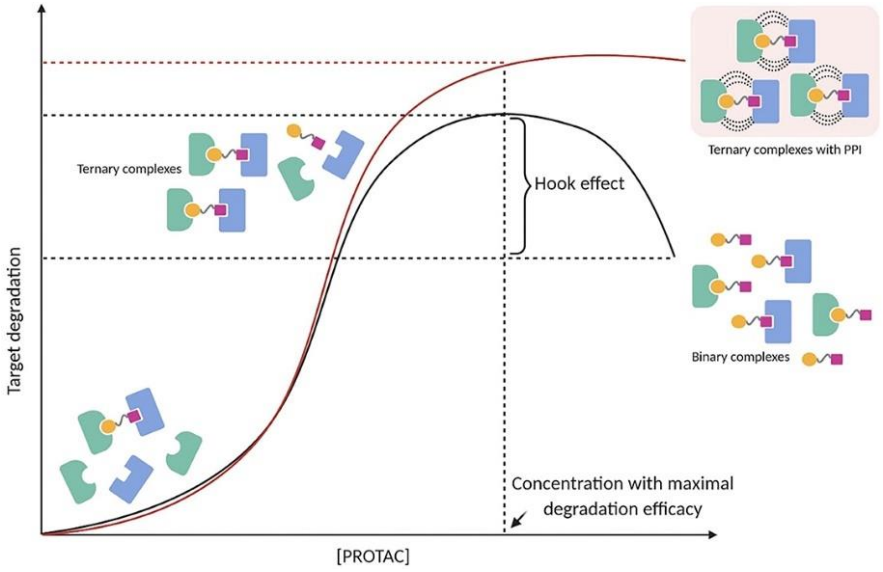


Figure 79 : Illustration de l'effet hook qui peut apparaitre lors de la formation du complexe ternaire POI-PROTAC-E3.[294]

En résumé, les PROTACs et les inhibiteurs covalents se présentent comme une bonne alternative à l'inhibition traditionnelle réversible des cibles thérapeutiques. Si les inhibiteurs irréversibles permettent l'inactivation d'une protéine jusqu'à son renouvellement cellulaire, les PROTACs présentent l'avantage d'induire une dégradation catalytique de cette dernière et de cibler des cibles biologiques considérées comme inatteignables par des inhibiteurs.

3. Application aux LIMKs

Lors du développement d'inhibiteurs ATP-compétitifs des LIMKs de type pyrrolopyrimidine dans notre laboratoire, l'équipe du Pr Knapp et du Dr Mathea de l'Université Goethe de Francfort a réussi à co-cristalliser 3 composés dans les sites actifs de LIMK1 et LIMK2 dont l'inhibiteur **AC429**, co-cristallisé dans le site actif de LIMK1 (Figure 33, page 66) présenté au chapitre 1. Un autre composé, l'inhibiteur **6** de la série Ph-Ph a quant à lui été co-cristallisé dans le site actif de LIMK2 (Figure 80). Ce cliché cristallographique a révélé la potentielle présence d'une liaison hydrogène entre la Cys365 de LIMK2 et le groupement méthoxyle

[292] Rodbard, D.; Feldman, Y.; Jaffe, M. L.; Miles, L. E. M. *Immunochemistry* **1978**, *15* (2), 77–82.
[293] Douglass, E. F.; Miller, C. J.; Sparer, G.; Shapiro, H.; Spiegel, D. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (16), 6092–6099.
[294] Cecchini, C.; Pannilunghi, S.; Tardy, S.; Scapozza, L. *Front. Chem.* **2021**, *9*, 672267.
[295] Li, X.; Pu, W.; Zheng, Q.; Ai, M.; Chen, S.; Peng, Y. *Mol. Cancer* **2022**, *21* (1), 1–30.

situé sur le deuxième phényl de l'urée de **6**. Nous avons pensé que cela constituait une bonne base pour la création de ligands covalents. C'est pour cette raison que nous avons entrepris le développement d'inhibiteurs covalents irréversibles ciblant LIMK2, dans le but d'améliorer l'inhibition des LIMKs et d'induire des effets cellulaires plus conséquents.

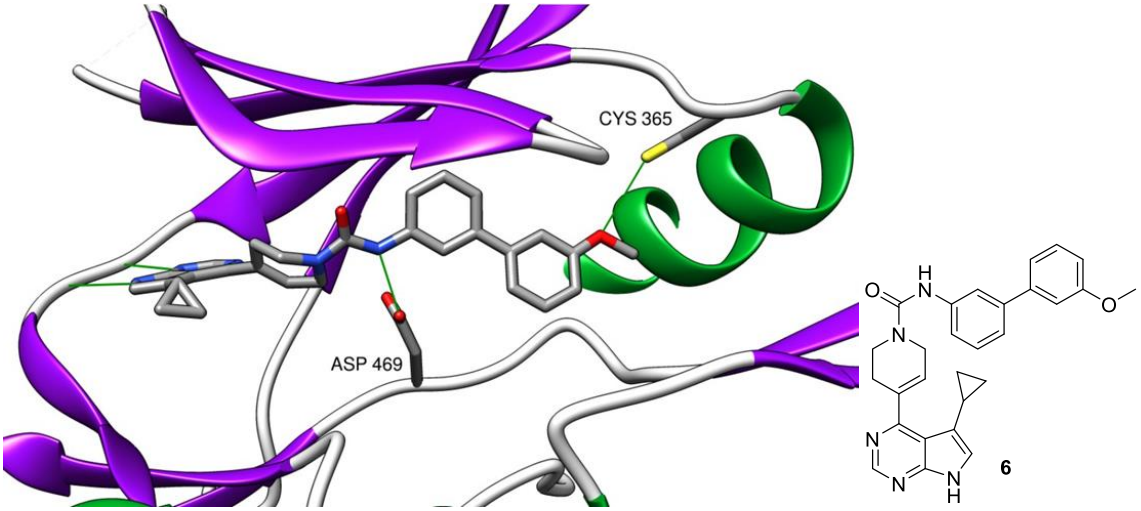


*Figure 80 : Co-cristallisation de l'inhibiteur **6** dans le site actif de LIMK2.*

En parallèle, face à l'intérêt thérapeutique que représentent les PROTACs, des études ont montré l'avantage de ces molécules pour l'inactivation de kinases résistantes aux inhibiteurs anticancéreux.[296] En 2020, une importante étude de Donovan *et al.* a démontré que les LIMKs étaient des cibles particulièrement sensibles à la dégradation par le système ubiquitine-protéasome induite par les PROTACs.[297] Plus récemment, Malvi *et al.* ont réussi à dégrader la protéine LIMK2 par le système ubiquitine-protéasome des cellules cancéreuses de mélanome grâce au PROTAC **TH-257-PEG3-VH032** (Figure 81).[298]

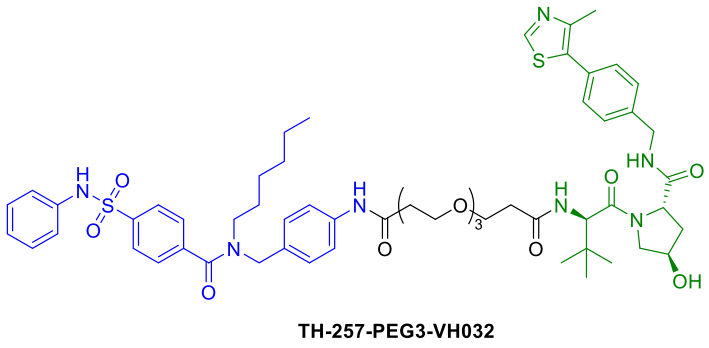


*Figure 81 : Structure du **PROTAC TH-257-PEG3-VH032** ciblant LIMK2 dans les cellules de mélanome.*

À la vue de ces résultats encourageants, nous avons pris la décision d'inactiver la voie LIMK/cofiline en ciblant les LIMKs par les premiers PROTACs spécialement conçus contre ces dernières avec un squelette de type pyrrolopyrimidine.

[296] Yu, F.; Cai, M.; Shao, L.; Zhang, J. *Front. Chem.* **2021**, *9*, 679120.
[297] Donovan, K. A.; Ferguson, F. M.; Bushman, J. W.; Eleuteri, N. A.; Bhunia, D.; Ryu, S.; Tan, L.; Shi, K.; Yue, H.; Liu, X.; Dobrovolsky, D.; Jiang, B.; Wang, J.; Hao, M.; You, I.; Teng, M.; Liang, Y.; Hatcher, J.; Li, Z.; Manz, T. D.; Groendyke, B.; Hu, W.; Nam, Y.; Sengupta, S.; Cho, H.; Shin, I.; Agius, M. P.; Ghobrial, I. M.; Ma, M. W.; Che, J.; Buhrlage, S. J.; Sim, T.; Gray, N. S.; Fischer, E. S. *Cell* **2020**, *183* (6), 1714-1731.
[298] Malvi, P.; Reddy, D. S.; Kumar, R.; Chava, S.; Burela, S.; Parajuli, K.; Zhang, X.; Wajapeyee, N. *Oncogene* **2023**, *42* (18), 1478–1491.

II – Inhibiteurs covalents des LIMKs

1. Synthèse des inhibiteurs

Grâce aux RSA précédemment établies lors de mon travail de thèse, des données de co-cristallisation et de modélisation moléculaire, la synthèse d'inhibiteurs covalents ciblant les LIMKs a été réalisée durant les stages postdoctoraux du Dr Oliver et du Dr Blondeau à l'ICOA, que je tiens à remercier grandement pour leur travail sur ce sujet. Afin de cibler la Cys365 du site actif de LIMK2, nous avons choisi de positionner des fonctions électrophiles sur le deuxième phényle de l'urée de nos inhibiteurs (Figure 82). D'après les très bonnes affinités pour les LIMKs du composé **52** obtenu précédemment, nous avons choisi de remplacer la fonction acétylamide de l'inhibiteur **52** par différents accepteurs de Michael tels que les motifs acrylamides (**a**), 4-diméthylaminocrotonamide (**b**), sulfonamide de vinyle (**c**), propiolamide (**d**) et α-cyanoacrylamide (**e**).

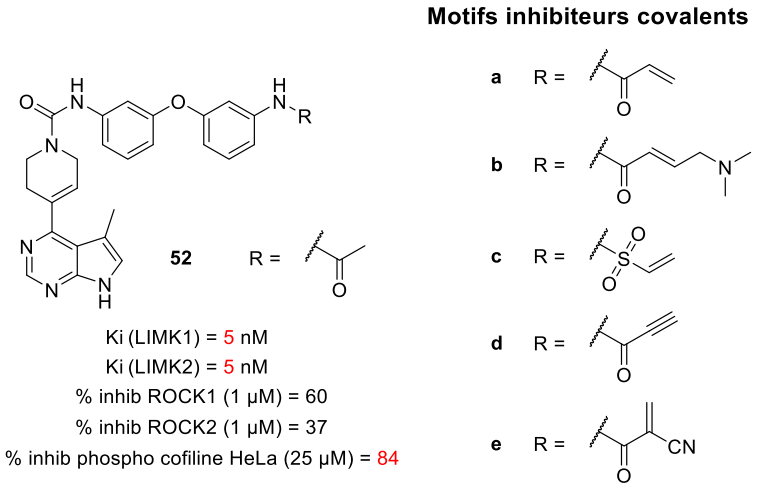


*Figure 82 : Inhibiteurs covalents ciblés à partir de la structure de l'inhibiteur réversible **52**.*

a) Motif acrylamide **246(OM145)**

Pour effectuer la synthèse des inhibiteurs covalents ciblés, nous avons dans un premier temps créé une plateforme chimique commune, le dérivé **249** (Schéma 49), sur laquelle des acylations auraient pu être effectuées. Pour cela, une protection du 3-aminophénol **21** avec un groupement Boc a mené au composé **250**, qui a pu être couplé à la 3-iodoaniline *via* une réaction d'Ullmann pour former l'aniline **251** avec un rendement de 70 %. L'urée **252** a ensuite été synthétisée par l'attaque nucléophile de l'amine secondaire **8** sur l'intermédiaire carbamate, formé *in situ* par l'activation de l'aniline **251** avec le 4-nitrophénylchloroformate (**42**). Au bout de 2 h de réaction à 50 °C, l'urée **252** a été obtenue avec un rendement de 72 %. Enfin, la déprotection de l'amine du composé **252**, par un traitement avec une solution à 4 M d'acide chlorhydrique dans le 1,4-dioxane, a mené à la formation de la plateforme chimique **249**.

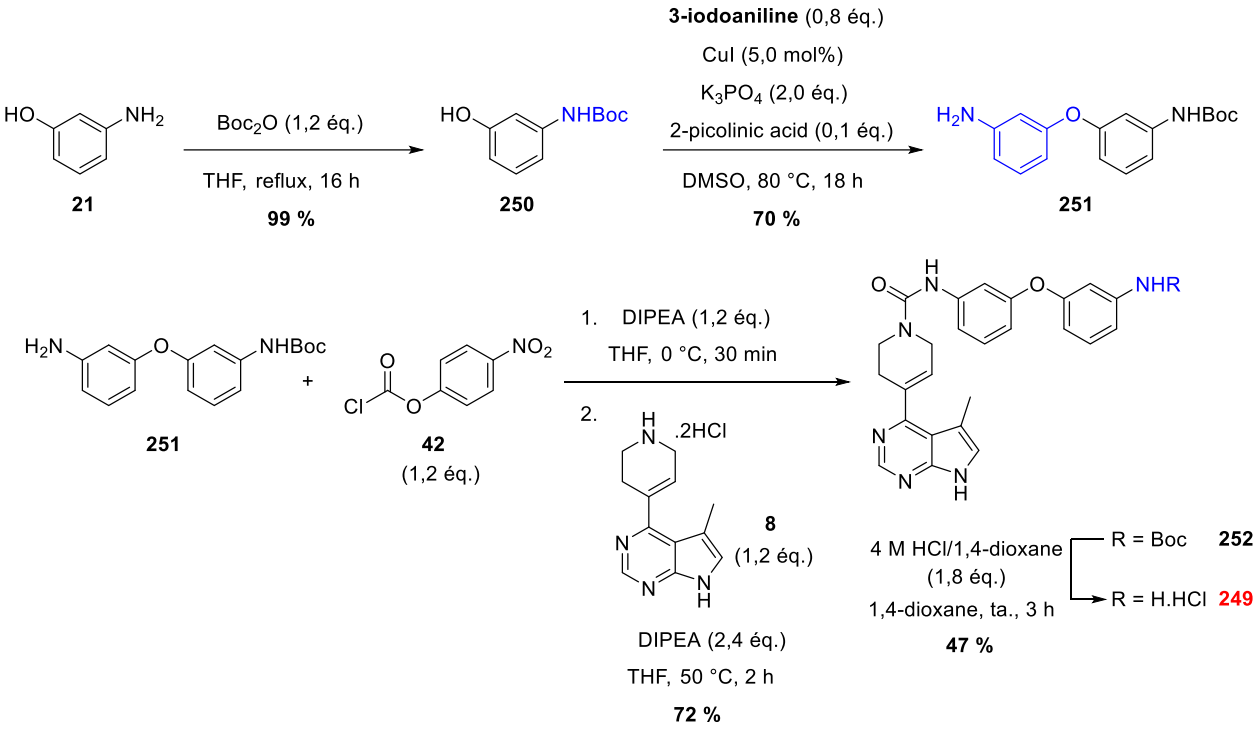


*Schéma 49 : Suite réactionnelle menant à la plateforme synthétique **249**.*

Après l'obtention de la plateforme **249**, un essai d'acylation a été réalisé avec du chlorure d'acryloyle **253** pour incorporer le motif acrylamide (Schéma 50). Malheureusement, une très faible conversion du produit de départ **249** en **246(OM145)** a été notée et un mélange complexe a été obtenu après 16 h de réaction. Comme ses homologues pyrrolopyrimidine, l'urée **249** présente une mauvaise solubilité dans les solvants organiques. Ceci pourrait expliquer la faible conversion lors de l'acylation avec **253**. Par conséquent, une autre voie de synthèse a été réalisée pour contourner cette problématique.

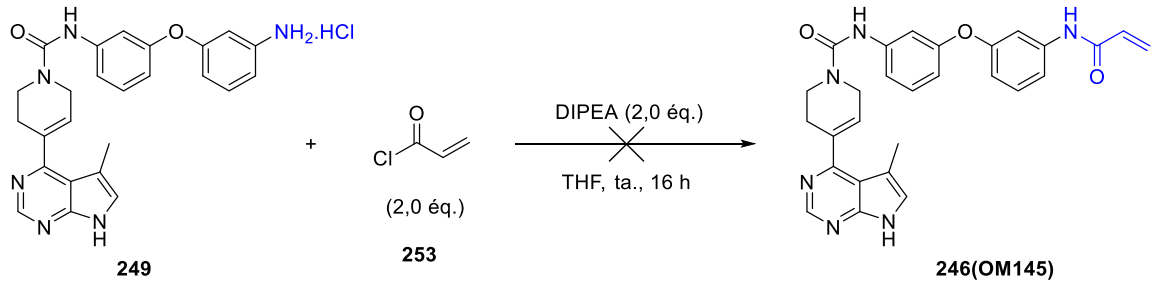


*Schéma 50 : Essai d'acylation de l'aniline **249** pour mener à l'inhibiteur irréversible **246(OM145)**.*

Le motif acrylamide a été ajouté en amont de l'étape de formation de l'urée, sur la dianiline monoprotégée **251** obtenue précédemment (Schéma 51). Après 16 h de réaction à température ambiante, l'acylation de l'aniline **251** en présence de **253** a conduit au produit **254** avec 66 % de rendement. Ces conditions expérimentales étant identiques aux précédentes, cette expérience a confirmé que les difficultés rencontrées n'étaient pas dues à un manque de réactivité de l'aniline pour le chlorure d'acryloyle mais plutôt à la solubilité.

Le protocole de déprotection de l'amine que nous avons utilisé usuellement, avec une solution 4 M d'acide chlorhydrique dans le 1,4-dioxane, a conduit à une addition 1,4 de Michael non désirée de l'anion chlorure sur la fonction acrylamide du composé **254**. Une analyse RMN du brut réactionnel a confirmé que

le chlorure d'alkyle **255** était le produit majoritaire. Pour pallier cette problématique, l'acide trifluoroacétique (TFA) a été utilisé en remplacement de l'acide chlorhydrique. L'intermédiaire **256** obtenu après l'évaporation du milieu réactionnel, a été engagé directement dans la dernière étape de formation de l'urée avec la plateforme hétérocyclique méthylée **8**. Le composé final acrylamide **246(OM145)** a ainsi été obtenu avec un rendement de 80 % sur ces deux étapes. Son évaluation biologique en tant qu'inhibiteur irréversible sera discutée dans la partie suivante.

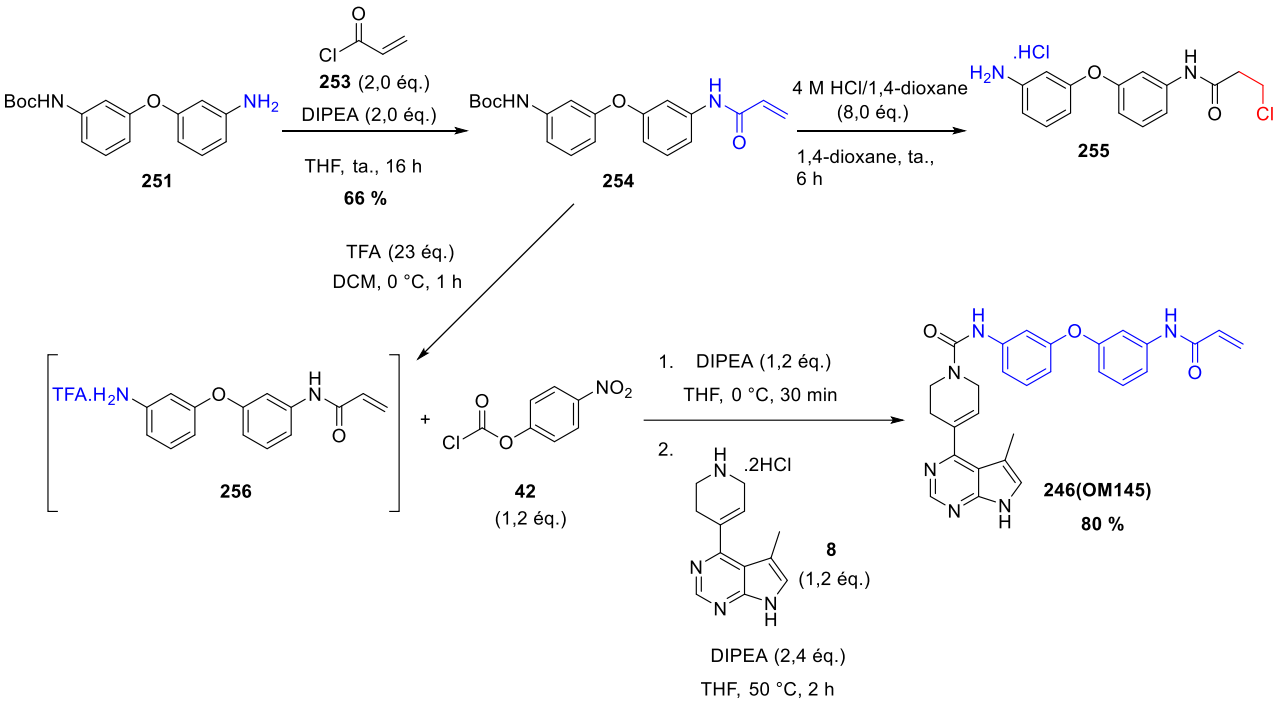


*Schéma 51 : Synthèse de l'inhibiteur irréversible acrylamide **246(OM145)**. Les intermédiaires **256** et **255** n'ont pas été purifiés, leur détection a été réalisée par ^{1}H RMN.*

b) Motif 4-diméthylaminocrotonamide

Le motif 4-diméthylaminocrotonamide est le deuxième groupement le plus utilisé dans les inhibiteurs covalents irréversibles en tant que bon accepteur de Michael. La présence du groupement diméthylamine peut permettre l'activation d'une cystéine du site actif par la formation d'une liaison hydrogène entre les fonctions thiol et amine (Figure 83).[299]

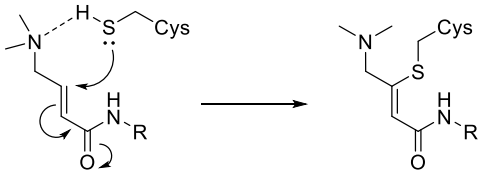


Figure 83 : Influence du groupement diméthylamine dans l'addition de Michael d'une cystéine sur un motif 4-diméthylaminocrotonamide.[299]

La synthèse d'un inhibiteur irréversible portant le groupement 4-diméthylaminocrotonamide a été initiée à la suite des résultats obtenus ci-dessus. Un couplage peptidique a été réalisé entre l'aniline **251** et l'acide 4-(diméthylamino)-2-butènoïque chlorhydraté **257** en présence de HATU comme agent de couplage (Schéma 52). Après 16 h de réaction, l'amine protégée **258** a été isolée avec un rendement de 52 % puis un

[299] Wissner, A.; Mansour, T. S. *Arch. Pharm. (Weinheim)* **2008**, *341* (8), 465–477.

traitement avec de l'acide chlorhydrique 4 M dans le 1,4-dioxane a permis d'obtenir l'ammonium **259** après concentration du milieu. Contrairement à la fonction acrylamide, aucune addition du chlore n'a été observée sur l'accepteur de Michael. L'intermédiaire **259** a été engagé directement dans l'étape de formation de l'urée dans les conditions habituelles avec du 4-nitrophénylchloroformate **42** et la plateforme méthylée **8**. Cependant, l'urée attendue **260** n'a pas été formée, due probablement à un manque de réactivité du sel chlorhydrate **259**.

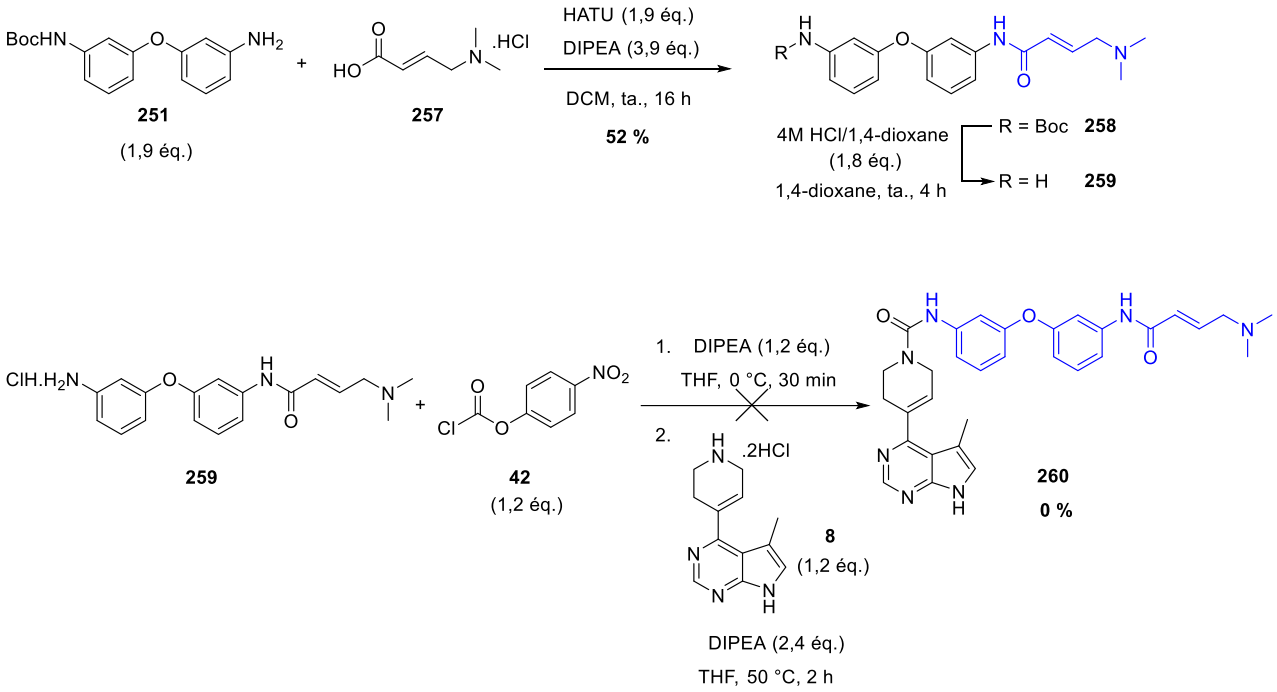


*Schéma 52 : Tentative de synthèse de l'urée **260** par la formation d'un carbamate.*

Pour parer à cette problématique, la méthode de formation de l'urée a été changée en utilisant du triphosgène **261** afin de former un isocyanate à partir de l'aniline **259**, en présence de triéthylamine dans le tétrahydrofurane pendant 1 h à 30 °C (Schéma 53). Après conversion de l'aniline de départ, l'amine secondaire **8** a été rajoutée et le milieu réactionnel a été agité pendant 18 h. Cependant, lors de la purification du brut réactionnel complexe, le produit attendu **260** n'a pas été repéré. Au lieu de ce dernier, le composé **262**, dont le groupement diméthylamine a été substitué par un atome de chlore, a été isolé avec un faible rendement de 10 %.

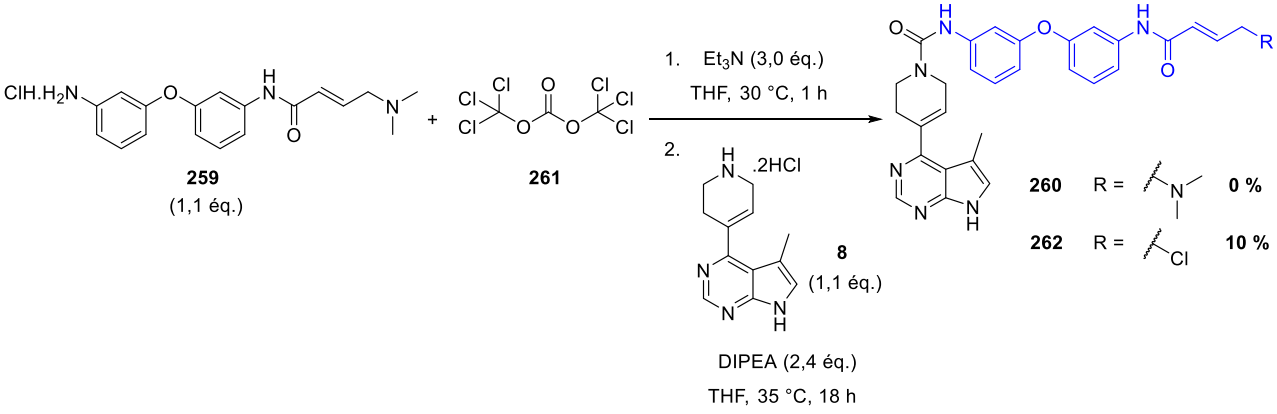


*Schéma 53 : Essai de formation de l'urée **260** avec du triphosgène.*

Malgré l'utilisation répandue du triphosgène avec une amine tertiaire en tant que base pour capturer l'acide chlorhydrique libéré, comme la triéthylamine, certaines publications ont montré qu'une réaction secondaire est possible entre ces deux espèces et qu'elle menait à la formation de chloroéthane **263** et de chlorure de diéthylcarbamoyle **264** (Schéma 54).[300,301] Dans notre cas, l'amine tertiaire du motif diméthylaminocrotonamide présent sur l'intermédiaire **259** ou sur le produit attendu **260**, a pu réagir avec le phosgène, libéré par le triphosgène, pour mener au composé chlorocrotonamide **262** et libérer du chlorure de diméthylcarbamoyle **265**.

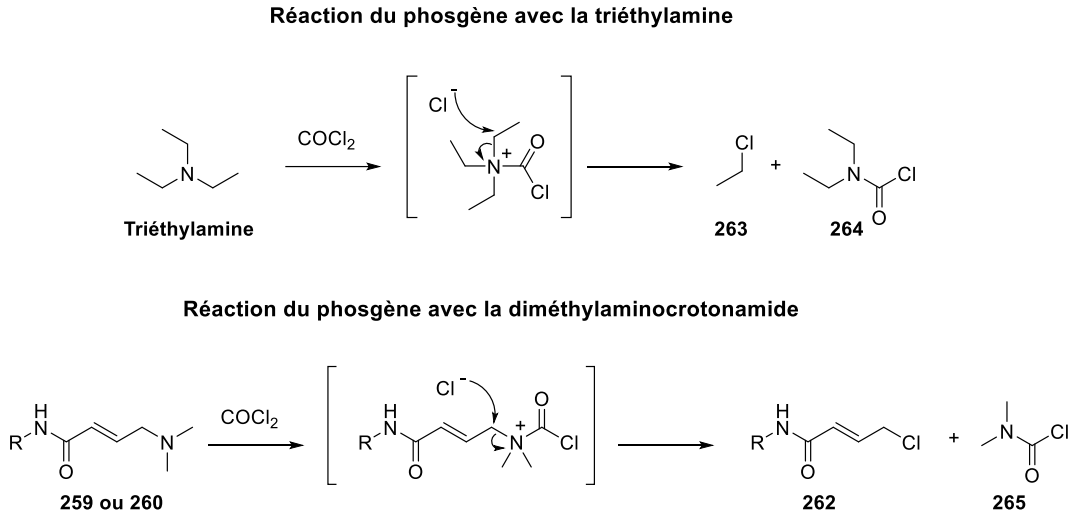


Schéma 54 : Réactions secondaires de désalkylation d'amines tertiaires par du phosgène.

Ainsi, comme l'utilisation du triphosgène dans l'étape finale a mené à de nombreux sous-produits dont le composé **262**, d'autres voies de synthèse d'urée sont actuellement en cours de développement comme l'activation de l'aniline avec le CDI.[200]

c) Motif sulfonamide de vinyle

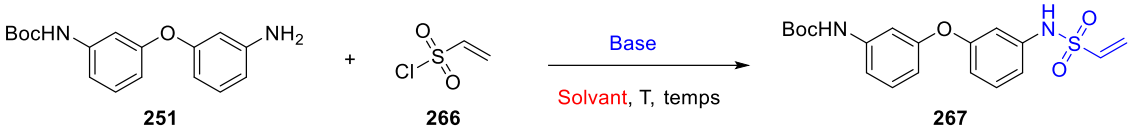
Le motif sulfonamide de vinyle (Figure 82, page 144) est l'un des meilleurs électrophiles. Il présente une réactivité plus élevée vis-à-vis des cystéines que les fonctions acrylamide et 4-diméthylaminocrotonamide précédentes.[302] Pour cette raison, nous avons réalisé des essais de sulfonylation de l'aniline **251** avec le chlorure de sulfonyle d'éthylène **266** pour obtenir le composé **267** (Tableau 25).

L'utilisation de diisopropyléthylamine (DIPEA) comme base dans le tétrahydrofurane a conduit, après 16 h de réaction à température ambiante, à des produits de dégradation (entrée 1). Nous avons pensé que la grande réactivité du chlorure de sulfonyle d'éthylène **266** pourrait entraîner des réactions secondaires, c'est pourquoi la température de réaction a été abaissée à 0 °C (entrée 2) mais aucune évolution n'a été observée. Un nouvel essai a alors été réalisé (entrée 3), toujours à 0 °C, mais en diluant cette fois-ci le réactif **266** dans le solvant de réaction afin que l'ajout soit le plus lent possible avec une forte agitation. Malheureusement, aucune évolution par rapport aux deux autres essais n'a été observée. Face à ces difficultés, les conditions réactionnelles ont été modifiées en changeant la diisopropyléthylamine par la triéthylamine, et le tétrahydrofurane par le dichlorométhane (entrée 4). La température et le temps de

[300] Itaya, T.; Kanai, T. *Heterocycle* **1997**, *46* (1), 101-104.
[301] Lemoucheux, L.; Rouden, J.; Ibazizene, M.; Sobrio, F.; Lasne, M.-C. *J. Org. Chem.* **2003**, *68* (19), 7289–7297.
[302] Flanagan, M. E.; Abramite, J. A.; Anderson, D. P.; Aulabaugh, A.; Dahal, U. P.; Gilbert, A. M.; Li, C.; Montgomery, J.; Oppenheimer, S. R.; Ryder, T.; Schuff, B. P.; Uccello, D. P.; Walker, G. S.; Wu, Y.; Brown, M. F.; Chen, J. M.; Hayward, M. M.; Noe, M. C.; Obach, R. S.; Philippe, L.; Shanmugasundaram, V.; Shapiro, M. J.; Starr, J.; Stroh, J.; Che, Y. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (23), 10072–10079.

réaction n'ont pas été changés quant à eux. Dans ces nouvelles conditions, le produit attendu **267** a été observé par RMN dans le brut réactionnel, mais sa séparation n'a pas pu être réalisée à cause de nombreux sous-produits.

*Tableau 25 : Conditions de sulfonylation de l'aniline **251**.*



251 **266** **267**

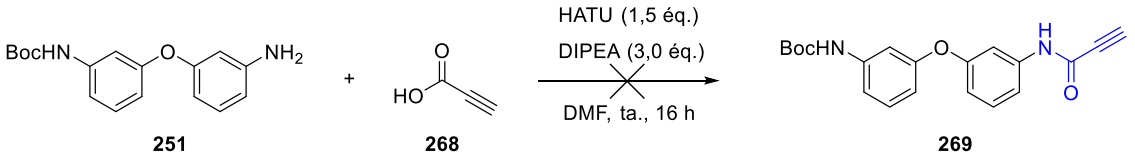
Entrée	266	Base	Solvant	T (°C)	Temps	Résultats
1	2,0 éq.	DIPEA (2,0 éq.)	THF	ta.	16 h	Dégradation
2	2,0 éq.	DIPEA (2,0 éq.)	THF	0 °C	16 h	Dégradation
3	**Dilué** ; 2,0 éq.	DIPEA (2,0 éq.)	THF	0 °C	16 h	Dégradation
4	**Dilué** ; 1,2 éq.	Et_3N (1,5 éq.)	DCM	0 °C	16 h	Séparation complexe

Face aux difficultés rencontrées dans la réaction de sulfonylation de l'aniline **251**, d'autres essais d'optimisation sont en cours à l'heure où sont écrites ces lignes. L'utilisation de chlorure de 2-chloroéthanesulfonyle reste une alternative au réactif **266** couramment utilisée dans la littérature grâce à sa plus grande stabilité et permet de former le motif sulfonamide de vinyle *in situ*.[303]

d) Motif propiolamide

Le motif propiolamide (Figure 82, page 144) est l'un des plus décrits dans la synthèse d'inhibiteurs covalents. Contrairement à la fonction acrylamide, l'hybridation sp du carbone α apporte une rigidité supplémentaire au groupement qui pourrait favoriser la création d'une liaison covalente avec la Cys365 du site actif de LIMK2 en se positionnant à proximité.

Une tentative de couplage peptique entre l'aniline **251** et l'acide propiolique **268** a été réalisée en utilisant le HATU comme agent de couplage (Schéma 55). Cependant, aucune trace de **269** n'a été observée après 16 h de réaction.



251 **268** **269**

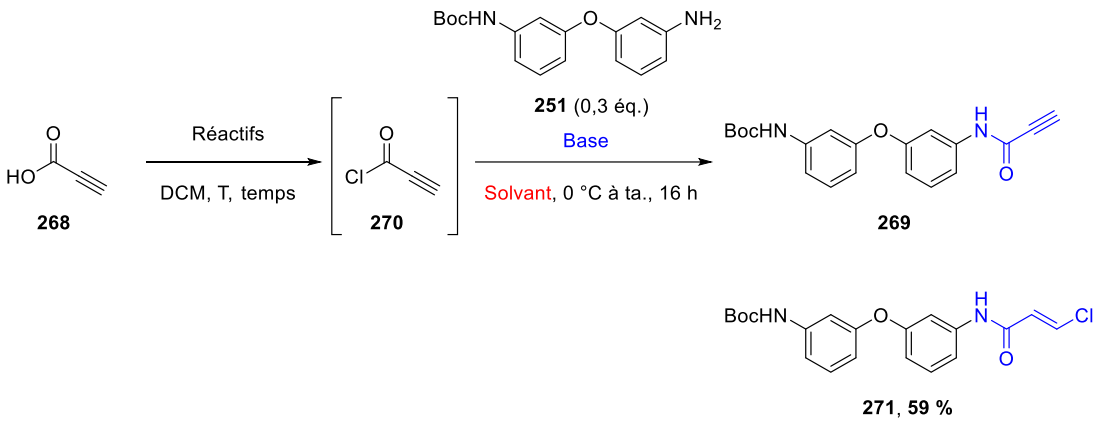
*Schéma 55 : Couplage peptidique entre l'aniline **251** et l'acide propiolique.*

Face à la faible réactivité de l'aniline, des essais d'acylation de cette dernière ont été réalisés avec le chlorure de propionyle **270** préalablement formé à partir de l'acide propiolique **268** (Tableau 26). Deux essais de conversion de l'acide carboxylique **268** en chlorure d'acyle **270** ont été réalisés avec 1 équivalent de chlorure d'oxalyle [$(COCl)_2$] et une goutte de DMF comme catalyseur à 0 °C[304] (entrées 1 et 2). Après que la dégradation du produit de départ **268** ait été observée au bout de 16 h (entrée 1), le temps de réaction a été raccourci à 1,5 h lors du deuxième essai (entrée 2). Malheureusement, le chlorure d'acyle **270** n'a pas été

[303] Rondestvedt, C. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76* (7), 1926–1929.
[304] Magnani, J. L.; Peterson, J. M.; Sarkar, A. K.; Vohra, Y. U.; Baek M.-G. WO2018169853A1, **2018**.

observé et le produit majoritaire détecté a été l'acide 3-chloroacrylique, résultant de l'addition de Michael du chlore sur l'alcyne.

*Tableau 26 : Essais d'acylation de l'aniline **251** en passant par le chlorure d'acyle **270**.*



Entrée	Réactifs	T (°C)	Tps	Résultats	Base	Solvant	Résultats
1	$(COCl)_2$ (1,0 éq.), DMF cat.	0	16 h	Dégradation			
2	$(COCl)_2$ (1,0 éq.), DMF cat.	0	1,5 h	Alcène			
3	PCl_5 (1,0 éq.)	0	1 h	Brut engagé	$NaHCO_3$ (5,0 éq.)	DCM	Dégradation
4	CCl_3CN (2,0 éq.), PPh_3 (2,0 éq.)	40	2 h	Brut engagé	Pyridine (3,0 éq.)	THF	Formation de **271** (59 %)

Une autre méthode de la littérature impliquant l'utilisation du pentachlorure de phosphore (PCl_5) dans le dichlorométhane (entrée 3) a permis d'obtenir l'intermédiaire **270** après 1 h de réaction.[305] Le milieu réactionnel a alors été concentré puis le brut a été utilisé tel quel dans l'étape suivante d'acylation de l'amine **251** dans le dichlorométhane, toujours à 0 °C, et en présence de bicarbonate de sodium en tant que base (entrée 3). Cependant, après 16 h de réaction à température ambiante, l'amide **269** n'a pas été formé. De nombreux produits de dégradation aromatiques ont pu être observés en RMN.

Afin d'éviter l'utilisation de conditions acides, nous avons choisi d'utiliser le système trichloroacétonitrile/triphénylphosphine (PPh_3/CCl_3CN) qui permet la formation de chlorure d'acyle dans le dichlorométhane à reflux pendant 2 h (entrée 4).[306,307] Cette méthode de formation d'amides présente l'avantage de ne pas nécessiter de traitement ou d'évaporation du milieu réactionnel avant l'ajout d'une amine et prévient donc l'hydrolyse du chlorure d'acyle. Après la formation de l'intermédiaire **270**, l'amine **251** et la pyridine ont été mises en solution dans le tétrahydrofurane puis le milieu réactionnel contenant le chlorure d'acyle a été ajouté à 0 °C.[193] Après 16 h de réaction, l'amide **271** a été obtenu avec un rendement de 59 % au détriment du produit attendu **269**. Malgré des conditions non acides de formation du chlorure d'acyle **270**, l'acide propiolique a de nouveau subi une attaque nucléophile par un atome de chlore.

Face à ces résultats, d'autres tentatives de formations de l'amide **269** sont en cours d'élaboration. D'après les essais réalisés jusqu'ici, les voies de synthèse passant par le chlorure d'acyle **270** mènent à une

[305] Lucescu, L.; Bîcu, E.; Belei, D.; Shova, S.; Rigo, B.; Gautret, P.; Dubois, J.; Ghinet, A. *Res. Chem. Intermed.* **2016**, *42* (3), 1999–2021.
[306] Jang, D. O.; Park, D. J.; Joonggon, K. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40* (29), 5323–5326.
[307] Kijrungphaiboon, W.; Chantarasriwong, O.; Chavasiri, W. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53* (6), 674–677.

dégradation des produits de départ ou à une addition de Michael par l'attaque nucléophile d'un chlore. Des méthodes de couplage peptique sont donc en cours d'exploration comme l'utilisation de CDI, de T3P ou en passant par la formation d'un fluorure d'acyle.[308]

e) Motif α-cyanoacrylamide

Le motif α-cyanoacrylamide est l'une des fonctions les plus utilisées dans la conception d'inhibiteurs covalents réversibles (Schéma 48, page 131). Nous avons donc initié la synthèse d'un inhibiteur covalent réversible avec cette fonction (Figure 82, page 144) à partir du 3-aminophénol **21** (Schéma 56). Après un couplage d'Ullmann avec la 3-iodoaniline, la dianiline **272** a été obtenue avec 87 % de rendement. La monoacylation de l'aniline **272** a été réalisée à partir du 2-cyanoacétate de méthyle **273** et en présence de DABAL-Me_3 selon des conditions opératoires décrites dans la littérature.[197] Après 8 min de réaction à 130 °C sous irradiations aux micro-ondes, l'amide **274** a été obtenu avec 51 % de rendement. L'urée **275** a été isolée avec 52 % de rendement à partir de l'amine secondaire **8** et de l'aniline **274**, après l'activation de cette dernière avec le 4-nitrophénylchloroformate **42**.

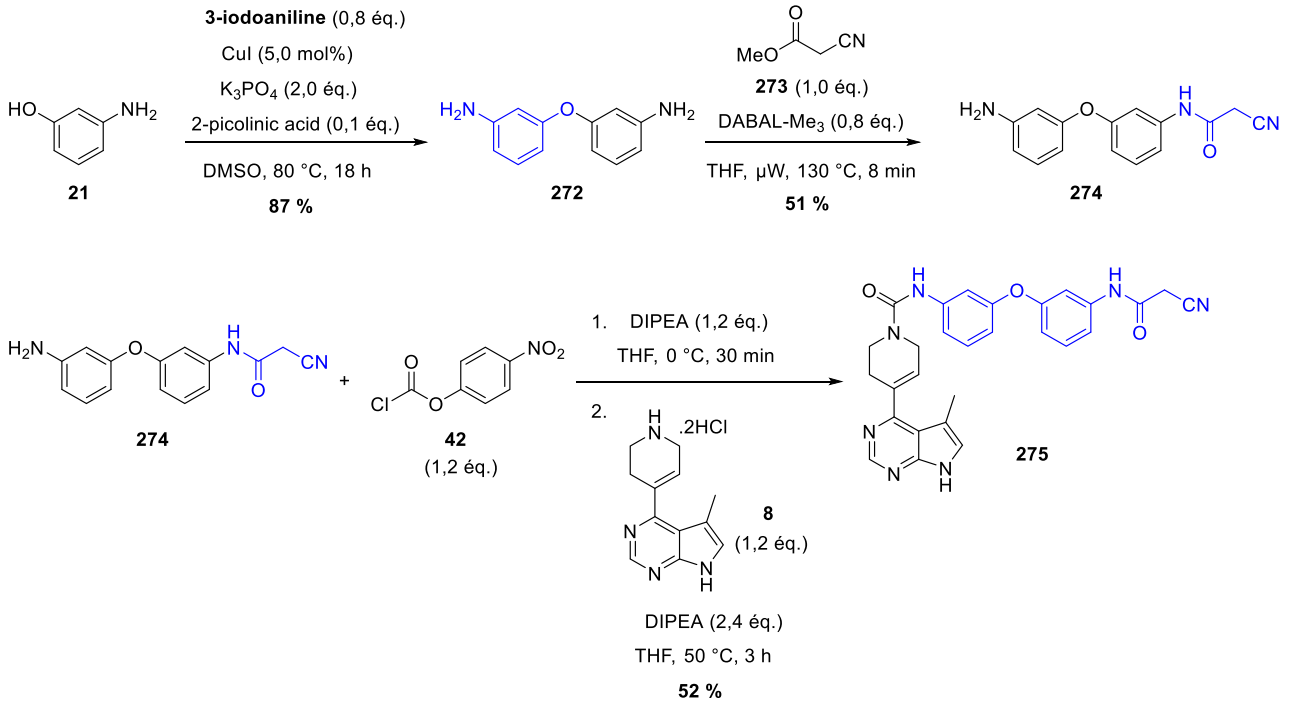


*Schéma 56 : Voie de synthèse de l'inhibiteur **275**.*

La synthèse du motif α-cyanoacrylamide s'effectue en général par une condensation de Knoevenagel entre un dérivé cyanoacétamide et un aldéhyde. Nous avons donc tenté de condenser le formaldéhyde sur le produit **275** en présence de pipéridine comme base, selon les conditions expérimentales décrites par Deng *et al.* (Schéma 57).[309] Malheureusement, une dégradation totale de l'urée **275** a été observée, sans aucune trace de la formation du cyanoacrylamide **276**.

[308] Due-Hansen, M. E.; Pandey, S. K.; Christiansen, E.; Andersen, R.; Hansen, S. V. F.; Ulven, T. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14* (2), 430–433.
[309] Deng, W.; Chen, X.; Jiang, K.; Song, X.; Huang, M.; Tu, Z.-C.; Zhang, Z.; Lin, X.; Ortega, R.; Patterson, A. V.; Smaill, J. B.; Ding, K.; Chen, S.; Chen, Y.; Lu, X. *ACS Med. Chem. Lett.* **2021**, *12* (4), 647–652.

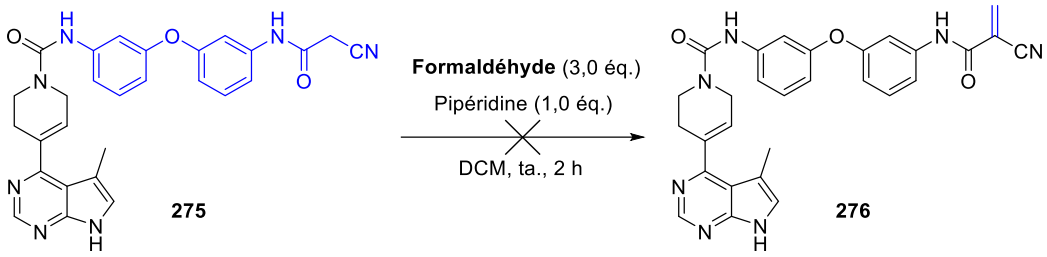


*Schéma 57 : Essai de condensation du formaldéhyde sur le cyanoacétamide **275**.*

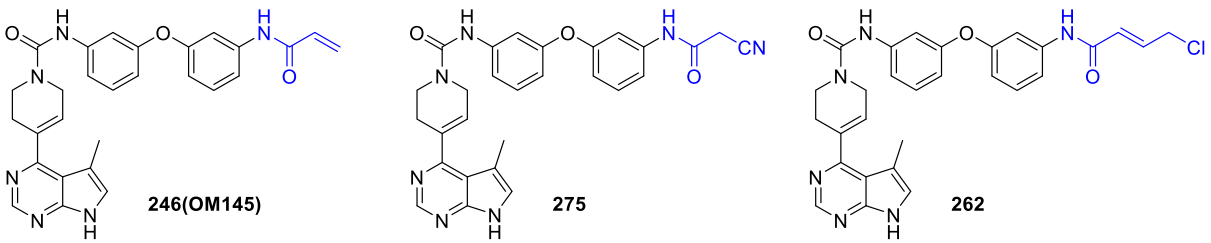
Face aux difficultés rencontrées lors de la synthèse de l'inhibiteur covalent réversible **276**, nous avons décidé d'arrêter l'exploration du motif α-cyanoacrylamide. En effet, la présence du groupement nitrile sur le précurseur **275** permet à ce dernier d'être considéré lui-même comme un éventuel inhibiteur covalent réversible, à confirmer ultérieurement.

f) Évaluations biologiques des inhibiteurs

En conclusion de cette partie dédiée à la synthèse d'inhibiteurs covalents ciblant les LIMKs et plus particulièrement la Cys365 du site actif de LIMK2, 3 composés ont été synthétisés :

- **246(OM145)**, potentiel inhibiteur irréversible
- **262**, produit non attendu issu du motif diméthylaminocrotonamide
- **275**, potentiel inhibiteur covalent réversible

Ces composés ont donc été évalués biologiquement sur les LIMKs et les ROCKs ainsi que sur l'inhibition de la phosphorylation de la cofiline des cellules HeLa pour les composés **246(OM145)** et **275** (Figure 84). Les 3 inhibiteurs (**246(OM145)**, **275**, **262**) présentent chacun de bonnes affinités pour les LIMKs, sous la barre des 100 nM. Parmi eux, le composé **246(OM145)** est le seul à passer sous le seuil des 10 nM avec des constantes d'inhibitions de 3 et 8 nM sur LIMK1 et LIMK2 respectivement. L'inhibition des ROCKs fait également apparaître une sélectivité correcte vis-à-vis des LIMKs pour les 3 composés, en particulier pour **246(OM145)** et **275** dont les valeurs ne dépassent pas 50 % d'inhibition des ROCKs à 1 µM. Ainsi, les inhibiteurs **246(OM145)** et **275** sont très affins des LIMKs et possèdent une sélectivité modérée vis-à-vis de ces dernières par rapport aux ROCKs. L'évaluation de l'inhibition de la phosphorylation de la cofiline sur les cellules HeLa à 25 µM a montré de très bons résultats, avec 90 % d'inhibition pour **246(OM145)** et jusqu'à 99 % pour **275**. Ces valeurs démontrent qu'à cette concentration, ces 2 inhibiteurs diminuent de façon drastique l'activité enzymatique des LIMKs sur la cofiline dans les cellules HeLa.



246(OM145)	275	262
Ki (LIMK1) = 3 nM	Ki (LIMK1) = 13 nM	Ki (LIMK1) = 20 nM
Ki (LIMK2) = 8 nM	Ki (LIMK2) = 20 nM	Ki (LIMK2) = 71 nM
% inhib ROCK1 (1 µM) = 47	% inhib ROCK1 (1 µM) = 53	% inhib ROCK1 (1 µM) = 49
% inhib ROCK2 (1 µM) = 28	% inhib ROCK2 (1 µM) = 36	% inhib ROCK2 (1 µM) = 67
% inhib phospho cofiline HeLa (25 µM) = 90	% inhib phospho cofiline HeLa (25 µM) = 99	

*Figure 84 : Données biologiques des inhibiteurs potentiellement covalents **246(OM145)**, **275** et **262**.*

Le seul inhibiteur potentiellement irréversible de ce lot **246(OM145)** a été caractérisé davantage pour connaître son mode d'inhibition et s'il effectue une liaison covalente entre la Cys365 du site actif de LIMK2 ciblée.

2. Caractérisation de **246(OM145)**

a) Type d'inhibition

Pour confirmer le mode d'interaction entre l'inhibiteur **246(OM145)** et les LIMKs, une analyse par spectrométrie de masse a été réalisée par l'équipe du Pr Knapp et du Dr Mathea de l'Université de Francfort. Après incubation de l'inhibiteur **246(OM145)** (MW = 495 Da) avec LIMK1 et LIMK2, les analyses par spectrométrie de masse ont permis d'observer une augmentation du poids moléculaire de LIMK1 passant de 35936 Da à 36431 Da (Figure 85), tandis qu'aucun changement n'a été mesuré pour LIMK2. À notre grande surprise, ces résultats indiquent que la molécule **246(OM145)** a créé une liaison covalente non pas avec LIMK2 et sa Cys365 que nous ciblions initialement, mais avec un résidu de LIMK1.

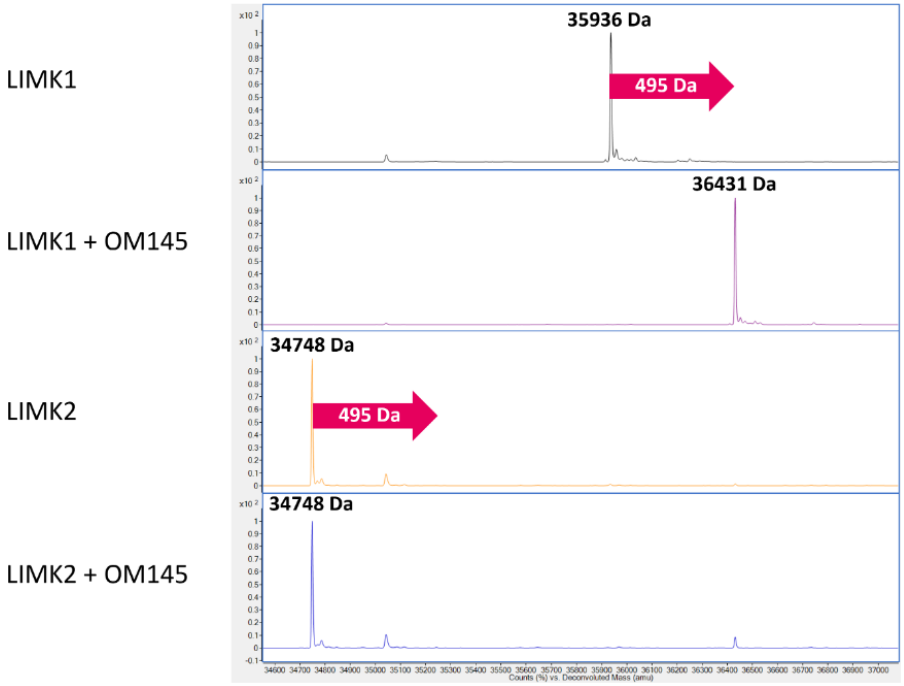


*Figure 85 : Analyse par spectrométrie de masse de l'inhibition irréversible de LIMK1 par **246(OM145)**.*

Face à ces résultats surprenants, le complexe LIMK1-**246(OM145)** a été co-cristallisé et sa structure 3D a été déterminée par l'équipe du Pr Knapp. Ils ont ainsi pu visualiser les sites d'interaction entre l'inhibiteur irréversible **246(OM145)** et sa cible LIMK1 (Figure 86). Grâce à cette caractérisation structurale, nous avons pu observer qu'une liaison covalente s'est créée entre la Cys349 de LIMK1 et le motif acrylamide de la molécule **246(OM145)**, ce qui a engendré un repli imprévisible du groupement phénoxyaryle et a induit une déstabilisation des feuillets β situés dans le lobe *N* de LIMK1.

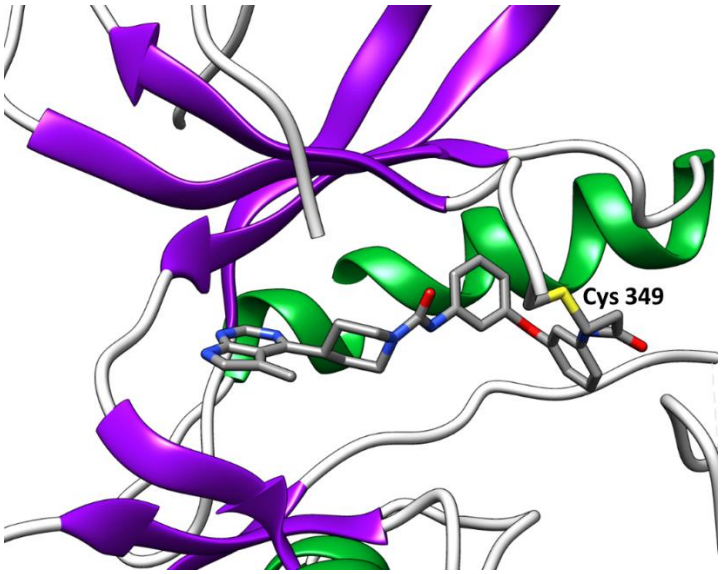


*Figure 86 : Cliché cristallographique de l'inhibiteur irréversible **246(OM145)** dans le site actif de LIMK1, établissant une liaison covalente avec la Cys349.*

Deux raisons pour lesquelles l'inhibiteur **246(OM145)** ne se lie pas à LIMK2 peuvent être évoquées :

- La fonction thiol (-SH) de la Cys365 n'est peut-être pas suffisamment activée par la présence de résidus pouvant créer des liaisons hydrogène avec cette dernière.
- La flexibilité de la molécule dans la poche peut éloigner spatialement la fonction acrylamide de la Cys365.

Dans le premier cas, une étude de l'environnement peptique est en cours par le Dr Aci-Sèche de l'équipe SB&C de l'ICOA, pour comparer les résidus situés autour de la Cys349 activée de LIMK1 avec ceux situés proches de notre cible initiale, la Cys365 de LIMK2.

Dans le second cas, la flexibilité apportée par le groupement phénoxyaryle est responsable du repli de la molécule dans le site actif de LIMK1. Pour contourner cette problématique, un inhibiteur plus rigide biaryle **277** est en cours de synthèse dans le but de cibler la Cys365 de LIMK2 (Figure 87).

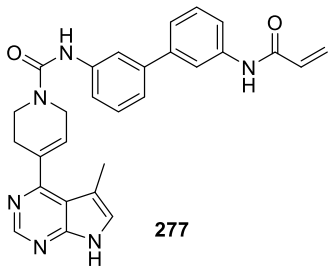


*Figure 87 : Structure de l'inhibiteur biaryle **277**, plus rigide que l'inhibiteur irréversible **246(OM145)**, ciblé pour l'inhibition irréversible de LIMK2.*

Afin de pouvoir comparer les différences d'efficacité entre l'inhibition réversible et l'inhibition covalente de LIMK1, la synthèse d'un inhibiteur structurellement proche du composé **246(OM145)** a été réalisée. L'inhibiteur **278** a ainsi été conçu avec une fonction propanamide à la place de la fonction électrophile acrylamide du composé **246(OM145)** (Schéma 58). Le remplacement de l'accepteur de Michael empêche ainsi l'attaque d'une cystéine et fait de la molécule **278** un inhibiteur réversible très similaire à l'inhibiteur irréversible **246(OM145)**. Sa synthèse est proche de celle de **246(OM145)** (Schéma 51, page 146), l'acylation de l'aniline **251** avec du chlorure de propanoyle **279** a permis d'obtenir l'amide **280** avec un

rendement de 68 %. La seconde aniline a ensuite été déprotégée avec de l'acide chlorhydrique 4 M dans le 1,4-dioxane, puis l'intermédiaire **281** a été engagé directement dans l'étape de formation de l'urée. Après une activation sous forme de carbamate avec le 4-nitrophénylchloroformate **42** à 0 °C pendant 30 min, la plateforme méthylée **8** a été ajoutée et le milieu a été chauffé à 50 °C. Après 2 h de réaction, l'inhibiteur réversible **278** a été obtenu avec 58 % de rendement.

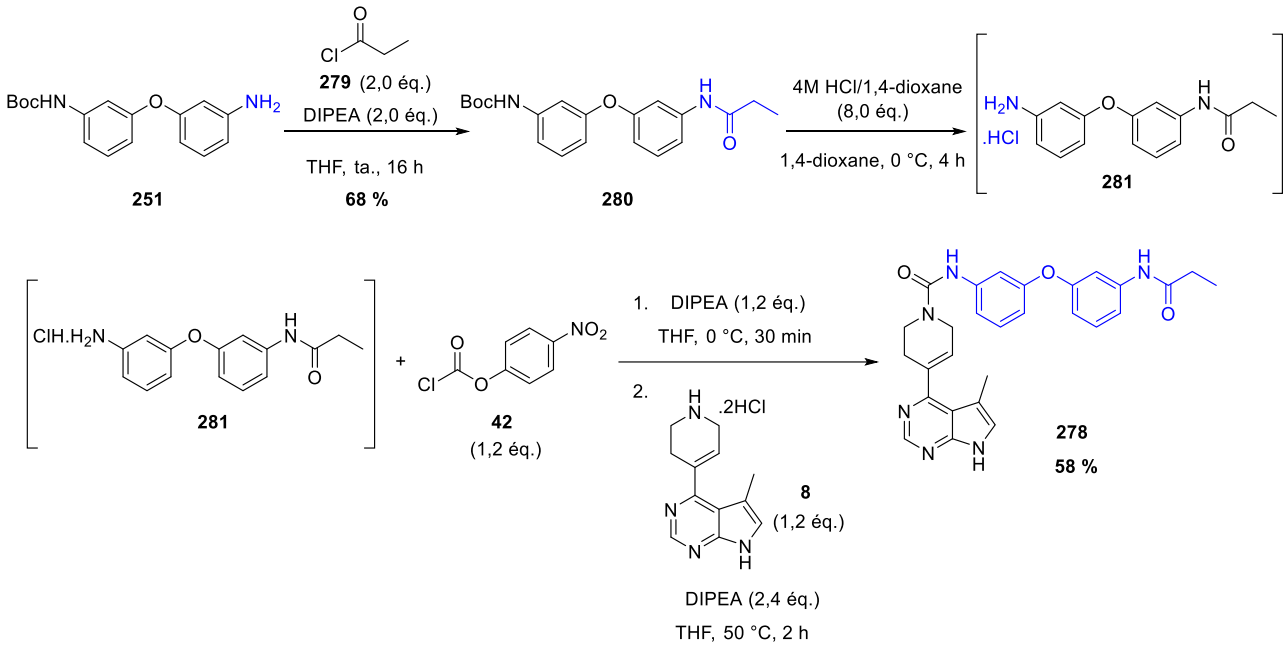
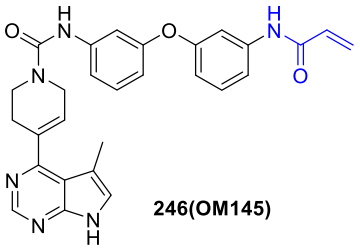
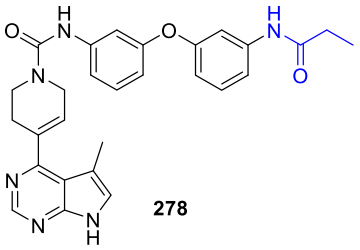


*Schéma 58 : Synthèse de l'inhibiteur réversible **278**, analogue de l'inhibiteur irréversible **246(OM145)**.*

L'évaluation des affinités du composé **278** sur les LIMKs purifiées a montré d'excellentes valeurs de constantes d'inhibition de 3 et 6 nM pour LIMK1 et LIMK2 respectivement (Figure 88). L'inhibition des ROCKs à une concentration de 1 µM reste modérément en dessous de 50 % comme pour l'analogue acrylamide **246(OM145)**. Il peut être souligné que les pourcentages d'inhibition de la phosphorylation de la cofiline des cellules HeLa, traitées pendant 2 h à 25 µM, sont comparables entre l'inhibiteur réversible **278** (96 %) et l'inhibiteur irréversible **246(OM145)** (90 %). La comparaison des deux composés montre des comportements cellulaires similaires (inhibition des LIMKs, sélectivité des LIMKs vis-à-vis des ROCKs, inhibition de la phosphorylation de la cofiline).



Ki (LIMK1) = 3 nM
Ki (LIMK2) = 8 nM
% inhib ROCK1 (1 µM) = 47
% inhib ROCK2 (1 µM) = 28
% inhib phospho cofiline HeLa (25 µM) = 90



Ki (LIMK1) = 3 nM
Ki (LIMK2) = 6 nM
% inhib ROCK1 (1 µM) = 49
% inhib ROCK2 (1 µM) = 41
% inhib phospho cofiline HeLa (25 µM) = 96

*Figure 88 : Évaluations biologiques de l'inhibiteur irréversible **246(OM145)** et de son analogue réversible **278**.*

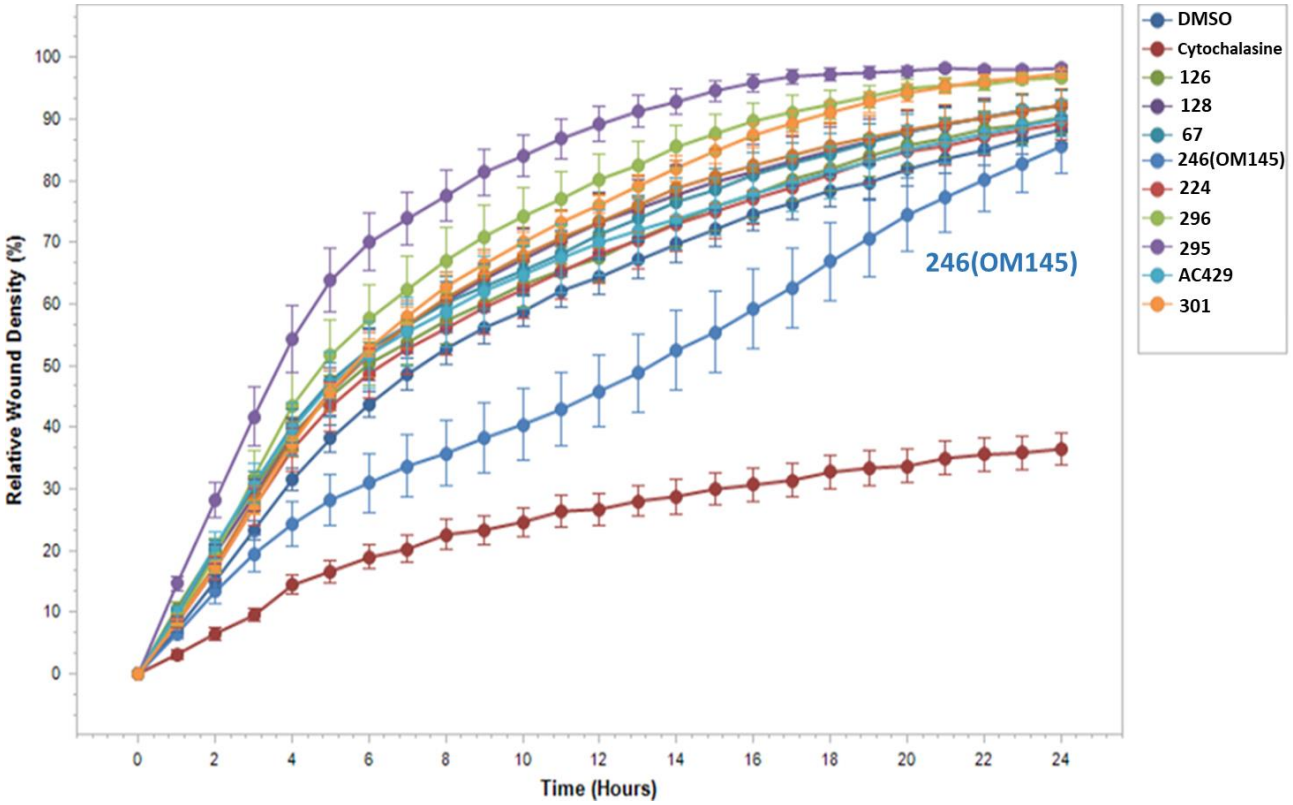
Pour aller plus loin dans la caractérisation des effets biologiques induits par l'inhibiteur irréversible **246(OM145)**, l'évaluation de l'activité enzymatique de LIMK1 sera évaluée après sa préincubation avec l'inhibiteur **246(OM145)** pour permettre au complexe covalent LIMK1-**246(OM145)** de se former. Le même protocole sera réalisé avec le composé **278** et les cinétiques des activités enzymatiques seront comparées.

b) Données biologiques de **246(OM145)**

Migration cellulaire

Au vu de la très bonne inhibition de la phosphorylation de la cofiline engendrée par l'inhibiteur irréversible **246(OM145)**, son effet sur la migration cellulaire a été mesuré par un test de migration cellulaire réalisé par l'équipe du Dr Ruchaud de la Station biologique de Roscoff. Les tests ont été réalisés selon le même protocole que celui décrit dans le chapitre 2, les cellules U2OS ont été traitées à une concentration de 2,5 µM en inhibiteur pendant 24 h afin de mesurer les taux de migration cellulaire.

Neuf composés ont été testés avec l'inhibiteur **246(OM145)** lors de ces tests répétés trois fois. Malheureusement, lors de ces expériences, les incertitudes de mesure se sont avérées trop importantes pour la plupart des inhibiteurs et il est donc impossible de conclure à un effet sur la migration cellulaire. Seul l'inhibiteur **246(OM145)** présente une inhibition statistiquement significative de la migration cellulaire entre 6 et 8 h sur l'ensemble des trois tests (Graphe 8). S'il est difficile de comparer le composé **246(OM145)** avec d'autres inhibiteurs de référence comme **AC429**, il semble ressortir du lot avec un très bon impact sur la migration cellulaire.

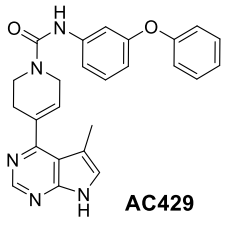
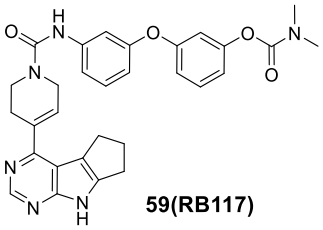
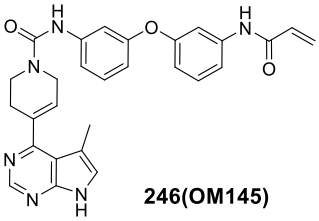


*Graphe 8 : Résultat d'un test de migration cellulaire sur cellules U2OS traitées avec 2,5 µM d'inhibiteur. Le DMSO est utilisé comme contrôle et la cytochalasine comme référence. Seul le composé **246(OM145)** a présenté des résultats reproductibles sur 3 expériences.*

Études ADME-tox

Face à ces bons résultats cellulaires, l'inhibiteur irréversible **246(OM145)** est apparu comme un bon candidat pour de futurs essais précliniques sur un modèle de souris KO-*NF1*. Une évaluation de ses paramètres ADME-tox a ainsi été réalisée en suivant les mêmes protocoles que ceux décrits pour les composés **59**(**RB117**) et **AC429** au chapitre 2. En comparant les résultats obtenus précédemment avec les composés **AC429** et **59**(**RB117**), le profil ADME de l'inhibiteur **246(OM145)** est similaire à celui de **59**(**RB117**) avec une liaison aux protéines plasmatiques très élevée de 100 % accompagnée d'une clairance intrinsèque conséquente de 458 µL/min/mg (Tableau 27). Ces données indiquent que, comme l'inhibiteur **59**(**RB117**), le composé **246(OM145)** se lie fortement aux protéines du plasma et sa fraction libre est rapidement éliminée, ce qui peut limiter sa répartition dans les tissus. On peut néanmoins noter une nette amélioration de la solubilité aqueuse de la molécule **246(OM145)** (2,7 µmol/L) par rapport aux composés **AC429** (1,1 µmol/L) et **59**(**RB117**) (0,56 µmol/L).

*Tableau 27 : Résultats des études ADME sur **246(OM145)** et comparaison avec les composés **AC429** et **59**(**RB117**).*

	 AC429	 59(RB117)	 246(OM145)
Solubilité aqueuse (µM) pH 7.4	**1,1**	**0,56**	**2,7**
Protein plasma binding (PPB) Homme **(% lié)**	**99,7 %**	**100 %**	**100 %**
Clairance intrinsèque CL_{int} souris (µL/min/mg)	**63**	**462**	**458**
Demi-vie ($t_{1/2}$) souris	**ND**	**49 min**	**ND**

La toxicité aiguë de l'inhibiteur irréversible **246(OM145)** a également été évaluée par laboratoire Typage et Archivage Animaux Modèles (TAAM) situé à Orléans avec une formulation identique à celle utilisée pour évaluer le composé **59**(**RB117**) (20 % de cyclodextrine et 5 % de DMSO). Après évaluation de la toxicité aiguë du composé **246(OM145)** à trois doses de 15, 30 et 50 mg/kg, aucun signe d'intolérance ni de toxicité n'a été observé.

En conclusion, l'unique inhibiteur irréversible **246(OM145)** de LIMK1 que nous avons synthétisé a présenté de très bonnes affinités pour les LIMKs et une réponse cellulaire adéquate avec une inhibition de la migration cellulaire au bout de 6 à 8h de traitement. D'après les résultats des études ADME-tox, le profil du composé **246(OM145)** ressemble à celui de l'inhibiteur **59**(**RB117**), sans aucun signe de toxicité à 50 mg/kg et avec une clairance intrinsèque élevée. Par conséquent, l'injection de 2 doses journalières de 50 mg/kg est envisagée lors du test préclinique sur un modèle murin KO-*NF1*.

III – PROTACs ciblant les LIMKs

La conception de PROTACs ciblant spécifiquement les LIMKs présente un grand intérêt dans l'inactivation de la voie LIMK/cofiline grâce à la dégradation de ces kinases par le protéasome. À l'image des inhibiteurs covalents irréversibles, les PROTACs induisent une inactivation de ces protéines jusqu'à leur renouvellement cellulaire. Par conséquent, la création de PROTACs basés sur nos inhibiteurs réversibles de type pyrrolopyrimidine nous a semblé être une voie d'inactivation des LIMKs innovante et intéressante à exploiter.

1. Synthèse du PROTAC-amide (**283**)

a) Conception du PROTAC-amide

Pour débuter la synthèse de PROTACs ciblant les LIMKs, quatre choix ont été réalisés : l'E3 ubiquitine ligase ciblée et son ligand, le linker et la position de ce dernier sur nos inhibiteurs des LIMKs.

D'après les travaux de Donovan *et al.*[297], les LIMKs peuvent être dégradées par le système ubiquitine-protéasome grâce au PROTAC **282** qui comporte un ligand du VHL (Figure 89). Ainsi, nous avons fait le choix d'utiliser le même ligand du VHL lors de la conception de nos PROTACs. En outre, la présence d'une amine primaire sur le ligand du VHL commercial, aisément fonctionnalisable avec différents linkers, a conforté notre choix.

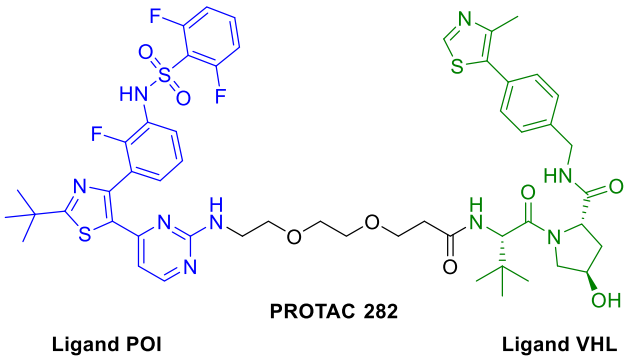


Figure 89 : Structure du PROTAC dégradant les LIMKs décrite par Donovan et al.

En raison du poids moléculaire important des PROTACs, nous avons choisi de baser nos PROTACs sur l'inhibiteur **127** comportant une urée de type Ph-O-alkyle qui lui offre une grande flexibilité (Figure 90). La présence d'un groupe acétamide permet d'introduire un linker dans cette position sans impacter l'affinité du ligand pour les LIMKs.

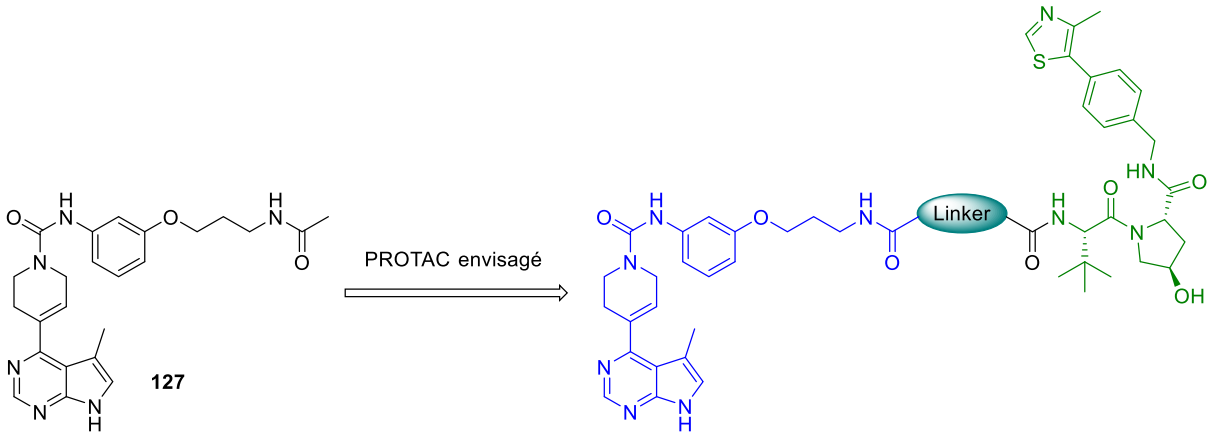


*Figure 90 : Structure des PROTACs envisagée à partir de l'inhibiteur **127**.*

Enfin, un linker de type alkyle a été choisi avec une longueur de 7 atomes de carbone afin d'obtenir une distance entre le ligand des LIMKs et le ligand du VHL proche de celle existant dans le PROTAC **282** : ni trop courte pour éviter que les deux protéines ne se gênent spatialement, ni trop longue pour permettre une ubiquitinylation des LIMKs optimale. Ainsi, le PROTAC **283** a été notre première structure ciblée avec un linker alkyle, reliant les ligands des LIMKs et de l'E3 ubiquitine ligase VHL par deux fonctions amide (Figure 91).

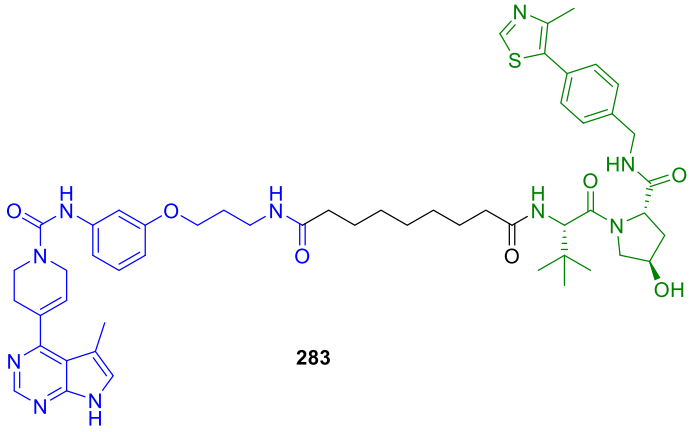


*Figure 91 : Structure ciblée du PROTAC **283** des LIMKs.*

b) Synthèse du PROTAC **283**

Dans un premier temps, le linker et le ligand du VHL ont été attachés ensemble. Pour ce faire, un couplage peptidique a été entrepris entre l'amine du ligand du VHL **284** et l'acide carboxylique du linker **285**, en présence de HATU (Schéma 59). Après 18 h de réaction, le complexe linker-VHL ligand **286** a été obtenu avec un rendement de 83 %. L'ester de *tert*-butyle situé en fin de chaîne aliphatique a ensuite été hydrolysé pour mener à l'acide carboxylique **287**.

En parallèle, l'amine de l'inhibiteur **128**, dont la synthèse a été décrite au Tableau 10, page 63 du chapitre 1, a également été déprotégée en milieu acide avant d'être engagée directement dans l'étape finale de couplage peptique avec l'acide carboxylique **287** et mener ainsi au PROTAC **283**, avec un faible rendement de 5 %. L'évaluation biologique de la dégradation des LIMKs avec le composé **283** sera présentée à la fin de ce chapitre.

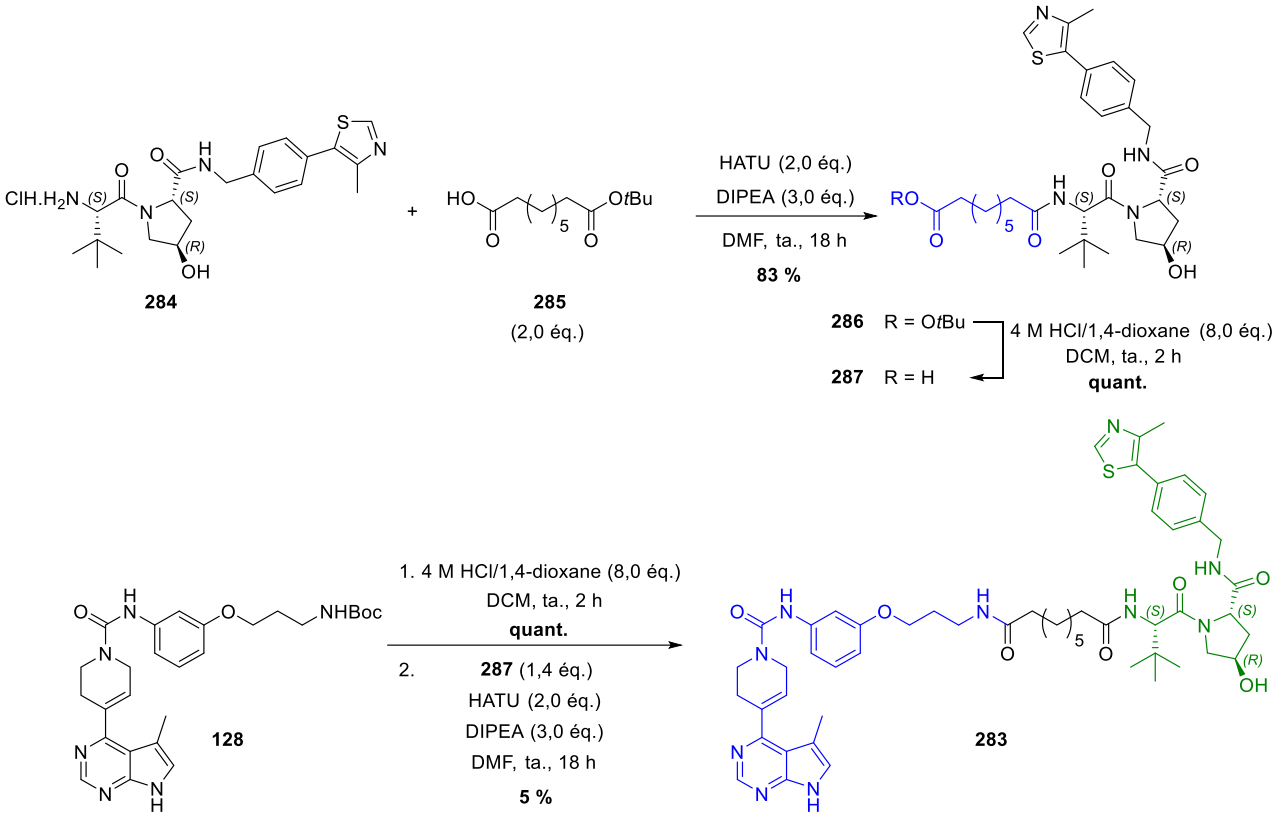


*Schéma 59 : Voie de synthèse du PROTAC **283**.*

Lors de cette dernière étape de couplage peptidique, la présence de nombreux sous-produits tels que la tétraméthylurée, ainsi que la faible solubilité du PROTAC **283** dans les solvants usuels ont rendu la purification très complexe. Après deux purifications sur silice en phase normale, une pureté de seulement 65 % a été obtenue. Au vu de la complexité de la séparation, la purification du PROTAC **283** a été confiée à la société Reach Separations de Strasbourg. Après une colonne chromatographique en phase inverse puis une autre en SFC (chromatographie en phase supercritique), le composé **283** a été isolé avec une pureté supérieure à 90 %.

2. Synthèse des PROTACs-triazole (**295**, **296**, **301**)

Pour éviter de rencontrer à nouveau des problèmes de purification de produits secondaires lors de l'étape finale de couplage peptidique, nous avons décidé de changer la fonction amide par un de ses bioisotères, le triazole. L'utilisation d'une réaction click entre un ligand d'une POI lié à un azoture et un ligand du VHL relié à un alcyne permet la formation d'un triazole tout en réduisant fortement la présence de sous-produits (Figure 92). Ce mode d'assemblage a par ailleurs déjà été utilisé avec succès par Wurz *et al.* lors de la synthèse de PROTACs ciblant la protéine BRD4.[288]

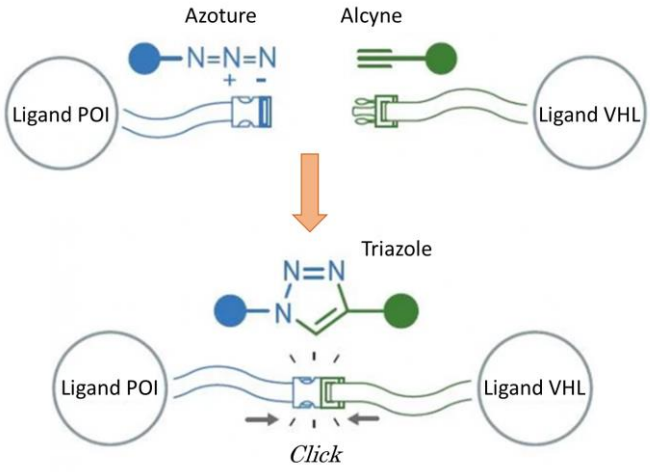


Figure 92 : Utilisation de la réaction click dans l'assemblage de PROTACs par un triazole.

a) Validation du motif triazole

Avant de commencer la synthèse de PROTACs assemblés par un triazole, il a été important pour nous de confirmer que le remplacement de la fonction acétamide présente sur le composé **127** (Figure 90, page 159) par un triazole, substitué ou non, n'induisait pas une baisse d'affinité pour les LIMKs. La synthèse des composés **288a** et **289** a alors été initiée dans le but d'évaluer l'influence du groupement triazole pour l'affinité pour les LIMKs (Figure 93).

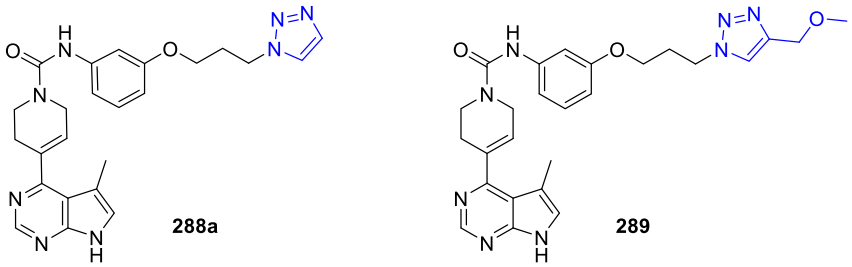


*Figure 93 : Structure des inhibiteurs **288a** et **289** avec un motif triazole.*

La synthèse des inhibiteurs triazoles a nécessité la préparation du composé **290**, comportant une fonction azoture sur la chaîne propyle (Schéma 60). Pour cela, le groupe azoture a été inséré par une substitution nucléophile du brome porté par le composé **92** avec de l'azoture de sodium. Après 18 h de réaction à 40 °C, le produit **291** a été obtenu avec un rendement presque quantitatif. L'étape suivante de réduction du groupement nitro a nécessité l'utilisation de conditions réductrices chimiosélectives en raison de la présence de l'azoture. Après l'échec d'une réduction sélective en présence de fer et d'acide acétique, nous avons utilisé une méthode de réduction des groupes nitro à base d'acide diboronique [$B_2(OH)_4$] et de 4,4'-bipyridine, décrite par Jang *et al.*[310] Cette méthode de réduction des composés nitro-aromatiques a permis d'obtenir l'aniline **292** avec 80 % de rendement après seulement 15 min de réaction. L'étape de formation de l'urée entre cette dernière et l'amine secondaire **8** a mené à la plateforme de synthèse **290** avec un rendement de 79 %.

[310] Jang, M.; Lim, T.; Park, B. Y.; Han, M. S. *J. Org. Chem.* **2022**, *87* (2), 910–919.

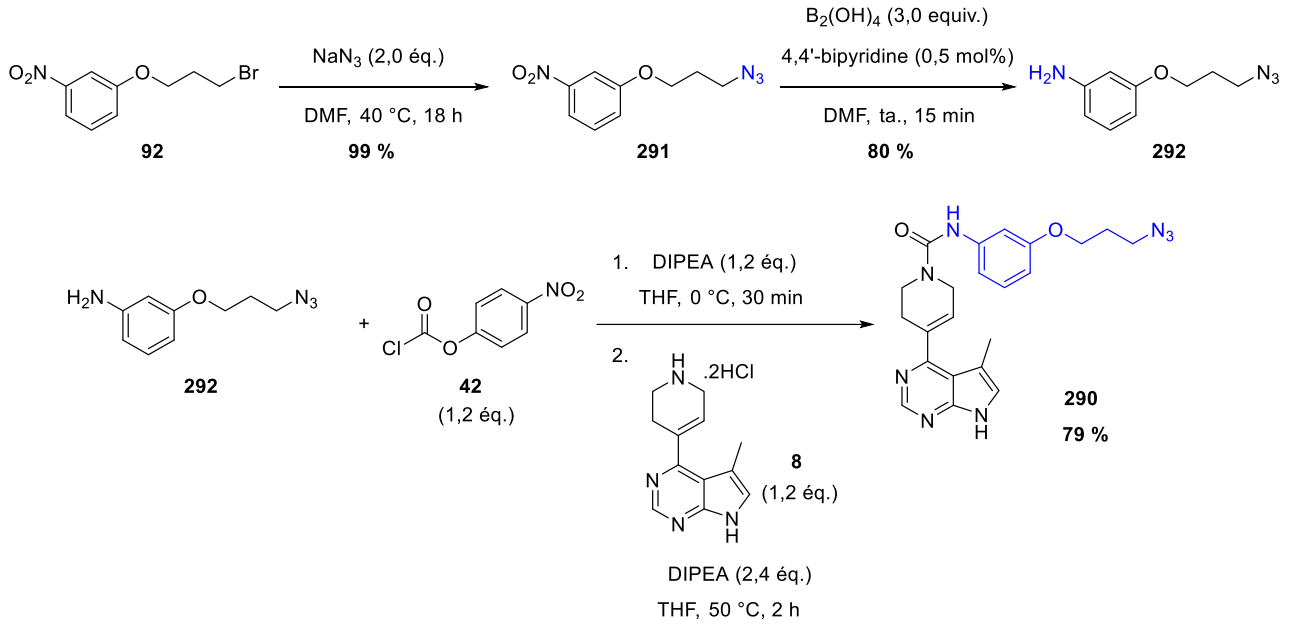


*Schéma 60 : Préparation de l'azoture **290**.*

Afin de synthétiser le triazole **288a**, une réaction click entre l'azoture **290** et le triméthylacétylène **293** a été réalisée en présence du couple sulfate de cuivre/ascorbate de sodium et de carbonate de potassium dans un système méthanol/diméthylformamide[311] (Schéma 61). Néanmoins, si le produit attendu **288a** a été obtenu avec 16 % de rendement, son isomère **288b** a été isolé avec 31 % de rendement. Ce dernier provient d'une migration inédite de l'insaturation de la 3,6-dihydropyridine pour mener à une 3,4-dihydropyridine. Par manque de temps, la raison de cette isomérisation en énamide n'a pour l'heure pas encore été expliquée, mais pourrait donner lieu à un travail de méthodologie plus poussé.

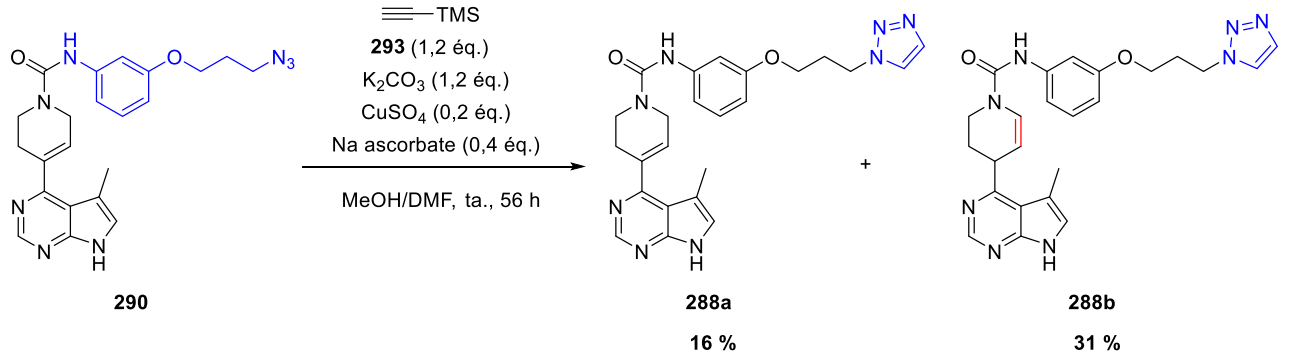


*Schéma 61 : Réaction click entre l'azoture **290** et le triméthylsilylacétylène **293**.*

Un second inhibiteur avec un triazole (**289**) a été ensuite synthétisé avec cette fois-ci un groupement diméthyléther en *C*-4 du triazole afin de valider la position d'un linker dans cette position (Schéma 62). Une réaction click a donc été réalisée entre l'azoture **290** et l'éther de méthyle propargyle **294**, toujours avec le même système catalytique à base de sulfate de cuivre et d'ascorbate de sodium, dans un mélange *tert*-butanol/eau[312] auquel du diméthylformamide a été ajouté pour obtenir une solubilisation complète du

[311] Fletcher, J. T.; Walz, S. E.; Keeney, M. E. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49* (49), 7030–7032.
[312] Wu, H.; Yang, K.; Zhang, Z.; Leisten, E. D.; Li, Z.; Xie, H.; Liu, J.; Smith, K. A.; Novakova, Z.; Barinka, C.; Tang, W. *J. Med. Chem.* **2019**, *62* (15), 7042–7057.

produit de départ **290**. Le triazole **289** a été obtenu après 18 h de réaction, avec un rendement de 29 % sans que l'isomérisation de l'insaturation du cycle central ait été observée.

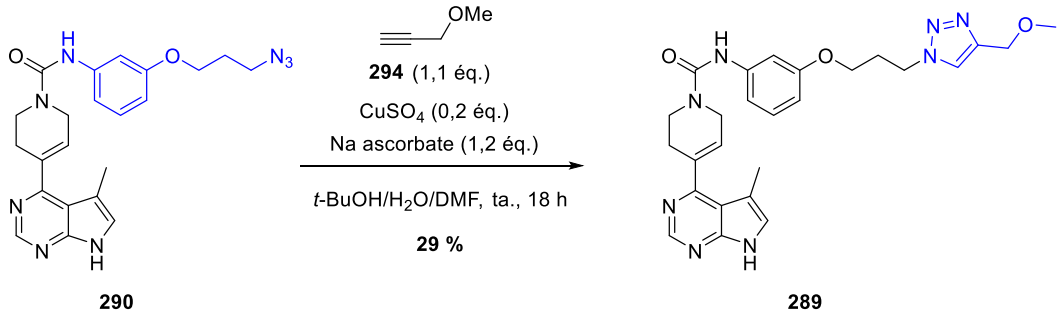
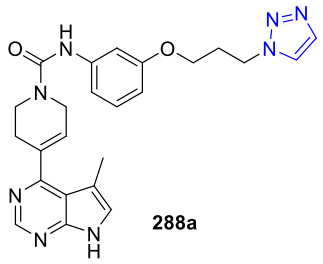


*Schéma 62 : Synthèse du triazole substitué **289**.*

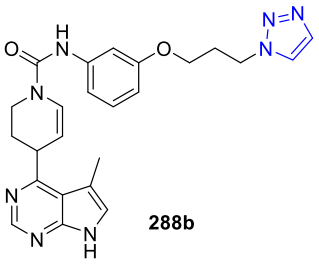
Les produits de type triazole **288a, 288b, 289** ainsi que l'intermédiaire azoture **290** ont été testés sur enzymes purifiées pour évaluer leurs affinités pour les LIMKs ainsi que leur pourcentage d'inhibition des ROCKs à 1 µM (Figure 94). L'inhibition de la phosphorylation de la cofiline des cellules HeLa a également été évaluée pour les composés **288a**, **288b** et **290**. Les constantes d'inhibition des produits initialement ciblés **288a** et **289** sont inférieures à 80 nM, ce qui confirme que le triazole, substitué ou non, est bien toléré lors de l'insertion de la molécule dans les sites actifs des LIMKs. L'azoture **290** présente également de bons Ki, de 46 et 61 nM sur LIMK1 et LIMK2 respectivement, tout comme le sous-produit **288b**. L'isomérisation de l'insaturation du cycle central lui permet d'être plus sélectif des LIMKs vis-à-vis des ROCKS par rapport à son analogue **288a**. Cette sélectivité avait auparavant été observée lors de la préparation d'inhibiteurs des LIMKs avec un cycle central saturé de type pipéridine.[159]

Une très bonne inhibition de l'activité enzymatique des LIMKs dans les cellules HeLa a été observée pour les molécules **288b**, **288a**, **290** avec des inhibitions de la phosphorylation de la cofiline de 79, 85 et 91 % respectivement.



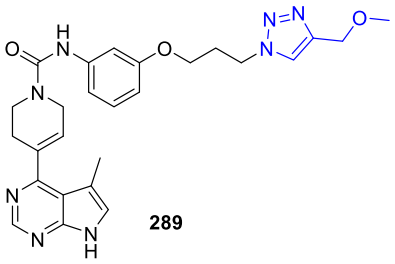
288a

Ki (LIMK1) = 66 nM
Ki (LIMK2) = 41 nM
% inhib ROCK1 (1 µM) = 58
% inhib ROCK2 (1 µM) = 39
% inhib phospho cofiline HeLa (25 µM) = 79



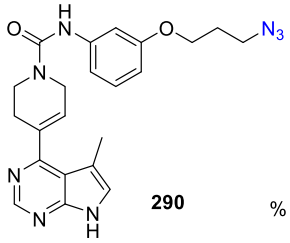
288b

Ki (LIMK1) = 107 nM
Ki (LIMK2) = 52 nM
% inhib ROCK1 (1 µM) = 11
% inhib ROCK2 (1 µM) = 6
% inhib phospho cofiline HeLa (25 µM) = 85



289

Ki (LIMK1) = 75 nM
Ki (LIMK2) = 25 nM
% inhib ROCK1 (1 µM) = 57
% inhib ROCK2 (1 µM) = 35



290

Ki (LIMK1) = 46 nM
Ki (LIMK2) = 61 nM
% inhib ROCK1 (1 µM) = 73
% inhib ROCK2 (1 µM) = 62
% inhib phospho cofiline HeLa (25 µM) = 91

*Figure 94 : Données biologiques des inhibiteurs de type triazole **288a**, **288b**, **289** et de l'azoture **290**.*

Pour conclure, la synthèse des composés **288a** et **289** a montré que le triazole ne provoquait pas de perte d'affinité pour les LIMKs. Ces résultats préliminaires ont mené à la synthèse de trois PROTACs assemblés dans une dernière étape par une réaction click.

b) Synthèse des PROTACs-triazole

Les deux premiers PROTACs de type triazole synthétisés possèdent un linker de type alkyle. Le PROTAC **295** est de taille semblable au PROTAC **283** (Figure 91, page 159), tandis que le second (**296**) est plus court de moitié (Schéma 63). Leur synthèse est similaire et débute par un couplage peptidique entre le ligand VHL **284** et l'acide 10-undécynoïque (**297**) ou l'acide 6-heptynoïque (**298**) pour mener aux alcynes intermédiaires **299** et **300** respectivement avec des rendements de 68 et 75 %. Une réaction click a ensuite été réalisée entre ces alcynes et l'azoture **290**, dans les mêmes conditions que précédemment pour mener aux PROTACs **296** et **295** avec des rendements de 74 et 59 %. Comme prévu, la dernière étape de cycloaddition de Huisgen a facilité la purification finale des PROTACs en évitant la formation de nombreux sous-produits.

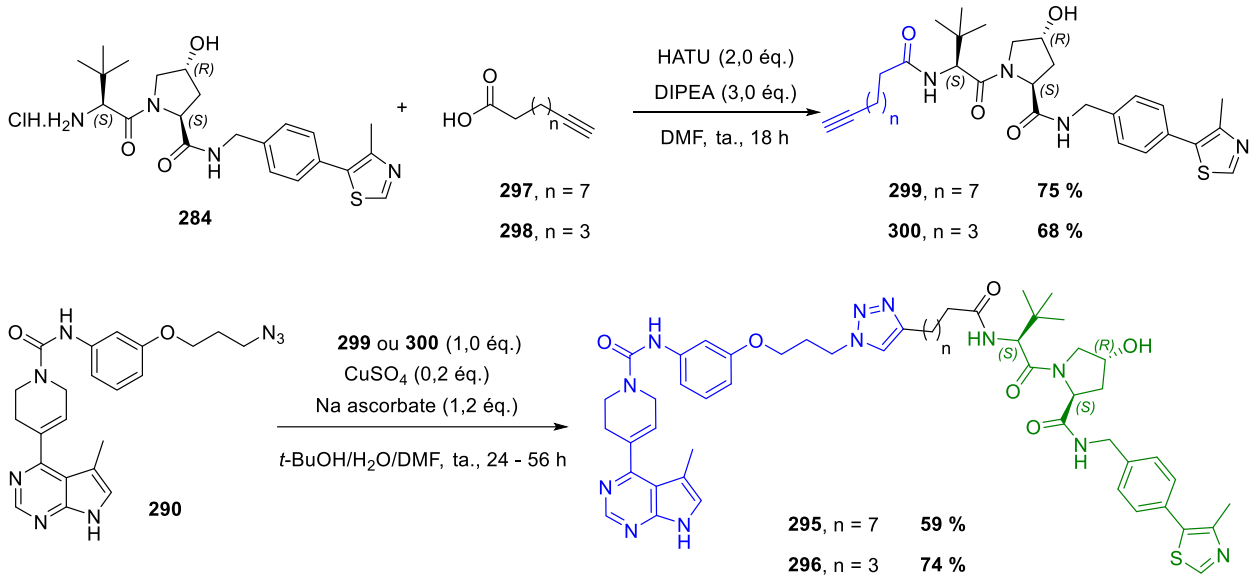


*Schéma 63 : Voie de synthèse des PROTACs **295** et **296**.*

Un dernier PROTAC, le composé **301** (Schéma 64) a été synthétisé en changeant la nature du linker alkyle par une chaîne PEG, tout en gardant une longueur similaire aux PROTACs **283** (Figure 91) et **295** (Schéma 63). Pour cela, le linker de type PEG **302** a été relié au ligand du VHL **284** par un couplage peptidique en présence de HATU comme précédemment pour mener au produit **303** avec 55 % de rendement. Cet alcyne et l'azoture **290** ont ensuite été engagés dans une cycloaddition de Huisgen pour conduire au PROTAC de type PEG **301** avec un rendement de 54 %.

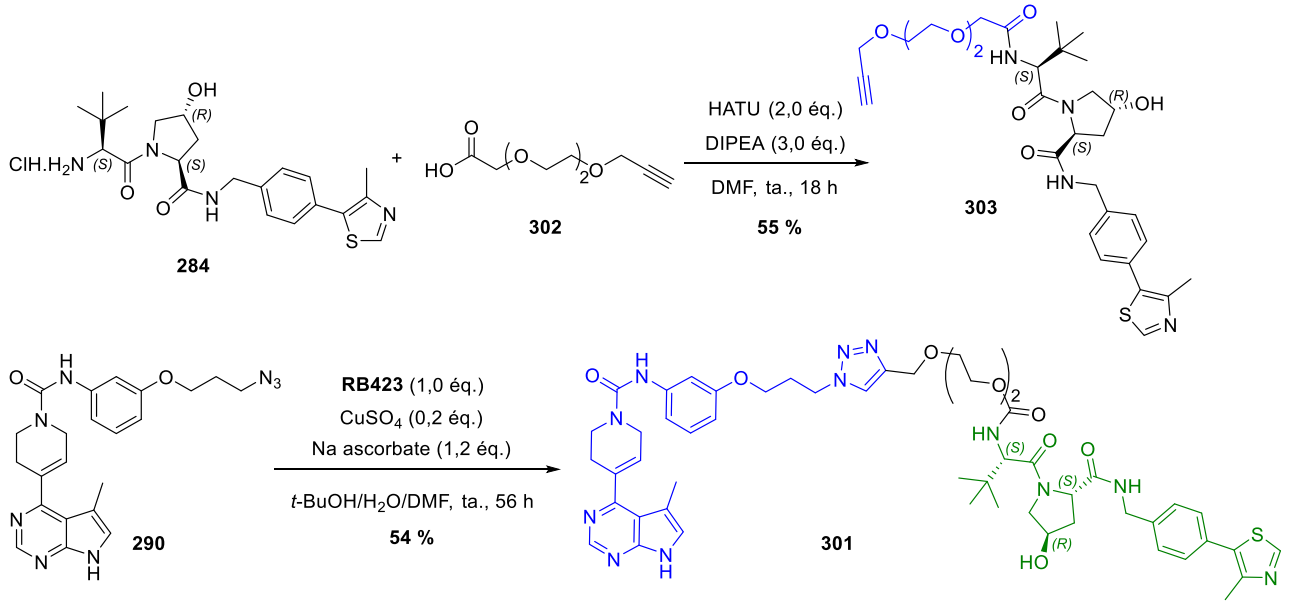
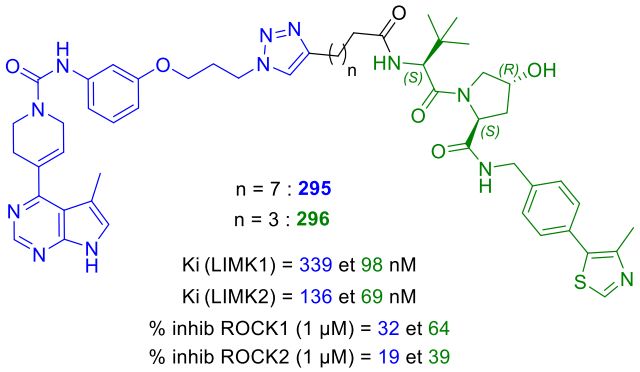


*Schéma 64 : Voie de synthèse du PROTAC de type PEG **301**.*

Pour conclure sur cette partie dédiée à la synthèse des PROTACs, 4 composés ont été synthétisés dont 3 avec un linker amide-triazole (**295**, **296**, **301**) et un avec un linker amide-amide (**283**). Leurs évaluations biologiques sur enzymes purifiées puis leurs effets sur la dégradation des LIMKs *in cellulo* ont été étudiés par la suite.

3. Évaluations biologiques des PROTACs ciblant les LIMKs

Les affinités pour les LIMKs des PROTACs **295**, **296** et **301** ainsi que leur inhibition des activités des ROCKs à 1 µM ont été mesurées par la société Life Technologies (Figure 95), selon les mêmes protocoles décrits au chapitre 1. On remarque que le PROTAC **296** présente de bonnes affinités pour les LIMKs avec des constantes d'inhibition de 98 et 69 nM pour LIMK1 et LIMK2 respectivement. Lorsque la taille du linker augmente, les affinités diminuent comme on peut l'observer pour les PROTACs **295** et **301**. L'inhibition des ROCKs reste modérée pour ces 3 composés, mais on observe une plus grande sélectivité pour les LIMKs avec **295** qui inhibe ROCK1 et ROCK2 à 32 et 19 % respectivement, à une concentration de 1 µM.



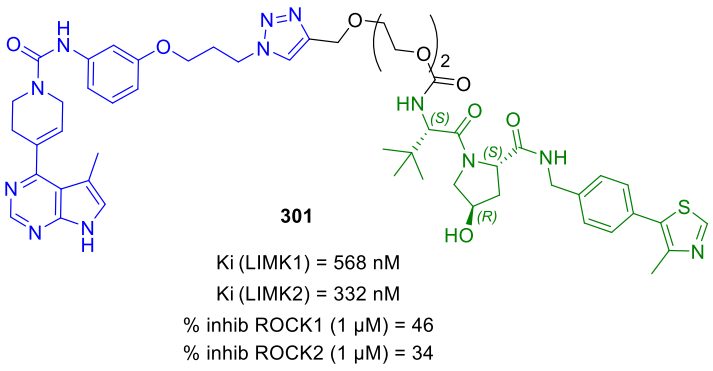


*Figure 95 : Évaluations biologiques des PROTACS **295**, **296** et **301**.*

a) Dégradations des LIMKs par les PROTACs

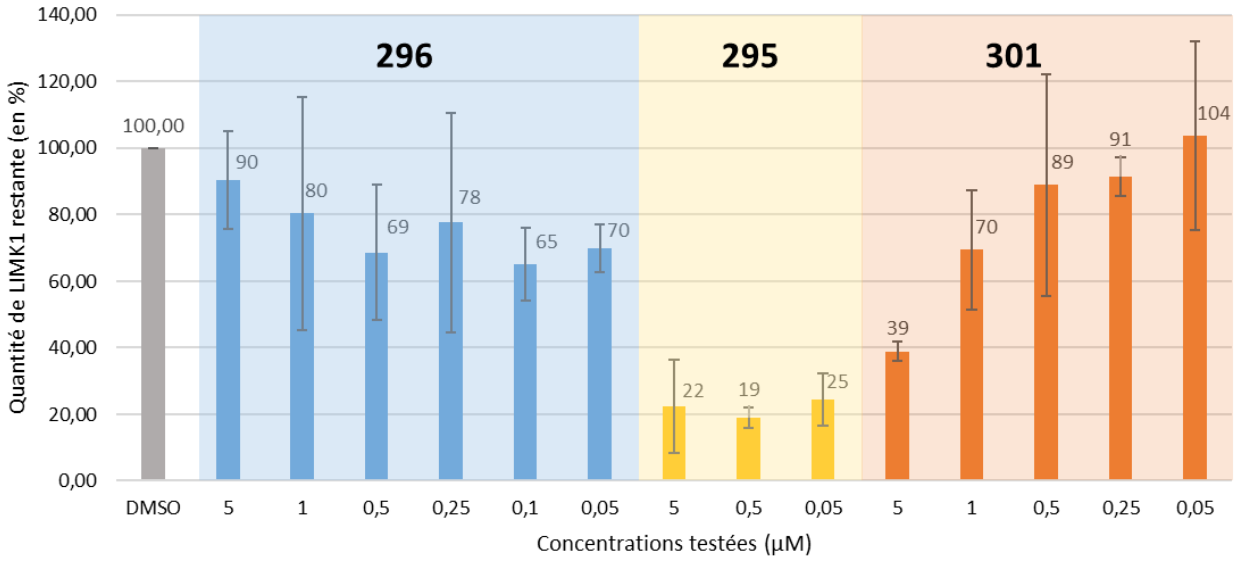
Contrairement aux inhibiteurs réversibles habituels, dont les constantes d'inhibition nous renseignent sur la puissance de ces derniers à inhiber l'activité catalytique de la kinase ciblée, ici elles nous informent uniquement sur la facilité des PROTACs à se lier aux LIMKs et donc à les recruter afin de former un complexe ternaire avec l'E3 ubiquitine ligase pour conduire à leur dégradation. Le taux de dégradation des LIMKs par ces PROTACs est donc une valeur plus probante pour évaluer l'activité de ces composés. Ainsi la dégradation des LIMKs induites par les PROTACs a été évaluée sur deux types de lignées cellulaires : HeLa et U2OS. Ces résultats ont été obtenus par l'équipe de biologistes du CBM et notamment par le Dr Serrano que je remercie.

Cellules HeLa

Pour évaluer la dégradation des LIMKs provoquée par nos PROTACs dans les cellules HeLa, ces dernières sont traitées pendant 4 h à des concentrations différentes en composés. Les cellules sont ensuite lysées puis les protéines sont séparées par électrophorèse sur gel d'acrylamide SDS-PAGE. Après western-

blot, des anticorps primaires spécifiques aux protéines d'intérêts telles que LIMK1 et LIMK2, puis des anticorps secondaires conjugués à un système de révélation et dirigés contre ces anticorps primaires, sont incubés avec la membrane et permettent la révélation de bandes correspondant aux LIMKs. Un étalon interne, la protéine glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) est utilisé et la dégradation des LIMKs est ensuite déterminée en comparant le rapport LIMKs/GAPDH, sur des cellules témoins non traitées par le PROTAC (DMSO) avec des cellules traitées par le PROTAC.

La dégradation de LIMK1 dans les cellules HeLa a été évaluée, à 6 concentrations différentes pour les molécules **296** et **301** comprises entre 5 et 0,05 µM, et aux concentrations de 5, 0,5 et 0,05 µM pour le PROTAC **295** (Graphe 9). Il peut être remarqué que le composé **295** provoque une très bonne dégradation de LIMK1 que ce soit à une concentration de 5 µM ou de 50 nM. Aux trois concentrations testées, **295** dégrade environ 75 % de LIMK1 au bout de 4 h de traitement. Par comparaison avec le PROTAC **301**, celui-ci démontre une dégradation de 60 % de LIMK1 au maximum, à la dose de 5 µM. Les résultats du composé **296** sont plus fluctuants, avec des barres d'erreurs conséquentes, mais il est tout de même possible d'observer une tendance de dégradation de LIMK1 autour de 20 à 30 %.



*Graphe 9 : Quantité de LIMK1 restante dans les cellules HeLa après leurs traitements à différentes concentrations de PROTACs (**296**, **295**, **301**) pendant 4 h.*

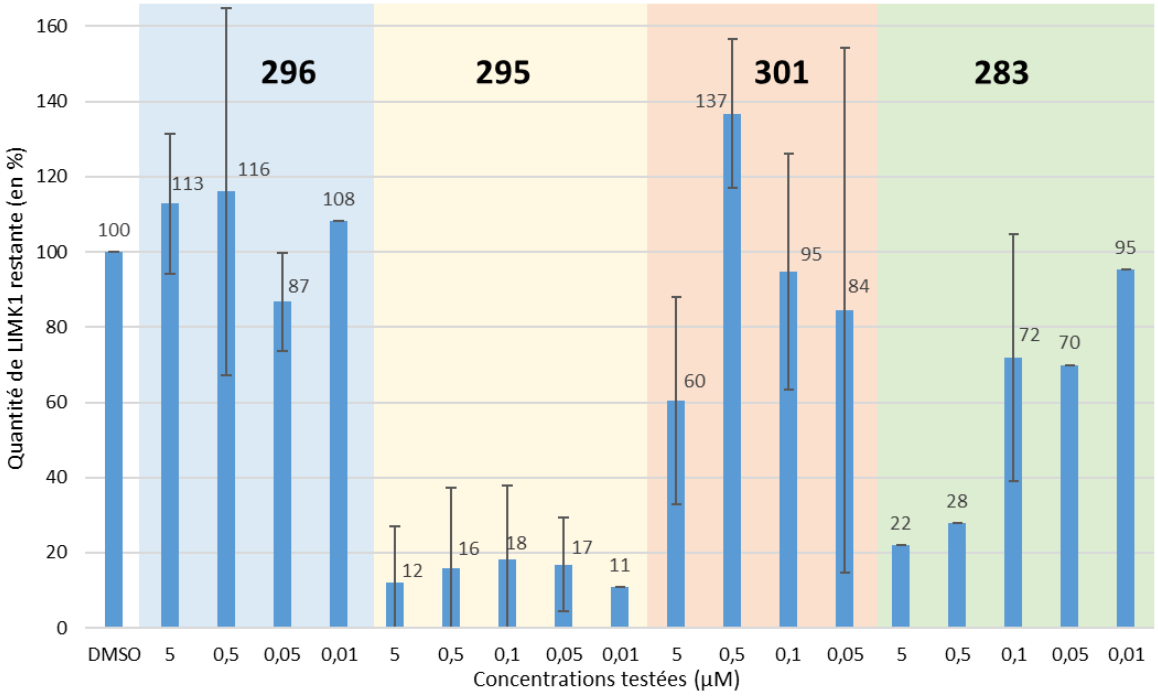
En raison de la faible sensibilité de l'anticorps primaire utilisé pour révéler LIMK2, les valeurs des rapports LIMK2/GAPH utilisés pour évaluer la dégradation de cette dernière ont présenté des barres d'erreurs trop importantes pour pouvoir être correctement exploitées.

Par conséquent, le PROTAC induisant la meilleure dégradation de LIMK1 dans les cellules HeLa est le composé avec un linker alkyle-triazole ayant la taille de linker la plus longue, **295** (Figure 96, page 169), avec une dégradation maximale de LIMK1 atteinte d'environ 75 % à une dose de seulement 50 nM.

Cellules U2OS

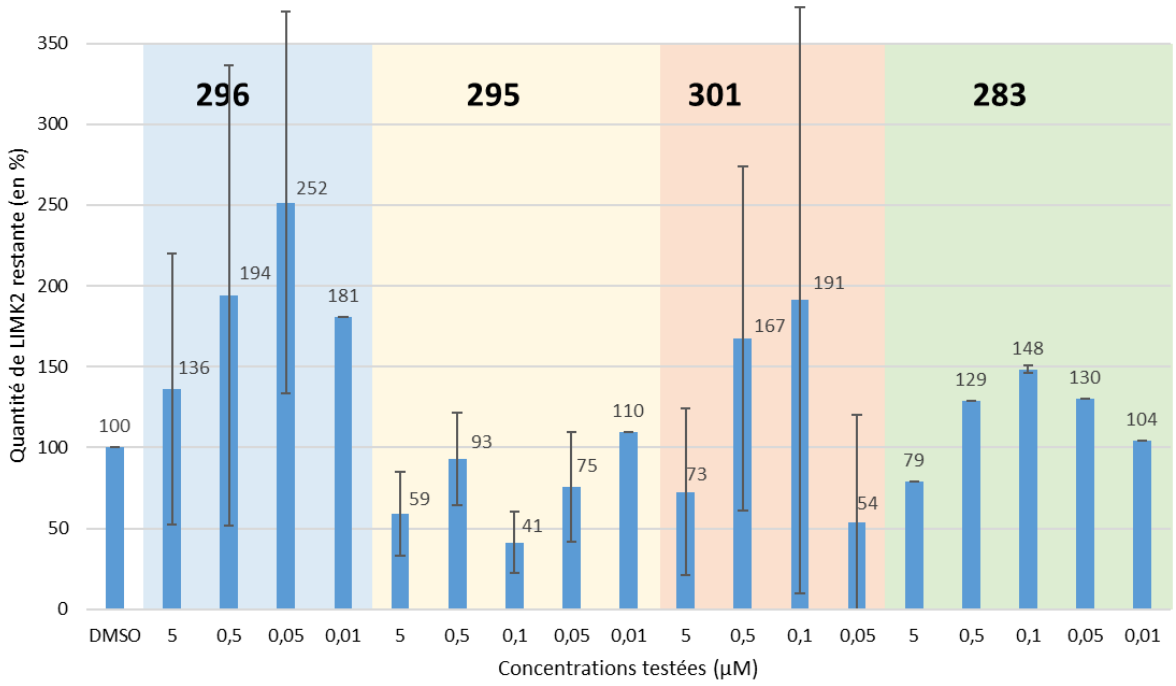
L'évaluation de la dégradation des LIMKs dans les cellules U2OS a ensuite été réalisée selon le même protocole que celui décrit plus haut avec les cellules HeLa. À nouveau, le PROTAC **295** se démarque des autres en induisant une excellente dégradation de 90 % de la quantité de LIMK1 dans les cellules U2OS à partir de

seulement 10 nM (Graphe 10). On note également une dégradation de 70 à 80 % de cette kinase provoquée par le composé **283** à 0,5 et 5 µM.



Graphe 10 : Quantité de LIMK1 restante dans les cellules U2OS après leurs traitements à différentes concentrations de PROTACs pendant 4 h.

L'exploitation des résultats de la dégradation de LIMK2 est une nouvelle fois rendue complexe par d'importantes barres d'erreurs sur les mesures à cause de la faible affinité de l'anticorps primaire pour LIMK2 (Graphe 11). Cependant, lorsque les tendances de dégradation de LIMK2 dans les cellules U2OS par les PROTACs sont observées, le produit **295** est à nouveau le plus efficace des quatre composés.



Graphe 11 : Quantité de LIMK2 restante dans les cellules U2OS après leurs traitements à différentes concentrations de PROTACs pendant 4 h.

b) Inhibition de la phosphorylation de la cofiline par les PROTACs

Cellules HeLa

L'inhibition de la phosphorylation de la cofiline dans les cellules HeLa a également été mesurée dans une première approche par l'équipe de biologistes du CBM à une concentration de 25 µM pendant 2 h comme cela est habituellement le cas (Figure 96). On remarque que pour cette dose et cette durée, les quatre PROTACs (**295**, **296**, **301**, **283**) présentent des inhibitions modérées allant de 30 à 52 % d'inhibition. En raison du mode d'action des PROTACs, la durée des expériences devra être rallongée pour pouvoir évaluer l'impact de la dégradation des LIMKs induite sur un temps plus long. De même, l'inhibition de la phosphorylation de la cofiline devra être testée à une concentration de PROTAC induisant de façon effective la dégradation des LIMKs, entre 10 nM et 5 µM pour le composé **295** par exemple.

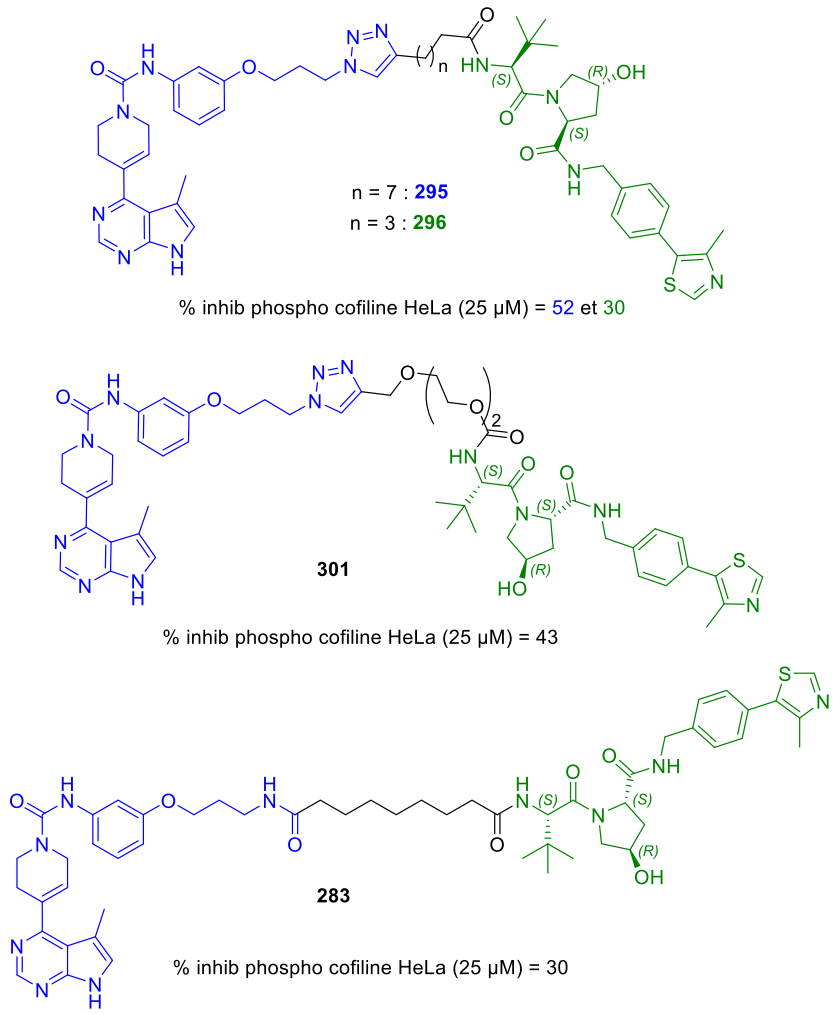
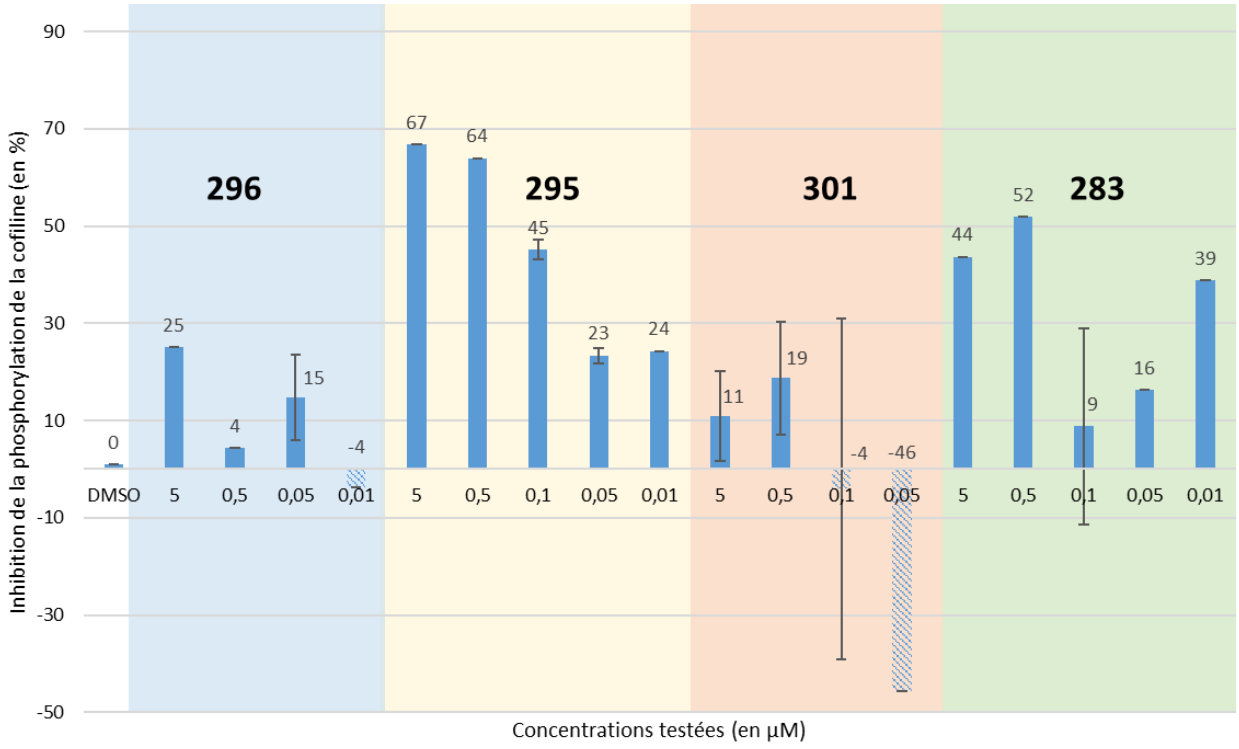


*Figure 96 : Pourcentages d'inhibition de la phosphorylation de la cofiline dans les cellules HeLa traitées pendant 2 h à une concentration de 25 µM en PROTACs **295**, **296**, **301** et **283**.*

Cellules U2OS

Les mesures d'inhibition de la phosphorylation de la cofiline provoquée par les PROTACs dans les cellules U2OS ont été réalisées dans les mêmes conditions que l'évaluation de la dégradation des LIMKs en traitant les cellules pendant 4 h avec les composés **296**, **295**, **301**, **283** à des concentrations allant de 5 à 0,01 ou 0,05 µM (Graphe 12).

Les PROTACs **296** et **301** provoquent une inhibition de la phosphorylation de la cofiline proche de 15-20 %, sans montrer de réelle corrélation avec la concentration. Au contraire, la présence de cofiline phosphorylée décroit en fonction de la concentration dans le cas de la molécule **295**, passant de 23-24 % d'inhibition obtenue à 0,01 et 0,05 µM, à 64-67 % lorsque l'on dépasse les 0,5 µM. Si le PROTAC **283** avec un linker amide-alkyle, provoque une inhibition de 39 % de la phosphorylation de la cofiline à 0,01 µM, celle-ci diminue aux concentrations de 0,05 et 0,1 µM pour atteindre 9 % d'inhibition, avant de remonter aux alentours de 50 % à partir de 0,5 µM.



Graphe 12 : Pourcentages d'inhibition de la phosphorylation de la cofiline dans les cellules U2OS traitées pendant 4 h avec les 4 PROTACs à des concentrations différentes.

Ainsi, l'inhibition de la phosphorylation de la cofiline mesurée à différentes concentrations en PROTACs s'est avérée être dépendante de la concentration pour le PROTAC **295**, avec une inhibition de 64 % de l'activité des LIMKs à une concentration de 500 nM pendant 4 h.

Pour conclure sur cette partie dédiée aux PROTACs, 4 composés ont été synthétisés : 3 avec un linker amide-triazole (**296**, **295**, **301**) et un avec un linker amide-amide (**283**). Les premiers résultats biologiques ont montré que le PROTAC **295** (Figure 97) est le plus prometteur des quatre, induisant une très bonne dégradation de LIMK1 aussi bien dans les cellules HeLa que les cellules U2OS. Davantage de tests seront réalisés afin de caractériser la dégradation de LIMK2 par nos PROTACs ainsi que l'impact de ces derniers sur la phosphorylation de la cofiline sur une durée supérieure à 4 h.

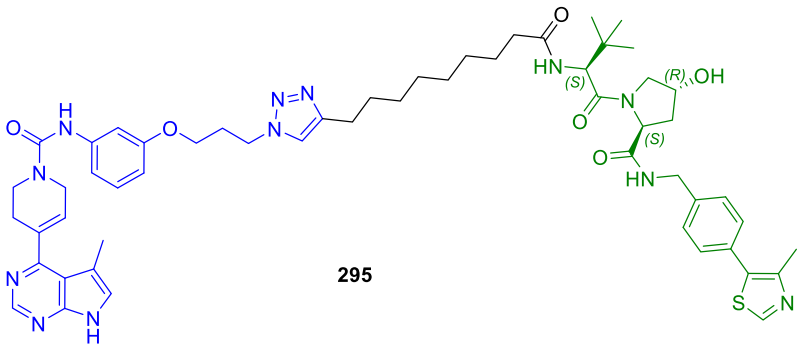


*Figure 97 : Structure de notre meilleur PROTAC **295**.*

En conclusion de ce chapitre dédié aux nouveaux modes d'inhibition des LIMKs, nos efforts de synthèse, appuyés par les données cristallographiques, nous ont permis d'obtenir le premier inhibiteur covalent irréversible de type pyrrolopyrimidine **246(OM145)** ciblant LIMK1. De plus amples caractérisations de l'inhibition de l'activité catalytique de cette kinase en présence du composé **246(OM145)** par rapport aux inhibiteurs réversibles sont programmées.

En ce qui concerne l'inhibition des LIMKs par leur dégradation engendrée par le système ubiquitine-protéasome, quatre PROTACs recrutant l'E3 ubiquitine ligase VHL ont été synthétisés. Parmi eux, le composé **295** a montré de très bons résultats sur la dégradation de LIMK1 pour deux lignées cellulaires (HeLa et U2OS) ainsi qu'une tendance encourageante pour la dégradation LIMK2 dans la lignée U2OS. Les tests biologiques sur les PROTACs sont en cours de réalisation, mais ces premiers résultats ouvrent la voie à l'exploration de nouveaux PROTACs basés sur le squelette du composé **295**.

Conclusion et Perspectives

Conclusion et perspectives

L'objectif de cette thèse a été de trouver plusieurs candidats précliniques pour lutter contre les manifestations de la Neurofibromatose de type 1 et plus particulièrement contre les neurofibromes cutanés, par la synthèse de nouveaux inhibiteurs sélectifs des LIMKs. Ces kinases, impliquées dans la dynamique du cytosquelette, sont responsables de la phosphorylation de la cofiline et permettent ainsi son inactivation, ce qui se traduit par une diminution de la dépolymérisation des filaments d'actine. Au vu du rôle des LIMKs suractivées dans différentes pathologies comme la NF1, le glioblastome, ou l'ostéosarcome, ces kinases représentent des cibles de choix pour la recherche de traitement contre ces maladies.

Au cours de ma thèse, j'ai également travaillé, au regard du rôle des LIMKs dans d'autres pathologies que la NF1, sur un projet annexe qui a eu pour but de trouver et développer des inhibiteurs des LIMKs pour lutter contre le glioblastome, principal cancer du cerveau.

Dans le premier chapitre, un important travail de chimie médicinale a été réalisé à partir de l'inhibiteur de type pyrrolopyrimidine **AC429**, synthétisé auparavant lors de la thèse du Dr Champiré. Pour cela des études de relations structure-activité ont été menées sur 3 régions de la molécule : la partie aniline de l'urée, le cycle central et la base hétérocyclique (Figure 98).

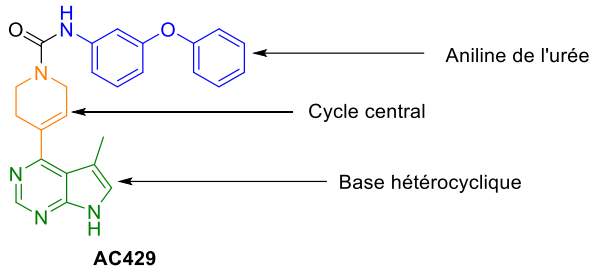


*Figure 98 : Sites de pharmacomodulations du composé **AC429**.*

- **Aniline de l'urée**

Les RSA réalisées sur la partie aniline ont permis la synthèse de 28 produits répartis en 4 séries de molécules avec une base 5-méthyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidine : Ph-O-Ph, Alk-O-Ph, Ph-O-Alk et Ph-*N*-Ph (Figure 99). Plusieurs types de substituants ont été insérés en position méta de l'aniline afin d'améliorer les affinités des produits finaux pour les LIMKs. Ainsi, 13 composés parmi les 28 synthétisés ont présenté de très bonnes constantes d'inhibitions pour les LIMKs inférieures à 50 nM.

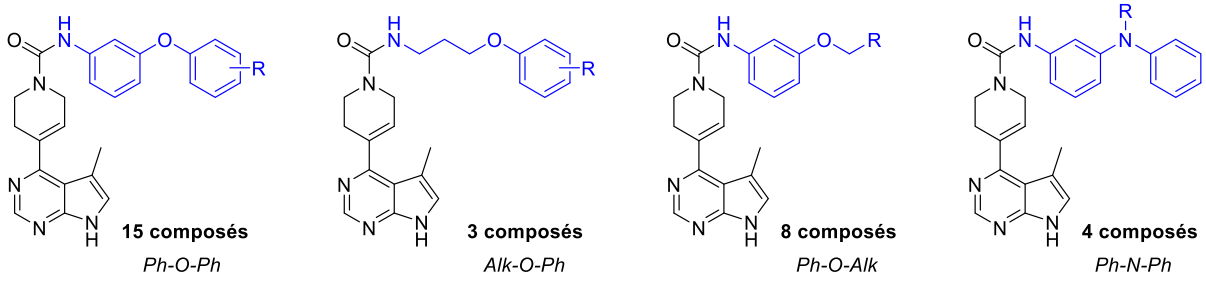


Figure 99 : Séries de composés issues des RSA réalisées sur l'aniline de l'urée avec une base pyrrolopyrimidine méthylée.

La base hétérocyclique de ces meilleurs composés a été modifiée au profit de la 5,6,7,8-tétrahydrocyclopenta[4,5]pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidine (Figure 100) qui a permis d'améliorer les affinités pour les LIMKs, et surtout de gagner en sélectivité pour les LIMKs vis-à-vis des ROCKs (kinases activatrices des LIMKs et impliquées dans de nombreuses voies de signalisation). Ce sont ainsi 13 molécules qui ont été

synthétisées, dont 5 composés présentant d'excellentes affinités pour les LIMKs, avec des Ki sous la barre des 5 nM.

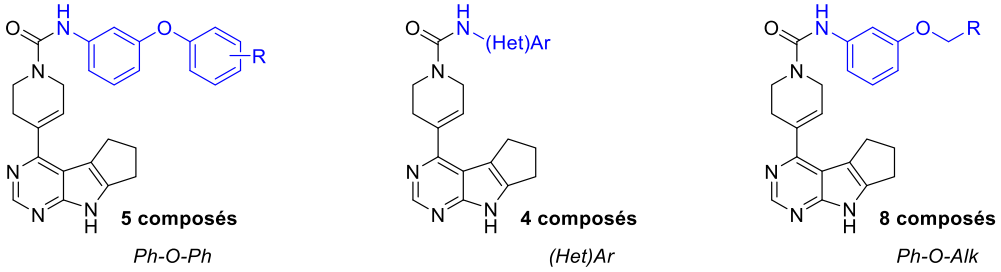


Figure 100 : Séries d'inhibiteurs développées avec une base pyrrolopyrimidine tricyclique.

- **Cycle central**

Après avoir optimisé la partie aniline de l'urée, nous avons décidé de remplacer le cycle central de type 3,6-dihydropyridine et la fonction urée par l'acide 1-aminocyclohex-3-ène-1-carboxylique relié à une aniline par une fonction amide, à l'image du composé de référence **LX7101**. La création de ces composés inédits dans la littérature a nécessité l'élaboration et l'optimisation d'une voie de synthèse en 15 étapes à partir du cyclohexane-1,4-dione monoéthylène acétal **168** commercial. Quatre composés ont ainsi été synthétisés en 15 étapes avec un bon rendement global de 3 à 7 % (Figure 101). Ces composés ont montré des affinités de l'ordre de 100-200 nM pour les LIMKs et des sélectivités faibles à modérées pour les LIMKs vis-à-vis des ROCKs avec une base pyrrolopyrimidine méthylée.

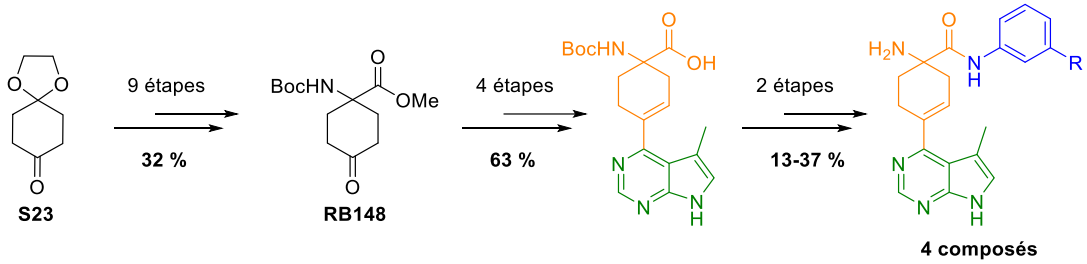


Figure 101 : Modification du cycle central des inhibiteurs des LIMKs.

- **Base hétérocyclique**

La base hétérocyclique pyrrolopyrimidine a été le dernier site de pharmacomodulation à avoir été modifié afin d'améliorer les paramètres enzymatiques de nos inhibiteurs. En poursuivant l'étude de la base 1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carbonitrile initiée durant la thèse du Dr Champiré, nous avons créé 6 séries d'inhibiteurs dérivés de cette structure, pour un total de 23 produits (Figure 102). L'évaluation des affinités pour les LIMKs de chaque série a montré que la présence combinée d'un nitrile en position *C*-5 de l'azaindole et d'un chlore en position *C*-3 permettait d'obtenir des composés sélectifs des LIMKs vis-à-vis des ROCKs. Ces derniers se sont également révélés être parmi les meilleurs inhibiteurs de la phosphorylation de la cofiline dans les cellules de glioblastome U251 et DBTRG.

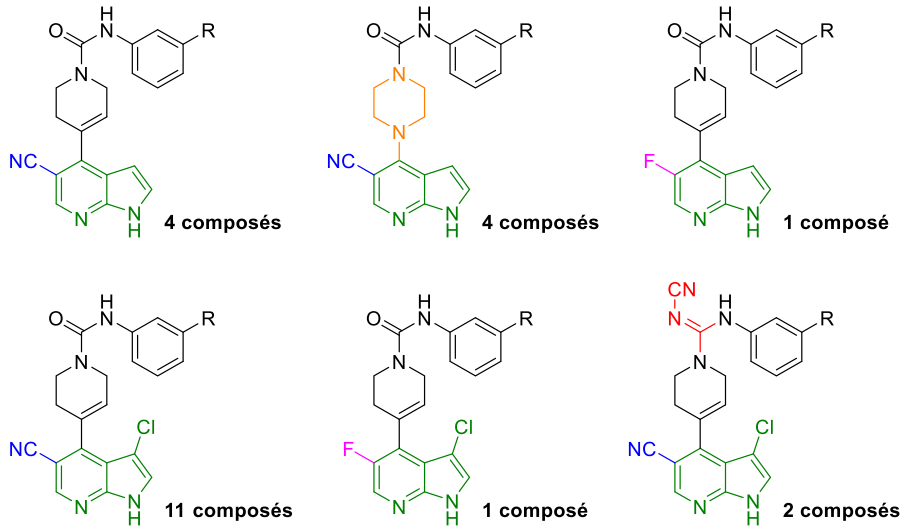
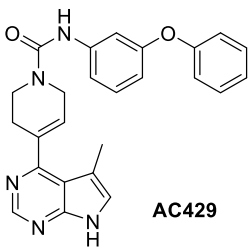


Figure 102 : Bilans des composés issus de la modification de la base hétérocyclique pyrrolopyrimidine.

Le remplacement de l'urée par une fonction cyanoguanidine (en rouge) a permis d'acidifier le proton porté par l'atome d'azote dans le but de renforcer la liaison hydrogène créée avec un résidu aspartate dans les sites actifs. En conséquence, les affinités pour les LIMKs des 2 composés avec une fonction cyanoguanidine ont été grandement améliorées comparées à leurs analogues urée. Ces résultats ouvrent ainsi la voie à de nouvelles familles de composés dont la fonction urée a été remplacée par une cyanoguanidine.

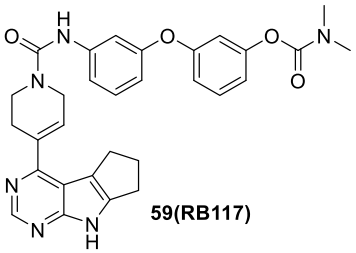
Dans le second chapitre de cette thèse consacré à la caractérisation biologique des inhibiteurs des LIMKs synthétisés, une sélection des composés les plus affins des LIMKs a été réalisée. L'inhibition de l'activité enzymatique des LIMKs a été évaluée par la mesure des taux de cofiline phosphorylée faite lors de tests *in vitro* sur 3 lignées cellulaires (HeLa, U251, DBTRG). En parallèle, la cytotoxicité de ces composés a également été évaluée. Enfin, l'impact des inhibiteurs des LIMKs sur la dynamique du cytosquelette d'actine a été mesuré lors de tests de migration cellulaire réalisés sur les cellules U2OS, U251 et DBTRG.

Ces différentes expériences nous ont permis de sélectionner 2 composés (**AC429** et **59**(**RB117**)) afin d'intégrer les essais *in vivo* sur un modèle de souris présentant toutes les manifestations de la NF1 et notamment les NFc (Figure 103). Des études ADME-tox ont permis de définir la dose et la fréquence d'injection. Ainsi, les souris traitées avec l'inhibiteur **AC429** ont reçu une dose quotidienne de 15 mg/kg tandis que celles traitées avec la molécule **59**(**RB117**) ont reçu deux doses journalières de 30 mg/kg.



AC429

Ki (LIMK1) = 19 nM
Ki (LIMK2) = 14 nM
% inhib ROCK1 (1 µM) = 44
% inhib ROCK2 (1 µM) = 24
IC_{50} (ROCK1) = 1,5 µM
IC_{50} (ROCK2) = 3,8 µM
% inhib phospho cofiline HeLa (25 µM) = 92



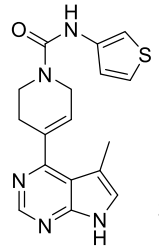
59(RB117)

Ki (LIMK1) = 5 nM
Ki (LIMK2) = 21 nM
% inhib ROCK1 (1 µM) = -1
% inhib ROCK2 (1 µM) = 1
% inhib phospho cofiline HeLa (25 µM) = 78

Figure 103 : Structures et données biologiques des composés testés in vivo sur un modèle de souris KO-NF1.

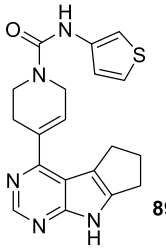
L'exploitation des premiers résultats de l'étude *in vivo* a montré une légère diminution du nombre de cellules de Schwann qui constituent principalement les NFc. Des analyses IHC et FACS réalisées sur des prélèvements de NFc situés sur le dos des souris traitées sont en cours d'exploitation. Elles ont pour but de mesurer les marqueurs des principaux constituants des NFc afin de mesurer l'impact des composés **AC429** et **59**(**RB117**) sur le microenvironnement de ces cellules tumorales.

Les toxicités aigües de 5 inhibiteurs candidats (Figure 104) sont en cours de mesure dans le but de sélectionner l'un d'entre eux pour être testé, avec la molécule **246(OM145)**, sur ce modèle de souris KO-*NF1*.



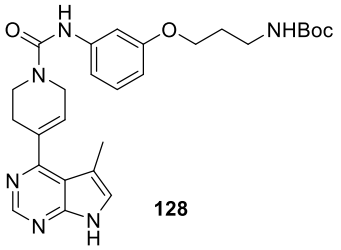
246

Ki (LIMK1) = 50 nM
Ki (LIMK2) = 186 nM
% inhib ROCK1 (1 µM) = 96
% inhib ROCK2 (1 µM) = 87
% inhib phospho cofiline HeLa (25 µM) = 84



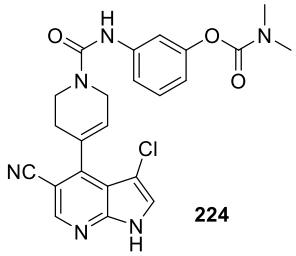
89

Ki (LIMK1) = 7 nM
Ki (LIMK2) = 47 nM
% inhib ROCK1 (1 µM) = 3
% inhib ROCK2 (1 µM) = -2
% inhib phospho cofiline HeLa (25 µM) = 75



128

Ki (LIMK1) = 65 nM
Ki (LIMK2) = 51 nM
% inhib ROCK1 (1 µM) = 48
% inhib ROCK2 (1 µM) = 33
% inhib phospho cofiline HeLa (25 µM) = 99

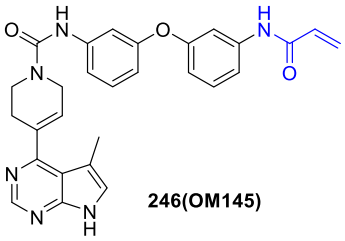


224

Ki (LIMK1) = 92 nM
Ki (LIMK2) = 11 nM
% inhib ROCK1 (1 µM) = 11
% inhib ROCK2 (1 µM) = 7
% inhib phospho cofiline HeLa (25 µM) = 87

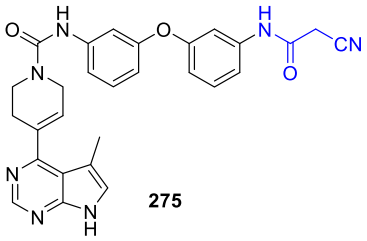
Figure 104 : Candidats en lice pour intégrer les essais in vivo sur un modèle de souris KO-NF1.

Dans le troisième et dernier chapitre dédié à l'utilisation de nouveaux modes d'inhibition des LIMKs, nous avons synthétisé le composé **246(OM145)** qui a été caractérisé par spectrométrie de masse et par cristallisation aux rayons X comme notre premier inhibiteur covalent irréversible de LIMK1 de type pyrrolopyrimidine. L'utilisation d'inhibiteurs irréversibles sélectifs des LIMKs permettrait une inhibition de ces kinases sur de plus longues durées, ce qui permettrait de diminuer la dose et d'induire des effets cellulaires plus marqués. À ce jour, si le composé **275** pourrait être un inhibiteur covalent réversible (Figure 105), seul le composé **246(OM145)** a pu être caractérisé aux rayons X, ce qui en fait un excellent candidat pour atteindre les phases de tests *in vivo*.



246(OM145)

Ki (LIMK1) = 3 nM
Ki (LIMK2) = 8 nM
% inhib ROCK1 (1 µM) = 47
% inhib ROCK2 (1 µM) = 28
% inhib phospho cofiline HeLa (25 µM) = 90

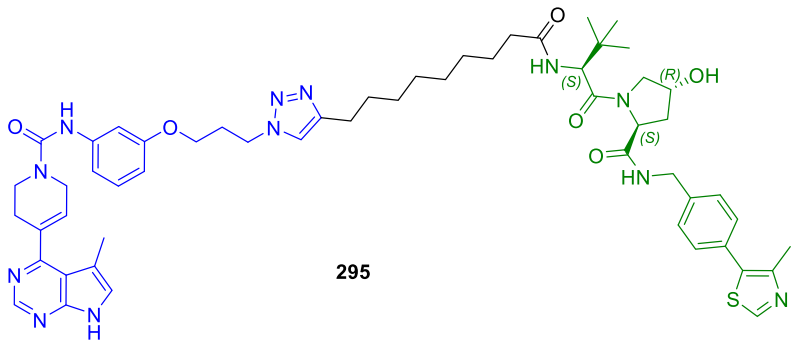


275

Ki (LIMK1) = 13 nM
Ki (LIMK2) = 20 nM
% inhib ROCK1 (1 µM) = 53
% inhib ROCK2 (1 µM) = 36
% inhib phospho cofiline HeLa (25 µM) = 99

*Figure 105 : Structure et données biologiques de l'inhibiteur covalent irréversible **246(OM145)** et du composé **275**.*

Dans la même idée, la synthèse de PROTACs visant à dégrader les LIMKs a été réalisée. Quatre PROTACs ciblant les LIMKs ont été synthétisés à partir de l'optimisation de nos inhibiteurs réversibles de type pyrrolopyrimidine méthylé. Parmi eux, le composé **295** (Figure 106) a induit une très bonne dégradation de LIMK1 à partir de 50 nM ainsi qu'une bonne tendance de dégradation pour LIMK2.



295

*Figure 106 : Structure du PROTAC **295**.*

Perspectives

De nombreuses perspectives s'offrent à nous pour continuer l'exploration de nouvelles séries d'inhibiteurs des LIMKs. Pour commencer, les anilines présentes sur les composés les plus affins des LIMKs pourraient être réutilisées avec une base hétérocyclique de type cyano afin de cibler les lignées cellulaires de glioblastome (Figure 107).

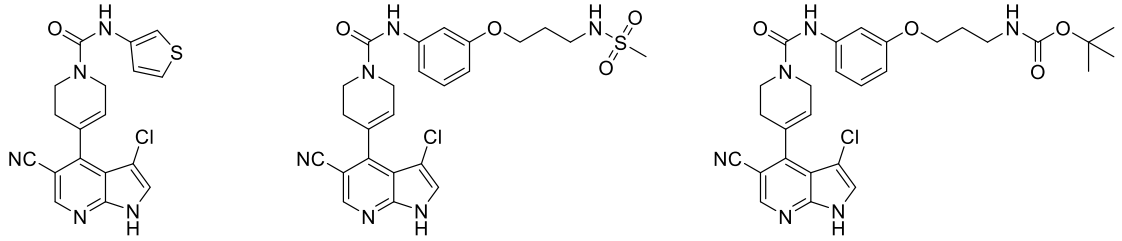


Figure 107 : Meilleures anilines assemblées avec la plateforme cyano pour cibler les lignées cellulaires de glioblastome.

Deux composés de cette série cyano (**228**, **229**; Figure 108) ont permis d'inhiber sélectivement LIMK2 vis-à-vis de LIMK1 contre toute attente. Il pourrait être intéressant de continuer l'exploration d'inhibiteurs sélectifs LIMK2/LIMK1 afin d'observer les effets cellulaires induits par cette sélectivité. La proportion de LIMK1 et LIMK2 n'étant pas la même selon les tissus, cette inhibition pourrait mener à des thérapies plus ciblées selon le type de pathologie. Des RSA pourront être réalisées sur les composés **228** et **229** pour confirmer l'importance de la substitution en position benzylique par les fonctions nitriles ou diméthylacétamide (Figure 108). Enfin, l'exploration de la poche dans laquelle se positionne le diméthylamide pourra être réalisée en changeant la nature de l'amine correspondante, au profit d'amines cycliques mono ou polyazotées de type pyrrolidine, pipéridine ou pipérazine. La fonction amide pourrait également être remplacée par un bioisostère sulfonamide.

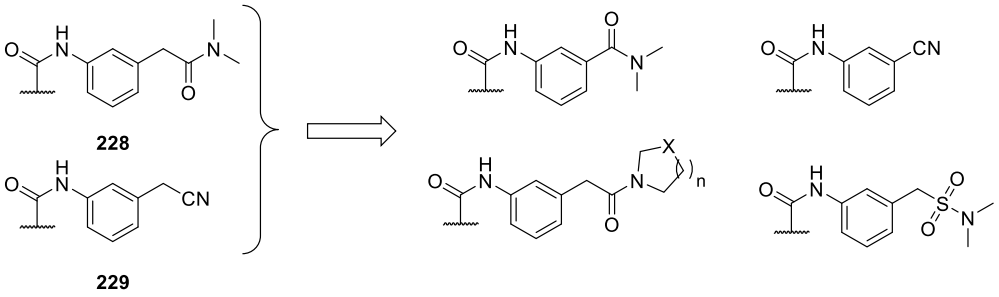


*Figure 108 : Proposition de structures pour débuter des RSA à partir des composés **228** et **229**.*

Hormis les composés cyano **228** et **229**, le seul inhibiteur ayant montré une sélectivité pour LIMK2 par rapport à LIMK1 est le composé **158**. Il serait donc intéressant d'assembler la dianiline, présente sur ce composé, avec la base hétérocyclique cyano afin d'améliorer cette sélectivité (Figure 109).

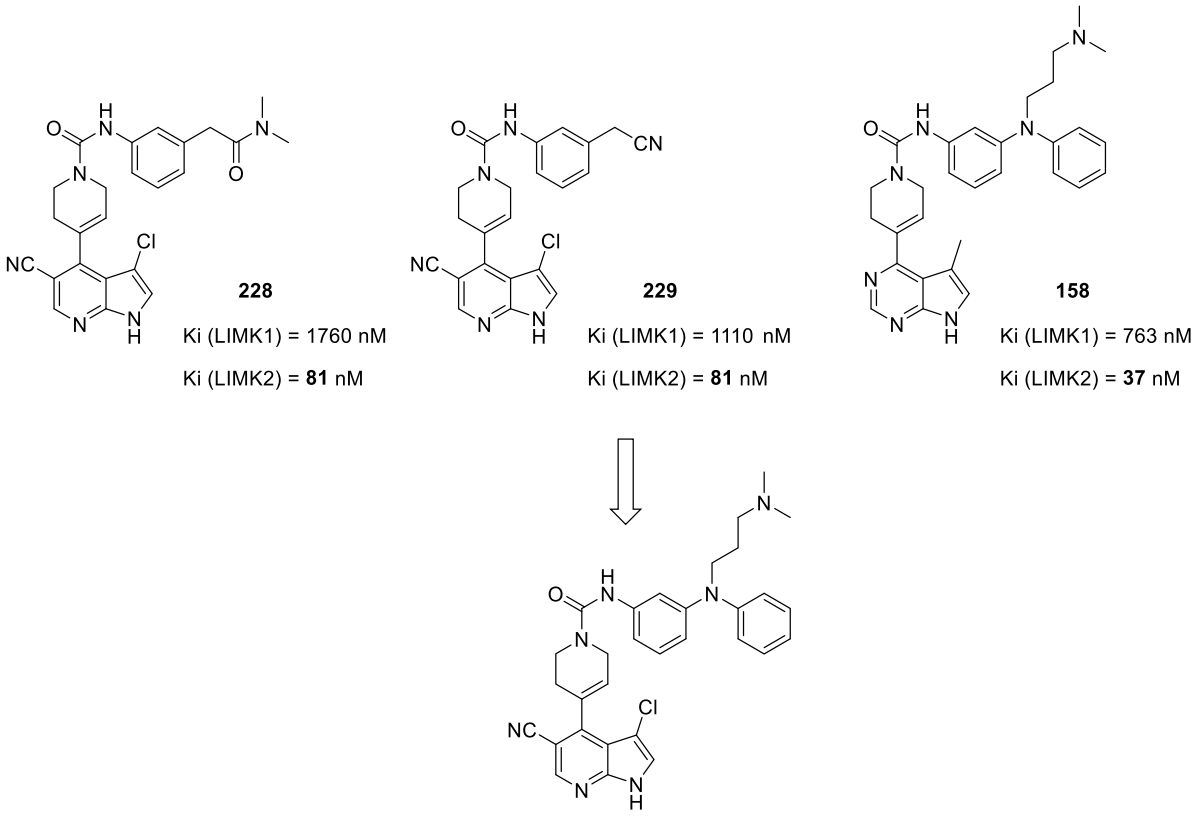


Figure 109 : Inhibiteurs sélectifs de LIMK2 vis-à-vis de LIMK1 et structure cible.

Les interactions entre nos inhibiteurs et la *hinge* des sites actifs des kinases s'établissant au niveau de la base hétérocyclique, il serait intéressant de poursuivre l'exploration de la série cyano avec des bioisostères du groupe nitrile comme un groupe amide ou difluorométhane (Figure 110). Une hydrolyse partielle du nitrile en milieu basique ou acide permettrait d'obtenir un amide primaire en position *C*-5 de l'azaindole. Une réduction partielle de ce nitrile avec de l'hydrure de diisobutylaluminium (DIBAL-H) pourrait permettre la formation d'un aldéhyde, qui serait difluoré en difluorométhane à l'aide d'un agent de fluoration comme le trifluorure de diéthylaminosoufre (DAST).

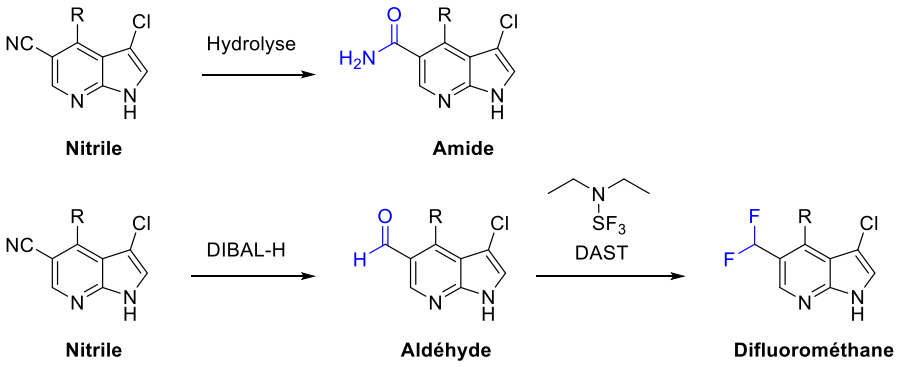


Figure 110 : Modification de la fonction nitrile en bioisostère amide ou difluorométhane.

Comme évoqué au chapitre 3, la recherche de nouveaux inhibiteurs covalents irréversibles se poursuit avec différentes fonctions en remplacement de l'acrylamide présente sur le composé **246(OM145)**. Afin de cibler la Cys365 de LIMK2, la synthèse d'un analogue Ph-Ph du composé **246(OM145)** est envisagée (Schéma 65). La rigidité de ce dernier pourrait profiter à la création d'une liaison covalente avec la cystéine ciblée du site actif de LIMK2.

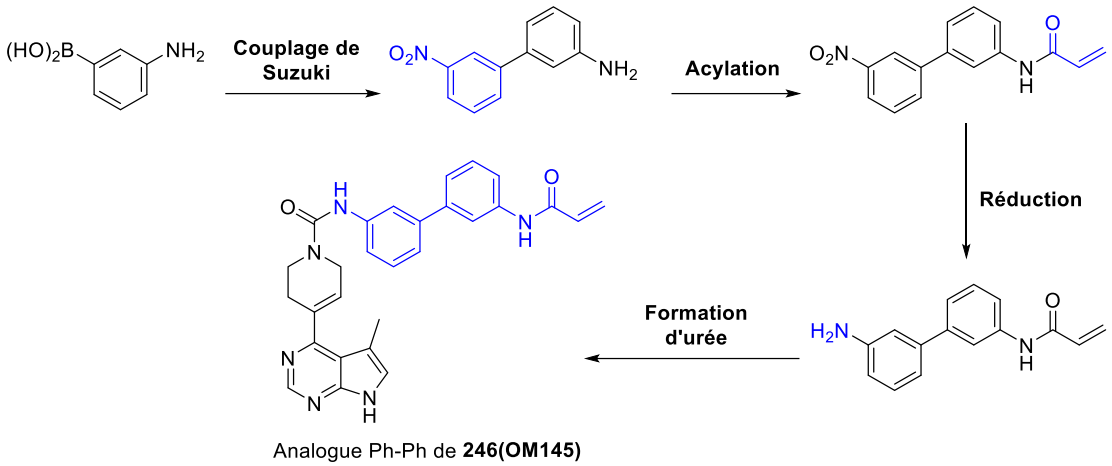


*Schéma 65 : Stratégie de synthèse de l'inhibiteur Ph-Ph analogue de **246(OM145)**.*

Les LIMKs pourraient également être pré-incubées sur différentes durées avec l'inhibiteur **275** (Figure 107, page 179)pour confirmer par spectrométrie de masse ou par rayon X une liaison covalente de cet éventuel inhibiteur covalent réversible. La base hétérocyclique méthylée des composés **246(OM145)** et **275** pourrait être changée pour une base tricyclique afin d'observer de possibles gains de sélectivité et d'affinité pour les LIMKs. En parallèle, les synthèses de potentiels inhibiteurs covalents irréversibles porteurs de fonctions électrophiles différentes de l'acrylamide **246(OM145)** seront poursuivies (Figure 111).

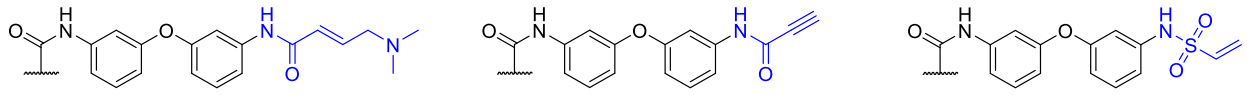


Figure 111 : Fonctions électrophiles des inhibiteurs irréversibles ciblés.

En dernier lieu, concernant les PROTACs, des modifications de la taille du linker présent sur la molécule **295** pourront être réalisés. On pourrait imaginer un linker d'une taille intermédiaire entre les PROTACs **295** et **296**, avec une longueur de 6 atomes de carbones (Figure 112).

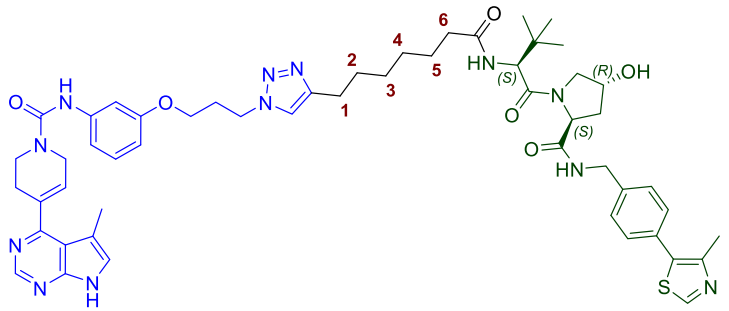


Figure 112 : PROTAC avec un linker à 6 carbones.

Un changement de l'E3 ubiquitine ligase pourrait également être intéressant à étudier en remplaçant le ligand VHL utilisé par le thalidomide. Il serait alors possible de comparer l'efficacité des PROTACs à dégrader les LIMKs en recrutant le VHL ou le CRBN dans différentes lignées cellulaires.

En ce qui concerne l'isomérisation de l'insaturation de la 3,6-dihydropyridine en énamide lors de la réaction click utilisée pour la formation des triazoles **288a** et **288b** (Schéma 61, page 162), un essai d'isomérisation a été réalisé à partir de l'intermédiaire **290**, en utilisant les mêmes conditions que celles-ci utilisées pour la formation du composé **288b**. Sans la présence d'une fonction azoture, nécessaire à une

réaction click, aucune migration de la double liaison du cycle central (**304**) n'a été observée. Un travail de méthodologie plus poussé pourrait alors être poursuivi.

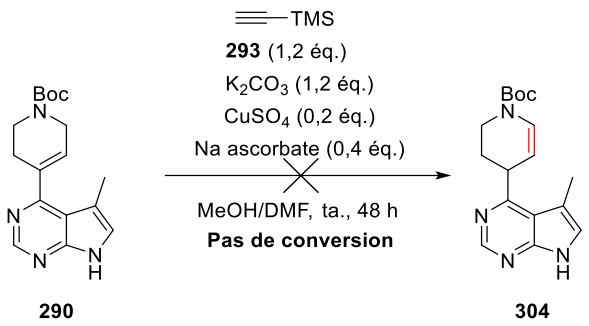


Schéma 66 : Test d'isomérisation de l'insaturation du cycle 3,6-dihydropyridine

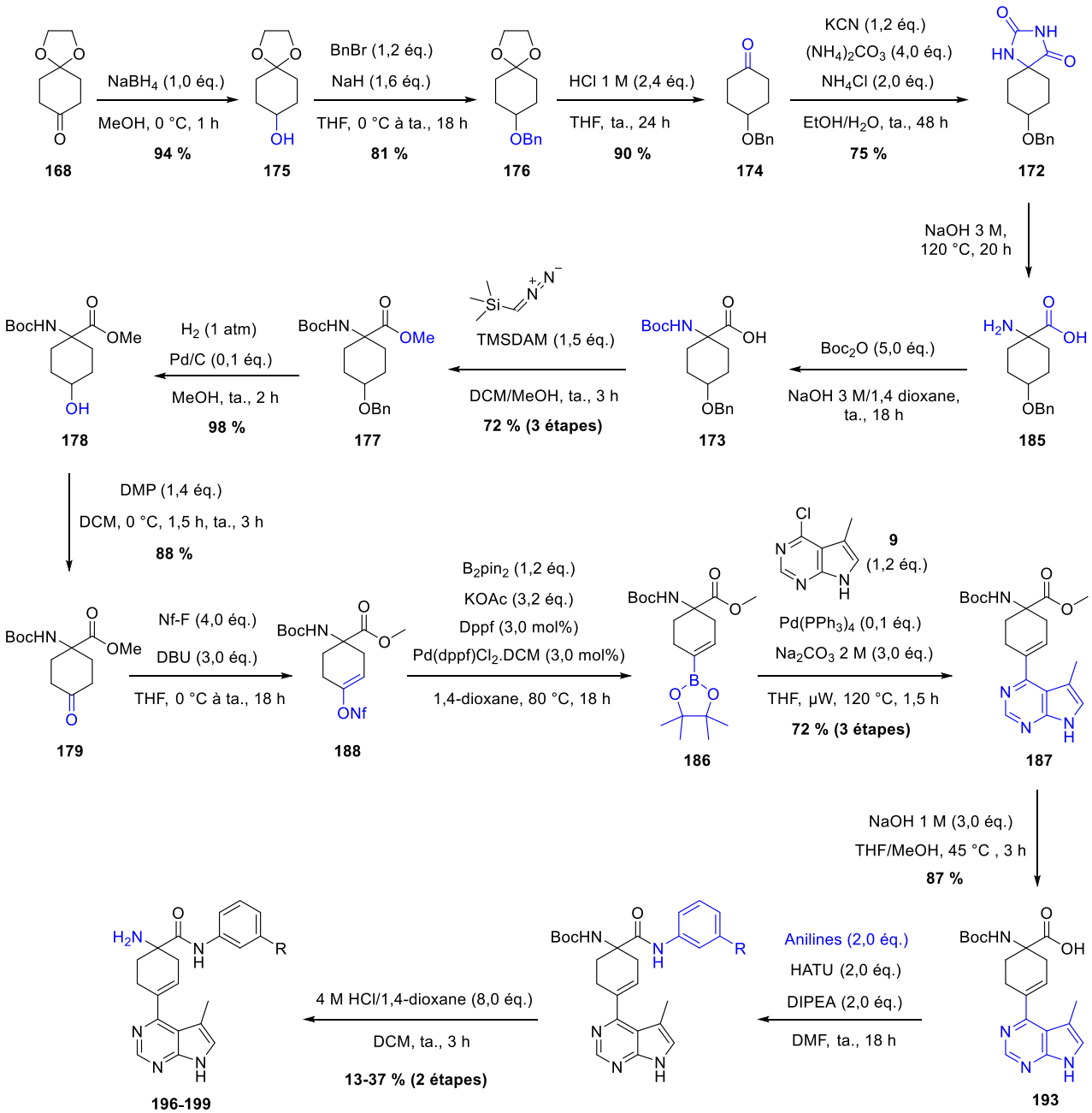
Au niveau des tests biologiques, une nouvelle lignée cellulaire immortalisée de cellules de Schwann issues de patients atteints de NF1 a été développée et rendue accessible pour la recherche durant ces trois dernières années. La mesure de l'inhibition de la phosphorylation de la cofiline, des inhibiteurs des LIMKs développés durant ma thèse, sur ce nouveau type de cellules proches de celles constituant les neurofibromes pourrait nous renseigner sur les inhibiteurs qui seraient potentiellement les plus efficaces *in vivo* sur le modèle de souris NF1.

Enfin, le traitement des souris NF1 pourrait être réalisé avant la phase de stabilisation du développement des NFc, durant la phase d'initiation caractérisée par une surexpression de la voie MAPK responsable de la prolifération cellulaire. Nos inhibiteurs des LIMKs pourraient être utilisés en synergie ou non avec des inhibiteurs des MEK afin de rechercher un effet préventif plutôt que curatif sur la maladie.

En conclusion, 84 nouvelles molécules inhibitrices des LIMKs ont été synthétisées ainsi que 4 PROTACs dans le but de limiter la suractivité de ces kinases, retrouvée dans de nombreuses maladies comme la NF1, le glioblastome ou l'ostéosarcome. Ce projet de chimie médicinale en collaboration avec des chimistes, biologistes et chémoinformaticiens a permis de proposer dans un premier temps deux candidats (**AC429** et **59**(**RB117**)) puis dans un second temps deux autres candidats (à définir), pour des études précliniques de NF1 pour laquelle très peu de solutions thérapeutiques restent proposées à l'heure actuelle. Les deux premiers candidats ont été testés *in vivo* et les analyses de leur effet sur le microenvironnement des neurofibromes sont en cours d'analyse.

Annexe

Annexe 1 : Voie de synthèse des inhibiteurs de type acide aminé.



Partie expérimentale

I – Indications générales

1. Réactifs et solvants

- Tous les réactifs et solvants ont été achetés auprès des fournisseurs suivants : Merck, Fluorochem, Ambeed, TCI, BLDpharm et Fisher Scientific.
- Le tétrakis(triphénylphosphine)palladium (0) a été préparé suivant la méthode décrite par D.R. Coulson.[313]
- Les composés 3-aminophényl *N*,*N*-diméthylcarbamate[154] et 3-(1*H*-pyrrol-1-yl)aniline[159] ont été synthétisés selon les protocole décrits dans la littérature.
- Les solvants utilisés sont de qualité HPLC p.a. sauf indication contraire. Les solvants anhydres nécessaires à certaines réactions ont été distillés ou séchés par les procédures suivantes :
    - Le tétrahydrofurane est séché sur cartouche par une station GT S100.
    - Le dichlorométhane est distillé sur P_2O_5.
    - L'acéronitrile est séché sur cartouche par une station GT S100.
    - Le *N,N*-diméthylformamide (Acros, ExtraDry over molecular sieve, AcroSeal®, H_2O < 50 ppm) est utilisé comme tel.
    - Le 1,4-dioxane (Acros, ExtraDry over molecular sieve, stabilized, AcroSeal®, H_2O < 50 ppm) est utilisé comme tel.

2. Appareillage et outils d'analyse

- Les réactions sous micro-ondes sont effectuées grâce à un appareil Biotage Initiator ou Initiator + sous contrôle de température à l'aide d'un capteur IR (puissance maximum : 400 W, pression maximum : 20 ou 30 bar).

- Le suivi des réactions a été réalisé par chromatographie sur couche mince (CCM) sur des feuilles d'aluminium couverte de gel de silice Merck 60 F_{254} (épaisseur 0,2 mm). La révélation a été réalisée sous lampe ultra-violet à 254 nm ou à l'aide d'une solution de permanganate de potassium (KMnO4).

- Les purifications par chromatographie sur colonne sont effectuées sur gel de silice Merck 40-70 µm ou 15-40 µm.

- Les spectres de résonance magnétique nucléaire du proton (**RMN ^{1}H**, **250 MHz**, **400 MHz** ou **700 MHz**), du carbone (**RMN ^{13}C**, **63 MHz**, **101 MHz** ou **176 MHz**), du fluor (**RMN ^{19}F**, **376 MHz)** sont réalisés en solution sur un appareil Bruker Avance DPX250 (250,131 MHz), sur un appareil Bruker Avance II (400 MHz) ou sur un appareil Bruker Avance III HD (700 MHz).
    - Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en partie par millions (ppm) par rapport au tétraméthylsilane pris comme référence interne pour les spectres effectués dans le chloroforme deutéré ($CDCl_3$) et au signal résiduel du diméthylsulfoxyde deutéré (DMSO-d_6).
    - La multiplicité des signaux est représentée de la manière suivante : singlet (s), broad singlet (brs), doublet (d), doublet of doublets (dd), doublet of doublets of doublets (ddd), triplet (t), doublet of triplets (dt), triplet of doublets (td), quartet (q), pentuplet (p), multiplet (m). Les constantes de couplages (*J*) sont exprimées en Hertz (Hz).

[313] Coulson, D. R; Satek, L. C.; Grim, S. O. *Inorg. Synth.* **1972**, *13*, 121-124.

- Les spectres infra-rouge (**IR**) ont été enregistrés sur un spectromètre Thermo-Nicolet AVATAR 320 AEK0200713. Il s'agit d'un appareil à ATR (Attenuated Total Reflexion) doté d'un cristal en Germanium. L'échantillon est directement déposé sur le Germanium avant l'enregistrement du spectre (pur).

- Les points de fusion (**Mp**) sont mesurés sur un banc Kofler Wagner & Munz, Heizbank et ne sont pas corrigés.

- Les spectres de masse basse résolution (**MS**) sont réalisés sur un appareil Perkin Elmer Sciex de type API 300. Les échantillons sont préalablement solubilisés dans une solution de chloroforme ou méthanol, puis sont ionisés par la technique du spray ionique.

- Les analyses de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (**LC-MS**) sont réalisées avec une colonne Acquity BEH C18 (1,7µm; 2,1*50 mm) en utilisant un gradient H_2O/CH_3CN et par détection UV à 254 nm.

- Les spectres de masse haute résolution (**HRMS**) sont réalisés sur un spectromètre de masse de type Bruker maXis au sein de la plateforme « Fédération de Recherche » entre l'ICOA et le CBM (FR2708).

II – Modes opératoires généraux et caractérisations structurales

General Procedure A: Urea synthesis using 4-nitrophenyl chloroformate

Under argon, to a solution of the desired aniline (1.0 equiv.) in dry THF (0.07 M) at 0 °C were added DIPEA (1.2 equiv.) and 4-nitrophenyl chloroformate (1.2 equiv.). The mixture was stirred at 0 °C for 30 min until total consumption of the starting material (TLC monitoring). Then, amine (1.2 equiv.) and DIPEA (1.2 or 2.4 equiv.) were added and the reaction mixture was stirred at 50 °C for 2 h until full completion (TLC monitoring). The solvent was removed under reduced pressure and the residue was partitioned between DCM and H_2O. The organic layer was separated and washed twice with H_2O then dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography to afford the desired product.

General Procedure B: Mitsunobu reaction

To a solution of 3-nitrophenol (1.0 equiv.) in dry THF (0.28 M) under argon were added the primary alcohol (2.0 equiv.) and triphenylphosphine (1.7 equiv.). The mixture was stirred at rt for 10 min until full dissolution of the triphenylphosphine. Diisopropyl azodicarboxylate (DIAD) (1.7 equiv.) was then added dropwise at rt over 5 to 10 min. The reaction mixture was stirred at rt for 24 h then diluted with H_2O and extracted twice with Et_2O. The combined organic layers were dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography to afford the desired product.

General Procedure C: Williamson reaction

To a solution of 3-nitrophenol (1.0 equiv.) in dry MeCN (0.80 M) under argon were added K_2CO_3 (1.6 equiv.) and the corresponding alkyl halide (8.0 equiv.). The resulting suspension was stirred under reflux until full conversion (TLC monitoring), then concentrated under reduced pressure. The residue was partitioned between DCM and H_2O. The aqueous layer was separated and extracted twice with DCM then the combined organic layers were dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography to afford the desired product.

General Procedure D: Nitro group reduction

A 50 mL round bottom flask was loaded with the aromatic nitro compound (1.0 equiv.) then a suspension of 10 wt.% Pd/C (0.1 equiv.) in MeOH (0.18 M) was added. The flask was flushed with hydrogen then stirred at rt under hydrogen gas atmosphere until full conversion of the starting material. The reaction mixture was filtered through Celite, washed with MeOH then concentrated under vacuum to afford the desired amine.

General Procedure E: Suzuki-Miyaura cross-coupling

To a solution of chlorinated heterocycle (1.0 equiv.) in THF (0.25 M) was added the boronate ester (1.1 equiv.). This suspension was degassed for 20 min then a 2 M aqueous solution of Na_2CO_3 (3.0 equiv.), previously degassed, was added following by $Pd(PPh_3)_4$ (0.10 to 0.15 equiv.). The mixture was then heated under microwave irradiation at 120 °C for 1.5 h and extracted with DCM. The combined organic layers were dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography to afford the desired product.

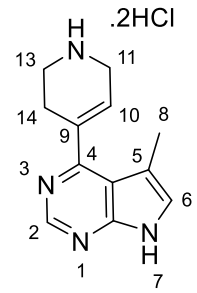
General Procedure F: *N*-alkylation

To a solution of alkyl halide (1.0 equiv.) in dry THF (0.18 M) under argon atmosphere was added the amine (3.1 equiv.). The reaction mixture was stirred under reflux until full conversion then cooled to rt and concentrated under reduced pressure. The residue was stirred in an aqueous solution of HCl 1 M for 15 min, washed twice with Et_2O and then treated with a 10 % aqueous solution of NaOH to pH ~ 10-13. The aqueous layer was extracted with Et_2O (three times) then the combined organic layers were dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure to afford the desired product.

General Procedure G: Ullmann coupling with Ar-I

An oven-dried microwave reaction vial was charged with a magnetic stirbar, 3-aminophenol (1.2 equiv.), copper(I) iodide (5 mol%), 2-picolinic acid (10 mol%), aryl iodide (if solid; 1.0 equiv.) and K_3PO_4 (2.0 equiv.). The tube was then evacuated and back-filled with argon. The evacuation/backfill sequence was repeated two additional times. Under argon, remaining liquid reagents were added, followed by dry DMSO (0.50 M). The vial was sealed then placed in a preheated hot plate at 80 °C and the reaction mixture was stirred vigorously for 18 h. The reaction mixture was cooled to room temperature. EtOAc and H_2O were added, the aqueous layer was separated and extracted twice with EtOAc. The combined organic layers were washed with brine, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by silica gel column chromatography to afford the desired aniline.

5-Methyl-4-(1,2,3,6-tetrahydropyridin-4-yl)-7H-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidine dihydrochloride (8)



Chemical Formula: $C_{12}H_{16}Cl_2N_4$
Molecular Weight: 287.19

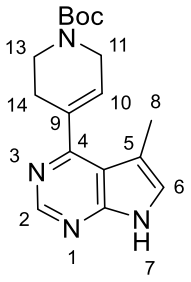
To a 4 M solution of HCl in 1,4-dioxane (8.0 equiv.) cooled at 0 °C was added **11** (0.60 g, 1.91 mmol). The reaction mixture was stirred at rt for 1 h. After completion, the precipitate was filtered then washed with Et_2O (3 x 20 mL) to afford compound **8** (550 mg, 1.91 mmol, quant.) as a yellow solid. The product was used without further purification in the next step.

MP: > 260 °C.

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 13.22 (s, 1H, **NH**), 9.93 (s, 2H, **NH** + **H+**), 8.98 (s, 1H, **H$_2$**), 7.73 (s, 1H, **H$_6$**), 6.34 (s, 1H, **H$_{10}$**), 4.88 (brs, 1H, **H+**), 3.87 (s, 2H, **H$_{11}$**), 3.35 (s, 2H, **H$_{13}$**), 2.94 (s, 2H, **H$_{14}$**), 2.39 – 2.27 (m, 3H, **H$_8$**).

All spectra data correspond to the values found in the thesis of Champiré A. defended in Orléans on November 30th 2018.

tert-Butyl 4-(5-methyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxylate (11)



Chemical Formula: $C_{17}H_{22}N_4O_2$
Molecular Weight: 314.39

The reaction was carried out as described in general procedure **E** using 4-chloro-5-methyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidine (0.61 g, 3.61 mmol), *N*-Boc,1,2,3,6-tetrahydropyridine-4-boronic acid pinacol ester (1.23 g, 3.97 mmol, 1.1 equiv.), $Pd(PPh_3)_4$ (0.63 g, 0.54 mmol, 15 mol%.) in THF (11 mL) and a 2 M aqueous solution of Na_2CO_3 (5.4 mL, 10.80 mmol, 3.0 equiv.). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using DCM/acetone 70/30 to afford compound **1** (0.63 g, 2.00 mmol, 56 %) as a yellow solid.

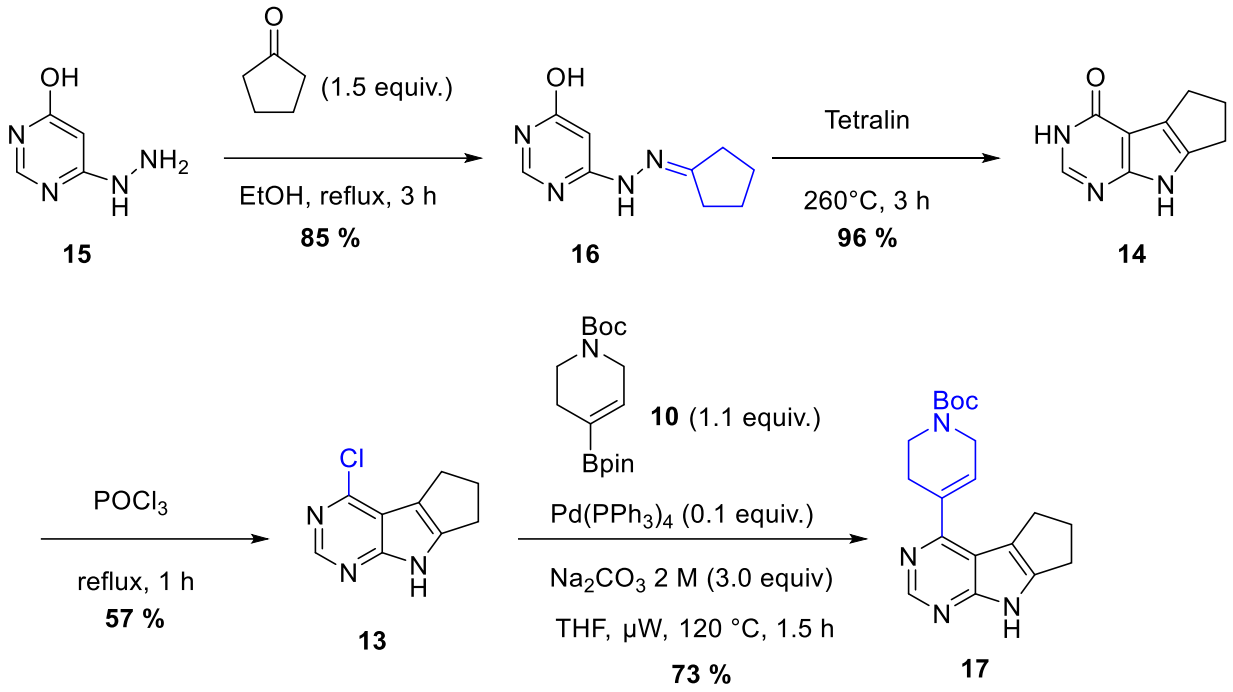
R_f (DCM/acetone 70/30) 0.19.

Mp: 190-192 °C.

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-d_6) δ 11.81 (s, 1H, **NH**), 8.63 (s, 1H, **H_2**), 7.30 (dd, *J* = 2.3, 1.2 Hz, 1H, **H_6**), 6.03 – 5.92 (m, 1H, **H_{10}**), 4.06 (d, *J* = 3.1 Hz, 2H, **H_{11}**), 3.59 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H, **H_{13}**), 2.59 (s, 2H, **H_{14}**), 2.21 (d, *J* = 1.1 Hz, 3H, **H_8**), 1.44 (s, 9H, ***t*-Bu**).

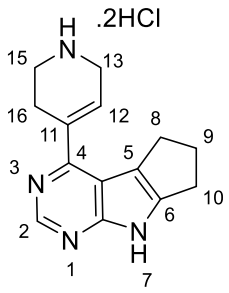
All spectra data correspond to the values found in the thesis of Champiré A. defended in Orléans on November 30th 2018.

Synthesis of the building block 17



The compound **17** was prepared according to known procedures described in Klar, U.; Kettschau G.; Sülzle D.; Pühler F.; Kosemund D.; Lienau P.; Bömer U. WO2013174743, **2013** and Routier, S.; Bénédetti, H.; Vallée-Meheust, B.; Bonnet, P.; Plé, K.; Aci-Sèche, S.; Ruchaud, S.; Braka, A.; Champiré, A.; Andrès, C.; Vourc'h, P. WO2021239727, **2021**.

4-(1,2,3,6-Tetrahydropyridin-4-yl)-5,6,7,8-tetrahydrocyclopenta[4,5]pyrrolo[2,3-d]pyrimidine dihydrochloride (12)



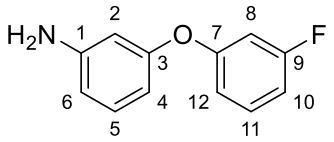
Chemical Formula: $C_{14}H_{18}Cl_2N_4$
Molecular Weight: 313.23

To a 4 M solution of HCl in 1,4-dioxane (8.0 equiv.) cooled to 0 °C was added **17** (1.56 g, 4.58 mmol). The reaction mixture was stirred at rt for 2.5 h. After completion, the precipitate was filtered then washed with Et_2O (3 x 20 mL) and dried to afford compound **12** (1.44 g, 4.58 mmol, quant.) as a yellow powder. The product was used without further purification in the next step.

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-d_6) δ 13.17 (s, 1H, **NH**), 9.72 (s, 2H, **NH + H+**), 8.84 (s, 1H, **H_2**), 6.61 (brs, 1H, **H_{12}**), 3.89 (s, 2H, **H_{13}**), 3.05 – 2.81 (m, 6H, **H_8 + H_{10} + H_{15}**), 2.59 – 2.30 (m, 4H, **H_9** + **H_{16}**).

All spectral data corresponded to the values found in the thesis of Anthony Champiré (Orléans, November 30th 2018).

3-(3-Fluorophenoxy)aniline (22)



Chemical Formula: $C_{12}H_{10}FNO$
Molecular Weight: 203.22

The reaction was carried out as described in general procedure **G** using 3-fluoroiodobenzene (235 µL, 2.00 mmol), 3-aminophenol (262 mg, 2.40 mmol, 1.2 equiv.), copper(I) iodide (19 mg, 0.10 mmol, 5 mol%), 2-picolinic acid (25 mg, 0.20 mmol, 10 mol%), and K_3PO_4 (849 mg, 4.00 mmol, 2.0 equiv.) in dry DMSO (4 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of PE/EtOAc from 90/10 up to 80/20 to afford compound **22** (406 mg, 2.00 mmol, quant.) as an orange liquid.

R_f (PE/EtOAc 80/20) 0.35.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3381, 1584, 1481, 1262, 1172, 1147, 1117, 971, 846, 768, 679.

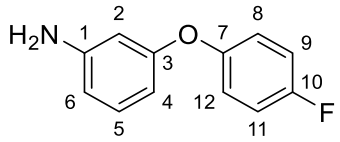
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.33 – 7.22 (m, 1H, **H_{11}**), 7.14 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, **H_5**), 6.85 – 6.70 (m, 3H, **H_8**, **H_{10}**, **H_{12}**), 6.46 (ddd, *J* = 8.0, 2.2, 0.9 Hz, 1H, **$H_{6/4}$**), 6.42 (ddd, *J* = 8.1, 2.3, 0.9 Hz, 1H, **$H_{4/6}$**), 6.38 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H, **H_2**), 3.74 (brs, 2H, **NH_2**).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 163.6 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 246.3 Hz, **C-C_9**), 159.0 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 10.6 Hz, **C-C_7**), 157.6 (**C-C_3**), 148.3 (**C-C_1**), 130.6 (**CH_{Ar}-C_5**), 130.5 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 9.8 Hz, **CH_{Ar}-C_{11}**), 114.3 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 3.1 Hz, **CH_{Ar}-C_{12}**), 110.9 (**CH_{Ar}-$C_{6/4}$**), 109.8 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 21.3 Hz, **CH_{Ar}-C_{10}**), 109.5 (**CH_{Ar}-$C_{4/6}$**), 106.3 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 24.4 Hz, **CH_{Ar}-C_8**), 106.2 (**CH_{Ar}-C_2**).

^{19}F NMR (376 MHz, $CDCl_3$) δ -111.18 – -111.29 (m, 1F).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{12}H_{11}FNO$ $[M+H]^+$: 204.0819, found: 204.0824.

3-(4-Fluorophenoxy)aniline (23)



Chemical Formula: $C_{12}H_{10}FNO$
Molecular Weight: 203.22

The reaction was carried out as described in general procedure **G** using 4-fluoroiodobenzene (231 μL, 2.00 mmol), 3-aminophenol (262 mg, 2.40 mmol, 1.2 equiv.), copper(I) iodide (19 mg, 0.10 mmol, 5 mol%), 2-picolinic acid (25 mg, 0.20 mmol, 10 mol%), and K_3PO_4 (849 mg, 4.00 mmol, 2.0 equiv.) and dry DMSO (4 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of PE/EtOAc from 100 up to 90/10 to afford compound **23** (332 mg, 1.63 mmol, 82 %) as an orange oil.

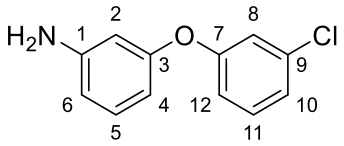
R_f (PE/EtOAc 90/10) 0.32.

^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 7.12 – 6.94 (m, 5H, **H_5**, **H_8**, **H_9**, **H_{11}**, **H_{12}**), 6.41 (ddd, *J* = 8.0, 2.2, 0.9 Hz, 1H, **H_6**), 6.34 (ddd, *J* = 8.1, 2.3, 0.9 Hz, 1H, **H_4**), 6.28 (td, *J* = 2.3, 0.4 Hz, 1H, **H_2**), 3.69 (brs, 2H, **NH_2**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{12}H_{11}FNO$ $[M+H]^+$: 204.0819, found: 204.0823.

All spectra data corresponded to the literature values as found in Maiti D., Buchwald S. L., *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 17423–17429.

3-(3-Chlorophenoxy)aniline (24)



Chemical Formula: $C_{12}H_{10}ClNO$
Molecular Weight: 219.67

The reaction was carried out as described in general procedure **G** using 3-chloroiodobenzene (248 μL, 2.00 mmol), 3-aminophenol (262 mg, 2.40 mmol, 1.2 equiv.), copper(I) iodide (19 mg, 0.10 mmol, 5 mol%), 2-picolinic acid (25 mg, 0.20 mmol, 10 mol%), and K_3PO_4 (849 mg, 4.00 mmol, 2.0 equiv.) in dry DMSO (4 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of PE/EtOAc from 95/5 up to 80/20 to afford compound **24** (427 mg, 1.94 mmol, 97 %) as an orange liquid.

R_f (PE/EtOAc 80/20) 0.39.

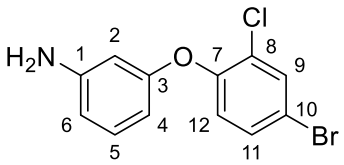
IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3379, 1579, 1488, 1470, 1283, 1219, 1144, 1067, 963, 848, 769, 678.

^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 7.23 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H, **H_{11}**), 7.12 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, **H_5**), 7.05 (ddd, *J* = 7.9, 2.0, 1.0 Hz, 1H, **H_{10}**), 6.99 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H, **H_8**), 6.90 (ddd, *J* = 8.2, 2.4, 1.0 Hz, 1H, **H_{12}**), 6.46 (ddd, *J* = 8.0, 2.2, 0.9 Hz, 1H, **H_6**), 6.40 (ddd, *J* = 8.0, 2.3, 0.9 Hz, 1H, **H_4**), 6.34 (t, *J* = 2.2 Hz, 1H, **H_2**), 3.72 (brs, 2H, **NH_2**).

^{13}C NMR (63 MHz, $CDCl_3$) δ 158.4 (**C**), 157.6 (**C**), 148.3 (**C**), 135.1 (**C**), 130.7 (**CH_{Ar}-C_5**), 130.5 (**CH_{Ar}-C_{11}**), 123.2 (**CH_{Ar}-C_{10}**), 119.1 (**CH_{Ar}-C_8**), 117.0 (**CH_{Ar}-C_{12}**), 110.9 (**CH_{Ar}-C_6**), 109.4 (**CH_{Ar}-C_4**), 106.1 (**CH_{Ar}-C_2**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{12}H_{11}ClNO$ $[M+H]^+$: 220.0524, found: 220.0525.

3-(4-Bromo-2-chlorophenoxy)aniline (25)



Chemical Formula: $C_{12}H_9BrClNO$
Molecular Weight: 298.56

To a solution of 3-aminophenol (274 mg, 2.51 mmol, 1.05 equiv.) in dry DMSO (2 mL) under argon was added *t*-BuOK (295 mg, 2.63 mmol, 1.1 equiv.). The solution was stirred at rt for 30 min then 4-bromo-2-chloro-1-fluorobenzene (290 µL, 2.39 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at 80 °C for 18 h then cooled to rt, diluted with H_2O (25 mL) and EtOAc (50 mL). The aqueous layer was separated and extracted with EtOAc (2 x 50 mL) then the combined organic layers were washed with brine (3 x 20 mL), dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of PE/EtOAc from 100 up to 90/10 to afford compound **25** (612 mg, 2.05 mmol, 86 %) as an orange oil.

R_f (PE/EtOAc 90/10) 0.21.

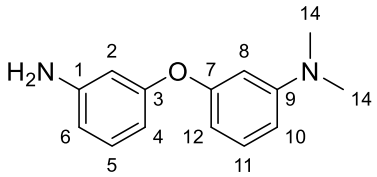
IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3377, 1621, 1573, 1470, 1256, 1232, 1142, 1080, 959, 757, 684.

^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 7.59 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, **H_9**), 7.31 (dd, *J* = 8.7, 2.4 Hz, 1H, **H_{11}**), 7.10 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, **H_5**), 6.87 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, **H_{12}**), 6.44 (ddd, *J* = 8.0, 2.2, 0.9 Hz, 1H, **H_6**), 6.33 (ddd, *J* = 8.0, 2.4, 0.9 Hz, 1H, **H_4**), 6.28 (t, *J* = 2.2 Hz, 1H, **H_2**), 3.72 (brs, 2H, **NH_2**).

^{13}C NMR (63 MHz, $CDCl_3$) δ 157.7 (**C-C_7**), 152.1 (**C-C_3**), 148.3 (**C-C_1**), 133.2 (**CH_{Ar}-C_9**), 131.0 (**CH_{Ar}-C_{11}**), 130.6 (**CH_{Ar}-C_5**), 126.9 (**C-C_8**), 122.0 (**CH_{Ar}-C_{12}**), 116.1 (**C-C_{10}**), 110.7 (**CH_{Ar}-C_6**), 108.1 (**CH_{Ar}-C_4**), 104.9 (**CH_{Ar}-C_2**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{12}H_{10}BrClNO$ $[M+H]^+$: 299.9607, found: 299.9606.

3-(3-Aminophenoxy)-*N*,*N*-dimethylaniline (26)



Chemical Formula: $C_{14}H_{16}N_2O$
Molecular Weight: 228.29

An oven dried microwave reaction vial was loaded with 3-aminophenol (196 mg, 1.80 mmol, 1.2 equiv.), CuI (29 mg, 0.15 mmol, 10 mol%), 2-picolinic acid (37 mg, 0.30 mmol, 20 mol%) and K_3PO_4 (637 mg, 3.00 mmol, 2.0 equiv.). It was then evacuated and back-filled with argon 3 times then 3-bromo-*N*,*N*-dimethylaniline (300 mg, 1.50 mmol) and dry DMSO (3.0 mL) were added under argon and the reaction mixture was stirred at 90 °C in a preheated plate for 24 h. The reaction mixture was diluted with H_2O (25 mL) and EtOAc (25 mL), the aqueous layer was separated and extracted with EtOAc (3 x 20 mL) then the combined organic layers were washed with brine (3 x 15 mL), dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of PE/EtOAc from 100 up to 80/20 to afford compound **26** (166 mg, 0.73 mmol, 49 %) as a brown oil.

R_f (PE/EtOAc 90/10) 0.19.

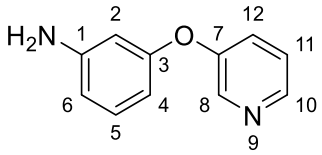
IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3459, 3373, 2914, 1602; 1570; 1489, 1447, 1282, 1228, 1173, 1153, 1001, 835, 765, 687.

^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 7.17 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H, **H_5**), 7.08 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, **H_{11}**), 6.48 (ddd, *J* = 8.2, 2.5, 0.8 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.45 – 6.30 (m, 5H, **5 x H_{Ar}**), 3.66 (s, 2H, **NH_2**), 2.93 (s, 6H, **2 x H_{14}**).

^{13}C NMR (63 MHz, $CDCl_3$) δ 159.0 (**C**), 158.0 (**C**), 152.2 (**C-C_1**), 148.0 (**C-C_9**), 130.3 (**CH_{Ar}-C_{11}**), 130.0 (**CH_{Ar}-C_5**), 109.8 (**CH_{Ar}**), 108.8 (**CH_{Ar}**), 107.8 (**CH_{Ar}**), 107.4 (**CH_{Ar}**), 105.3 (**CH_{Ar}**), 104.0 (**CH_{Ar}**), 40.7 (**2 x CH_3-C_{14}**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{14}H_{17}N_2O$ $[M+H]^+$: 229.1335, found: 229.1338.

3-(Pyridin-3-yloxy)aniline (27)



Chemical Formula: $C_{11}H_{10}N_2O$
Molecular Weight: 186.21

The reaction was carried out as described in general procedure **G** using 3-iodopyridine (410 mg, 2.00 mmol), 3-aminophenol (262 mg, 2.40 mmol, 1.2 equiv.), copper(I) iodide (19 mg, 0.10 mmol, 5 mol%), 2-picolinic acid (25 mg, 0.20 mmol, 10 mol%), and K_3PO_4 (849 mg, 4.00 mmol, 2.0 equiv.) in dry DMSO (4 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of PE/EtOAc from 80/20 up to 50/50 to afford compound **27** (247 mg, 1.33 mmol, 55 %) as a brown oil.

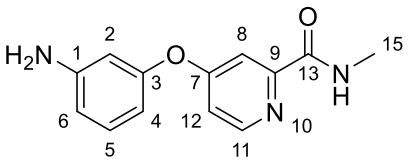
R_f (PE/EtOAc 50/50) 0.30.

^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 8.41 (dd, *J* = 2.8, 0.8 Hz, 1H, **H_{10}**), 8.35 (dd, *J* = 4.5, 1.6 Hz, 1H, **H_8**), 7.34 – 7.21 (m, 2H, **H_{11}**, **H_{12}**), 7.12 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, **H_5**), 6.46 (ddd, *J* = 8.0, 2.2, 0.9 Hz, 1H, **H_4**), 6.39 (ddd, *J* = 8.0, 2.3, 0.9 Hz, 1H, **H_6**), 6.34 (t, *J* = 2.2 Hz, 1H, **H_2**), 3.73 (brs, 2H, **NH_2**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{11}H_{11}N_2O$ $[M+H]^+$: 187.0866, found: 187.0871.

All spectra data corresponded to the literature values as found in Maiti D., Buchwald S. L., *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 17423–17429.

4-(3-Aminophenoxy)-*N*-methylpicolinamide (28)



Chemical Formula: $C_{13}H_{13}N_3O_2$
Molecular Weight: 243.27

To a solution of 3-aminophenol (336 mg, 3.08 mmol, 1.05 equiv.) in dry DMSO (2 mL) under argon was added *t*-BuOK (361 mg, 3.22 mmol, 1.1 equiv.). The solution was stirred at rt for 30 min then 4-chloro-*N*-methylpicolinamide (500 mg, 2.93 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at 80 °C for 3 h then cooled to rt then diluted with H_2O (40 mL) and EtOAc (50 mL). The aqueous layer was separated and extracted with EtOAc (2 x 30 mL) then the combined organic layers were washed with brine (15 mL), dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 100 up to 98/2 to afford compound **28** (516 mg, 2.12 mmol, 72 %) as a colourless oil.

R_f (DCM/MeOH 98/2) 0.59.

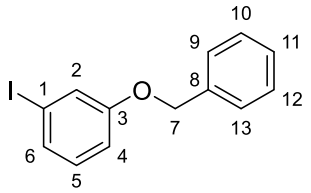
IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3353, 3229, 3057, 1664, 1596, 1581, 1568, 1528, 1298, 1151.

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-d_6) δ 8.75 (q, *J* = 4.8 Hz, 1H, **NH**), 8.49 (dd, *J* = 5.6, 0.5 Hz, 1H, **H_{11}**), 7.41 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 7.20 – 7.02 (m, 2H, **2 x H_{Ar}**), 6.51 (ddd, *J* = 8.1, 2.1, 0.9 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.32 (t, *J* = 2.2 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.27 (ddd, *J* = 7.9, 2.4, 0.9 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 5.39 (s, 2H, **NH_2**), 2.79 (d, *J* = 4.9 Hz, 3H, **H_{15}**).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-d_6) δ 165.7 (**C**), 163.8 (**C**), 154.3 (**C**), 152.4 (**C**), 151.0 (**C**), 150 (**CH_{Ar}-C_{11}**), 130.6 (**CH_{Ar}**), 114.3 (**CH_{Ar}**), 111.4 (**CH_{Ar}**), 109.0 (**CH_{Ar}**), 107.2 (**CH_{Ar}**), 105.4 (**CH_{Ar}**), 26.0 (**CH_3-C_{15}**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{13}H_{14}N_3O_2$ $[M+H]^+$: 244.1081, found: 244.1080.

1-(Benzyloxy)-3-iodobenzene (31)



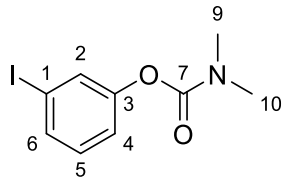
Chemical Formula: $C_{13}H_{11}IO$
Molecular Weight: 310.13

To a solution of 3-iodophenol (500 mg, 2.27 mmol) in acetone (3 mL) were added K_2CO_3 (471 mg, 3.41 mmol, 1.5 equiv.), and benzyl bromide (406 µL, 3.41 mmol, 1.5 equiv.). The resulting suspension was stirred at rt for 18 h, diluted with a saturated solution of NH_4Cl (15 mL) then the aqueous layer was separated and extracted with Et_2O (2 x 30 mL). The combined organic layers were dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was precipitated in PE at 0 °C, after filtration of the solid the filtrate was evaporated and precipitated again to afford compound **31** (366 mg, 1.18 mmol, 52 %) as a white powder.

^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 7.48 – 7.27 (m, 7H, **7 x H_{Ar}**), 7.05 – 6.89 (m, 2H, **2 x H_{Ar}**), 5.03 (s, 2H, **H_7**).

All spectra data corresponded to the literature values as found in Kutz, S.; Schmidt, A.; Knölker, H.-J. *Synthesis (Stuttg).* **2016**, *49* (02), 275–292.

3-Iodophenyl *N*,*N*-dimethylcarbamate (32)



Chemical Formula: $C_9H_{10}INO_2$
Molecular Weight: 291.09

To a solution of 3-iodophenol (600 mg, 2.73 mmol) in dry MeCN (14 mL) under argon atmosphere were added K_2CO_3 (567 mg, 4.10 mmol, 1.5 equiv.), and dimethylcarbamyl chloride (377 µL, 4.10 mmol, 1.5 equiv.). The reaction mixture was stirred under reflux for 18 h then cooled to rt and concentrated under reduced pressure. The residue was dissolved in EtOAc (50 mL) and H_2O (20 mL), then the aqueous layer was separated and extracted with EtOAc (2 x 30 mL). The combined organic layers were washed with KOH 1M (15 mL), dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of PE/EtOAc from 100 up to 90/10 to afford compound **32** (730 mg, 2.51 mmol, 92 %) as a colourless oil.

R_f (PE/EtOAc 90/10) 0.40.

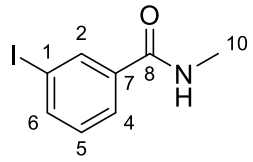
IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 2929, 1716, 1576, 1466, 1382, 1201, 1153, 1009, 859, 771, 682.

^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 7.57 – 7.47 (m, 2H, **2 x H_{Ar}**), 7.14 – 7.01 (m, 2H, **2 x H_{Ar}**), 3.04 (d, *J* = 18.5 Hz, 6H, **H_9 + H_{10}**).

^{13}C NMR (63 MHz, $CDCl_3$) δ 154.5 (**C**), 152.0 (**C**), 134.4 (**CH_{Ar}**), 131.1 (**CH_{Ar}**), 130.6 (**CH_{Ar}**), 121.5 (**CH_{Ar}**), 93.5 (**C**), 36.9 (**CH_3-$C_{9/10}$**), 36.6 (**CH_3-$C_{10/9}$**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_9H_{11}INO_2$ $[M+H]^+$: 291.9829, found: 291.9834.

3-Iodo-*N*-methylbenzamide (33)



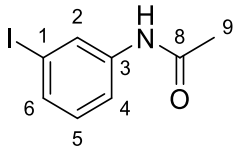
Chemical Formula: C_8H_8INO
Molecular Weight: 261.06

Under argon atmosphere, 3-iodobenzoic acid (400 mg, 1.61 mmol), DMAP (236 mg, 1.93 mmol, 1.2 equiv.) and HATU (734 mg, 1.93 mmol, 1.2 equiv.) were suspended in dry THF (16 mL) followed by the addition of DIPEA (336 µL, 1.93 mmol, 1.2 equiv.). The resulting suspension was stirred at rt for 20 min then methylamine hydrochloride (130 mg, 1.93 mmol, 1.2 equiv.) was added, and the reaction mixture was stirred at rt for 30 min and concentrated to dryness. The residue was dissolved in DCM (50 mL), the organic layer was washed with 1M HCl (15 mL), H_2O (15 mL), a saturated solution of $NaHCO_3$ (15 mL), H_2O (4 x 30 mL) and brine (30 mL). The organic layer was dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure to afford compound **33** (328 mg, 1.26 mmol, 78 %) as a white solid. The obtained product was used in the next step without further purification.

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 8.52 (brs, 1H, **NH**), 8.17 (t, *J* = 1.6 Hz, 1H, **CH_{Ar}-C_2**), 7.88 (ddd, *J* = 7.9, 1.8, 1.1 Hz, 1H, **CH_{Ar}-$C_{6/4}$**), 7.83 (ddd, *J* = 7.8, 1.7, 1.1 Hz, 1H, **CH_{Ar}-$C_{4/6}$**), 7.27 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, **CH_{Ar}-C_5**), 2.77 (d, *J* = 4.6 Hz, 3H, **CH_3-H_{10}**).

All spectra data corresponded to the literature values as found in Sun, X.; Zhao, W.; Li, B.-J. *Chem. Commun.* **2020**, *56* (8), 1298–1301.

N-(3-Iodophenyl)acetamide (34)



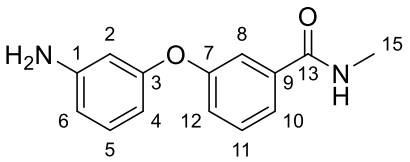
Chemical Formula: C_8H_8INO
Molecular Weight: 261.06

A solution of 3-iodoaniline (329 mL, 2.74 mmol) in acetic anhydride (5.5 mL) was stirred at rt for 4 h. The reaction mixture was poured into cold water, neutralized with 1 M KOH and extracted with DCM (4 x 50 mL). The combined organic layers were dried over MgSO4, filtered and concentrated under reduced pressure to afford compound **34** (714 mg, 2.74 mmol, quant.) as a brownish solid. The obtained product was used in the next step without further purification.

^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 7.90 (brs, 1H, **H_2**), 7.53 – 7.40 (m, 2H, **H_4**, **H_6**), 7.27 (brs, 1H, **NH**), 7.03 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, **H_5**), 2.17 (s, 3H, **H_9**).

All spectra data corresponded to the literature values as found in Linstad, E. J.; Vāvere, A. L.; Hu, B.; Kempinger, J. J.; Snyder, S. E.; DiMagno, S. G. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15* (10), 2246–2252.

3-(3-Aminophenoxy)-*N*-methylbenzamide (37)



Chemical Formula: $C_{14}H_{14}N_2O_2$
Molecular Weight: 242.28

The reaction was carried out as described in general procedure **G** using iodoaryl **33** (274 mg, 1.05 mmol), 3-aminophenol (138 mg, 1.26 mmol, 1.2 equiv.), copper(I) iodide (10 mg, 0.05 mmol, 5 mol%), 2-picolinic acid (14 mg, 0.11 mmol, 10 mol%) and K_3PO_4 (446 mg, 2.10 mmol, 2.0 equiv.) in dry DMSO (2.1 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 100 up to 98/2 to afford compound **37** (184 mg, 0.76 mmol, 72 %) as an orange oil.

R_f (DCM/MeOH 95/5) 0.29.

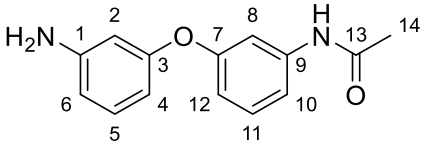
IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3347, 2927, 2362, 1632, 1577, 1488, 1286, 1227, 1150, 965, 686.

^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 7.44 (dt, *J* = 7.7, 1.4 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 7.38 – 7.35 (m, 1H, **H_{Ar}**), 7.30 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, **H_{11}**), 7.12 – 7.01 (m, 2H, **H_5 + H_{Ar}**), 6.57 (brs, 1H, **NH**), 6.40 (ddd, *J* = 8.0, 2.2, 0.9 Hz, 1H, **$H_{6/4}$**), 6.34 (ddd, *J* = 8.0, 2.3, 0.9 Hz, 1H, **$H_{4/6}$**), 6.26 (t, *J* = 2.2 Hz, 1H, **H_2**), 3.73 (brs, 2H, **NH_2**), 2.91 (d, *J* = 4.8 Hz, 3H, **H_{15}**).

^{13}C NMR (63 MHz, $CDCl_3$) δ 167.8 (**C**), 157.8 (**C**), 157.6 (**C**), 148.3 (**C**), 136.4 (**C**), 130.5 (**CH_{Ar}-C_5**), 129.9 (**CH_{Ar}-C_{11}**), 121.7 (**CH_{Ar}**), 121.5 (**CH_{Ar}**), 117.2 (**CH_{Ar}**), 110.6 (**CH_{Ar}-$C_{6/4}$**), 109.0 (**CH_{Ar}-$C_{4/6}$**), 105.8 (**CH_{Ar}-C_2**), 26.9 (**CH_3-C_{15}**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{14}H_{15}N_2O_2$ $[M+H]^+$: 243.1128, found: 243.1132.

N-(3-(3-Aminophenoxy)phenyl)acetamide (38)



Chemical Formula: $C_{14}H_{14}N_2O_2$
Molecular Weight: 242.28

The reaction was carried out as described in general procedure **G** using iodoaryl **34** (522 mg, 2.00 mmol), 3-aminophenol (262 mg, 2.40 mmol, 1.2 equiv.), copper(I) iodide (19 mg, 0.10 mmol, 5 mol%), 2- picolinic acid (25 mg, 0.20 mmol, 10 mol%) and K_3PO_4 (849 mg, 4.00 mmol, 2.0 equiv.) in dry DMSO (4 mL). The crude was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of PE/EtOAc from 80/20 up to 50/50 to afford compound **38** (320 mg, 1.32 mmol, 66 %) as a brown oil.

R_f (PE/EtOAc 50/50) 0.16.

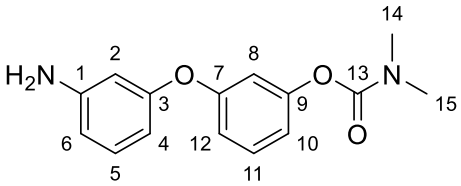
IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3303, 2917, 2361, 1667, 1598, 1545, 1484, 1415, 1283, 1256, 1178, 1153, 854, 772, 685.

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 9.98 (s, 1H, **NH**), 7.36 – 7.19 (m, 3H, **H$_8$**, **H$_{10}$**, **H$_{11}$**), 6.99 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, **H$_5$**), 6.65 (ddd, *J* = 7.4, 2.3, 1.6 Hz, 1H, **H$_{12}$**), 6.31 (ddd, *J* = 8.0, 2.1, 1.0 Hz, 1H, **H$_6$**), 6.17 (t, *J* = 2.2 Hz, 1H, **H$_2$**), 6.13 (ddd, *J* = 7.8, 2.4, 0.9 Hz, 1H, **H$_4$**), 5.24 (s, 2H, **NH$_2$**), 2.00 (s, 3H, **H$_{14}$**).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 168.8 (**C-C$_{13}$**), 157.9 (**C**), 157.7 (**C**), 150.9 (**C**), 141.2 (**CH$_{Ar}$-C$_9$**), 130.5 (**CH$_{Ar}$-C$_{11}$**), 130.3 (**CH$_{Ar}$-C$_5$**), 113.9 (**CH$_{Ar}$**), 113.6 (**CH$_{Ar}$-C$_{12}$**), 109.8 (**CH$_{Ar}$-C$_6$**), 109.4 (**CH$_{Ar}$**), 106.4 (**CH$_{Ar}$-C$_4$**), 104.4 (**CH$_{Ar}$-C$_2$**), 24.5 (**CH$_3$-C$_{14}$**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{14}H_{15}N_2O_2$ $[M+H]^+$: 243.1128, found: 243.1134.

3-(3-Aminophenoxy)phenyl dimethylcarbamate (39)



Chemical Formula: $C_{15}H_{16}N_2O_3$
Molecular Weight: 272.30

The reaction was carried out as described in general procedure **G** using iodoaryl **32** (582 mg, 2.00 mmol), 3-aminophenol (262 mg, 2.40 mmol, 1.2 equiv.), copper(I) iodide (19 mg, 0.10 mmol, 5 mol%), 2-picolinic acid (25 mg, 0.20 mmol, 10 mol%) and K_3PO_4 (849 mg, 4.00 mmol, 2.0 equiv.) in dry DMSO (4 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of PE/EtOAc from 80/20 up to 70/30 to afford compound **39** (166 mg, 0.67 mmol, 30 %) as a brown oil.

R_f (PE/EtOAc 70/30) 0.18.

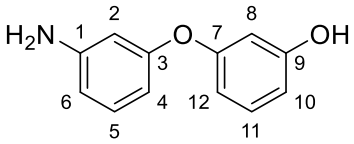
IR (ATR diamond, cm^{-1}) v: 3362, 2935, 1709, 1599, 1584, 1479, 1387, 1254, 1167, 1147, 970, 770, 685.

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-*d_6*) 7.34 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H, **H_{11}**), 7.01 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, **H_5**), 6.87 – 6.83 (m, 1H, **$H_{10/12}$**), 6.83 – 6.79 (m, 1H, **$H_{12/10}$**), 6.68 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H, **H_8**), 6.35 (ddd, *J* = 8.0, 2.1, 0.9 Hz, 1H, **$H_{4/6}$**), 6.21 (t, *J* = 2.2 Hz, 1H, **H_2**), 6.15 (ddd, *J* = 7.9, 2.4, 0.9 Hz, 1H, **$H_{6/4}$**), 5.25 (s, 2H, **NH_2**), 2.94 (d, *J* = 30.0 Hz, 6H, **H_{14} + H_{15}**).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-*d_6*) δ 157.8 (**C**), 156.9 (**C**), 153.7 (**C**), 152.3 (**C**), 150.6 (**C**), 130.1(**CH_{Ar}-C_5**), 130.0 (**CH_{Ar}-C_{11}**), 116.3 (**CH_{Ar}-$C_{12/10}$**), 114.8 (**CH_{Ar}-$C_{10/12}$**), 111.8 (**CH_{Ar}-C_8**), 109.8 (**CH_{Ar}-$C_{4/6}$**), 106.2 (**CH_{Ar}-$C_{6/4}$**), 104.3 (**CH_{Ar}-C_2**), 36.3 (**CH_3-$C_{14/15}$**), 36.1 (**CH_3-$C_{15/14}$**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{15}H_{17}N_2O_3$ $[M+H]^+$: 273.1234, found: 273.1235.

3-(3-Aminophenoxy)phenol (40)



Chemical Formula: $C_{12}H_{11}NO_2$
Molecular Weight: 201.22

The reaction was carried out as described in general procedure **D** using nitro compound **41** (139 mg, 0.48 mmol) and Pd/C 10 wt.% (51 mg, 0.05 mmol, 0.1 equiv.) in MeOH (2.7 mL) for 3 h to afford compound **40** (90 mg, 0.45 mmol, 94 %) as a beige solid.

Mp: 120-121 °C.

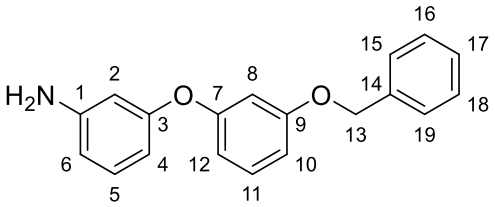
IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3377, 3310, 3004, 1590, 1489, 1455, 1291, 1186, 1152, 1136, 1003, 984, 880, 858, 771, 690.

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-d_6) δ 9.51 (s, 1H, **OH**), 7.12 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H, **H_{11}**), 6.98 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, **H_5**), 6.48 (ddd, *J* = 8.1, 2.3, 1.0 Hz, 1H, **H_{10}**), 6.39 (ddd, *J* = 8.1, 2.4, 1.0 Hz, 1H, **H_{12}**), 6.35 – 6.27 (m, 2H, **H_8**, **$H_{4/6}$**), 6.17 (t, *J* = 2.2 Hz, 1H, **H_2**), 6.12 (ddd, *J* = 7.9, 2.4, 1.0 Hz, 1H, **$H_{6/4}$**), 5.20 (brs, 2H, **NH_2**).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-d_6) δ 158.7 (**C**), 158.2 (**C**), 157.4 (**C**), 150.4 (**C**), 130.2 (**CH_{Ar}-C_{11}**), 129.9 (**CH_{Ar}-C_5**), 110.1 (**CH_{Ar}-C_{10}**), 109.3 (**CH_{Ar}-$C_{4/6}$**), 109.0 (**CH_{Ar}-C_{12}**), 106.1 (**CH_{Ar}-$C_{6/4}$**), 105.4 (**CH_{Ar}-C_8**), 104.1 (**CH_{Ar}-C_2**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{12}H_{12}NO_2$ $[M+H]^+$: 202.0863, found: 202.0867.

3-(3-(Benzyloxy)phenoxy)aniline (41)



Chemical Formula: $C_{19}H_{17}NO_2$
Molecular Weight: 291.35

The reaction was carried out as described in general procedure **G** using iodoaryl **31** (310 mg, 1.00 mmol), 3-aminophenol (131 mg, 1.20 mmol, 1.2 equiv.), copper(I) iodide (10 mg, 0.05 mmol, 5 mol%), 2-picolinic acid (12 mg, 0.10 mmol, 10 mol%), and K_3PO_4 (425 mg, 2.00 mmol, 2.0 equiv.) in dry DMSO (2 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of PE/EtOAc from 90/10 up to 80/20 to afford compound **41** (221 mg, 0.76 mmol, 76 %) as a brown oil.

R_f (PE/EtOAc 80/20) 0.38.

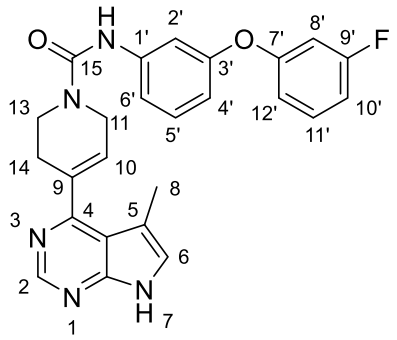
IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3377, 3020, 1582, 1483, 1281, 1260, 1175, 1150, 1131, 1025, 970, 842, 735, 684.

^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 7.46 – 7.30 (m, 5H, **5 x H_{Ar}**), 7.22 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H, **H_{11}**), 7.09 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, **H_5**), 6.72 (dd, *J* = 8.2, 2.4 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.68 – 6.58 (m, 2H, **2 x H_{Ar}**), 6.48 – 6.37 (m, 2H, **2 x H_{Ar}**), 6.33 (t, *J* = 2.2 Hz, 1H, **H_2**), 5.02 (s, 2H, **H_{13}**), 3.68 (s, 2H, **NH_2**).

^{13}C NMR (63 MHz, $CDCl_3$) δ 160.1 (**C-C_9**), 158.5 (**C-C_7**), 158.2 (**C-C_3**), 148.1 (**C-C_1**), 136.9 (**C-C_{14}**), 130.5 (**CH_{Ar}-C_5**), 130.2 (**CH_{Ar}-C_{11}**), 128.7 (**2 x CH_{Ar}**), 128.2 (**CH_{Ar}**), 127.7 (**2 x CH_{Ar}**), 111.6 (**CH_{Ar}**), 110.4 (**CH_{Ar}**), 109.7 (**CH_{Ar}**), 109.3 (**CH_{Ar}**), 105.9 (**2 x CH_{Ar}-C_2 + CH_{Ar}**), 70.2 (**CH_2-C_{13}**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{19}H_{18}NO_2$ $[M+H]^+$: 292.1332, found: 292.1336.

N-(3-(3-Fluorophenoxy)phenyl)-4-(5-methyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxamide (43)



Chemical Formula: $C_{25}H_{22}FN_5O_2$
Molecular Weight: 443.48

The reaction was carried out as described in general procedure **A** using aniline **22** (77 mg, 0.38 mmol), 4-nitrophenyl chloroformate (91 mg, 0.45 mmol, 1.2 equiv.), DIPEA (237 µL, 1.36 mmol, 2.4 equiv.) and amine **8** (130 mg, 0.45 mmol, 1.2 equiv.) in dry THF (5.4 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 98/2 up to 97/3 to afford compound **43** (129 mg, 0.29 mmol, 76 %) as a brown solid.

R_f (DCM/MeOH 95/5) 0.33.

Mp: degradation 150 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3863, 2936, 1705, 1593, 1541, 1448, 1238, 1173, 1150, 1049, 683.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 11.83 (s, 1H, **NH**), 8.70 (s, 1H, **NH**), 8.64 (s, 1H, **H_2**), 7.47 – 7.38 (m, 1H, **$H_{11'}$**), 7.38 – 7.23 (m, 4H, **4 x H_{Ar}**), 6.96 (td, *J* = 8.5, 2.5 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.90 – 6.80 (m, 2H, **$H_{8'}$ + $H_{12'}$**), 6.67 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.03 (brs, 1H, **H_{10}**), 4.20 (d, *J* = 3.0 Hz, 2H, **H_{11}**), 3.71 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H, **H_{13}**), 2.66 (brs, 2H, **H_{14}**), 2.22 (s, 3H, **H_8**).

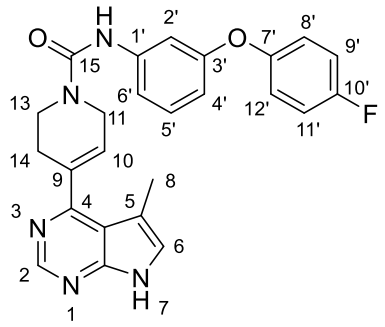
^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 162.8 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 244.6 Hz, **C-$C_{9'}$**), 159.3 (**C**), 158.4 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 11.0 Hz, **C-$C_{7'}$**), 155.8 (**C**), 154.8 (**C**), 152.6 (**C**), 150.1 (**CH_{Ar}-C_2**), 142.4 (**C**), 134.2 (**C**), 131.2 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 9.8 Hz, **CH_{Ar}-$C_{11'}$**), 129.7 (**CH_{Ar}**), 128.2 (**CH-C10**), 125.0 (**CH_{Ar}**), 115.1(**CH_{Ar}**), 114.3 (**C**), 114.2 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 2.9 Hz, **CH_{Ar}-$C_{12'}$**), 112.3 (**CH_{Ar}**), 110.0 (**CH_{Ar}**), 109.9 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 21.0 Hz, **CH_{Ar}-$C_{10'}$**), 108.9 (**C**), 105.8 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 24.5 Hz, **CH_{Ar}-$C_{8'}$**), 43.6 (**CH_2-C_{11}**), 40.6 (**CH_2-C_{13}**), 27.3 (**CH_2-C_{14}**), 12.9 (**CH_3-C_8**).

^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ -110.9 – -111.0 (m, 1F).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{25}H_{23}FN_5O_2$ $[M+H]^+$: 444.1830, found: 444.1835.

Purity (HPLC): > 99.9 %.

N-(3-(4-Fluorophenoxy)phenyl)-4-(5-methyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxamide (44)



Chemical Formula: $C_{25}H_{22}FN_5O_2$
Molecular Weight: 443.48

The reaction was carried out as described in general procedure **A** using aniline **23** (79 mg, 0.39 mmol), 4-nitrophenyl chloroformate (94 mg, 0.47 mmol, 1.2 equiv.), DIPEA (244 µL, 1.40 mmol, 2.4 equiv.) and amine **8** (134 mg, 0.47 mmol, 1.2 equiv.) in dry THF (5.6 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 98/2 up to 97/3 to afford compound **44** (129 mg, 0.29 mmol, 74 %) as a white powder.

R_f (DCM/MeOH 95/5) 0.25.

Mp: 213-215 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3863, 2970, 2920, 1638, 1593, 1541, 1499, 1435, 1238, 1203, 1063, 964, 835, 787, 689.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.82 (s, 1H, **NH**), 8.65 (s, 1H, **NH**), 8.64 (s, 1H, **H_2**), 7.34 – 7.28 (m, 2H, **2 x H_{Ar}**), 7.27 – 7.19 (m, 4H, **4 x H_{Ar}**), 7.12 – 7.00 (m, 2H, **2 x H_{Ar}**), 6.59 (dd, *J* = 7.6, 2.3 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.03 (brs, 1H, **H_{10}**), 4.26 – 4.15 (m, 2H, **H_{11}**), 3.71 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, **H_{13}**), 2.66 (brs, 2H, **H_{14}**), 2.22 (s, 3H, **H_8**).

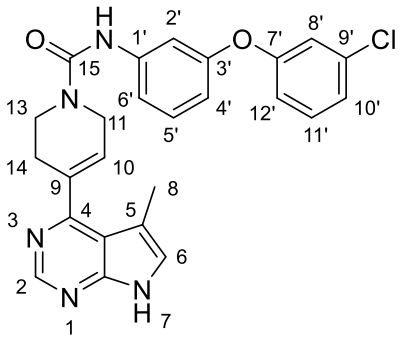
^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 159.3 (**C**), 158.13 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 239.2 Hz, **C-$C_{10'}$**), 157.2 (**C**), 154.8 (**C**), 152.6 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 2.3 Hz, **C-$C_{7'}$**), 152.6 (**C**), 150.1 (**CH_{Ar}-C_2**), 142.2 (**C**), 134.2 (**C**), 129.6 (**CH_{Ar}**), 128.2 (**CH-C_{10}**), 125.0 (**CH_{Ar}**), 120.7 (d, *J* = 8.4 Hz, **2 x CH_{Ar}-$C_{12'}$ + $C_{8'}$**), 116.5 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 23.4 Hz, **2 x CH_{Ar}-$C_{11'}$ + $C_{9'}$**), 114.3 (**C + CH_{Ar}**), 111.4 (**CH_{Ar}**), 109.0 (**CH_{Ar}**), 108.9 (**C**), 43.6 (**CH_2-C_{11}**), 40.6 (**CH_2-C_{13}**), 27.3 (**CH_2-C_{14}**), 12.9 (**CH_3-C_8**).

^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-d_6) δ -119.99 – -120.08 (m, 1F).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{25}H_{23}FN_5O_2$ $[M+H]^+$: 444.1830, found: 444.1836.

Purity (HPLC): > 99.9 %.

N-(3-(3-Chlorophenoxy)phenyl)-4-(5-methyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxamide (45)



Chemical Formula: $C_{25}H_{22}ClN_5O_2$
Molecular Weight: 459.93

The reaction was carried out as described in general procedure **A** using aniline **24** (90 mg, 0.41 mmol), 4-nitrophenyl chloroformate (99 mg, 0.49 mmol, 1.2 equiv.), DIPEA (258 µL, 1.48 mmol, 2.4 equiv.) and amine **8** (141 mg, 0.49 mmol, 1.2 equiv.) in dry THF (5.9 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 98/2 up to 95/5 to afford compound **45** (161 mg, 0.35 mmol, 85 %) as a white solid.

R_f (DCM/MeOH 95/5) 0.39.

Mp: degradation 124 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3863, 2982, 2907, 1647, 1585, 1520, 1445, 1217 1065, 964, 775, 679.

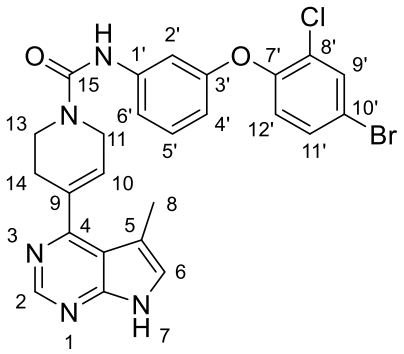
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.82 (s, 1H, **NH**), 8.70 (s, 1H, **NH**), 8.64 (s, 1H, **H_2**), 7.45 – 7.25 (m, 5H, **5 x H_{Ar}**), 7.22 – 7.16 (m, 1H, **H_{Ar}**), 7.06 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.98 (dd, *J* = 8.3, 2.4 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.66 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.09 – 5.99 (m, 1H, **H_{10}**), 4.20 (d, *J* = 3.1 Hz, 2H, **H_{11}**), 3.72 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, **H_{13}**), 2.67 (brs, 2H, **H_{14}**), 2.22 (s, 3H, **H_8**).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 159.3 (**C**), 158.0 (**C**), 155.8 (**C**), 154.8 (**C**), 152.6 (**C**), 150.1 (**CH_{Ar}-C_2**), 142.4 (**C**), 134.2 (**C**), 133.9 (**C**), 131.4 (**CH_{Ar}**), 129.8 (**CH_{Ar}**), 128.1 (**CH-C_{10}**), 125.0 (**CH_{Ar}**), 123.1 (**CH_{Ar}**), 118.2 (**CH_{Ar}**), 117.0 (**CH_{Ar}**), 115.2 (**CH_{Ar}**), 114.3 (**C**), 112.4 (**CH_{Ar}**), 110.0 (**CH_{Ar}**), 108.9 (**C**), 43.6 (**CH_2-C_{11}**), 40.6 (**CH_2-C_{13}**), 27.3 (**CH_2-C_{14}**), 12.9 (**CH_3-C_8**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{25}H_{23}ClN_5O_2$ $[M+H]^+$: 460.1535, found: 460.1539.

Purity (HPLC): > 99.9 %.

N-(3-(4-Bromo-2-chlorophenoxy)phenyl)-4-(5-methyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxamide (46)



Chemical Formula: $C_{25}H_{21}BrClN_5O_2$
Molecular Weight: 538.83

The reaction was carried out as described in general procedure **A** using aniline **25** (65 mg, 0.22 mmol), 4-nitrophenyl chloroformate (53 mg, 0.26 mmol, 1.2 equiv.), DIPEA (137 µL, 0.79 mmol, 2.4 equiv.) and amine **8** (75 mg, 0.26 mmol, 1.2 equiv.) in dry THF (3.1 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 98/2 up to 96/4 to afford compound **46** (87 mg, 0.16 mmol, 73 %) as a white powder.

R_f (DCM/MeOH 95/5) 0.30.

Mp: degradation 148 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3863, 2982, 2900, 2176, 1647, 1472, 1449, 1256, 1231, 1057, 964, 735, 685.

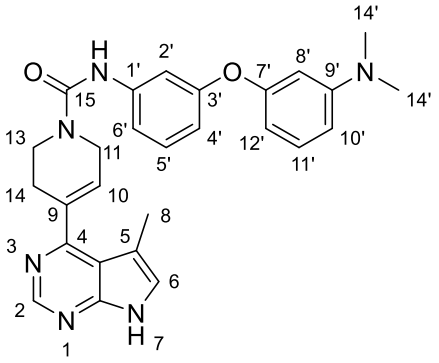
^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-d_6) δ 11.85 (s, 1H, **NH**), 8.70 (s, 1H, **NH**), 8.64 (s, 1H, **H_2**), 7.89 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, **$H_{9'}$**), 7.57 (dd, *J* = 8.7, 2.4 Hz, 1H, **$H_{11'}$**), 7.37 – 7.30 (m, 2H, **H_6**, **H_{Ar}**), 7.26 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, **$H_{5'}$**), 7.21 (t, *J* = 2.2 Hz, 1H, **$H_{2'}$**), 7.06 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, **$H_{12'}$**), 6.61 (ddd, *J* = 7.8, 2.5, 1.2 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.03 (brs, 1H, **H_{10}**), 4.19 (d, *J* = 3.1 Hz, 2H, **H_{11}**), 3.70 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, **H_{13}**), 2.66 (brs, 2H, **H_{14}**), 2.22 (d, *J* = 1.1 Hz, 3H, **H_8**).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-d_6) δ 159.3 (**C**), 156.2 (**C**), 154.8 (**C**), 152.6 (**C**), 151.3 (**C**), 150.1 (**CH_{Ar}-C_2**), 142.4 (**C**), 134.2 (**C**), 132.8 (**CH_{Ar}-$C_{9'}$**), 131.7 (**CH_{Ar}-$C_{11'}$**), 129.8 (**CH_{Ar}-$C_{5'}$**), 128.2 (**CH-C_{10}**), 126.0 (**C**), 125.0 (**CH_{Ar}**), 122.7 (**CH_{Ar}-$C_{12'}$**), 116.0 (**C**), 114.7 (**CH_{Ar}**), 114.3 (**C**), 110.9 (**CH_{Ar}**), 108.9 (**C**), 108.3 (**CH_{Ar}-$C_{2'}$**), 43.6 (**CH_2-C_{11}**), 40.6 (**CH_2-C_{13}**), 27.3 (**CH_2-C_{14}**), 12.9 (**CH_3-C_8**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{25}H_{22}BrClN_5O_2$ $[M+H]^+$: 540.0620, found: 540.0621.

Purity (HPLC): > 99.9 %.

N-(3-(3-(Dimethylamino)phenoxy)phenyl)-4-(5-methyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxamide (47)



Chemical Formula: $C_{27}H_{28}N_6O_2$
Molecular Weight: 468.56

The reaction was carried out as described in general procedure **A** using aniline **26** (78 mg, 0.34 mmol), 4-nitrophenyl chloroformate (83 mg, 0.41 mmol, 1.2 equiv.), DIPEA (143 µL, 0.82 mmol, 2.4 equiv.), and amine **8** (103 mg, 0.41 mmol, 1.2 equiv.) in dry THF (4.9 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 100 up to 95/5 to afford compound **47** (124 mg, 0.27 mmol, 78 %) as a brown solid.

R_f (DCM/MeOH 95/5) 0.38.

Mp: 114-116 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 2972, 1595, 1522, 1435, 1231, 1209, 1057, 687.

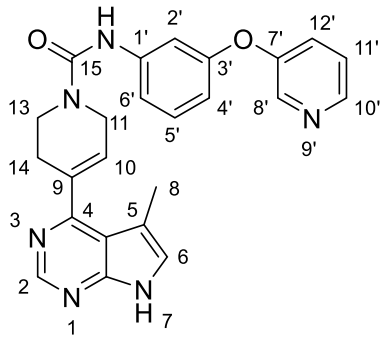
^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-d_6) δ 11.82 (s, 1H, **NH**), 8.64 (s, 2H, **NH + H_2**), 7.35 – 7.10 (m, 5H, **H_6 + 4 x H_{Ar}**), 6.58 (ddd, *J* = 7.6, 2.4, 1.4 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.49 (ddd, *J* = 8.5, 2.5, 0.8 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.37 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.24 (ddd, *J* = 8.0, 2.2, 0.8 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.03 (br s, 1H, **H_{10}**), 4.19 (d, *J* = 3.0 Hz, 2H, **H_{11}**), 3.71 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H, **H_{13}**), 2.88 (s, 6H, **$H_{14'}$**), 2.66 (brs, 2H, **H_{14}**), 2.22 (d, *J* = 1.1 Hz, 3H, **H_8**).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-d_6) δ 159.3 (**C**), 157.5 (**C**), 157.1 (**C**), 154.9 (**C**), 152.6 (**C**), 151.9 (**C**), 150.1 (**CH_{Ar}-C_2**), 142.0 (**C**), 134.2 (**C**), 129.9 (**CH_{Ar}**), 129.3 (**CH_{Ar}**), 128.2 (**CH-C_{10}**), 125.0 (**CH_{Ar}-C_6**), 114.3 (**C**), 114.1 (**CH_{Ar}**), 111.6 (**CH_{Ar}**), 109.4 (**CH_{Ar}**), 108.9 (**C**), 107.6 (**CH_{Ar}**), 106.2 (**CH_{Ar}**), 102.9 (**CH_{Ar}**), 43.6 (**CH_2-C_{11}**), 40.6 (**CH_2-C_{13}**), 40.0 (**2 x CH_3-$C_{14'}$**), 27.3 (**CH_2-C_{14}**), 12.9 (**CH_3-C_8**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{27}H_{29}N_6O_2$ $[M+H]^+$: 469.2347, found: 469.2348.

Purity (HPLC): 97.8 %.

4-(5-Methyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-*N*-(3-(pyridin-3-yloxy)phenyl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxamide (48)



Chemical Formula: $C_{24}H_{22}N_6O_2$
Molecular Weight: 426.48

The reaction was carried out as described in general procedure **A** using aniline **27** (70 mg, 0.38 mmol), 4-nitrophenyl chloroformate (91 mg, 0.45 mmol, 1.2 equiv.), DIPEA (236 µL, 1.35 mmol, 2.4 equiv.) and amine **8** (130 mg, 0.45 mmol, 1.2 equiv.) in dry THF (5.4 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 98/2 up to 95/5 to afford compound **48** (112 mg, 0.26 mmol, 68 %) as a white powder.

R_f (DCM/MeOH 95/5) 0.24.

Mp: degradation 132 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3852, 2970, 2344, 1638, 1533, 1435, 1225, 1059, 797, 706, 691.

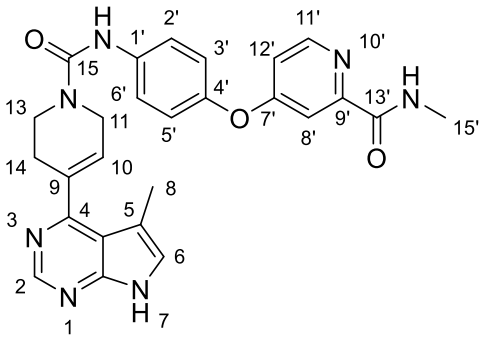
^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-d_6) δ 11.83 (s, 1H, **NH**), 8.71 (s, 1H, **NH**), 8.64 (s, 1H, **H_2**), 8.43 – 8.32 (m, 2H, **2 x H_{Ar}**), 7.49 – 7.40 (m, 2H, **2 x H_{Ar}**), 7.38 – 7.24 (m, 4H, **4 x H_{Ar}**), 6.72 – 6.61 (m, 1H, **H_{Ar}**), 6.03 (brs, 1H, **H_{10}**), 4.19 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H, **H_{11}**), 3.71 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H, **H_{13}**), 2.66 (brs, 2H, **H_{14}**), 2.22 (s, 3H, **H_8**).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-d_6) δ 159.3 (**C**), 156.2 (**C**), 154.8 (**C**), 153.3 (**C**), 152.6 (**C**), 150.1 (**CH_{Ar}-C_2**), 144.5 (**CH_{Ar}**), 142.4 (**C**), 141.0 (**CH_{Ar}**), 134.2 (**C**), 129.8 (**CH_{Ar}**), 128.2 (**CH-C_{10}**), 125.8 (**CH_{Ar}**), 125.1 (**CH_{Ar}**), 124.7 (**CH_{Ar}**), 114.9 (**CH_{Ar}**), 114.3 (**C**), 111.8 (**CH_{Ar}**), 109.3 (**CH_{Ar}**), 108.9 (**C**), 43.6 (**CH_2-C_{11}**), 40.6 (**CH_2-C_{13}**), 27.3 (**CH_2-C_{14}**), 13.0 (**CH_3-C_8**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{24}H_{23}N_6O_2$ $[M+H]^+$: 427.1877, found: 427.1885.

Purity (HPLC): > 99.9 %.

N-Methyl-4-(4-(4-(5-methyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-1,2,3,6-tetrahydropyridine-1-carboxamido)phenoxy)picolinamide (49)



Chemical Formula: $C_{26}H_{25}N_7O_3$
Molecular Weight: 483.53

The reaction was carried out as described in general procedure **A** using 4-(4-aminophenoxy)-*N*-methylpicolinamide (100 mg, 0.41 mmol), 4-nitrophenyl chloroformate (99 mg, 0.49 mmol, 1.2 equiv.), DIPEA (258 µL, 1.48 mmol, 3.6 equiv.), and amine **8** (142 mg, 0.49 mmol, 1.2 equiv.) in dry THF (5.9 mL). The crude was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH/NH_4OH from 98/2/0.1 up to 93/7/0.1 to afford compound **49** (175 mg, 0.362 mmol, 88 %) as a beige powder.

R_f (DCM/MeOH/NH_4OH 95/5/0.1) 0.44.

Mp: degradation 149 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 2175, 2018, 1975, 1651, 1533, 1490, 1416, 1290, 1227, 1196, 922, 835.

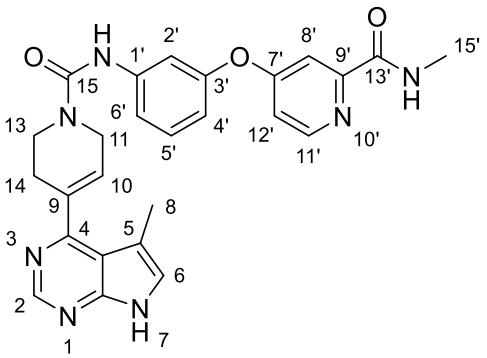
^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 11.83 (s, 1H, **NH**), 8.80 – 8.71 (m, 2H), **2 x NH**), 8.65 (s, 1H, **H_2**), 8.52 – 8.48 (m, 1H, **$H_{11'}$**), 7.70 – 7.60 (m, 2H, **2 x H_{Ar}**), 7.38 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 7.35 – 7.29 (m, 1H, **H_{Ar}**), 7.17 – 7.08 (m, 3H, **3 x H_{Ar}**), 6.06 (brs, 1H, **H_{10}**), 4.30 – 4.21 (m, 2H, **H_{11}**), 3.76 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H, **H_{13}**), 2.79 (d, *J* = 4.8 Hz, 3H, **$H_{15'}$**), 2.70 (brs, 2H, **H_{14}**), 2.29 – 2.22 (m, 3H, **H_8**).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 166.1 (**C**), 163.8 (**C**), 159.4 (**C**), 155.1 (**C**), 152.6 (**C**), 152.4 (**C**), 150.3 (**CH_{Ar}-$C_{11'}$**), 150.1 (**CH_{Ar}-C_2**), 147.4(**C**), 138.4 (**C**), 134.3 (**C**), 128.3 (**CH-C_{10}**), 125.1 (**CH_{Ar}**), 121.4 (**2 x CH_{Ar}**), 121.0 (**2 x CH_{Ar}**), 114.4 (**C**), 114.0 (**CH_{Ar}**), 108.9 (**C**), 108.7 (**CH_{Ar}**), 43.6 (**CH_2-C_{11}**), 40.6 (**CH_2-C_{13}**), 27.3 (**CH_2-C_{14}**), 26.0 (**CH_3-$C_{15'}$**), 13.0 (**CH_3-C_8**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{26}H_{26}N_7O_3$ $[M+H]^+$: 484.2092, found: 484.2086.

Purity (HPLC): 97.6 %.

N-Methyl-4-(3-(4-(5-methyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-1,2,3,6-tetrahydropyridine-1-carboxamido)phenoxy)picolinamide (50)



Chemical Formula: $C_{26}H_{25}N_7O_3$
Molecular Weight: 483.53

The reaction was carried out as described in general procedure **A** using aniline **28** (110 mg, 0.45 mmol), 4-nitrophenyl chloroformate (109 mg, 0.54 mmol, 1.2 equiv.), DIPEA (284 µL, 1.63 mmol, 3.6 equiv.), and amine **8** (156 mg, 0.54 mmol, 1.2 equiv.) in dry THF (6.5 mL). The crude was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 98/2 up to 95/5 to afford compound **50** (160 mg, 0.33 mmol, 73 %) as a beige powder.

R_f (DCM/MeOH 95/5) 0.54.

Mp: 211-213 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) v: 2972, 1647, 1589, 1509, 1435, 1298, 1244, 1194, 787.

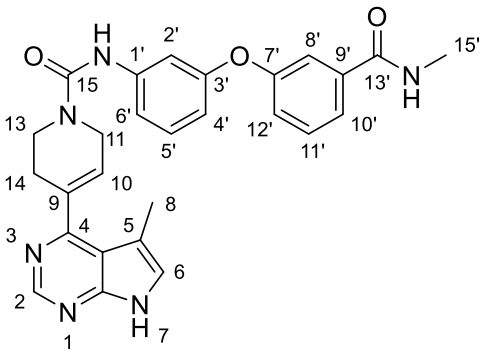
^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-d_6) δ 11.82 (s, 1H, **NH**), 8.85 – 8.71 (m, 2H, **2 x NH**), 8.64 (s, 1H, **H_2**), 8.52 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H, **$H_{11'}$**), 7.52 – 7.33 (m, 4H, **4 x H_{Ar}**), 7.30 (brs, 1H, **H_6**), 7.18 (dd, *J* = 5.6, 2.6 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.80 (ddd, *J* = 7.8, 2.3, 1.3 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.03 (brs, 1H, **H_{10}**), 4.21 (d, *J* = 3.1 Hz, 2H, **H_{11}**), 3.73 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, **H_{13}**), 2.79 (d, *J* = 4.8 Hz, 3H, **$H_{15'}$**), 2.72 – 2.67 (m, 2H, **H_{14}**), 2.22 (d, *J* = 1.0 Hz, 3H, **H_8**).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-d_6) δ 165.5 (**C**), 163.8 (**C**), 159.3 (**C**), 154.8 (**C**), 153.4 (**C**), 152.6 (**C**), 152.5 (**C**), 150.5 (**CH_{Ar}-$C_{11'}$**), 150.1 (**CH_{Ar}-C_2**), 142.7 (**C**), 134.2 (**C**), 130.2 (**CH_{Ar}**), 128.1 (**CH-C_{10}**), 125.0 (**CH_{Ar}-C_6**), 116.6 (**CH_{Ar}**), 114.4 (**CH_{Ar}**), 114.3 (**C**), 113.7 (**CH_{Ar}**), 111.4 (**CH_{Ar}**), 109.1 (**CH_{Ar}**), 108.9 (**C**), 43.6 (**CH_2-C_{11}**), 40.6 (**CH_2-C_{13}**), 27.3 (**CH_2-C_{14}**), 26.0 (**CH_3-$C_{15'}$**), 12.9 (**CH_3-C_8**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{26}H_{26}N_7O_3$ $[M+H]^+$: 484.2092, found: 484.2088.

Purity (HPLC): 97.5 %.

4-(5-Methyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-*N*-(3-(3-(methylcarbamoyl)phenoxy)phenyl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxamide (51)



Chemical Formula: $C_{27}H_{26}N_6O_3$
Molecular Weight: 482.54

The reaction was carried out as described in general procedure **A** using aniline **37** (76 mg, 0.29 mmol), 4-nitrophenyl chloroformate (70 mg, 0.35 mmol, 1.2 equiv.), DIPEA (182 µL, 1.05 mmol, 2.4 equiv.) and amine **8** (100 mg, 0.35 mmol, 1.2 equiv.) in dry THF (4.0 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 98/2 up to 95/5 to afford compound **51** (57 mg, 0.12 mmol, 41 %) as a white powder.

R_f (DCM/MeOH 95/5) 0.31.

Mp: degradation 190 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) v: 3863, 2982, 2905, 1638, 1530, 1437, 1250, 1057, 681.

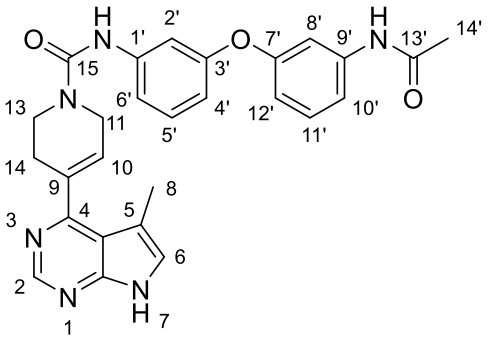
^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-d_6) δ 11.84 (s, 1H, **NH**), 8.70 (brs, 1H, **NH**), 8.64 (s, 1H, **H_2**), 8.48 (q, *J* = 4.1 Hz, 1H, **NH**), 7.60 (dt, *J* = 7.8, 1.3 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 7.54 – 7.42 (m, 2H, **2 x H_{Ar}**), 7.40 – 7.13 (m, 5H, **5 x H_{Ar}**), 6.64 (ddd, *J* = 7.6, 2.5, 1.3 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.11 – 5.95 (m, 1H, **H_{10}**), 4.20 (d, *J* = 3.1 Hz, 2H, **H_{11}**), 3.71 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, **H_{13}**), 2.76 (d, *J* = 4.4 Hz, 3H, **$H_{15'}$**), 2.66 (brs, 2H, **H_{14}**), 2.21 (brs, 3H, **H_8**).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-d_6) δ 165.8 (**$C_{13'}$**), 159.3 (**C**), 156.8 (**C**), 156.5 (**C**), 154.8 (**C**), 152.6 (**C**), 150.1 (**CH_{Ar}-C_2**), 142.3 (**C**), 136.4 (**C**), 134.2 (**C**), 130.0 (**CH_{Ar}**), 129.7 (**CH_{Ar}**), 128.2 (**CH-C_{10}**), 125.0 (**CH_{Ar}**), 121.9 (**CH_{Ar}**), 121.2 (**CH_{Ar}**), 117.1 (**CH_{Ar}**), 114.8 (**CH_{Ar}**), 114.3 (**C**), 112.1 (**CH_{Ar}**), 109.7 (**CH_{Ar}**), 108.9 (**C**), 43.6 (**CH_2-C_{11}**), 40.6 (**CH_2-C_{13}**), 27.3 (**CH_2-C_{14}**), 26.3 (**CH_3-$C_{15'}$**), 12.9 (**CH_3-C_8**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{27}H_{27}N_6O_3$ $[M+H]^+$: 483.2139, found: 483.2148.

Purity (HPLC): > 99.9 %.

N-(3-(3-Acetamidophenoxy)phenyl)-4-(5-methyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxamide (52)



Chemical Formula: $C_{27}H_{26}N_6O_3$
Molecular Weight: 482.54

The reaction was carried out as described in general procedure **A** using aniline **38** (100 mg, 0.41 mmol), 4-nitrophenyl chloroformate (100 mg, 0.50 mmol, 1.2 equiv.), DIPEA (260 µL, 1.49 mmol, 2.4 equiv.) and amine **8** (143 mg, 0.50 mmol, 1.2 equiv.) in dry THF (6.0 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 98/2 up to 94/6 to afford compound **52** (46 mg, 0.10 mmol, 24 %) as a pale white powder after co-evaporation with ethanol.

R_f (DCM/MeOH 95/5) 0.30.

Mp: degradation 156 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3863, 2990, 2901, 2361, 1647, 1595, 1531, 1485, 1420, 1254, 1238, 1179, 1153, 1059, 966, 860, 735, 659.

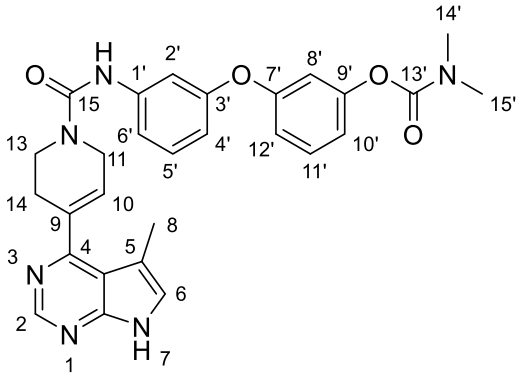
^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-d_6) δ 11.84 (s, 1H, **NH**), 10.00 (s, 1H, **NH**), 8.68 (s, 1H, **NH**), 8.64 (s, 1H, **H_2**), 7.50 – 7.17 (m, 7H, **7 x H_{Ar}**), 6.77 – 6.56 (m, 2H, **2 x H_{Ar}**), 6.03 (brs, 1H, **H_{10}**), 4.20 (s, 2H, **H_{11}**), 3.71 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, **H_{13}**), 2.66 (brs, 2H, **H_{14}**), 2.22 (s, 3H, **H_8**), 2.01 (s, 3H, **$H_{14'}$**).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-d_6) δ 168.4 (**$C_{13'}$**), 159.3 (**C**), 157.1 (**C**), 156.6 (**C**), 154.8 (**C**), 152.6 (**C**), 150.1 (**CH_{Ar}-C_2**), 142.2 (**C**), 140.8 (**C**), 134.2 (**C**), 130.0 (**CH_{Ar}**), 129.6 (**CH_{Ar}**), 128.2 (**CH-C_{10}**), 125.0 (**CH_{Ar}**), 114.6 (**CH_{Ar}**), 114.3 (**C**), 113.7 (**CH_{Ar}**), 113.1 (**CH_{Ar}**), 112.1 (**CH_{Ar}**), 109.7 (**CH_{Ar}**), 108.9 (**CH_{Ar}**), 108.9 (**C**), 43.6 (**CH_2-C_{11}**), 40.6 (**CH_2-C_{13}**), 27.3 (**CH_2-C_{14}**), 24.0 (**CH_3-$C_{14'}$**), 12.9 (**CH_3-C_8**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{27}H_{27}N_6O_3$ $[M+H]^+$: 483.2139, found: 483.2135.

Purity (HPLC): > 99.9 %.

3-(3-(4-(5-Methyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-1,2,3,6-tetrahydropyridine-1-carboxamido)phenoxy)phenyl dimethylcarbamate (53)



Chemical Formula: $C_{28}H_{28}N_6O_4$
Molecular Weight: 512.57

The reaction was carried out as described in general procedure **A** using aniline **39** (69 mg, 0.25 mmol), 4-nitrophenyl chloroformate (61 mg, 0.30 mmol, 1.2 equiv.), DIPEA (157 µL, 0.91 mmol, 2.4 equiv.) and amine **8** (87 mg, 0.30 mmol, 1.2 equiv.) in dry THF (3.6 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 98/2 up to 95/5 to afford compound **53** (81 mg, 0.16 mmol, 64 %) as a white powder after co-evaporation with ethanol.

R_f (DCM/MeOH 95/5) 0.27.

Mp: degradation 132 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3863, 2978, 2914, 2361, 1705, 1647, 1593, 1541, 1479, 1435, 1387, 1250, 1180, 1059, 964, 750, 685.

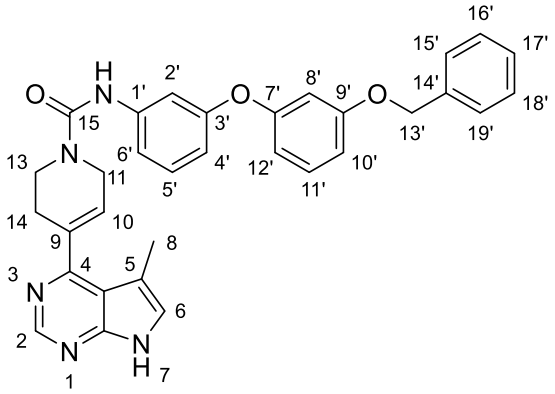
^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-d_6) δ 11.84 (s, 1H, **NH**), 8.72 (s, 1H, **NH**), 8.64 (s, 1H, **H_2**), 7.45 – 7.19 (m, 5H, **5 x H_{Ar}**), 6.94 – 6.81 (m, 2H, **2 x H_{Ar}**), 6.74 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.64 (ddd, *J* = 7.8, 2.4, 1.2 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.12 – 5.97 (m, 1H, **H_{10}**), 4.28 – 4.13 (m, 2H, **H_{11}**), 3.72 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, **H_{13}**), 3.00 (s, 3H, **$H_{14'/15'}$**), 2.88 (s, 3H, **$H_{15'/14'}$**), 2.67 (brs, 2H, **H_{14}**), 2.22 (s, 3H, **H_8**).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-d_6) δ 159.3 (**C**), 157.6 (**C**), 156.1 (**C**), 154.8 (**C**), 153.7 (**C**), 152.6 (**C**), 152.4 (**C**), 150.1 (**CH_{Ar}-C_2**), 142.4 (**C**), 134.2 (**C**), 130.1 (**CH_{Ar}**), 129.7 (**CH_{Ar}**), 128.2 (**CH-C_{10}**), 125.1 (**CH_{Ar}**), 116.7 (**CH_{Ar}**), 115.0 (**CH_{Ar}**), 114.9 (**CH_{Ar}**), 114.3 (**C**), 112.3 (**CH_{Ar}**), 112.0 (**CH_{Ar}**), 110.1 (**CH_{Ar}**), 108.9 (**C**), 43.6 (**CH_2-C_{11}**), 40.6 (**CH_2-C_{13}**), 36.3 (**CH_3-$C_{14'/15'}$**), 36.1 (**CH_3-$C_{15'/14'}$**), 27.3 (**C_{14}**), 13.0 (**CH_3-C_8**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{25}H_{24}N_5O_3$ $[M+H]^+$: 513.2245, found: 513.2235.

Purity (HPLC): 98.7 %.

N-(3-(3-(Benzyloxy)phenoxy)phenyl)-4-(5-methyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxamide (54)



Chemical Formula: $C_{32}H_{29}N_5O_3$
Molecular Weight: 531.62

The reaction was carried out as described in general procedure **A** using aniline **41** (54 mg, 0.19 mmol), 4-nitrophenyl chloroformate (45 mg, 0.22 mmol, 1.2 equiv.), DIPEA (116 µL, 0.67 mmol, 2.4 equiv.) and amine **8** (64 mg, 0.22 mmol, 1.2 equiv.) in dry THF (2.6 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 100 up to 97/3 to afford compound **54** (79 mg, 0.15 mmol, 79 %) as a white powder.

R_f (DCM/MeOH 95/5) 0.29.

Mp: degradation 111 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3863, 2970, 2359, 1638, 1591, 1483, 1433, 1258, 1177, 1132, 1042, 964, 735, 658.

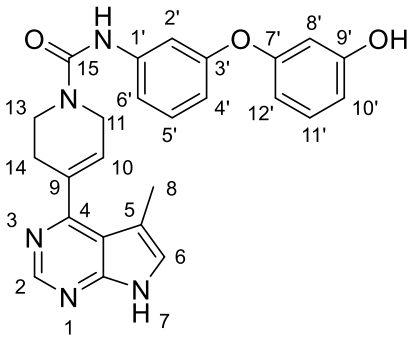
^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-d_6) δ 12.10 (s, 1H, **NH**), 8.95 (brs, 1H**, NH**), 8.92 (s, 1H, **H_2**), 7.76 – 7.46 (m, 10H, **10 x H_{Ar}**), 7.06 (ddd, *J* = 8.3, 2.5, 0.9 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.94 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.92 – 6.81 (m, 2H, **2 x H_{Ar}**), 6.33 – 6.26 (m, 1H, **H_{10}**), 5.36 (s, 2H, **$H_{13'}$**), 4.54 – 4.41 (m, 2H, **H_{11}**), 3.99 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H, **H_{13}**), 2.94 (brs, 2H, **H_{14}**), 2.50 (d, *J* = 1.0 Hz, 3H, **H_8**).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-d_6) δ 159.7 (**C**), 159.3 (**C**), 158.0 (**C**), 156.4 (**C**), 154.8 (**C**), 152.6 (**C**), 150.1 (**C_2**), 142.2 (**C**), 136.8 (**C**), 134.2 (**C**), 130.4 (**CH_{Ar}**), 129.5 (**CH_{Ar}**), 128.4 (**2 x CH_{Ar}**), 128.2 (**CH_{Ar}**), 127.8 (**CH-C_{10}**), 127.7 (**2 x CH_{Ar}**), 125.0 (**CH_{Ar}**), 114.7 (**CH_{Ar}**), 114.3 (**C**), 112.1 (**CH_{Ar}**), 110.7 (**CH_{Ar}**), 109.8 (**CH_{Ar}**), 109.7 (**CH_{Ar}**), 108.9 (**C**), 105.4 (**CH_{Ar}**), 69.4 (**CH_2-$C_{13'}$**), 43.6 (**CH_2-C_{11}**), 40.6 (**CH_2-C_{13}**), 27.3 (**CH_2-C_{14}**), 12.9 (**CH_3-C_8**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{32}H_{30}N_5O_3$ $[M+H]^+$: 532.2343, found: 532.2351.

Purity (HPLC): 97.9 %.

N-(3-(3-Hydroxyphenoxy)phenyl)-4-(5-methyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxamide (55)



Chemical Formula: $C_{25}H_{23}N_5O_3$
Molecular Weight: 441.49

The reaction was carried out as described in general procedure **A** using aniline **40** (79 mg, 0.39 mmol), 4-nitrophenyl chloroformate (95 mg, 0.47 mmol, 1.2 equiv.), DIPEA (246 µL, 1.41 mmol, 2.4 equiv.) and amine **8** (136 mg, 0.47 mmol, 1.2 equiv.) in dry THF (5.6 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 98/2 up to 96/4 to afford compound **55** (80 mg, 0.18 mmol, 46 %) as a white powder.

R_f (DCM/MeOH 95/5) 0.22.

Mp: degradation 144 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3863, 2972, 2903, 2359, 1636, 1593, 1541, 1522, 1435, 1234, 1177, 1065, 970, 849, 781, 655.

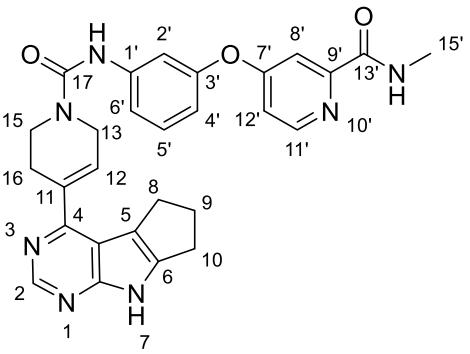
^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-d_6) δ 11.81 (s, 1H, **NH**), 9.55 (s, 1H, **OH**), 8.65 (s, 1H, **NH**), 8.64 (s, 1H, **H_2**), 7.37 – 7.20 (m, 4H, **4 x H_{Ar}**), 7.15 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H, **$H_{5'}$**), 6.61 (ddd, *J* = 7.7, 2.4, 1.3 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.52 (ddd, *J* = 8.1, 2.3, 0.9 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.43 (ddd, *J* = 8.1, 2.4, 0.9 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.38 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H, **$H_{2'}$**), 6.08 – 5.98 (m, 1H, **H_{10}**), 4.20 (d, *J* = 3.1 Hz, 2H, **H_{11}**), 3.71 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H, **H_{13}**), 2.66 (brs, 2H, **H_{14}**), 2.22 (d, *J* = 1.1 Hz, 3H, **H_8**).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-d_6) δ 159.3 (**C**), 158.7 (**C**), 158.0 (**C**), 156.5 (**C**), 154.8 (**C**), 152.6 (**C**), 150.1 (**CH_{Ar}-C_2**), 142.1 (**C**), 134.2 (**C**), 130.3 (**CH_{Ar}-$C_{5'}$**), 129.5 (**CH_{Ar}**), 128.1 (**CH-C_{10}**), 125.0 (**CH_{Ar}**), 114.5 (**CH_{Ar}**), 114.3 (**C**), 112.2 (**CH_{Ar}**), 110.4 (**CH_{Ar}**), 109.9 (**CH_{Ar}**), 109.0 (**CH_{Ar}**), 108.9 (**C**), 105.5 (**CH_{Ar}-$C_{2'}$**), 43.6 (**CH_2-C_{11}**), 40.6 (**CH_2-C_{13}**), 27.3 (**CH_2-C_{14}**), 12.9 (**CH_3-C_8**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{25}H_{24}N_5O_3$ $[M+H]^+$: 442.1874, found: 442.1883.

Purity (HPLC): 96.1 %.

N-Methyl-4-(3-(4-(5,6,7,8-tetrahydrocyclopenta[4,5]pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-1,2,3,6-tetrahydropyridine-1-carboxamido)phenoxy)picolinamide (56)



Chemical Formula: $C_{28}H_{27}N_7O_3$
Molecular Weight: 509.57

The reaction was carried out as described in general procedure **A** using aniline **28** (94 mg, 0.39 mmol), 4-nitrophenyl chloroformate (95 mg, 0.47 mmol, 1.2 equiv.), DIPEA (244 µL, 1.40 mmol, 2.4 equiv.) and amine **12** (148 mg, 0.47 mmol, 1.2 equiv.) in dry THF (5.6 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 100 up to 95/5 to afford compound **56** (75 mg, 0.15 mmol, 38 %) as a pale yellow solid.

R_f (DCM/MeOH 95/5) 0.36.

Mp: 187-189 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3384, 3311, 3123, 3032, 2918, 2849, 1674, 1654, 1589, 1524, 1434, 1359, 1332, 1271, 1214, 1081, 968, 834, 794, 785, 689.

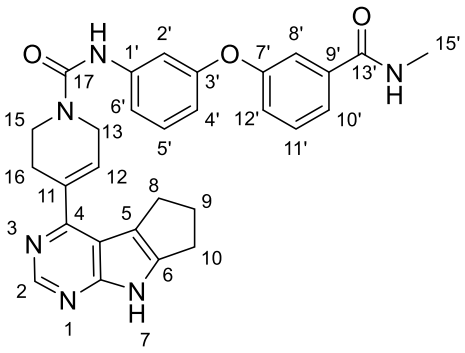
^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-d_6) δ 11.96 (s, 1H, **NH**), 8.85 – 8.68 (m, 2H, **2 x NH**), 8.57 (s, 1H, **H_2**), 8.52 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H, **$H_{11'}$**), 7.57 – 7.32 (m, 4H, **4 x H_{Ar}**), 7.18 (dd, *J* = 5.6, 2.6 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.80 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.57 (brs, 1H, **H_{12}**), 4.25 (brs, 2H, **H_{13}**), 3.70 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H, **H_{15}**), 2.94 – 2.82 (m, 4H, **H_8 + H_{10}**), 2.79 (d, *J* = 4.8 Hz, 3H, **$H_{15'}$**), 2.77 – 2.67 (m, 2H, **H_{16}**), 2.46 – 2.35 (m, 2H, **H_9**).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 165.5 (**C**), 163.8 (**C**), 156.4 (**C**), 154.8 (**C**), 154.7 (**C**), 153.4 (**C**), 152.5 (**C**), 150.4 (**CH_{Ar}-$C_{11'}$**), 148.9 (**CH_{Ar}-C_2**), 145.8 (**C**), 142.7 (**C**), 134.9 (**C**), 130.2 (**CH_{Ar}**), 128.5 (**CH-C_{12}**), 116.6 (**CH_{Ar}**), 115.0 (**C**), 114.4 (**CH_{Ar}**), 113.7 (**CH_{Ar}**), 111.6 (**C**), 111.4 (**CH_{Ar}**), 109.1 (**CH_{Ar}**), 43.9 (**CH_2-C_{13}**), 40.5 (**CH_2-C_{15}**), 27.6 (**CH_2-$C_{8/10}$**), 27.2 (**CH_2-C_9**), 26.1 (**CH_2-C_{16}**), 26.0 (**CH_3-$C_{16'}$**), 25.5 (**CH_2-$C_{10/8}$**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{28}H_{28}N_7O_3$ $[M+H]^+$: 510.2248, found: 510.2245.

Purity (HPLC): 97.0 %.

N-(3-(3-(Methylcarbamoyl)phenoxy)phenyl)-4-(5,6,7,8-tetrahydrocyclopenta[4,5]pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxamide (57)



Chemical Formula: $C_{29}H_{28}N_6O_3$
Molecular Weight: 508.58

The reaction was carried out as described in general procedure **A** using aniline **37** (84 mg, 0.35 mmol), 4-nitrophenyl chloroformate (85 mg, 0.42 mmol, 1.2 equiv.), DIPEA (219 µL, 1.26 mmol, 2.4 equiv.) and amine **12** (132 mg, 0.42 mmol, 1.2 equiv.) in dry THF (5.0 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 100 up to 95/5 to afford compound **57** (84 mg, 0.17 mmol, 47 %) as a beige powder.

R_f (DCM/MeOH 95/5) 0.26.

Mp: 149-151 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3337, 3126, 3034, 2943, 1639, 1605, 1586, 1556, 1540, 1442, 1289, 1252, 1196, 1164, 966, 810, 769, 757, 697.

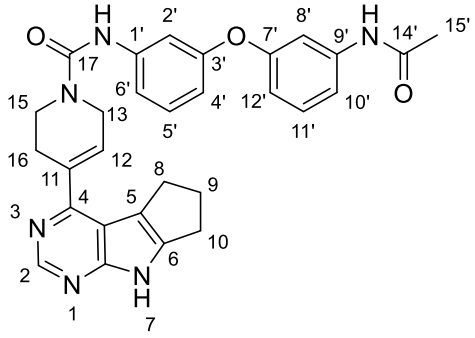
^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-d_6) δ 11.96 (s, 1H, **NH**), 8.66 (s, 1H, **NH**), 8.57 (s, 1H, **H_2**), 8.46 (q, *J* = 4.2 Hz, 1H, **NH**), 7.60 (dt, *J* = 7.8, 1.3 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 7.54 – 7.40 (m, 2H, **2 x H_{Ar}**), 7.39 – 7.20 (m, 3H, **3 x H_{Ar}**), 7.17 (ddd, *J* = 8.1, 2.5, 1.0 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.69 – 6.58 (m, 1H, **H_{Ar}**), 6.59 – 6.52 (m, 1H, **H_{12}**), 4.29 – 4.17 (m, 2H, **H_{13}**), 3.68 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H, **H_{15}**), 2.90 – 2.75 (m, 4H, **H_8 + H_{10}**), 2.76 (d, *J* = 4.5 Hz, 3H, **$H_{15'}$**), 2.72 (brs, 2H, **H_{16}**), 2.41 (p, *J* = 7.0 Hz, 2H, **H_9**).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-d_6) δ 165.8 (**C**), 156.8 (**C**), 156.5 (**C**), 156.4 (**C**), 155.6 (**C**), 154.7 (**C**), 148.8 (**CH_{Ar}-C_2**), 145.8 (**C**), 142.3 (**C**), 136.4 (**C**), 134.8 (**C**), 129.9 (**CH_{Ar}**), 129.6 (**CH_{Ar}**), 128.5 (**CH-C_{12}**), 121.8 (**CH_{Ar}**), 121.2 (**CH_{Ar}**), 117.1 (**CH_{Ar}**), 115.0 (**C**), 114.7 (**CH_{Ar}**), 112.0 (**CH_{Ar}**), 111.6 (**C**), 109.7 (**CH_{Ar}**), 43.9 (**CH_2-C_{13}**), 40.5 (**CH_2-C_{15}**), 27.6 (**CH_2-$C_{8/10}$**), 27.1 (**CH_2-C_9**), 26.2 (**CH_3-$C_{15'}$**), 26.1 (**CH_2-C_{16}**), 25.5 (**CH_2-$C_{10/8}$**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{29}H_{29}N_6O_3$ $[M+H]^+$: 509.2296, found: 509.2301.

Purity (HPLC): > 99.9 %.

N-(3-(3-Acetamidophenoxy)phenyl)-4-(5,6,7,8-tetrahydrocyclopenta[4,5]pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxamide (58)



Chemical Formula: $C_{29}H_{28}N_6O_3$
Molecular Weight: 508.58

The reaction was carried out as described in general procedure **A** using aniline **38** (97 mg, 0.40 mmol), 4-nitrophenyl chloroformate (97 mg, 0.48 mmol, 1.2 equiv.), DIPEA (251 µL, 1.44 mmol, 2.4 equiv.) and amine **12** (151 mg, 0.48 mmol, 1.2 equiv.) in dry THF (5.7 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 100 up to 95/5 to afford compound **58** (129 mg, 0.25 mmol, 64 %) as a beige powder.

R_f (DCM/MeOH 95/5) 0.32.

Mp: 169-171 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3318, 3109, 2916, 2847, 1681, 1650, 1600, 1556, 1533, 1484, 1431, 1368, 1294, 1250, 1152, 967, 866, 776, 732, 684.

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-d_6) δ 11.95 (s, 1H, **NH**), 9.97 (s, 1H, **NH**), 8.64 (s, 1H, **NH**), 8.57 (s, 1H, **H_2**), 7.37 – 7.18 (m, 6H, **6 x H_{Ar}**), 6.68 (dt, *J* = 7.4, 1.8 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.65 – 6.59 (m, 1H, **H_{Ar}**), 6.58 – 6.51 (m, 1H, **H_{12}**), 4.30 – 4.12 (m, 2H, **H_{13}**), 3.68 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, **H_{15}**), 2.96 – 2.79 (m, 4H, **H_8 + H_{10}**), 2.72 (brs, 2H, **H_{16}**), 2.41 (p, *J* = 7.3 Hz, 2H, **H_9**), 2.01 (s, 3H, **$H_{15'}$**).

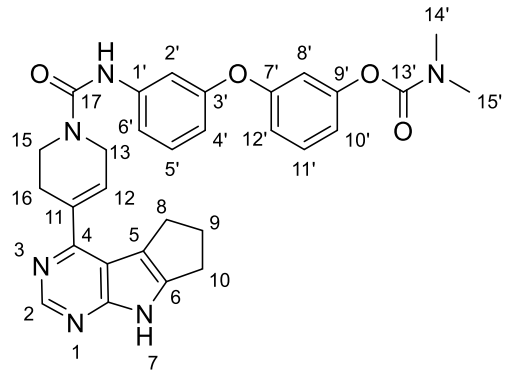
^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 168.4 (**C**), 157.1 (**C**), 156.6 (**C**), 156.4 (**C**), 154.8 (**C**), 154.7 (**C**), 148.9 (**CH_{Ar}-C_2**), 145.7 (**C**), 142.2 (**C**), 140.8 (**C**), 134.9 (**C**), 129.9 (**CH_{Ar}**), 129.5 (**CH_{Ar}**), 128.5 (**CH-C_{12}**), 115.0 (**C**), 114.6 (**CH_{Ar}**), 113.7 (**CH_{Ar}**), 113.1 (**CH_{Ar}**), 112.1 (**CH_{Ar}**), 111.6 (**C**), 109.7 (**CH_{Ar}**), 108.9 (**CH_{Ar}**), 43.9 (**CH_2-C_{13}**), 40.5 (**CH_2-C_{15}**), 27.6 (**CH_2-$C_{8/10}$**), 27.2 (**CH_2-C_9**), 26.1 (**CH_2-C_{16}**), 25.5 (**CH_2-$C_{10/8}$**), 24.0 (**CH_3-$C_{15'}$**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{29}H_{29}N_6O_3$ $[M+H]^+$: 509.2296, found: 509.2295.

Purity (HPLC): > 99.9 %.

3-(3-(4-(5,6,7,8-Tetrahydrocyclopenta[4,5]pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-1,2,3,6-tetrahydropyridine-1-carboxamido)phenoxy)phenyl dimethylcarbamate

59(RB117)



Chemical Formula: $C_{30}H_{30}N_6O_4$
Molecular Weight: 538.61

The reaction was carried out as described in general procedure **A** using aniline **39** (73 mg, 0.27 mmol), 4-nitrophenyl chloroformate (64 mg, 0.32 mmol, 1.2 equiv.), DIPEA (169 µL, 0.97 mmol, 2.4 equiv.) and amine **12** (101 mg, 0.32 mmol, 1.2 equiv.) in dry THF (3.9 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 100 up to 96/4 to afford compound **59**(**RB117**) (96 mg, 0.18 mmol, 66 %) as a pale yellow powder.

R_f (DCM/MeOH 95/5) 0.37.

Mp: 129-131 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 2935, 1706, 1640, 1593, 1538, 1480, 1386, 1248, 1171, 1150, 1073, 964, 866, 773, 753, 684.

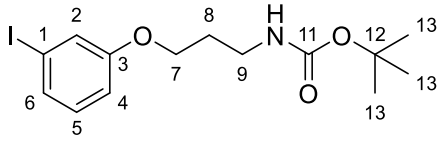
^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-d_6) δ 11.96 (s, 1H, **NH**), 8.68 (s, 1H, **NH**), 8.57 (s, 1H, **H_2**), 7.43 – 7.20 (m, 4H, **4 x H_{Ar}**), 6.91 – 6.83 (m, 2H, **2 x H_{Ar}**), 6.74 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.64 (ddd, *J* = 7.8, 2.4, 1.2 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.59 – 6.53 (m, 1H, **H_{12}**), 4.23 (d, *J* = 3.2 Hz, 2H, **H_{13}**), 3.69 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, **H_{15}**), 3.01 (s, 3H, **$H_{14'}$**), 2.93 – 2.81 (m, 7H, **$H_{15'}$ + H_8 + H_{10}**), 2.72 (brs, 2H, **H_{16}**), 2.46-2.28 (m, 2H**, H_9**).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 157.6 (**C**), 156.4 (**C**), 156.1 (**C**), 154.8 (**C**), 154.7 (**C**), 153.6 (**C**), 152.4 (**C**), 148.9 (**CH_{Ar} -C_2**), 145.7 (**C**), 142.3 (**C**), 134.9 (**C**), 130.1 (**CH_{Ar}**), 129.6 (**CH_{Ar}**), 128.5 (**CH-C_{12}**), 116.6 (**CH_{Ar}**), 115.0 (**C**), 115.0 (**CH_{Ar}**), 114.9 (**CH_{Ar}**), 112.3 (**CH_{Ar}**), 112.0 (**CH_{Ar}**), 111.6 (**C**), 110.1 (**CH_{Ar}**), 43.9 (**CH_2-C_{13}**), 40.5 (**CH_2-C_{15}**), 36.3 (**CH_3-$C_{14'}$**), 36.1 (**CH_3-$C_{15'}$**), 27.6 (**CH_2-$C_{8/10}$**), 27.2 (**CH_2-C_9**), 26.1 (**CH_2-C_{16}**), 25.5 (**CH_2-$C_{10/8}$**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{30}H_{31}N_6O_4$ $[M+H]^+$: 539.2401, found: 539.2404.

Purity (HPLC): > 99.9 %.

tert-Butyl (3-(3-iodophenoxy)propyl)carbamate (61)



Chemical Formula: $C_{14}H_{20}INO_3$
Molecular Weight: 377.22

To a solution of 3-iodophenol (500 mg, 2.27 mmol) in dry MeCN (2.8 mL) was added K_2CO_3 (784 mg, 5.68 mmol, 2.5 equiv.) and 3-(boc-amino)propyl bromide (676 mg, 2.84 mmol, 1.3 equiv.). The reaction mixture was stirred under reflux for 18 h then cooled to rt, diluted with H_2O (24 mL) and DCM (50 mL). The aqueous layer was separated and extracted with DCM (3 x 25 mL) then the combined organic layers were dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of PE/EtOAc from 95/5 up to 90/10 to afford compound **61** (780 mg, 2.07 mmol, 91 %) as a colourless oil.

R_f (PE/EtOAc 95/5) 0.30.

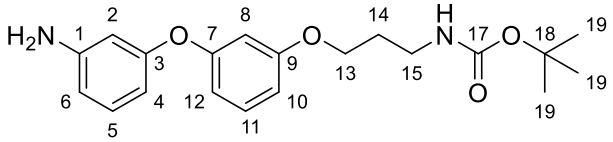
IR (ATR diamond, cm^{-1}) 3338, 2965, 2932, 2880, 1678, 1584, 1280, 1166, 774.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.32 – 7.24 (m, 2H, **2 x H_{Ar}**), 7.00 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.87 (dd, *J* = 8.4, 2.4 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 4.72 (s, 1H, **NH**), 4.00 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, **H_7**), 3.33 (q, *J* = 6.5 Hz, 2H, **H_9**), 1.98 (p, *J* = 6.4 Hz, 2H, **H_8**), 1.46 (s, 9H, **H_{13}**).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 159.4 (**C**), 156.0 (**C**), 130.8 (**CH_{Ar}**), 130.0 (**CH_{Ar}**), 123.7 (**CH_{Ar}**), 114.2 (**CH_{Ar}**), 94.3 (**C**), 79.3 (**C-C_{12}**), 65.9 (**CH_2-C_5**), 37.9 (**CH_2-C_9**), 29.5 (**CH_2-C_8**), 28.4 (**3 x CH_3-C_{13}**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{14}H_{21}INO_3$ $[M+H]^+$: 378.0561, found: 378.0565.

tert-Butyl (3-(3-(3-aminophenoxy)phenoxy)propyl)carbamate (62)



Chemical Formula: $C_{20}H_{26}N_2O_4$
Molecular Weight: 358.44

The reaction was carried out as described in general procedure **G** using **61** (300 mg, 0.80 mmol), 3-aminophenol (105 mg, 0.96 mmol, 1.2 equiv.), copper(I) iodide (8 mg, 0.04 mmol, 5 mol%), 2-picolinic acid (10 mg, 0.08 mmol, 10 mol%), and K_3PO_4 (338 mg, 1.60 mmol, 2.0 equiv.) in dry DMSO (1.6 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a solvent system of PE/EtOAc 80/20 to afford compound **62** (153 mg, 0.43 mmol, 54 %) as a white solid.

R_f (PE/EtOAc 70/30) 0.24.

Mp: 103-105 °C.

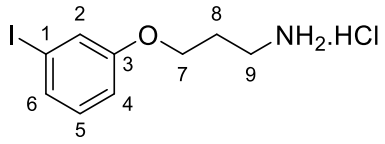
IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3464, 3350, 3228, 2980, 2876, 1698, 1578, 1276, 1049, 766.

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.20 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 7.09 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H , **H_{Ar}**), 6.61 (t, *J* = 8.6 Hz, 2H, **2 x H_{Ar}**), 6.58 – 6.55 (m, 1H, **H_{Ar}**), 6.45 – 6.37 (m, 2H, **2 x H_{Ar}**), 6.34 (brs, 1H, **H_{Ar}**), 4.82 – 4.61 (m, 1H, **NH**), 3.98 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, **H_{13}**), 3.71 (brs, 2H, **NH_2**), 3.38 – 3.17 (m, 2H, **H_{15}**), 2.03 – 1.87 (m, 2H, **H_{14}**), 1.44 (s, 9H, **H_{19}**).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 160.2 (**C**), 158.6 (**C**), 158.3 (**C**), 156.1 (**C**), 148.1 (**C**), 130.5 (**CH_{Ar}**), 130.2 (**CH_{Ar}**), 111.5 (**CH_{Ar}**), 110.4 (**CH_{Ar}**), 109.5 (**CH_{Ar}**), 109.3 (**CH_{Ar}**), 105.9 (**CH_{Ar}**), 105.7 (**CH_{Ar}**), 79.0 (**C-C_{18}**), 66.1 (**CH_2-C_{13}**), 38.2 (**CH_2-C_{15}**), 29.7 (**CH_2-C_{14}**), 28.6 (**3 x CH_3-C_{19}**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{20}H_{27}N_2O_4$ $[M+H]^+$: 359.1965, found: 359.1963.

3-(3-Iodophenoxy)propan-1-amine hydrochloride (63)



Chemical Formula: $C_9H_{13}ClINO$
Molecular Weight: 313.56

To a solution of **61** (1.00 g, 2.65 mmol) in dry DCM (30 mL) was added a 4 M solution of HCl in 1,4-dioxane (5.30 mL, 21.2 mmol, 8.0 equiv.). The reaction mixture was stirred at rt for 3 h then concentrated *in vacuo*. The residu was triturated in Et_2O (10 mL), filtered and the solid was washed with Et_2O (3 x 10 mL). After completion, the precipitate was filtered then washed with Et_2O (3 x 20 mL) to afford compound **63** (678 mg, 2.16 mmol, 82 %) as a white powder. The product was used without further purification in the next step.

Mp: 183-185 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) 2968, 2889, 2756, 2624, 1590, 1562, 1235, 774.

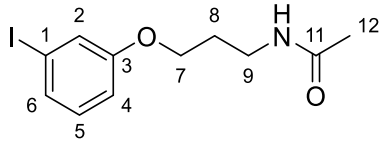
NMR analysis were done on the free base form.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 7.29 – 7.24 (m, 2H, **2 x H_{Ar}**), 6.98 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.88 – 6.83 (m, 1H, **H_{Ar}**), 4.01 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H, **H_7**), 2.89 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, **H_9**), 1.90 (p, *J* = 6.5 Hz, 2H, **H_8**), 1.32 (s, 2H, **NH_2**).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 159.6 (**C**), 130.8 (**CH_{Ar}**), 129.9 (**CH_{Ar}**), 123.7 (**CH_{Ar}**), 114.3 (**CH_{Ar}**), 94.5 (**C**), 66.1 (**CH_2-C_7**), 39.2 (**CH_2-C_9**), 33.0 (**CH_2-C_8**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_9H_{13}INO$ $[M+H]^+$: 278.0036, found: 278.0036.

N-(3-(3-Iodophenoxy)propyl)acetamide (64)



Chemical Formula: $C_{11}H_{14}INO_2$
Molecular Weight: 319.14

To a solution of **63** (335 mg, 1.07 mmol) in Ac_2O (2.2 mL) was added Et_3N (0.17 mL, 1.22 mmol, 1.1 equiv.). The reaction mixture was stirred at rt for 48 h then diluted with H_2O and basified to pH 14 with a 1 M aqueous solution of KOH. The aqueous layer was extracted with DCM (3 x 50 mL), then the combined organic layers were washed with a saturated aqueous solution of $NaHCO_3$, brine, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo* to afford compound **64** (257 mg, 0.81 mmol, 76 %) as a yellow oil. The product was used without further purification in the next step.

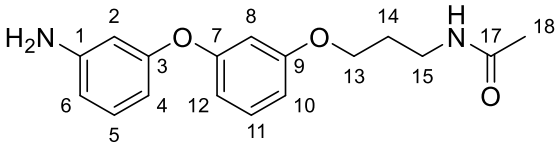
IR (ATR diamond, cm^{-1}) 3312, 3248, 2914, 2849, 1730, 1470, 1197, 1179, 717.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 7.29 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 7.25 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 7.00 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.85 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 5.75 (brs, 1H, **NH**), 4.00 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H, **H_7**), 3.44 (q, *J* = 6.3 Hz, 2H, **H_9**), 2.05 – 1.95 (m, 5H, **H_8 + H_{12}**).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 170.3 (**C-C_{11}**), 159.3 (**C**), 131.0 (**CH_{Ar}**), 130.3 (**CH_{Ar}**), 123.8 (**CH_{Ar}**), 114.3 (**CH_{Ar}**), 94.5 (**C**), 66.4 (**CH_2-C_7**), 37.4 (**CH_2-C_9**), 29.1 (**CH_2-C_8**), 23.5 (**CH_2-C_{12}**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{11}H_{15}INO_2$ $[M+H]^+$: 320.0142, found: 320.0147.

N-(3-(3-(3-Aminophenoxy)phenoxy)propyl)acetamide (65)



Chemical Formula: $C_{17}H_{20}N_2O_3$
Molecular Weight: 300.36

The reaction was carried out as described in general procedure **G** using **64** (257 mg, 0.81 mmol), 3-aminophenol (106 mg, 0.97 mmol, 1.2 equiv.), copper(I) iodide (8 mg, 0.04 mmol, 5 mol%), 2-picolinic acid (10 mg, 0.08 mmol, 10 mol%), and K_3PO_4 (344 mg, 1.62 mmol, 2.0 equiv.) in dry DMSO (1.6 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 100 up to 98/2 to afford compound **65** (151 mg, 0.50 mmol, 62 %) as a colourless oil.

R_f (DCM/MeOH 98/2) 0.15.

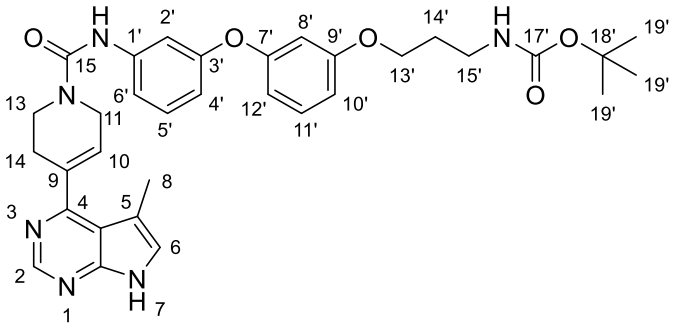
IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3338, 2931, 1581, 1485, 1177, 1132, 767.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.25 – 7.15 (m, 1H, **H_{Ar}**), 7.14 – 7.04 (m, 1H, **H_{Ar}**), 6.66 – 6.58 (m, 2H, **2 x H_{Ar}**), 6.56 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.46 – 6.36 (m, 2H, **2 x H_{Ar}**), 6.33 (t, *J* = 2.2 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 5.78 (brs, 1H, **NH**), 4.00 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H, **H_{13}**), 3.70 (brs, 2H, **NH_2**), 3.44 (q, *J* = 6.3 Hz, 2H, **H_{15}**), 2.07 – 1.90 (m, 5H, **H_{14} + H_{18}**).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 170.3 (**C-C_{17}**), 160.0 (**C**), 158.6 (**C**), 158.2 (**C**), 148.2 (**C**), 130.5 (**CH_{Ar}**), 130.3 (**CH_{Ar}**), 111.6 (**CH_{Ar}**), 110.5 (**CH_{Ar}**), 109.4 (**CH_{Ar}**), 109.2 (**CH_{Ar}**), 105.9 (**CH_{Ar}**), 105.6 (**CH_{Ar}**), 66.5 (**CH_2-C_{13}**), 37.6 (**CH_2-C_{15}**), 29.0 (**CH_2-C_{14}**), 23.5 (**CH_3-C_{18}**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{17}H_{21}N_2O_3$ $[M+H]^+$: 301.1547, found: 301.1549.

tert-Butyl (3-(3-(3-(4-(5-methyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-1,2,3,6-tetrahydropyridine-1-carboxamido)phenoxy)phenoxy)propyl)carbamate (66)



Chemical Formula: $C_{33}H_{38}N_6O_5$
Molecular Weight: 598.70

The reaction was carried out as described in general procedure **A** using aniline **62** (122 mg, 0.34 mmol), 4-nitrophenyl chloroformate (83 mg, 0.41 mmol, 1.2 equiv.), DIPEA (212 µL, 1.23 mmol, 3.6 equiv.) and amine **8** (118 mg, 0.41 mmol, 1.2 equiv.) in dry THF (4.9 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a solvent system of DCM/MeOH 98/2 to afford compound **66** (158 mg, 0.26 mmol, 77 %) as a white solid.

R_f (DCM/MeOH 95/5) 0.21.

Mp: 103-105 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) v: 3274, 2977, 2927, 1644, 1591, 1176, 1152, 772.

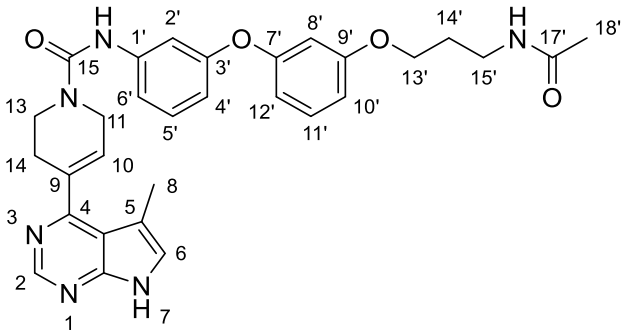
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.81 (s, 1H, **NH**), 8.66 (s, 1H, **NH**), 8.64 (s, 1H, **H_2**), 7.37 – 7.16 (m, 5H, **H_6 + 4 x H_{Ar}**), 6.89 – 6.79 (m, 1H, **NH**), 6.68 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.62 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.58 – 6.50 (m, 2H, **2 x H_{Ar}**), 6.08 – 5.98 (m, 1H, **H_{10}**), 4.20 (brs, 2H, **H_{11}**), 3.94 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, **$H_{13'}$**), 3.71 (t, *J* = 4.9 Hz, 2H, **H_{13}**), 3.06 (q, *J* = 6.1 Hz, 2H, **$H_{15'}$**), 2.66 (brs, 2H, **H_{14}**), 2.22 (s, 3H, **H_8**), 1.81 (p, *J* = 6.8 Hz, 2H, **$H_{14'}$**), 1.35 (s, 9H, **$H_{19'}$**).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 160.0 (**C**), 159.3 (**C**), 158.0 (**C**), 156.5 (**C**), 155.6 (**C**), 154.9 (**C**), 152.6 (**C**), 150.1 (**CH_{Ar}-C_2**), 142.2 (**C**), 134.2 (**C**), 130.4 (**CH_{Ar}**), 129.5 (**CH_{Ar}**), 128.2 (**CH-C_{10}**), 125.0 (**CH_{Ar}**), 114.6 (**CH_{Ar}**), 114.3 (**C**), 112.1 (**CH_{Ar}**), 110.5 (**CH_{Ar}**), 109.8 (**CH_{Ar}**), 109.4 (**CH_{Ar}**), 108.9 (**C**), 105.0 (**CH_{Ar}**), 77.5 (**C-$C_{18'}$**), 65.4 (**CH_2-$C_{13'}$**), 43.6 (**CH_2-C_{11}**), 40.6 (**CH_2-C_{13}**), 36.9 (**CH_2-$C_{15'}$**), 29.1 (**CH_2-$C_{14'}$**), 28.2 (**3 x CH_3-$C_{19'}$**), 27.3 (**CH_2-C_{14}**), 12.9 (**CH_3-C_8**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{33}H_{39}N_6O_5$ $[M+H]^+$: 599.2976, found: 599.2981.

Purity (HPLC): 99.0 %.

N-(3-(3-(3-Acetamidopropoxy)phenoxy)phenyl)-4-(5-methyl-7*H*-pyrrolo[2,3-]pyrimidin-4-yl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxamide (67)



Chemical Formula: $C_{30}H_{32}N_6O_4$
Molecular Weight: 540.62

The reaction was carried out as described in general procedure **A** using aniline **65** (147 mg, 0.49 mmol), 4-nitrophenyl chloroformate (121 mg, 0.60 mmol, 1.2 equiv.), DIPEA (320 μL, 1.80 mmol, 3.6 equiv.) and amine **8** (172 mg, 0.60 mmol, 1.2 equiv.) in dry THF (7.0 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a solvent system of DCM/MeOH 98/2 to afford compound **67** (181 mg, 0.33 mmol, 67 %) as a white solid.

R_f (DCM/MeOH 95/5) 0.14.

Mp: 115-117 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3228, 3106, 2925, 2867, 1637, 1591, 1537, 1434, 1178, 770.

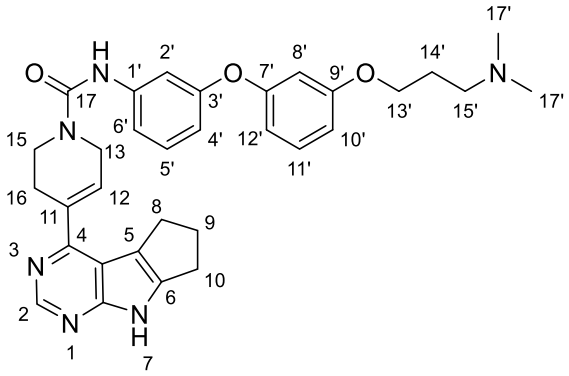
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 11.82 (s, 1H, **NH**), 8.67 (s, 1H, **NH**), 8.64 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, **H_2**), 7.88 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H, **NH**), 7.34 – 7.21 (m, 5H, **5 x H_{Ar}**), 6.69 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.62 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.59 – 6.51 (m, 2H, **2 x H_{Ar}**), 6.03 (s, 1H, **H_{10}**), 4.20 (brs, 2H, **H_{11}**), 3.96 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, **$H_{13'}$**), 3.71 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, **H_{13}**), 3.16 (q, *J* = 6.6 Hz, 2H, **$H_{15'}$**), 2.66 (brs, 2H, **H_{14}**), 2.22 (s, 3H, **H_8**), 1.82 (q, *J* = 6.5 Hz, 2H, **$H_{14'}$**), 1.79 (s, 3H, **$H_{18'}$**).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 169.1 (**C-$C_{17'}$**), 160.0 (**C**), 159.3 (**C**), 158.0 (**C**), 156.5 (**C**), 154.9 (**C**), 152.6 (**C**), 150.1 (**CH_{Ar}-C_2**), 142.2 (**C**), 134.2 (**C**), 130.4 (**CH_{Ar}**), 129.5 (**CH_{Ar}**), 128.2 (**CH-C_{10}**), 125.0 (**CH_{Ar}**), 114.7 (**CH_{Ar}**), 114.3 (**C**), 112.1 (**CH_{Ar}**), 110.5 (**CH_{Ar}**), 109.8 (**CH_{Ar}**), 109.4 (**CH_{Ar}**), 108.9 (**C**), 105.0 (**CH_{Ar}**), 65.4 (**CH_2-C_{11}**), 43.6 (**CH_2-$C_{13'}$**), 40.6 (**CH_2-C_{13}**), 35.5 (**CH_2-$C_{15'}$**), 28.8 (**CH_2-$C_{14'}$**), 27.3 (**CH_2-C_{14}**), 22.6 (**CH_3-$C_{18'}$**), 12.9 (**CH_3-C_8**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{30}H_{33}N_6O_4$ $[M+H]^+$: 541.2558, found: 541.2561.

Purity (HPLC): 99.0 %.

N-(3-(3-(3-(Dimethylamino)propoxy)phenoxy)phenyl)-4-(5,6,7,8-tetrahydrocyclopenta[4,5]pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxamide (68)



Chemical Formula: $C_{32}H_{36}N_6O_3$
Molecular Weight: 552.68

The reaction was carried out as described in general procedure **A** using aniline **71** (100 mg, 0.35 mmol), 4-nitrophenyl chloroformate (85 mg, 0.42 mmol, 1.2 equiv.), DIPEA (219 μL, 1.26 mmol, 2.4 equiv.) and amine **12** (132 mg, 0.42 mmol, 1.2 equiv.) in dry THF (5.0 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 100 up to 90/10 to afford compound **68** (67 mg, 0.12 mmol, 35 %) as a yellow powder.

R_f (DCM/MeOH 90/10) 0.29.

Mp: 117-119 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3129, 2944, 2856, 1640, 1590, 1538, 1485, 1434, 1259, 1178, 1152, 1073, 981, 843, 770, 685, 604.

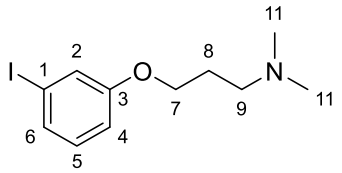
^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-d_6) δ 11.97 (s, 1H, **NH**), 8.66 (s, 1H, **NH**), 8.57 (s, 1H, **H_2**), 7.37 – 7.19 (m, 4H, **4 x H_{Ar}**), 6.73 – 6.66 (m, 1H, **H_{Ar}**), 6.66 – 6.59 (m, 1H, **H_{Ar}**), 6.59 – 6.51 (m, 3H, **2 x H_{Ar} + H_{12}**), 4.27 – 4.17 (m, 2H, **H_{13}**), 3.97 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, **$H_{13'}$**), 3.69 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H, **H_{15}**), 2.95 – 2.79 (m, 4H, **H_8 + H_{10}**), 2.72 (brs, 2H, **H_{16}**), 2.46 – 2.31 (m, 4H, **H_9 + $H_{15'}$**), 2.15 (s, 6H, **$H_{17'}$**), 1.82 (p, *J* = 6.7 Hz, 2H, **$H_{14'}$**).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-d_6) δ 160.0 (**C**), 158.0 (**C**), 156.5 (**C**), 156.4 (**C**), 154.8 (**C**), 154.8 (**C**), 148.9 (**CH_{Ar}-C_2**), 145.7 (**C**), 142.2 (**C**), 134.9 (**C**), 130.4 (**CH_{Ar}**), 129.5 (**CH_{Ar}**), 128.5 (**CH-C_{12}**), 115.0 (**C**), 114.6 (**CH_{Ar}**), 112.1 (**CH_{Ar}**), 111.6 (**C**), 110.5 (**CH_{Ar}**), 109.8 (**CH_{Ar}**), 109.3 (**CH_{Ar}**), 104.9 (**CH_{Ar}**), 65.9 (**CH_2-$C_{13'}$**), 55.5 (**CH_2-$C_{15'}$**), 45.0 (**2 x CH_3-$C_{17'}$**), 43.9 (**CH_2-C_{13}**), 40.5 (**CH_2-C_{15}**), 27.7 (**CH_2-$C_{8/10}$**), 27.2 (**CH_2-C_9**), 26.7 (**CH_2-$C_{14'}$**), 26.2 (**CH_2-C_{16}**), 25.5 (**CH_2-$C_{10/8}$**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{32}H_{37}N_6O_3$ $[M+H]^+$: 553.2922, found: 553.2926.

Purity (HPLC): 98.3 %.

3-(3-Iodophenoxy)-*N*,*N*-dimethylpropan-1-amine (70)



Chemical Formula: $C_{11}H_{16}INO$
Molecular Weight: 305.16

A 20 mL microwave reaction vial was charged with 3-iodophenol (300 mg, 1.36 equiv.), 3-dimethylamino-1-propyl chloride hydrochloride (280 mg, 1.77 mmol, 1.3 equiv.), Cs_2CO_3 (1.10 g, 3.40 mmol, 2.5 equiv.) and NaI (51 mg, 0.34 mmol, 0.25 equiv.). Dry MeCN (14 mL) was added under argon, the vial was sealed and the reaction mixture was stirred at 67 °C for 18 h. It was then cooled to rt, the inorganic salts were filtered and the filtrate was concentrated *in vacuo*. The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH/NH_4OH from 98/2/0.1 up to 95/5/0.1 to afford compound **70** (316 mg, 1.04 mmol, 76 %) as an orange oil.

R_f (DCM/MeOH/NH_4OH 95/5/0.1) 0.36.

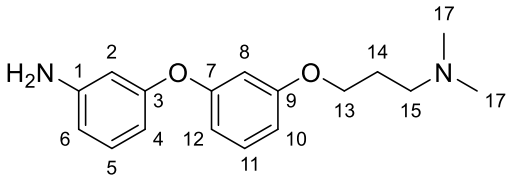
IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 2914, 2686, 2505, 2454, 1584, 1471, 1462, 1405, 1290, 1228, 1042, 957, 846, 767, 681.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) 7.29 – 7.26 (m, 2H, **2 x H_{Ar}**), 6.98 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.86 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 3.99 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, **H_7**), 2.54 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, **H_9**), 2.32 (s, 6H, **H_{11}**), 2.00 (p, *J* = 6.6 Hz, 2H, **H_8**).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) 159.6 (**C-C_3**), 130.9 (**CH_{Ar}**), 130.0 (**CH_{Ar}**), 123.8 (**CH_{Ar}**), 114.3 (**CH_{Ar}**), 94.5 (**C-C_1**), 66.3 (**CH_2-C_7**), 56.4 (**CH_2-C_9**), 45.4 (**2 x CH_3-C_{11}**), 27.2 (**CH_2-C_8**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{11}H_{17}INO$ $[M+H]^+$: 306.0349, found: 306.0352.

3-(3-(3-(Dimethylamino)propoxy)phenoxy)aniline (71)



Chemical Formula: $C_{17}H_{22}N_2O_2$
Molecular Weight: 286.38

The reaction was carried out as described in general procedure **G** using **70** (290 mg, 0.95 mmol), 3-aminophenol (124 mg, 1.14 mmol, 1.2 equiv.), copper(I) iodide (10 mg, 0.05 mmol, 5 mol%), 2-picolinic acid (12 mg, 0.10 mmol, 10 mol%), and K_3PO_4 (403 mg, 1.90 mmol, 2.0 equiv.) in dry DMSO (2 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 99/1 up to 95/5 to afford compound **71** (115 mg, 0.42 mmol, 42 %) as an orange oil.

R_f (DCM/MeOH 95/5) 0.35.

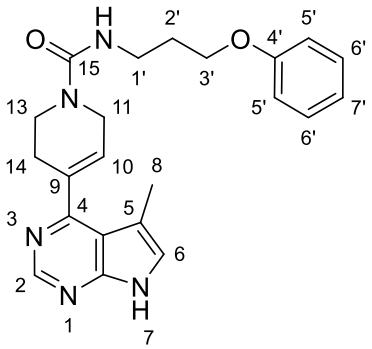
IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3409, 3327, 3220, 3037, 2965, 1592, 1487, 1469, 1279, 1262, 1181, 1153, 1062, 994, 843, 770, 687.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.17 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 7.06 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.62 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.60 – 6.55 (m, 2H, **2 x H_{Ar}**), 6.38 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, **2 x H_{Ar}**), 6.31 (s, 1H, **H_{Ar}**), 3.95 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, **H_{13}**), 3.77 (brs, 2H, **NH_2**), 2.43 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, **H_{15}**), 2.24 (s, 6H, **H_{17}**), 1.97 – 1.88 (m, 2H, **H_{14}**).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 160.3 (**C**), 158.4 (**C**), 158.2 (**C**), 148.1 (**C**), 130.3 (**CH_{Ar}**), 130.0 (**CH_{Ar}**), 111.2 (**CH_{Ar}**), 110.2 (**CH_{Ar}**), 109.4 (**CH_{Ar}**), 109.0 (**CH_{Ar}**), 105.7 (**CH_{Ar}**), 105.6 (**CH_{Ar}**), 66.3 (**CH_2-C_{13}**), 56.4 (**CH_2-C_{15}**), 45.5 (**2 x CH_3-C_{17}**), 27.5 (**CH_2-C_{14}**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{17}H_{23}N_2O_2$ $[M+H]^+$: 287.1754, found: 287.1759.

4-(5-Methyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-*N*-(3-phenoxypropyl)-3,6-dihydro-2*H*-pyridine-1-carboxamide (72)



Chemical Formula: $C_{22}H_{25}N_5O_2$
Molecular Weight: 391.47

The reaction was carried out as described in general procedure **A** using amine **75** (90 mg, 0.60 mmol), 4-nitrophenyl chloroformate (144 mg, 0.71 mmol, 1.2 equiv.), DIPEA (365 µL, 2.15 mmol, 3.6 equiv.) and amine **8** (205 mg, 0.71 mmol, 1.2 equiv.) in dry THF (8.5 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 100 up to 95/5 to afford compound **72** (140 mg, 0.40 mmol, 67 %) as a pale yellow powder.

R_f (DCM/MeOH 94/5/1) 0.45.

Mp: 94-96 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3186, 2924, 1695, 1623, 1599, 1537, 1496, 1469, 1452, 1401, 1343, 1330, 1243, 1216, 1060, 755, 733, 692.

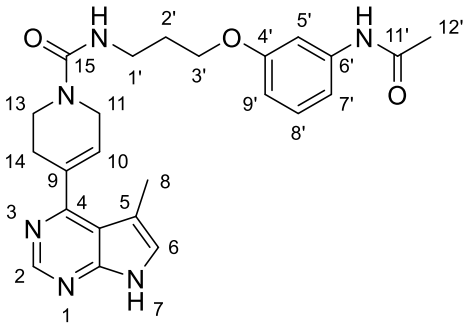
^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-d_6) δ 11.81 (s, 1H, **NH**), 8.63 (s, 1H, **H_2**), 7.38 – 7.20 (m, 3H, **H_6+$H_{6'}$**), 6.98 – 6.85 (m, 3H, **NH + $H_{5'}$**), 6.65 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H,**$H_{7'}$**), 6.05 – 5.97 (m, 1H, **H_{10}**), 4.10 – 3.94 (m, 4H, **H_{11}+$H_{3'}$**), 3.58 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H, **H_{13}**), 3.29 – 3.16 (m, 2H, **$H_{1'}$**), 2.59 (s, 2H, **H_{14}**), 2.21 (s, 3H, **H_8**), 1.90 (p, *J* = 6.6 Hz, 2H, **$H_{2'}$**).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-d_6) δ 159.5 (**C**), 158.6 (**C**), 157.5 (**C**), 152.6 (**CH_{Ar}-C_2**), 150.1 (**C**), 134.2 (**C**), 129.4 (**2 x CH_{Ar}-$C_{6'}$**), 128.6 (**CH-C_{10}**), 125.0 (**CH_{Ar}-$C_{7'}$**), 120.4 (**2 x CH_{Ar}-$C_{5'}$**), 114.4 (**CH_{Ar}-C_6**), 114.2 (**C**) 108.9 (**C-C_5**), 65.3 (**CH_2-$C_{3'}$**), 43.3 (**CH_2-C_{11}**), 40.1 (**CH_2-C_{13}**), 37.2 (**CH_2-$C_{1'}$**), 29.6 (**CH_2-$C_{2'}$**), 27.2 (**CH_2-C_{14}**), 12.8 (**CH_3-C_8**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{22}H_{26}N_5O_2$ $[M+H]^+$: 392.2081, found: 392.2083.

Purity (HPLC): > 99.9 %.

N-(3-(3-acetamidophenoxy)propyl)-4-(5-methyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxamide (73)



Chemical Formula: $C_{24}H_{28}N_6O_3$
Molecular Weight: 448.53

To a suspension of **81** (80 mg, 0.33 mmol) in a mixture of dry MeCN (3.3 mL) and dry DMF (1 mL) was added DIPEA (264 µL, 1.52 mmol, 4.6 equiv.). The solution was preheated to 70 °C then N,N'-disuccinimidyl carbonate (102 mg, 0.40 mmol, 1.2 equiv.) was added and the reaction mixture was stirred at 70 °C for an additional 30 min. The amine **8** (115 mg, 0.40 mmol, 1.2 equiv.) was added and the suspension was stirred at 90 °C for 1.5 h. After completion, the reaction mixture was diluted with H_2O (15 mL) and the aqueous layer was extracted with DCM (3 x 40 mL). The combined organic layers were washed with brine (3 x 10 mL), dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 100 up to 95/5. The obtained solid was dissolved in EtOH/EtOAc and co-evaporated with heptane (3 x 25 mL) then dried at 50 °C for 3 days under high vacuum to afford **73** (54 mg, 0.12 mmol, 36 %) as a white solid.

R_f (DCM/MeOH 95/5) 0.08.

Mp: 139-141 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3382, 3272, 2919, 1654, 1615, 1534, 1493, 1440, 1424, 1271, 1257, 1207, 2284, 1156, 1028, 951, 837, 784, 761, 686.

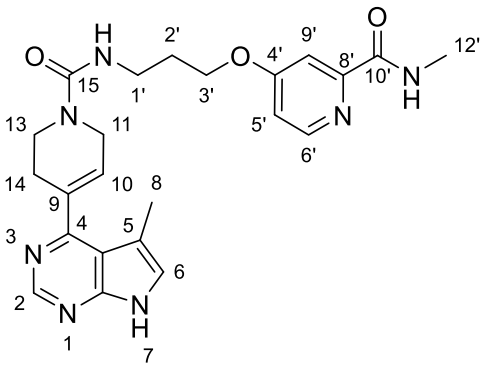
^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-d_6) δ 11.85 (s, 1H, **NH**), 9.88 (s, 1H, **NH**), 8.64 (s, 1H, **H_2**), 7.36 – 7.26 (m, 2H, **2 x H_{Ar}**), 7.16 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 7.06 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.71 – 6.56 (m, 2H, **NH + H_{Ar}**), 6.00 (brs, 1H, **H_{10}**), 4.12 – 4.01 (m, 2H, **H_{11}**), 3.96 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H, **$H_{3'}$**), 3.58 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H, **H_{13}**), 3.28 – 3.17 (m, 2H, **$H_{1'}$**), 2.58 (brs, 2H, **H_{14}**), 2.20 (d, *J* = 1.1 Hz, 3H, **H_8**), 2.02 (s, 3H, **$H_{12'}$**), 1.89 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, **$H_{2'}$**).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-d_6) δ 168.3 (**C-$C_{11'}$**), 159.5 (**C**), 158.8 (**C**), 157.5 (**C**), 152.6 (**C**), 150.1 (**CH_{Ar}-C_2**), 140.4 (**C**), 134.2 (**C**), 129.4 (**CH-C_{10}**), 128.5 (**CH_{Ar}**), 124.9 (**CH_{Ar}**), 114.3 (**C**), 111.2 (**CH_{Ar}**), 108.9 (**C**), 108.8 (**CH_{Ar}**), 105.4 (**CH_{Ar}**), 65.3 (**CH_2-$C_{3'}$**), 43.3 (**CH_2-C_{11}**), 40.0 (**CH_2-C_{13}**), 37.2 (**CH_2-$C_{1'}$**), 29.6 (**CH_2-$C_{2'}$**), 27.2 (**CH_2-C_{14}**), 24.1 (**CH_3-$C_{12'}$**), 12.9 (**CH_3-C_8**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{24}H_{29}N_6O_3$ $[M+H]^+$: 449.2296, found: 449.2293.

Purity (HPLC): > 99.9 %.

N-Methyl-4-[3-[[4-(5-methyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-3,6-dihydro-2*H*-pyridine-1-carbonyl]amino]propoxy]pyridine-2-carboxamide (74)



Chemical Formula: $C_{23}H_{27}N_7O_3$
Molecular Weight: 449.51

The reaction was carried out as described in general procedure **A** using amine **82** (80 mg, 0.38 mmol), 4-nitrophenyl chloroformate (93 mg, 0.46 mmol, 1.2 equiv.), DIPEA (235 μL, 1.37 mmol, 3.6 equiv.) and amine **8** (132 mg, 0.46 mmol, 1.2 equiv.) in dry THF (6.0 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH/NH_4OH from 100 up to 95/5/1 to afford compound **74** (105 mg, 0.23 mmol, 61 %) as a white powder

R_f (DCM/MeOH/NH_4OH 94/5/1) 0.45.

Mp: 121-123 °C

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3279, 2954, 2357, 1697, 1669, 1594, 1534, 1465, 1402, 1326, 1309, 1217, 997, 794.

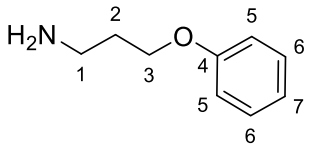
^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-d_6) δ 11.80 (s, 1H, **NH**), 8.71 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H, **NH**), 8.63 (s, 1H, **H_2**), 8.42 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H, **$H_{6'}$**), 7.53 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, **H_6**), 7.30 (s, 1H, **$H_{9'}$**), 7.15 – 7.12 (m, 1H, **$H_{5'}$**), 6.67 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, **NH**), 5.99 (s, 1H, **H_{10}**), 4.18 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, **$H_{3'}$**), 4.06 (d, *J* = 3.3 Hz, 2H, **H_{11}**), 3.58 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, **H_{13}**), 3.25 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H, **$H_{1'}$**), 2.81 (d, *J* = 4.8 Hz, 3H, **H_8**), 2.58 (s, 2H, **H_{14}**), 2.21 (s, 3H, **$H_{12'}$**), 1.94 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, **$H_{2'}$**).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-d_6) δ 165.8 (**C**), 164.1 (**C**), 159.5 (**C**), 157.5 (**C**), 152.6 (**C**), 152.1 (**C**), 150.1 (**CH_{Ar}-$C_{6'}$**), 149.7 (**CH_{Ar}-C_2**), 134.2 (**C**), 128.5 (**CH_{Ar}-C_6**), 124.9 (**CH-C_{10}**), 114.3 (**C**), 112.6 (**CH_{Ar}-$C_{5'}$**), 108.9 (**CH_{Ar}-$C_{9'}$**), 107.8 (**C**), 66.1 (**CH_2-C_{11}**), 43.3 (**CH_2-$C_{3'}$**), 40.1 (**CH_2-C_{13}**) 36.9 (**CH_2-$C_{1'}$**), 29.2 (**CH_2-$C_{2'}$**), 27.2 (**CH_2-C_{14}**), 25.9 (**CH_3-$C_{12'}$**), 12.8 (**CH_3-C_8**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{23}H_{28}N_7O_3$ $[M+H]^+$: 450.2250, found: 450.2248.

Purity (HPLC): > 99.9 %.

3-Phenoxypropylamine (75)



Chemical Formula: $C_9H_{13}NO$
Molecular Weight: 151.21

To a solution of **77** (350 mg, 1.98 mmol) in dry THF (3 mL) were added triphenylphosphine (1.3 g, 3.95 mmol, 2.0 equiv.) and water (1 mL, 55.3 mmol, 28 equiv.). The mixture was stirred at rt for 16 h then the solvent was removed under reduce pressure and the crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of PE/EtOAc/(MeOH with 2 % of NEt_3) from 50/50/0 up to 0/50/50 to afford compound **75** (197 mg, 1.30 mmol, 66 %) as a yellow oil.

R_f (DCM/MeOH/NH_4OH 90/10/1) 0.60.

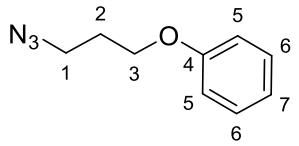
IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 2943, 1598, 1585, 1494, 1470, 1390, 1300, 1239, 1171, 1152, 1080, 1033, 931, 883, 815, 750, 690, 589.

^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 7.32 – 7.10 (m, 2H, **H_6**), 7.00 – 6.79 (m, 3H, **H_5+H_7**), 4.05 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H, **H_3**), 3.07 – 2.78 (m, 2H, **NH_2**), 2.16 – 1.79 (m, 4H, **H_2+H_1**).

^{13}C NMR (63 MHz, $CDCl_3$) δ 159.0 (**C-C_4**), 129.6 (**2 x CH_{Ar}-C_6**), 129.5 (**CH_{Ar}-C_7**), 120.8 (**2 x CH_{Ar}-C_5**), 114.5 (**CH_2-C_3**), 65.8 (**CH_2-C_1**), 39.3 (**CH_2-C_2**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for C_9H_1O $[M+H]^+$: 152.1070 , found: 152.1071.

(1-Azidopropoxy)benzene (77)



Chemical Formula: $C_9H_{11}N_3O$
Molecular Weight: 177.21

To a suspension of (3-bromopropoxy)benzene (330 µL, 2.09 mmol) in dry DMF (2 mL) was added sodium azide (172 mg, 4.18 mmol, 2.0 equiv.). The reaction mixture was stirred at 40 °C for 48 h then diluted with H_2O (15 mL) and EtOAc (30 mL). The organic layer was separated, washed with brine (3 x 20 mL), dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of PE/EtOAc from 100 up to 90/10 to afford compound **77** (366 mg, 2.07 mmol, 99 %) as a colourless oil.

R_f (PE/EtOAc 9/1) 0.70.

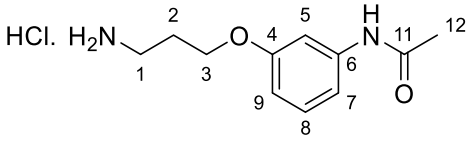
IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3063, 3041, 2931, 2876, 2093, 1599, 1587, 1470, 1390, 1291, 1240, 1171, 1081, 1043, 963, 883, 817, 751, 690.

^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 7.38 – 7.19 (m, 2H, **H_6**), 7.05 – 6.76 (m, 3H, **H_5+H_7**), 4.05 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H, **H_3**), 3.52 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, **H_1**), 2.11 – 1.99 (m, 2H, **H_2**).

^{13}C NMR (63 MHz, $CDCl_3$) δ 158.8 (**C-C_4**), 129.6 (**2 x CH_{Ar}-C_6**), 121.0 (**CH_{Ar}-C_7**), 114.6 (**2 x CH_{Ar}-C_5**), 64.5 (**CH_2-C_3**), 48.4 (**CH_2-C_1**), 28.9 (**CH_2-C_2**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_9H_{12}NO$ $[M-N_2+H]^+$: 150.0911 , found: 150.0913.

N-(3-(3-Aminopropoxy)phenyl)acetamide hydrochloride (81)



Chemical Formula: $C_{11}H_{17}ClN_2O_2$
Molecular Weight: 244.72

Step 1: The reaction was carried out as described in general procedure **B** using 3-acetamidophenol (151 mg, 1.00 mmol), 3-(Boc-amino)-1-propanol (350 mg, 2.00 mmol, 2.0 equiv.), PPh_3 (446 mg, 1.70 mmol, 1.7 equiv.) and DIAD (335 µL, 1.70 mmol, 1.7 equiv.) in dry THF (3.6 mL). The crude reaction mixture was filtered on silica gel using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 100 up to 98/2 [$\mathbf{R_f}$ (DCM/MeOH 95/5) = 0.38].

Step 2: The intermediate product was dissolved in dry DCM (7.9 mL), the reaction mixture was cooled to 0 °C then HCl 4N in 1,4-dioxane (1.6 mL, 6.3 mmol, 8.0 equiv.) was added. The solution was stirred at rt for 18 h then filtered. The precipitate was washed with Et_2O (3 x 15 mL) and dried under high vacuum to afford **81** (174 mg, 0.61 mmol, 71 %) as a white solid. The product was used without further purification in the next step.

Mp: 138-140 °C.

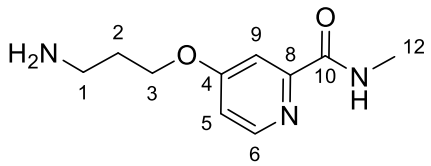
IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3025, 2952, 1624, 1598, 1477, 1436, 1267, 1167, 1051 865, 811, 759, 686.

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-d_6) δ 10.09 (s, 1H, **NH**), 8.12 (brs, 3H, **NH_2 + H+**), 7.36 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 7.22 – 7.05 (m, 2H, **2 x H_{Ar}**), 6.60 (ddd, *J* = 8.0, 2.5, 1.2 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 4.01 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H, **H_3**), 3.01 – 2.84 (m, 2H, **H_1**), 2.08 – 1.95 (m, 5H, **H_{12} + H_2**).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-d_6) δ 168.4 (**C-C_{11}**), 158.5 (**C**), 140.6 (**C**), 129.4 (**CH_{Ar}**), 111.5 (**CH_{Ar}**), 108.8 (**CH_{Ar}**), 105.5 (**CH_{Ar}**), 64.4 (**CH_2-C_3**), 36.2 (**CH_2-C_1**), 26.9 (**CH_2-C_2**), 24.1 (**CH_3-C_{12}**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{11}H_{17}N_2O_2$ $[M+H]^+$: 209.1285, found: 209.1287.

4-(3-Aminopropoxy)-*N*-methyl-pyridine-2-carboxamide (82)



Chemical Formula: $C_{10}H_{15}N_3O_2$
Molecular Weight: 209.25

To a solution of **85** (120 mg, 0.51 mmol) in dry THF (0.65 mL) were added triphenylphosphine (268 mg, 1.02 mmol, 2.0 equiv.) and water (257 µL, 14.28 mmol, 28 equiv.). The mixture was stirred at rt for 16 h then the solvent wewasre removed under reduce pressure and the crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a solvent system of DCM/(MeOH with 1 % NH_4OH) from 100/0 up to 90/10 to afford compound **82** (88 mg, 0.42 mmol, 82 %) as a colourless oil.

R_f (DCM/MeOH/NH_4OH 90/10/1) 0.20.

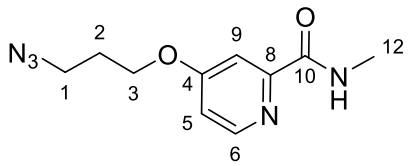
IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3355, 2943, 1658, 1594, 1562, 1531, 1463, 1410, 1307, 1234, 1145, 1107, 1038, 1012, 995, 950, 880, 812, 786, 572.

^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 8.32 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H, **H_6**), 8.06 (s, 1H, **NH**), 7.73 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, **H_9**), 6.90 (dd, *J* = 5.6, 2.6 Hz, 1H, **H_5**), 4.19 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H, **H_3**), 3.02 (d, *J* = 5.1 Hz, 3H, **H_{12}**), 2.92 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, **H_1**), 2.03 – 1.95 (m, 2H, **H_2**).

^{13}C NMR (63 MHz, $CDCl_3$) δ 166.4 (**C**), 165.0 (**C**), 152.0 (**C**), 149.3 (**CH_{Ar}-C_6**), 113.2 (**CH_{Ar}-C_5**), 107.9 (**CH_{Ar}-C_9**), 66.3 (**CH_2-C_3**), 38.9 (**CH_2-C_1**), 32.5 (**CH_2-C_2**), 26.2 (**CH_3-C_{12}**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{10}H_{15}N_3O_2$ $[M+H]^+$: 210.1240, found: 210.1237.

4-(3-azidopropoxy)-*N*-methyl-pyridine-2-carboxamide (84)



Chemical Formula: $C_{10}H_{13}N_5O_2$
Molecular Weight: 235.25

To a solution of *N*-methyl-4-chloropydine-2-carboxamide (200 mg, 1.17 mmol) in dry DMA (3 mL) were added 3-azidopropanol (355 mg, 3.52 mmol, 3.0 equiv.) and *t*-BuOK (328 mg, 2.93 mmol, 2.9 equiv.). The mixture was heated under microwave irradiation at 100 °C for 1 h then diluted with DCM (15 mL) and the organic layer was washed with brine (3 x 10 mL), dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of PE/EtOAc from 100 up to 60/40 to afford compound **84** (84 mg, 0.36 mmol, 30 %) as a colourless oil.

R_f (PE/EtOAc 6/4) 0.25.

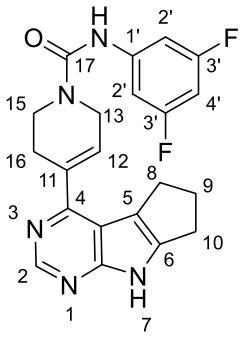
IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3390, 2941, 2094, 1667, 1594, 1563, 1528, 1463, 1410, 1306, 1232, 1144, 1107, 1042, 995, 970, 892, 840, 812, 787, 638, 572.

^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 8.34 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H, **H_6**), 8.05 (s, 1H, **NH**), 7.73 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, **H_9**), 6.91 (dd, *J* = 5.6, 2.6 Hz, 1H, **H_5**), 4.18 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, **H_3**), 3.53 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, **H_1**), 3.03 (d, *J* = 5.1 Hz, 3H, **H_{12}**), 2.15 – 2.03 (m, 2H, **H_2**).

^{13}C NMR (63 MHz, $CDCl_3$) δ 166.1 (**C**), 164.9 (**C**), 152.1 (**C**), 149.4 (**CH_{Ar}-C_6**), 113.2 (**CH_{Ar}-C_5**), 107.8 (**CH_{Ar}-C_9**), 65.0 (**CH_2-C_3**), 48.0 (**CH_2-C_1**), 28.5 (**CH_2-C_2**), 26.3 (**CH_3-C_{12}**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{10}H_{14}N_5O_2$ $[M+H]^+$: 236.1146, found: 236.1142.

N-(3,5-Difluorophenyl)-4-(5,6,7,8-tetrahydrocyclopenta[4,5]pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxamide (86)



Chemical Formula: $C_{21}H_{19}F_2N_5O$
Molecular Weight: 395.41

To a suspension of **12** (104 mg, 0.33 mmol) in dry DCM (4.7 mL) cooled at 0 °C were added DIPEA (145 µL, 0.83 mmol, 2.5 equiv.) and a solution of 3,5-difluorophenyl isocyanate (56 mg, 0.36 mmol, 1.1 equiv.) in dry DCM (0.5 mL) dropwise. The reaction mixture was stirred at 0 °C for 2 h then concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in DCM (50 mL) then the organic layer was washed with H_2O (2 x 10 mL), dried over MgSO4, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 100 up to 96/4 to afford compound **86** (86 mg, 0.22 mmol, 67 %) as a white powder.

R_f (DCM/MeOH 96/4) 0.21.

Mp: 219-221 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3260, 3021, 2945, 2862, 1673, 1541, 1435, 1375, 1272, 1168, 1130, 997, 848, 730, 679, 623, 597.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 11.96 (s, 1H, **NH**), 8.94 (s, 1H, **NH**), 8.57 (s, 1H, **H_2**), 7.35 – 7.24 (m, 2H, **$H_{2'}$**), 6.74 (tt, *J* = 9.3, 2.4 Hz, 1H, **$H_{4'}$**), 6.60 – 6.53 (m, 1H, **H_{12}**), 4.25 (d, *J* = 2.9 Hz, 2H, **H_{13}**), 3.71 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, **H_{15}**), 2.92 – 2.81 (m, 4H, **H_8 + H_{10}**), 2.77 – 2.72 (m, 2H, **H_{16}**), 2.41 (p, *J* = 7.3 Hz, 2H, **H_9**).

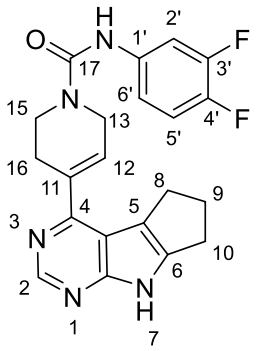
^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 162.3 (dd, $J_{C\text{-}F}$ = 241.5, 15.7 Hz, **2 x C-$C_{3'}$**), 156.5 (**C**), 154.7 (**C**), 154.3 (**C**), 148.9 (**CH_{Ar}-C_2**), 145.8 (**C**), 143.4 (t, $J_{C\text{-}F}$ = 14.2 Hz, **C-$C_{1'}$**), 134.9 (**C**), 128.3 (**CH-C_{12}**), 115.0 (**C**), 111.6 (**C**), 102.0 – 101.6 (m, **2 x CH_{Ar}-$C_{2'}$**), 96.5 (t, $J_{C\text{-}F}$ = 26.3 Hz, **CH_{Ar}-$C_{4'}$**), 43.8 (**CH_2-C_{13}**), 40.5 (**CH_2-C_{15}**), 27.6 (**CH_2-$C_{8/10}$**), 27.2 (**CH_2-C_9**), 26.1 (**CH_2-C_{16}**), 25.5 (**CH_2-$C_{10/8}$**).

^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ -110.3 – -110.4 (m, 2F).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{21}H_{20}F_2N_5O$ $[M+H]^+$: 396.1630, found: 396.1632.

Purity (HPLC): 99.5 %.

N-(3,4-Difluorophenyl)-4-(5,6,7,8-tetrahydrocyclopenta[4,5]pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxamide (87)



Chemical Formula: $C_{21}H_{19}F_2N_5O$
Molecular Weight: 395.41

To a suspension of **12** (103 mg, 0.33 mmol) in dry DCM (4.7 mL) cooled to 0 °C were added DIPEA (145 µL, 0.83 mmol, 2.5 equiv.) and a solution of 3,4-difluorophenyl isocyanate (42 µL, 0.36 mmol, 1.1 equiv.) in dry DCM (0.5 mL) dropwise. The reaction mixture was stirred at 0 °C for 1 h. The reaction mixture was diluted with DCM (40 mL) and MeOH (3 mL) then the organic layer was washed with H_2O (2 x 15 mL), dried over MgSO4, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 100 up to 96/4 to afford compound **87** (86 mg, 0.22 mmol, 67 %) as a beige solid.

R_f (DCM/MeOH 95/5) 0.33.

Mp: 244-246 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) v: 3394, 3115, 3019, 2945, 1646, 1550, 1525, 1435, 1289, 1205, 956, 827, 785, 731, 609.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.96 (s, 1H, **NH**), 8.76 (s, 1H, **NH**), 8.57 (s, 1H, **H_2**), 7.72 – 7.61 (m, 1H, **$H_{5'}$**), 7.36 – 7.22 (m, 2H, **$H_{2'}$ + $H_{6'}$**), 6.60 – 6.53 (m, 1H, **H_{12}**), 4.24 (d, *J* = 2.9 Hz, 2H, **H_{13}**), 3.70 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, **H_{15}**), 2.92 – 2.81 (m, 4H, **H_8 + H_{10}**), 2.78 – 2.70 (m, 2H, **H_{16}**), 2.41 (p, J = 7.3 Hz, 2H, **H_9**).

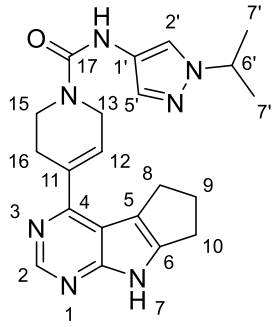
^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 156.4 (**C**), 154.8 (**C**), 154.7 (**C**), 148.9 (**CH_{Ar}-C_2**), 148.8 (dd, $J_{C\text{-}F}$ = 241.5, 13.1 Hz **C-$C_{3'/4'}$**), 145.7 (**C**), 144.4 (dd, $J_{C\text{-}F}$ = 239.4, 12.7 Hz, **C-$C_{4'/3'}$**), 137.7 (dd, $J_{C\text{-}F}$ = 9.5, 2.6 Hz, **C-$C_{1'}$**), 134.9 (**C**), 128.4 (**CH-C_{12}**), 116.8 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 17.4 Hz **CH_{Ar}-$C_{2'}$**), 115.5 (dd, $J_{C\text{-}F}$ = 5.8, 3.2 Hz, **CH_{Ar}-$C_{6'}$**), 115.0 (**C**), 111.6 (**C**), 108.3 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 21.6 Hz, **CH_{Ar}-$C_{5'}$**), 43.8 (**CH_2-C_{13}**), 40.5 (**CH_2-C_{15}**), 27.6 (**CH_2-$C_{8/10}$**), 27.2 (**CH_2-C_9**), 26.1 (**CH_2-C_{16}**), 25.5 (**CH_2-$C_{10/8}$**).

^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-d_6) δ -138.2 (ddd, $J_{F\text{-}H}$ = 23.6, 13.7, 7.7 Hz, 1F), -147.4 – -147.5 (m, 1F).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{21}H_{20}F_2N_5O$ $[M+H]^+$: 396.1630, found: 396.1629.

Purity (HPLC): 98.2 %.

N-(1-Isopropyl-1*H*-pyrazol-4-yl)-4-(5,6,7,8-tetrahydrocyclopenta[4,5]pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxamide (88)



Chemical Formula: $C_{21}H_{25}N_7O$
Molecular Weight: 391.48

The reaction was carried out as described in general procedure **A** using 1-isopropyl-1*H*-pyrazol-4-amine (65 mg, 0.52 mmol), 4-nitrophenyl chloroformate (127 mg, 0.63 mmol, 1.2 equiv.), DIPEA (326 µL, 1.87 mmol, 3.6 equiv.), and amine **12** (199 mg, 0.63 mmol, 1.2 equiv.) in dry THF (7.4 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 100 up to 95/5 to afford compound **88** (122 mg, 0.31 mmol, 60 %) as a beige solid.

R_f (DCM/MeOH 95/5) 0.19.

Mp: 149-151 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3116, 2973, 2361, 2209, 1635, 1541, 1410, 1241, 1072, 979, 727, 628, 594, 581, 574.

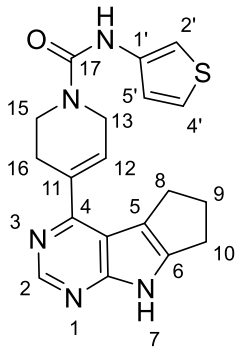
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.95 (s, 1H, **NH**), 8.59 (s, 1H, **H_2**), 8.56 (s, 1H, **NH**), 7.73 (s, 1H, **$H_{2'}$**), 7.38 (s, 1H, **$H_{5'}$**), 6.58 – 6.53 (m, 1H, **H_{12}**), 4.40 (hept, *J* = 6.5 Hz, 1H, **$H_{6'}$**), 4.18 (d, *J* = 1.8 Hz, 2H, **H_{13}**), 3.65 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, **H_{15}**), 2.92 – 2.80 (m, 4H, **H_8 + H_{10}**), 2.74 – 2.67 (m, 2H, **H_{16}**), 2.41 (p, *J* = 7.3 Hz, 2H, **H_9**), 1.37 (d, *J* = 6.6 Hz, 6H, **$H_{7'}$**).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 156.4 (**C**), 154.9 (**C**), 154.6 (**C**), 148.9 (**CH_{Ar}-C_2**), 145.7 (**C**), 134.9 (**C**), 129.6 (**CH_{Ar}-$C_{5'}$**), 128.7 (**CH-C_{12}**), 122.7 (**C-$C_{1'}$**), 117.5 (**CH_{Ar}-$C_{2'}$**), 115.0 (**C**), 111.6 (**C**), 52.7 (**CH-$C_{6'}$**), 43.8 (**CH_2-C_{13}**), 40.3 (**CH_2-C_{15}**), 27.6 (**CH_2-$C_{8/10}$**), 27.2 (**CH_2-C_9**), 26.1 (**CH_2-C_{16}**), 25.5 (**CH_2-$C_{10/8}$**), 22.6 (**2 x CH_3-$C_{7'}$**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{21}H_{26}N_7O$ $[M+H]^+$: 392.2193, found: 392.2196.

Purity (HPLC): > 99.9 %.

4-(5,6,7,8-Tetrahydrocyclopenta[4,5]pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-*N*-(thiophen-3-yl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxamide (89)



Chemical Formula: $C_{19}H_{19}N_5OS$
Molecular Weight: 365.46

To a suspension of **12** (78 mg, 0.25 mmol) in dry DCM (3.6 mL) cooled to 0 °C were added DIPEA (131 µL, 0.75 mmol, 3.0 equiv.) then thien-3-yl isocyanate (28 µL, 0.28 mmol, 1.1 equiv.) dropwise. The reaction mixture was stirred at 0 °C for 2 h then at rt for 18 h. The reaction mixture was concentrated *in vacuo* and the crude was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 100 up to 95/5 to afford compound **89** (64 mg, 0.18 mmol, 72 %) as a brown solid.

R_f (DCM/MeOH 95/5) 0.29.

Mp: 253-255 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3322, 3088, 2917, 2853, 1656, 1562, 1528, 1393, 1255, 1194, 1073, 841, 773, 621.

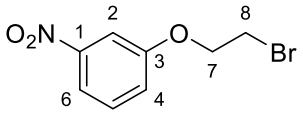
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.96 (s, 1H, **NH**), 8.97 (s, 1H, **NH**), 8.58 (s, 1H, **H_2**), 7.40 – 7.35 (m, 1H, **$H_{2'}$**), 7.32 – 7.28 (m, 1H, **$H_{4'}$**), 7.18 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H, **$H_{5'}$**), 6.58 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H, **H_{12}**), 4.28 – 4.20 (m, 2H, **H_{13}**), 3.69 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, **H_{15}**), 2.92 – 2.83 (m, 4H, **H_8 + H_{10}**), 2.77 – 2.70 (m, 2H, **H_{16}**), 2.42 (p, *J* = 7.3 Hz, 2H, **H_9**).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 156.4 (**C**), 154.9 (**C**), 154.7 (**C**), 148.9 (**CH_{Ar}-C_2**), 145.7 (**C**), 138.4 (**C**), 134.9 (**C**), 128.6 (**CH-C_{12}**), 123.8 (**CH_{Ar}-$C_{2'}$**), 122.2 (**CH_{Ar}-$C_{5'}$**), 115.0 (**C**), 111.6 (**C**), 106.2 (**CH_{Ar}-$C_{4'}$**), 43.9 (**CH_2-C_{13}**), 40.4 (**CH_2-C_{15}**), 27.7 (**CH_2-$C_{8/10}$**), 27.2 (**CH_2-C_9**), 26.1 (**CH_2-C_{16}**), 25.5 (**CH_2-$C_{10/8}$**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{19}H_{20}N_5OS$ $[M+H]^+$: 366.1383, found: 366.1382.

Purity (HPLC): 98.6 %.

1-(2-Bromoethoxy)-3-nitrobenzene (91)



Chemical Formula: $C_8H_8BrNO_3$
Molecular Weight: 246.06

The reaction was carried out as described in general procedure **C** using 3-nitrophenol (500 mg, 3.59 mmol), 1,2-dibromoethane (2.47 mL, 28.70 mmol, 8.0 equiv.), K_2CO_3 (794 mg, 5.74 mmol, 1.6 equiv.) and dry MeCN (4.5 mL) for 9 h. The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of PE/EtOAc from 100 up to 95/5 to afford compound **91** (698 mg, 2.84 mmol, 79 %) as a yellowish solid.

R_f (PE/EtOAc 90/10) 0.50.

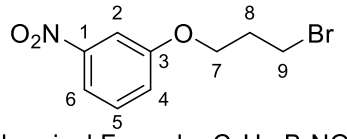
Mp: < 50 °C.

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-d_6) δ 7.84 (ddd, *J* = 8.1, 2.2, 1.0 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 7.74 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H, **H_2**), 7.60 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 7.45 (ddd, *J* = 8.3, 2.5, 1.0 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 4.58 – 4.37 (m, 2H, **H_7**), 3.92 – 3.77 (m, 2H, **H_8**).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-d_6) δ 158.4 (**C**), 148.8 (**C**), 130.8 (**CH_{Ar}**), 122.1 (**CH_{Ar}**), 116.0 (**CH_{Ar}**), 108.9 (**CH_{Ar}**), 68.5 (**CH_2-C_7**), 31.0 (**CH_2-C_8**).

All spectra data corresponded to the literature values as found in Kawamoto, M.; Shiga, N.; Takaishi, K.; Yamashita, T. *Chem. Commun.* **2010**, *46* (44), 8344–8346.

1-(3-Bromopropoxy)-3-nitrobenzene (92)



Chemical Formula: $C_9H_{10}BrNO_3$
Molecular Weight: 260.09

The reaction was carried out as described in general procedure **C** using 3-nitrophenol (500 mg, 3.59 mmol), 1 ,3-dibromopropane (2.91 mL, 28.70 mmol, 8.0 equiv.), and K_2CO_3 (794 mg, 5.74 mmol, 1.6 equiv.) in dry MeCN (4.5 mL) for 56 h. The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using PE/DCM (70/30) to afford compound **92** (634 mg, 2.44 mmol, 68 %) as a yellow oil.

R_f (PE/EtOAc 90/10) 0.45.

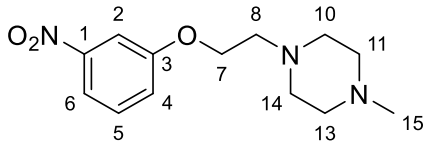
IR (ATR diamond, cm^{-1}) v: 3097, 2939, 882, 1521, 1347, 1251, 1033, 733.

^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 7.84 (ddd, *J* = 8.1, 2.2, 1.0 Hz, 1H, **H_6**), 7.74 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H, **H_2**), 7.44 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H, **H_5**), 7.23 (ddd, *J* = 8.3, 2.6, 1.0 Hz, 1H, **H_4**), 4.20 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H, **H_7**), 3.62 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, **H_9**), 2.36 (p, *J* = 6.1 Hz, 2H, **H_8**).

^{13}C NMR (63 MHz, $CDCl_3$) δ 159.4 (**C**), 149.4 (**C**), 130.1 (**CH_{Ar}-C_5**), 121.7 (**CH_{Ar}-C_4**), 116.1 (**CH_{Ar}-C_6**), 109.0 (**CH_{Ar}-C_2**), 66.2 (**CH_2-C_7**), 32.2 (**CH_2-C_8**), 29.6 (**CH_2-C_9**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_9H_{11}BrNO_3$ $[M+H]^+$: 259.9917, found: 259.9915.

1-Methyl-4-(2-(3-nitrophenoxy)ethyl)piperazine (94)



Chemical Formula: $C_{13}H_{19}N_3O_3$
Molecular Weight: 265.31

The reaction was carried out as described in general procedure **F** using the alkyl halide **91** (406 mg, 1.65 mmol), 1-methylpiperazine (568 µL, 5.12 mmol, 3.1 equiv.) and dry THF (9 mL) for 24 h to afford compound **94** (362 mg, 1.36 mmol, 83 %) as a beige solid which was used without further purification in the next step.

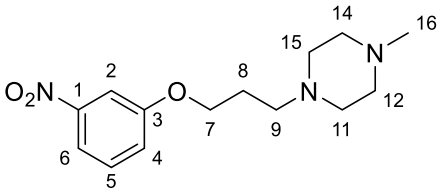
Mp: < 50 °C.

^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 7.81 (ddd, *J* = 8.1, 2.1, 1.0 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 7.74 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 7.41 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 7.22 (ddd, *J* = 8.3, 2.5, 1.0 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 4.17 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H, **H_7**), 2.84 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H, **H_8**), 2.62 (brs, 4H, **2 x CH_2**), 2.47 (brs, 4H, **2 x CH_2**), 2.29 (s, 3H, **H_{16}**).

^{13}C NMR (63 MHz, $CDCl_3$) δ 159.5 (**C**), 149.4 (**C**), 130.0 (**CH_{Ar}**), 121.9 (**CH_{Ar}**), 116.0 (**CH_{Ar}**), 109.1 (**CH_{Ar}**), 66.9 (**CH_2-C_8**), 57.1 (**CH_2-C_8**), 55.2 (**2 x CH_2**), 53.8 (**2 x CH_2**), 46.2 (**CH_3-C_{15}**).

All spectra data corresponded to the literature values as found in Lee, S.; Kim, D. G.; Kim, K.; Kim, T.; Lim, S.; Kong, H.; Kim, S.; Suh, Y.-G. *J. Med. Chem.* **2020**, *63* (8), 3908–3914.

1-Methyl-4-(3-(3-nitrophenoxy)propyl)piperazine (95)



Chemical Formula: $C_{14}H_{21}N_3O_3$
Molecular Weight: 279.34

The reaction was carried out as described in general procedure **F** using the alkyl halide **92** (400 mg, 1.54 mmol) and 1-methylpiperazine (530 µL, 4.77 mmol, 3.1 equiv.) in dry THF (9 mL) for 56 h to afford compound **95** (369 mg, 1.32 mmol, 86 %) as a yellow oil. The product was used without further purification in the next step.

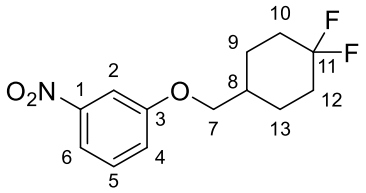
IR (ATR diamond, cm^{-1}) v: 2937, 2880, 2795, 1528, 1349, 1242, 1168, 739.

^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 7.80 (ddd, *J* = 8.1, 2.1, 1.0 Hz, 1H, **H_6**), 7.72 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H, **H_2**), 7.40 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H, **H_5**), 7.21 (ddd, *J* = 8.3, 2.5, 1.0 Hz, 1H, **H_4**), 4.09 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, **H_7**), 2.60 – 2.38 (m, 10H, **H_9**, **H_{11}**, **H_{12}**, **H_{14}**, **H_{15}**), 2.29 (s, 3H, **H_{16}**), 2.01 (p, *J* = 8.2, 6.6 Hz, 2H, **H_8**).

^{13}C NMR (63 MHz, $CDCl_3$) δ 159.7 (**C**), 149.4 (**C**), 130.0 (**CH_{Ar}-C_5**), 121.9 (**CH_{Ar}-C_4**), 115.8 (**CH_{Ar}-C_6**), 108.9 (**CH_{Ar}-C_2**), 67.1 (**CH_2-C_7**), 55.3 (**2 x CH_2**), 55.0 (**CH_2-C_9**), 53.4 (**2 x CH_2**), 46.2 (**CH_3-C_{16}**), 26.7 (**CH_2-C_8**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{14}H_{22}N_3O_3$ $[M+H]^+$: 280.1656, found: 280.1655.

1-((4,4-Difluorocyclohexyl)methoxy)-3-nitrobenzene (96)



Chemical Formula: $C_{13}H_{15}F_2NO_3$
Molecular Weight: 271.26

The reaction was carried out as described in general procedure **B** using 3-nitrophenol (300 mg, 2.16 mmol), (4,4-difluorocyclohexyl)methanol (562 µL, 4.32 mmol, 2.0 equiv.), PPh_3 (963 mg, 3.67 mmol, 1.7 equiv.) and DIAD (723 µL, 3.67 mmol, 1.7 equiv.) in dry THF (8 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of PE/DCM from 100 up to 75/25 to afford compound **96** (524 mg, 1.93 mmol, 89 %) as a yellowish solid.

R_f (PE/DCM 80/20) 0.28.

Mp: 75-77 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3186, 2906, 2791, 1595, 1495, 1462, 1288, 1153, 1036, 962, 840, 680.

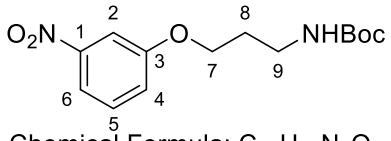
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.82 (dd, *J* = 8.1, 2.0 Hz, 1H, **H_6**), 7.71 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H, **H_2**), 7.43 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H, **H_5**), 7.21 (dd, *J* = 8.3, 2.5 Hz, 1H, **H_4**), 3.89 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H, **H_7**), 2.25-2.10 (m, 2H, **$H_{12/10}$**), 2.03 – 1.89 (m, 3H, **H_8** + **$H_{9/13}$**), 1.89 – 1.66 (m, 2H, **$H_{10/12}$**), 1.53 – 1.39 (m, 2H, **$H_{13/9}$**).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 159.6 (**C**), 149.4 (**C**), 130.1 (**CH_{Ar}-C_5**), 123.29 (dd, $J_{C\text{-}F}$ = 242.5, 239.5 Hz, **C-C_{11}**), 121.7 (**CH_{Ar}-C_4**), 116.0 (**CH_{Ar}-C_6**), 108.8 (**CH_{Ar}-C_2**), 72.6 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 3.0 Hz, **CH_2-C_7**), 35.9 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 1.6 Hz, **CH-C_8**), 33.1 (dd, $J_{C\text{-}F}$ = 25.6, 23.1 Hz, **2 x CH_2-C_{10}** + **C_{12}**), 25.8 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 9.7 Hz, **2 x CH_2-C_9** + **C_{13}**).

^{19}F NMR (376 MHz, $CDCl_3$) δ -91.62 (d, $J_{F\text{-}H}$ = 236.5 Hz, 1F), -102.21 (dtt, $J_{F\text{-}H}$ = 236.1, 33.5, 10.5 Hz, 1F).

HRMS (EI-MS) No MH+ or MH- ionization detected.

tert-Butyl (3-(3-nitrophenoxy)propyl)carbamate (97)



Chemical Formula: $C_{14}H_{20}N_2O_5$
Molecular Weight: 296.32

The reaction was carried out as described in general procedure **B** using 3-nitrophenol (200 mg, 1.44 mmol), 3-(boc-amino)-1-propanol (492 µL, 2.88 mmol, 2.0 equiv.), PPh_3 (642 mg, 2.45 mmol, 1.7 equiv.), and DIAD (.482 µL, 2.45 mmol, 1.7 equiv.) in dry THF (5 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of PE/EtOAc from 95/5 up to 80/20 to afford compound **97** (412 mg, 1.39 mmol, 96 %) as a yellow oil.

R_f (PE/EtOAc 80/20) 0.33.

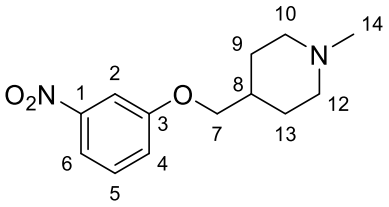
IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3351, 2980, 2931, 1687, 1525, 1347, 1244, 1166, 1036, 740.

^{1}H NMR (250 MHz, CDCl3) δ 7.82 (ddd, *J* = 8.1, 2.1, 1.0 Hz, 1H, **H_6**), 7.72 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H, **H_2**), 7.42 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H, **H_5**), 7.21 (ddd, *J* = 8.3, 2.5, 1.0 Hz, 1H, **H_4**), 4.71 (brs, 1H, **NH**), 4.09 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, **H_7**), 3.34 (q, *J* = 6.5 Hz, 2H, **H_9**), 2.02 (p, *J* = 6.4 Hz, 2H, **H_8**), 1.44 (s, 9H, ***t*-Bu**).

^{13}C NMR (63 MHz, $CDCl_3$) δ 159.5 (**C**), 156.1 (**C**), 149.4 (**C**), 130.1 (**CH_{Ar}-C_5**), 121.7 (**CH_{Ar}-C_4**), 116.0 (**CH_{Ar}-C_6**), 108.9 (**CH_{Ar}-C_2**), 79.6 (**C**), 66.5 (**CH_2-C_7**), 37.9 (**CH_2-C_9**), 29.6 (**CH_2-C_8**), 28.5 (**3 x CH_3**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{14}H_{21}N_2O_5$ $[M+H]^+$: 297.1445, found: 297.1440.

1-Methyl-4-((3-nitrophenoxy)methyl)piperidine (99)



Chemical Formula: $C_{13}H_{18}N_2O_3$
Molecular Weight: 250.30

To a microwave reaction vial loaded with **101** (216 mg, 0.91 mmol) were added formic acid (0.8 mL) and formaldehyde (37 wt. % in H_2O, 0.48 mL, 6.40 mmol, 7.0 equiv.). The tube was sealed and submitted to microwave irradiation at 90 °C for 2 cycles of 10 min. The reaction mixture was then diluted in H_2O (10 mL) and DCM (35 mL), and treated with a saturated aqueous solution of $NaHCO_3$ was added until pH ~ 9. The aqueous layer was extracted with DCM (3 x 20 mL) then the combined organic layers were dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure to afford compound **99** (207 mg, 0.83 mmol, 90 %) as a yellowish solid. The product was used without further purification in the next step.

Mp: 68-70 °C.

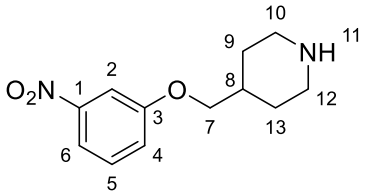
IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 2928, 1501, 1343, 1248, 739.

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-d_6) δ 7.80 (ddd, *J* = 8.1, 2.2, 1.0 Hz, 1H, **H_6**), 7.69 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H, **H_2**), 7.56 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H, **H_5**), 7.41 (ddd, *J* = 8.3, 2.5, 1.0 Hz, 1H, **H_4**), 3.95 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H, **H_7**), 2.88 – 2.70 (m, 2H, **CH_2**), 2.15 (s, 3H, **H_{14}**), 1.92 – 1.79 (m, 2H, **CH_2**), 1.78 – 1.61 (m, 3H, **H_8** + **CH_2**), 1.42 – 1.15 (m, 2H, **CH_2**).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-d_6) δ 159.3 (**C**), 148.7 (**C**), 130.7 (**CH_{Ar}-C_5**), 121.9 (**CH_{Ar}-C_4**), 115.4 (**CH_{Ar}-C_6**), 108.5 (**CH_{Ar}-C_2**), 72.8 (**CH_2-C_7**), 54.9 (**2 x CH_2**), 46.2 (**CH_3-C_{14}**), 34.7 (**CH-C_8**), 28.4 (**2 x CH_2**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{13}H_{19}N_2O_3$ $[M+H]^+$: 251.1390, found: 251.1387.

4-((3-Nitrophenoxy)methyl)piperidine (101)



Chemical Formula: $C_{12}H_{16}N_2O_3$
Molecular Weight: 236.27

The reaction was carried out as described in general procedure **B** using 3-nitrophenol (700 mg, 5.03 mmol), 1-Boc-4-piperidinemethanol (2.17 g, 10.10 mmol, 2.0 equiv.), PPh_3 (2.24 g, 8.55 mmol, 1.7 equiv.), and DIAD (1.68 mL, 8.55 mmol, 1.7 equiv.) in dry THF (28 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/PE from 80/20 up to 100/0. The intermediate product was then dissolved in dry DCM (30 mL), the reaction mixture was cooled to 0 °C then HCl 4N in 1,4-dioxane (6.0 mL, 24.10 mmol, 8.0 equiv.) was added. The solution was stirred at rt for 3 h then concentrated under reduced pressure. The white residue was partitioned between Et_2O (20 mL) and H_2O (20 mL), and the organic layer was removed. The aqueous layer was then washed with Et_2O (15 mL), treated with a saturated aqueous solution of $NaHCO_3$ until pH 8-9 and extracted with DCM (3 x 40 mL). The combined organic layers were dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under vacuum to afford compound **101** (326 mg, 1.38 mmol, 27 %) as a sticky orange solid which was used without further purification in the next step.

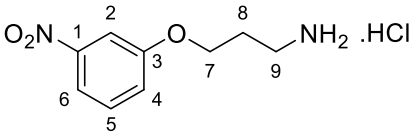
Mp: < 50 °C.

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 7.80 (ddd, *J* = 8.1, 2.2, 1.0 Hz, 1H, **H_6**), 7.68 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H, **H_2**), 7.56 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H, **H_5**), 7.40 (ddd, *J* = 8.3, 2.5, 1.0 Hz, 1H, **H_4**), 3.93 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H, **H_7**), 3.51 (brs, 1H, **NH**), 2.99 (d, *J* = 12.2 Hz, 2H, **CH_2**), 2.59 – 2.46 (m, 2H, **CH_2**), 1.97 – 1.78 (m, 1H, **H_8**), 1.72 (d, *J* = 12.8 Hz, 2H, **CH_2**), 1.22 (qd, *J* = 12.1, 4.1 Hz, 2H, **CH_2**).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 159.3 (**C**), 148.7 (**C**), 130.7 (**CH_{Ar}-C_5**), 121.9 (**CH_{Ar}-C_4**), 115.4 (**CH_{Ar}-C_6**), 108.6 (**CH_{Ar}-C_2**), 73.1 (**CH_2-C_7**), 45.2 (**2 x CH_2**), 35.5 (**CH-C_8**), 28.9 (**2 x CH_2**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{12}H_{17}N_2O_3$ $[M+H]^+$: 237.1234, found: 237.1235.

3-(3-Nitrophenoxy)propan-1-amine hydrochloride (102)



Chemical Formula: $C_9H_{13}ClN_2O_3$
Molecular Weight: 232.66

To a solution of **97** (1.54 g, 5.20 mmol) in dry DCM (52 mL) cooled to 0 °C was slowly added a 4 M solution of HCl in 1,4-dioxane (10.4 mL, 41.6 mmol, 8.0 equiv.). The reaction mixture was stirred at 0 °C for 5 min then at rt for 18 h. After completion, the precipitate was filtered then washed with Et_2O (3 x 20 mL) and dried under vacuum to afford compound **102** (1.1 g, 4.73 mmol, 92 %) as a white solid. The product was used without further purification in the next step.

Mp: 149-151 °C.

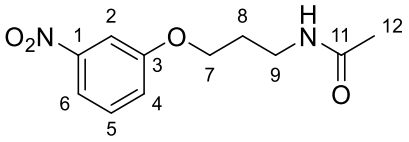
IR (ATR diamond, cm^{-1}) v: 3106, 3014, 2895, 2720, 2605, 1519, 1348, 1239, 1028, 891, 792, 738, 668.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.16 (brs, 3H, **NH_2 + H+**), 7.82 (dd, *J* = 8.1, 2.1 Hz, 1H, **H_6**), 7.72 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H, **H_2**), 7.59 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H, **H_5**), 7.43 (dd, *J* = 8.3, 2.5 Hz, 1H, **H_4**), 4.20 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H, **H_7**), 2.96 (q, *J* = 6.4 Hz, 2H, **H_9**), 2.08 (p, *J* = 6.6 Hz, 2H, **H_8**).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 158.9 (**C-C_3**), 148.7 (**C-C_1**), 130.7 (**CH_{Ar}-C_5**), 122.0 (**CH_{Ar}-C_4**), 115.6 (**CH_{Ar}-C_6**), 108.8 (**CH_{Ar}-C_2**), 65.6 (**CH_2-C_7**), 36.1 (**CH_2-C_9**), 26.6 (**CH_2-C_8**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_9H_{13}N_2O_3$ $[M+H]^+$: 197.0921, found: 197.0922.

N-(3-(3-Nitrophenoxy)propyl)acetamide (103)



Chemical Formula: $C_{11}H_{14}N_2O_4$
Molecular Weight: 238.24

To a suspension of **102** (300 mg, 1.29 mmol) in dry DCM (13 mL) were added triethylamine (539 µL, 3.87 mmol, 3.0 equiv.) and acetic anhydride (244 µL, 2.58 mmol, 2.0 equiv.). The solution was stirred at rt for 18 h. The reaction mixture was diluted with DCM (80 mL) then washed with a saturated aqueous solution of NH_4Cl (2 x 25 mL), a saturated aqueous solution of $NaHCO_3$ (2 x 25 mL), brine (25 mL). The organic layer was dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo* to afford compound **103** (269 mg, 1.13 mmol, 88 %) as a white solid. The product was used without further purification in the next step.

Mp: 97-99 °C.

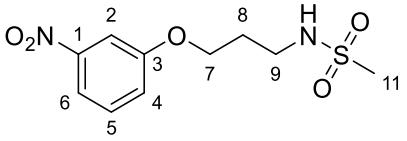
IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3289, 3091, 2934, 1651, 1526, 1349, 1245, 1029, 737, 672.

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.82 (dd, *J* = 8.2, 1.2 Hz, 1H, **H_6**), 7.71 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H, **H_2**), 7.43 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H, **H_5**), 7.21 (dd, *J* = 8.3, 2.2 Hz, 1H, **H_4**), 5.75 (brs, 1H, **NH**), 4.10 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H, **H_7**), 3.47 (q, *J* = 6.5 Hz, 2H, **H_9**), 2.05 (p, *J* = 6.4 Hz, 2H, **H_8**), 1.99 (s, 3H, **H_{12}**).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 170.4 (**C-C_{11}**), 159.4 (**C-C_3**), 149.4 (**C-C_1**), 130.2 (**CH_{Ar}-C_5**), 121.6 (**CH_{Ar}-C_4**), 116.1 (**CH_{Ar}-C_6**), 108.9 (**CH_{Ar}-C_2**), 66.7 (**CH_2-C_7**), 37.1 (**CH_2-C_9**), 29.2 (**CH_2-C_8**), 23.5 (**CH_3-C_{12}**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{11}H_{15}N_2O_4$ $[M+H]^+$: 239.1026, found: 239.1028.

N-(3-(3-Nitrophenoxy)propyl)methanesulfonamide (104)



Chemical Formula: $C_{10}H_{14}N_2O_5S$
Molecular Weight: 274.29

To a suspension of **102** (200 mg, 0.86 mmol) in dry DCM (3 mL) cooled to 0 °C were slowly added triethylamine (360 µL, 2.58 mmol, 3.0 equiv.) and methanesulfonyl chloride (100 µL, 1.29 mmol, 1.5 equiv.). The suspension was stirred at 0 °C for 1.5 h then at rt for 18 h. The reaction mixture was quenched with H_2O (20 mL), the aqueous layer was separated and extracted with DCM (3 x 20 mL). The combined organic layers were dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of PE/EtOAc from 70/30 up to 40/60 to afford compound **104** (174 mg, 0.63 mmol, 73 %) as a colourless oil.

R_f (PE/EtOAc 40/60) 0.23.

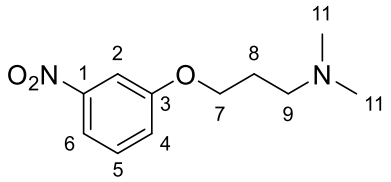
IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3291, 2936, 1526, 1350, 1316, 1246, 1149, 1077, 977, 769, 672.

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.83 (ddd, *J* = 8.2, 2.1, 0.9 Hz, 1H, **H_6**), 7.72 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H, **H_2**), 7.44 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H, **H_5**), 7.23 (ddd, *J* = 8.3, 2.6, 0.9 Hz, 1H, **H_4**), 4.61 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H, **NH**), 4.16 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H, **H_7**), 3.39 (q, *J* = 6.5 Hz, 2H, **H_9**), 2.97 (s, 3H, **H_{11}**), 2.12 (p, *J* = 6.2 Hz, 2H, **H_8**).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 159.2 (**C-C_3**), 149.4 (**C-C_1**), 130.2 (**CH_{Ar}-C_5**), 121.7 (**CH_{Ar}-C_4**), 116.3 (**CH_{Ar}-C_6**), 108.9 (**CH_{Ar}-C_2**), 66.0 (**CH_2-C_7**), 40.6 (**CH_2-C_9**), 40.5 (**CH_3-C_{11}**), 29.8 (**CH_2-C_8**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{10}H_{15}N_2O_5S$ $[M+H]^+$: 275.0696, found: 275.0700.

N,*N*-Dimethyl-3-(3-nitrophenoxy)propan-1-amine (105)



Chemical Formula: $C_{11}H_{16}N_2O_3$
Molecular Weight: 224.26

To a solution of **92** (523 mg, 2.01 mmol) in THF (1 mL) was added dimethylamine 40 wt.% in H_2O (1.4 mL, 12.07 mmol, 6.0 equiv.) then KOH (429 mg, 7.64 mmol, 3.8 equiv.). The clear solution was stirred at rt for 16 h. The reaction mixture was filtered, the filtrate was concentrated then purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH/NH_4OH from 98/2/1 up to 96/4/1 to afford compound **105** (421 mg, 1.88 mmol, 93 %) as a yellow oil.

R_f (DCM/MeOH/ NH_4OH 98/2/1) 0.16.

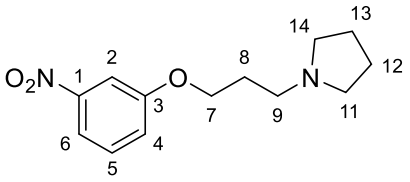
IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 2945, 2817, 2766, 1525, 1462, 1348, 1286, 1244, 1040, 814, 796, 736, 672.

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.80 (ddd, *J* = 8.1, 2.2, 1.0 Hz, 1H, **H_6**), 7.74 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H, **H_2**), 7.41 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H, **H_5**), 7.22 (ddd, *J* = 8.3, 2.6, 1.0 Hz, 1H, **H_4**), 4.10 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, **H_7**), 2.46 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, **H_9**), 2.26 (s, 6H, **H_{10}**), 1.99 (p, *J* = 6.7 Hz, 2H, **H_8**).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 159.7 (**C-C_3**), 149.4 (**C-C_1**), 130.0 (**CH_{Ar}-C_5**), 121.8 (**CH_{Ar}-C_4**), 115.7 (**CH_{Ar}-C_6**), 109.0 (**CH_{Ar}-C_2**), 67.1 (**CH_2-C_7**), 56.2 (**CH_2-C_9**), 45.7 (**CH_3-C_{11}**), 27.5 (**CH_2-C_8**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{11}H_{17}N_2O_3$ $[M+H]^+$: 225.1234, found: 225.1235.

1-(3-(3-Nitrophenoxy)propyl)pyrrolidine (106)



Chemical Formula: $C_{13}H_{18}N_2O_3$
Molecular Weight: 250.30

To a solution of **92** (365 mg, 1.40 mmol) in dry MeCN (7 mL) were added K_2CO_3 (387 mg, 2.80 mmol, 2.0 equiv.) and pyrrolidine (293 µL, 3.50 mmol, 2.5 equiv.). The suspension was stirred under reflux for 18h. The reaction mixture was cooled to rt, the inorganic salts were filtered off and the filtrate was concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in DCM (40 mL) and washed with H_2O (20 mL). The aqueous layer was extracted with DCM (3 x 20 mL) then the combined organic layers were dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH/NH_4OH from 100 up to 98/2/1 to afford compound **106** (331 mg, 1.32 mmol, 95 %) as an orange oil.

R_f (DCM/MeOH/ NH_4OH 98/2/1) 0.30.

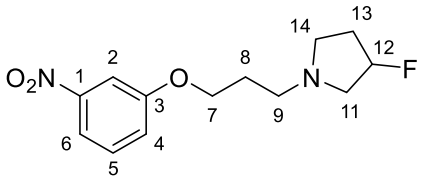
IR (ATR diamond, cm^{-1}) v: 2955, 2793, 1526, 1348, 1245, 1144, 1022, 874, 816, 737, 672.

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.84 – 7.78 (m, 1H, **H_6**), 7.74 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H, **H_2**), 7.41 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H, **H_5**), 7.22 (dd, *J* = 8.3, 2.2 Hz, 1H, **H_4**), 4.12 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, **H_7**), 2.64 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, **H_9**), 2.59 – 2.50 (m, 4H, **H_{11} + H_{14}**), 2.10 – 2.00 (m, 2H, **H_8**), 1.83 – 1.77 (m, 4H, **H_{12} + H_{13}**).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 159.8 (**C-C_3**), 149.4 (**C-C_1**), 130.0 (**CH_{Ar}-C_5**), 121.8 (**CH_{Ar}-C_4**), 115.7 (**CH_{Ar}-C_6**), 108.9 (**CH_{Ar}-C_2**), 67.3 (**CH_2-C_7**), 54.4 (**2 x CH_2-C_{11} + C_{14}**), 53.0 (**CH_2-C_9**), 28.8 (**CH_2-C_8**), 23.6 (**2 x CH_2-C_{12} + C_{13}**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{13}H_{19}N_2O_3$ $[M+H]^+$: 251.1390, found: 251.1390.

3-Fluoro-1-(3-(3-nitrophenoxy)propyl)pyrrolidine (107)



Chemical Formula: $C_{13}H_{17}FN_2O_3$
Molecular Weight: 268.29

To a solution of **92** (356 mg, 1.37 mmol) in dry MeCN (7 mL) were added K_2CO_3 (947 mg, 6.85 mmol, 5.0 equiv.) and 3-fluoropyrrolidine hydrochloride (431 mg, 3.43 mmol, 2.5 equiv.). The suspension was stirred under reflux for 18h. The reaction mixture was cooled to rt, the inorganic salts were filtered off and the filtrate was concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in DCM (40 mL) and washed with H_2O (20 mL). The aqueous layer was extracted with DCM (3 x 20 mL) then the combined organic layers were dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH/NH_4OH from 100 up to 99/1/1 to afford compound **107** (275 mg, 1.03 mmol, 75 %) as an orange oil.

R_f (DCM/MeOH/ NH_4OH 98/2/1) 0.41.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) v: 2952, 2801, 1525, 1471, 1347, 1286, 1244, 1147, 1092, 859, 815, 737, 672.

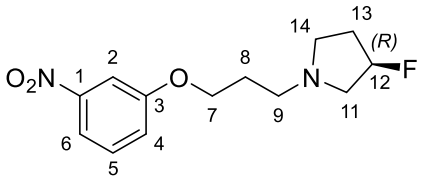
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.80 (ddd, *J* = 8.1, 2.2, 0.9 Hz, 1H, **H_6**), 7.73 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H, **H_2**), 7.41 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H, **H_5**), 7.22 (ddd, *J* = 8.3, 2.5, 1.0 Hz, 1H, **H_4**), 5.18 (dddt, $J_{H\text{-}F}$= 55.6, *J* = 6.7, 5.1, 1.8 Hz, 1H, **H_{12}**), 4.12 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, **H_7**), 2.96 – 2.83 (m, 2H, **H_{13a} + H_{14a}**), 2.80 – 2.64 (m, 3H **H_{13b} + H_9**), 2.49 – 2.41 (m, 1H, **H_{14b}**), 2.24 – 2.06 (m, 2H, **H_{11}**), 2.06 – 1.98 (m, 2H, **H_8**).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 159.7 (**C-C_3**), 149.3 (**C-C_1**), 130.0 (**CH_{Ar}-C_5**), 121.7 (**CH_{Ar}-C_4**), 115.7 (**CH_{Ar}-C_6**), 108.9 (**CH_{Ar}-C_2**), 93.6 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 175.5 Hz, **CH-C_{12}**), 66.9 (**CH_2-C_7**), 60.9 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 22.8 Hz, **CH_2-C_{13}**), 52.5 (**CH_2-C_{14}**), 52.5 (**CH_2-C_9**), 32.9 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 22.2 Hz, **CH_2-C_{11}**), 28.4 (**CH_2-C_8**).

^{19}F NMR (376 MHz, $CDCl_3$) δ -167.91 (dq, $J_{F\text{-}H}$ = 55.5, 28.7, 27.4 Hz).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{13}H_{18}FN_2O_3$ $[M+H]^+$: 269.1296, found: 269.1300.

(*R*)-3-Fluoro-1-(3-(3-nitrophenoxy)propyl)pyrrolidine (108)



Chemical Formula: $C_{13}H_{17}FN_2O_3$
Molecular Weight: 268.29

To a solution of **92** (378 mg, 1.45 mmol) in dry MeCN (7.3 mL) were added K_2CO_3 (1.00 g, 7.25 mmol, 5.0 equiv.) and (*R*)-3-fluoropyrrolidine hydrochloride (456 mg, 3.63 mmol, 2.5 equiv.). The suspension was stirred under reflux for 18 h. The reaction mixture was cooled to rt, the inorganic salts were filtered and the filtrate was concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in EtOAc (60 mL) and washed with H_2O (15 mL). The aqueous layer was extracted with EtOAc (20 mL) then the combined organic layers were dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo* to afford compound **108** (351 mg, 1.31 mmol, 90 %) as a yellow oil. The product was used without further purification in the next step.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) v: 2952, 2801, 1525, 1471, 1347, 1286, 1244, 1147, 1092, 859, 815, 737, 672.

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.80 (dd, *J* = 8.1, 2.1 Hz, 1H, **H_6**), 7.73 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H, **H_2**), 7.41 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H, **H_5**), 7.22 (dd, *J* = 8.3, 2.5 Hz, 1H, **H_4**), 5.18 (dt, *J* = 55.6, 5.8 Hz, 1H, **H_{12}**), 4.12 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, **H_7**), 2.96 – 2.83 (m, 2H, **H_{13a} + H_{14a}**), 2.80 – 2.64 (m, 3H **H_{13b} + H_9**), 2.49 – 2.41 (m, 1H, **H_{14b}**), 2.24 – 2.06 (m, 2H, **H_{11}**), 2.06 – 1.98 (m, 2H, **H_8**).

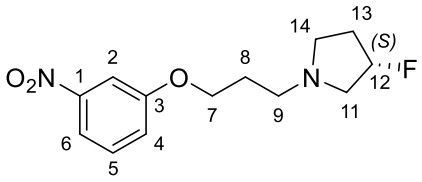
^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 159.7 (**C-C_3**), 149.3 (**C-C_1**), 130.0 (**CH_{Ar}-C_5**), 121.7 (**CH_{Ar}-C_4**), 115.7 (**CH_{Ar}-C_6**), 108.9 (**CH_{Ar}-C_2**), 93.6 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 175.5 Hz, **CH-C_{12}**), 66.9 (**CH_2-C_7**), 60.9 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 22.8 Hz, **CH_2-C_{13}**), 52.5 (**CH_2-C_{14}**), 52.5 (**CH_2-C_9**), 32.9 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 22.2 Hz, **CH_2-C_{11}**), 28.4 (**CH_2-C_8**).

^{19}F NMR (376 MHz, $CDCl_3$) δ -167.71 – -168.20 (m, 1F).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{13}H_{18}FN_2O_3$ $[M+H]^+$: 269.1296, found: 269.1295.

$[\alpha]_D^{20}$ +2.1 (*c* 1.0, $CHCl_3$).

(*S*)-3-Fluoro-1-(3-(3-nitrophenoxy)propyl)pyrrolidine (109)



Chemical Formula: $C_{13}H_{17}FN_2O_3$
Molecular Weight: 268.29

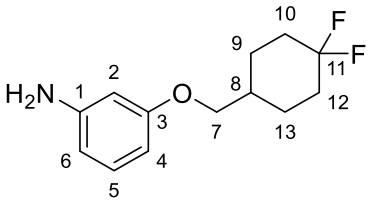
To a solution of **92** (386 mg, 1.48 mmol) in dry MeCN (7.4 mL) were added K_2CO_3 (1.02 g, 7.40 mmol, 5.0 equiv.) and (*S*)-3-fluoropyrrolidine hydrochloride (465 mg, 3.70 mmol, 2.5 equiv.). The suspension was stirred under reflux for 18 h. The reaction mixture was cooled to rt, the inorganic salts were filtered then the filtrate was concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in EtOAc (50 mL) and washed with H_2O (20 mL). The aqueous layer was extracted with EtOAc (2 x 15 mL) then the combined organic layers were dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo* to afford compound **109** (378 mg, 1.41 mmol, 95 %) as a yellow oil. The product was used without further purification in the next step.

The ^{1}H and ^{13}C spectra are identical to the (R)-enantiomer.

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{13}H_{18}FN_2O_3$ $[M+H]^+$: 269.1296, found: 269.1298.

$[\alpha]_D^{20}$ -7.8 (*c* 1.0, $CHCl_3$).

3-((4,4-Difluorocyclohexyl)methoxy)aniline (110)



Chemical Formula: $C_{13}H_{17}F_2NO$
Molecular Weight: 241.28

The reaction was carried out as described in general procedure **D** using nitro compound **96** (308 mg, 1.14 mmol), Pd/C 10 wt.% (121 mg, 0.11 mmol, 0.1 equiv.) in MeOH (6 mL) for 3 h to afford compound **110** (239 mg, 0.99 mmol, 87 %) as a colourless oil. The product was used without further purification in the next step.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3468, 3378, 2941, 2873, 1625, 1596, 1496, 1189, 1157, 1123.

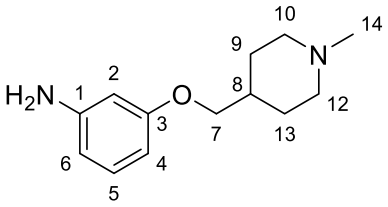
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.05 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, **H_5**), 6.34 – 6.27 (m, 2H, **H_4**, **H_6**), 6.23 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H, **H_2**), 3.77 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H, **H_7**), 3.65 (s, 2H, **NH_2**), 2.19 – 2.06 (m, 2H, **CH_2**), 1.99 – 1.90 (m, 2H, **CH_2**), 1.85 – 1.65 (m, 3H, **H_8 + CH_2**), 1.49 – 1.34 (m, 2H, **CH_2**).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 160.2 (**C**), 148.0 (**C**), 130.3 (**CH_{Ar}-C_5**), 123.7 (dd, $J_{C\text{-}F}$ = 242.1, 239.6 Hz, **C-C_{11}**), 108.1 (**CH_{Ar}**), 104.6 (**CH_{Ar}**), 101.8 (**CH_{Ar}-C_2**), 71.7 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 3.0 Hz, **CH_2-C_7**), 36.1 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 1.6 Hz, **CH-C_8**), 33.28 (dd, $J_{C\text{-}F}$ = 25.5, 22.8 Hz, **2 x CH_2-C_{10} + C_{12}**), 25.99 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 9.7 Hz, **2 x CH_2-C_9 + C_{13}**).

^{19}F NMR (376 MHz, $CDCl_3$) δ -91.40 (d, $J_{F\text{-}H}$ = 235.7 Hz, 1F), -102.00 (dtt, $J_{F\text{-}H}$ = 236.2, 33.2, 9.5 Hz, 1F).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{13}H_{18}F_2NO$ $[M+H]^+$: 242.1351, found: 242.1350.

3-((1-Methylpiperidin-4-yl)methoxy)aniline (111)



Chemical Formula: $C_{13}H_{20}N_2O$
Molecular Weight: 220.32

The reaction was carried out as described in general procedure **D** using nitro compound **99** (171 mg, 0.72 mmol), Pd/C 10 wt.% (77 mg, 0.07 mmol, 0.1 equiv.) in MeOH (4 mL) for 2 h to afford compound **111** (131 mg, 0.60 mmol, 82 %) as a beige solid. The product was used without further purification in the next step.

Mp: 87-89 °C.

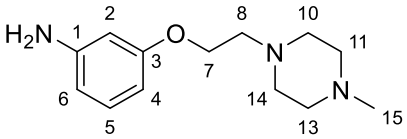
IR (ATR diamond, cm^{-1}) v: 2909, 1595, 1495, 1288, 1190, 155, 1036, 824, 691.

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-d_6) δ 6.86 (t, *J* = 8.3 Hz, 1H, **H_5**), 6.16 – 6.09 (m, 2H, **H_4**, **H_6**), 6.07 – 6.03 (m, 1H, **H_2**),4.99 (s, 2H, **NH_2**), 3.69 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H, **H_7**), 2.81 – 2.70 (m, 2H, **CH_2**), 2.14 (s, 3H, **H_{14}**), 1.83 (td, *J* = 11.6, 2.4 Hz, 2H, **CH_2**), 1.77 – 1.54 (m, 3H, **H_8** + **CH_2**), 1.37 – 1.15 (m, 2H, **CH_2**).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 159.7 (**C**), 149.9 (**C**), 129.5 (**C_5**), 106.7 (**CH_{Ar}**), 102.1 (**CH_{Ar}-C_2**), 100.0 (**CH_{Ar}**), 71.6 (**CH_{Ar}-C_7**), 55.0 (**2 x CH_2**), 46.2 (**CH_3-C_{14}**), 34.9 (**CH-C_8**), 28.6 (**2 x CH_2**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{13}H_{21}N_2O$ $[M+H]^+$: 221.1648, found: 221.1645.

3-(2-(4-Methylpiperazin-1-yl)ethoxy)aniline (112)



Chemical Formula: $C_{13}H_{21}N_3O$
Molecular Weight: 235.33

The reaction was carried out as described in general procedure **D** using the nitro compound **94** (315 mg, 1.19 mmol), Pd/C 10 wt.% (128 mg, 0.12 mmol, 0.1 equiv.) and MeOH (6.6 mL) for 2 h to afford compound **112** (261 mg, 1.11 mmol, 93 %) as a yellow oil which was used without further purification in the next step.

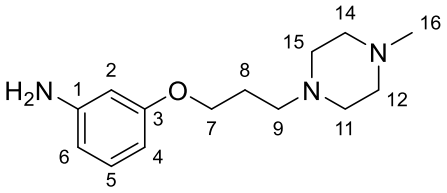
IR (ATR diamond, cm^{-1}) v: 3340, 3208, 2939, 2873, 2804, 1598, 1469, 1457, 1283, 1189, 1155.

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 6.87 (t, *J* = 8.3 Hz, 1H, **H$_{Ar}$**), 6.28 – 6.00 (m, 3H, **3 x H$_{Ar}$**), 5.00 (brs, 2H, **NH$_2$**), 3.94 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H, **H$_7$**), 2.63 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H, **H$_8$**), 2.46 (brs, 4H, **2 x CH$_2$**), 2.31 (brs, 4H, **2 x CH$_2$**), 2.14 (s, 3H, **CH$_3$-H$_{15}$**).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 159.4 (**C**), 149.9 (**C**), 129.5 (**C$_5$**), 106.8 (**CH$_{Ar}$**), 101.9 (**CH$_{Ar}$**), 100.1 (**CH$_{Ar}$**), 65.1 (**CH$_2$-C$_7$**), 56.6 (**CH$_2$-C$_8$**), 54.7 (**2 x CH$_2$**), 53.0 (**2 x CH$_2$**), 45.7 (**CH$_3$-C$_{15}$**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{13}H_{22}N_3O$ $[M+H]^+$: 236.1757, found: 236.1760.

3-(3-(4-Methylpiperazin-1-yl)propoxy)aniline (113)



Chemical Formula: $C_{14}H_{23}N_3O$
Molecular Weight: 249.36

The reaction was carried out as described in general procedure **D** using the nitro compound **95** (276 mg, 0.99 mmol), Pd/C 10 wt.% (105 mg, 0.01 mmol, 0.1 equiv.) in MeOH (5.5 mL) for 2 h to afford compound **113** (208 mg, 0.83 mmol, 85 %) as a beige solid. The product was used without further purification in the next step.

Mp: 54-56 °C.

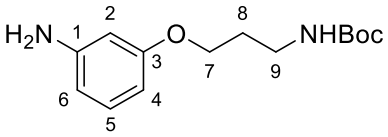
IR (ATR diamond, cm^{-1}) v: 2941, 2893, 2795, 1582, 1495, 1458, 1283, 1150, 1049, 1009, 845, 658.

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.04 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, **H_5**), 6.29 (ddd, *J* = 15.3, 8.0, 2.2 Hz, 2H, **H_4**, **H_6**), 6.24 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H, **H_2**), 3.96 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, **H_7**), 3.63 (s, 2H, **NH_2**), 2.76 – 2.33 (m, 10H, **H_9**, **H_{11}**, **H_{12}**, **H_{14}**, **H_{15}**), 2.29 (s, 3H, **H_{16}**), 1.94 (p, *J* = 6.7 Hz, 1H, **H_8**).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 160.4 (**C**), 147.9 (**C**), 130.2 (**CH_{Ar}-C_5**), 108.0 (**CH_{Ar}-C_6**), 104.8 (**CH_{Ar}-C_4**), 101.8 (**CH_{Ar}-C_2**), 66.2 (**CH_2-C_7**), 55.3 (**3 x CH_2**), 53.4 (**2 x CH_2**), 46.2 (**CH_3-C_{16}**), 27.0 (**CH_2-C_8**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{14}H_{24}N_3O$ $[M+H]^+$: 250.1914, found: 250.1916.

tert-Butyl (3-(3-aminophenoxy)propyl)carbamate (114)



Chemical Formula: $C_{14}H_{22}N_2O_3$
Molecular Weight: 266.34

The reaction was carried out as described in general procedure **D** using nitro compound **97** (239 mg, 0.81 mmol), Pd/C 10 wt.% (86 mg, 0.08 mmol, 0.1 equiv.) in MeOH (4.5 mL) for 3 h to afford compound **114** (196 mg, 0.74 mmol, 91 %) as a yellowish solid. The product was used without further purification in the next step.

Mp: 68-70 °C.

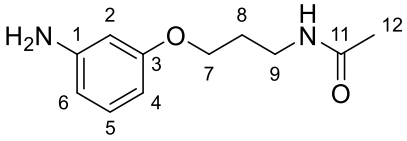
IR (ATR diamond, cm^{-1}) v: 3358, 2970, 2876, 1672, 1599, 1497, 1252, 1188, 1049, 777.

^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 7.05 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, **H_5**), 6.37 – 6.27 (m, 2H, **H_6 + H_4**), 6.24 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H, **H_2**), 4.75 (brs, 1H, **NH**), 3.98 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, **H_7**), 3.65 (brs, 2H, **NH_2**), 3.31 (q, *J* = 6.4 Hz, 2H, **H_9**), 1.95 (p, *J* = 6.3 Hz, 2H, **H_8**), 1.44 (s, 9H, ***t*-Bu**).

^{13}C NMR (63 MHz, $CDCl_3$) δ 160.1 (**C**), 156.1 (**C**), 147.9 (**C**), 130.3 (**CH_{Ar}-C_5**), 108.1 (**C_{Ar}**), 104.7 (**C_{Ar}**), 101.8 (**CH_{Ar}-C_2**), 79.4 (**C),** 65.8 (**CH_2-C_7**), 38.3 (**CH_2-C_9**), 29.7 (**CH_2-C_8**), 28.6 (**3 x CH_3**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{14}H_{23}N_2O_3$ $[M+H]^+$: 267.1703, found: 267.1702.

N-(3-(3-Aminophenoxy)propyl)acetamide (115)



Chemical Formula: $C_{11}H_{16}N_2O_2$
Molecular Weight: 208.26

The reaction was carried out as described in general procedure **D** using nitro compound **103** (250 mg, 1.05 mmol), Pd/C 10 wt.% (117 mg, 0.11 mmol, 0.1 equiv.) in MeOH (5.8 mL) for 2.5 h to afford compound **115** (200 mg, 0.84 mmol, 91 %) as a colourless oil which was used without further purification in the next step.

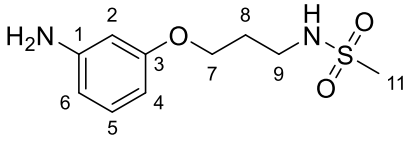
IR (ATR diamond, cm^{-1}) v: 3338, 3088, 2935, 2874, 1633, 1601, 1496, 1290, 1190, 1160, 1038, 764, 689.

^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 7.05 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, **H_5**), 6.31 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, **H_4**), 6.28 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, **H_6**), 6.22 (t, *J* = 2.2 Hz, 1H, **H_2**), 5.87 (brs, 1H, **NH**), 4.00 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H, **H_7**), 3.59 (brs, 2H, **NH_2**), 3.44 (q, *J* = 6.3 Hz, 2H, **H_9**), 2.02 – 1.91 (m, 5H, **H_8 + H_{12}**).

^{13}C NMR (63 MHz, $CDCl_3$) δ 170.2 (**C-C_{11}**), 159.9 (**C-C_3**), 148.0 (**C-C_1**), 130.3 (**CH_{Ar}-C_5**), 108.3 (**CH_{Ar}-C_4**), 104.6 (**CH_{Ar}-C_6**), 101.6 (**CH_{Ar}-C_2**), 66.3 (**CH_2-C_7**), 37.7 (**CH_2-C_9**), 29.0 (**CH_2-C_8**), 23.5 (**CH_3-C_{12}**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{11}H_{17}N_2O_2$ $[M+H]^+$: 209.1285, found: 209.1284.

N-(3-(3-Aminophenoxy)propyl)methanesulfonamide (116)



Chemical Formula: $C_{10}H_{16}N_2O_3S$
Molecular Weight: 244.31

The reaction was carried out as described in general procedure **D** using nitro compound **104** (165 mg, 0.60 mmol), Pd/C 10 wt.% (64 mg, 0.06 mmol, 0.1 equiv.) in MeOH (3.3 mL) for 2 h to afford compound **116** (137 mg, 0.56 mmol, 93 %) as a colourless oil which was used without further purification in the next step.

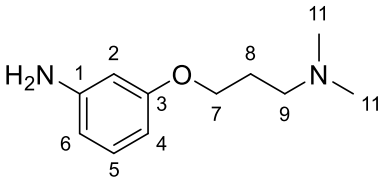
IR (ATR diamond, cm^{-1}) v: 3369, 2931, 1602, 1313, 1191, 1151, 1075, 982, 768, 689.

^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 7.05 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, **H_5**), 6.34 – 6.30 (m, 1H, **H_4**), 6.30 – 6.27 (m, 1H, **H_6**), 6.23 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H, **H_2**), 4.67 (brs, 1H, **NH**), 4.04 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H, **H_7**), 3.67 (brs, 2H, **NH_2**), 3.36 (q, *J* = 6.2 Hz, 2H, **H_9**), 2.94 (s, 3H, **H_{11}**), 2.04 (p, *J* = 6.1 Hz, 2H, **H_8**).

^{13}C NMR (63 MHz, $CDCl_3$) δ 159.7 (**C-C_3**), 148.0 (**C-C_1**), 130.4 (**CH_{Ar}-C_5**), 108.5 (**CH_{Ar}-C_4**), 104.5 (**CH_{Ar}-C_6**), 101.7 (**CH_{Ar}-C_2**), 65.7 (**CH_2-C_7**), 41.3 (**CH_2-C_9**), 40.4 (**CH_3-C_{11}**), 29.6 (**CH_2-C_8**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{10}H_{17}N_2O_3S$ $[M+H]^+$: 245.0954, found: 245.0955.

3-(3-(Dimethylamino)propoxy)aniline (117)



Chemical Formula: $C_{11}H_{18}N_2O$
Molecular Weight: 194.28

The reaction was carried out as described in general procedure **D** using nitro compound **105** (215 mg, 0.96 mmol), Pd/C 10 wt.% (106 mg, 0.10 mmol, 0.1 equiv.) in MeOH (5.0 mL) for 2 h to afford compound **117** (175 mg, 0.90 mmol, 94 %) as a yellow oil.

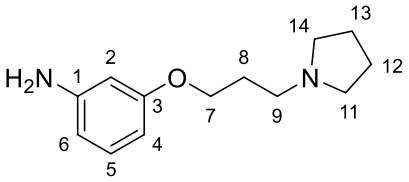
IR (ATR diamond, cm^{-1}) v: 3347, 3210, 2946, 2863, 2820, 2772, 1600, 1496, 1463, 1291, 1190, 1158, 1055, 839, 763, 688.

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.04 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, **H_5**), 6.32 (dd, *J* = 8.2, 1.6 Hz, 1H, **H_4**), 6.30 – 6.26 (m, 1H, **H_6**), 6.25 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H, **H_2**), 3.97 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, **H_7**), 3.63 (brs, 2H, **NH_2**), 2.44 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, **H_9**), 2.26 (s, 6H, **H_{11}**), 1.93 (p, *J* = 7.0 Hz, 2H, **H_8**).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 160.3 (**C-C_3**), 147.9 (**C-C_1**), 130.2 (**CH_{Ar}-C_5**), 108.0 (**CH_{Ar}-C_6**), 104.8 (**CH_{Ar}-C_4**), 101.8 (**CH_{Ar}-C_2**), 66.2 (**CH_2-C_7**), 56.6 (**CH_2-C_9**), 45.6 (**2 x CH_3-C_{11}**), 27.7 (**CH_2-C_8**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{11}H_{19}N_2O$ $[M+H]^+$: 195.1492, found: 195.1494.

3-(3-(Pyrrolidin-1-yl)propoxy)aniline (118)



Chemical Formula: $C_{13}H_{20}N_2O$
Molecular Weight: 220.32

The reaction was carried out as described in general procedure **D** using nitro compound **106** (279 mg, 1.11 mmol), Pd/C 10 wt.% (118 mg, 0.11 mmol, 0.1 equiv.) in MeOH (6.2 mL) for 3 h to afford compound **118** (221 mg, 1.00 mmol, 90 %) as a yellow oil.

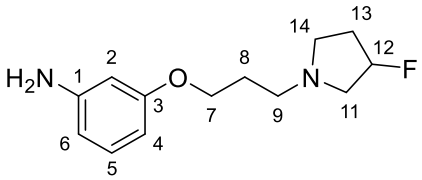
IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3346, 3212, 2953, 2875, 2795, 1598, 1495, 1462, 1291, 1188, 1154, 1052, 983, 836, 762, 687.

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.03 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, **H_5**), 6.32 (dd, *J* = 8.2, 2.3 Hz, 1H, **H_4**), 6.30 – 6.26 (m, 1H, **H_6**), 6.25 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H, **H_2**), 3.98 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, **H_7**), 3.63 (brs, 2H, **NH_2**), 2.61 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H, **H_9**), 2.57 – 2.48 (m, 4H, **H_{11} + H_{14}**), 2.02 – 1.94 (m, 2H, **H_8**), 1.83 – 1.75 (m, 4H, **H_{12} + H_{13}**).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 160.4 (**C-C_3**), 147.9 (**C-C_1**), 130.2 (**CH_{Ar}-C_5**), 107.9 (**CH_{Ar}-C_6**), 104.8 (**CH_{Ar}-C_4**), 101.8 (**CH_{Ar}-C_2**), 66.4 (**CH_2-C_7**), 54.4 (**2 x CH_2-C_{11} + C_{14}**), 53.4 (**CH_2-C_9**), 29.1 (**CH_2-C_8**), 23.6 (**2 x CH_2-C_{12} + C_{13}**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{13}H_{21}N_2O$ $[M+H]^+$: 221.1648, found: 221.1651.

3-(3-(3-Fluoropyrrolidin-1-yl)propoxy)aniline (119)



Chemical Formula: $C_{13}H_{19}FN_2O$
Molecular Weight: 238.31

The reaction was carried out as described in general procedure **D** using nitro compound **107** (275 mg, 1.03 mmol), Pd/C 10 wt.% (106 mg, 0.10 mmol, 0.1 equiv.) in MeOH (5.7 mL) for 18 h to afford compound **119** (227 mg, 0.95 mmol, 93 %) as a pale brown oil.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3374, 3216, 2948, 2801, 1599, 1495, 1462, 1291, 1189, 1155, 1090, 986, 833, 762, 688.

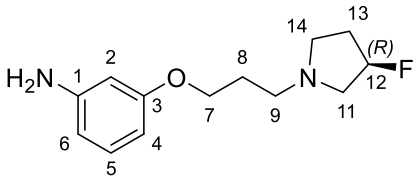
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.04 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, **H_5**), 6.31 (dd, *J* = 8.2, 1.4 Hz, 1H, **H_4**), 6.29 – 6.26 (m, 1H, **H_6**), 6.25 (t, *J* = 2.2 Hz, 1H, **H_2**), 5.17 (dddt, $J_{H\text{-}F}$ = 55.6, *J* = 6.7, 5.0, 1.8 Hz, 1H, **H_{12}**), 3.99 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, **H_7**), 3.64 (brs, 2H, **NH_2**), 2.96 – 2.83 (m, 2H, **H_{13a} + H_{14a}**), 2.80 – 2.68 (m, 1H, **H_{13b}**), 2.65 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, **H_9**), 2.50 – 2.41 (m, 1H, **H_{14b}**), 2.23 – 2.02 (m, 2H, **H_{11}**), 2.01 – 1.93 (m, 2H, **H_8**).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 160.3 (**C-C_3**), 147.9 (**C-C_1**), 130.2 (**CH_{Ar}-C_5**), 108.0 (**CH_{Ar}-C_6**), 104.8 (**CH_{Ar}-C_4**), 101.8 (**CH_{Ar}-C_2**), 93.6 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 175.2 Hz, **CH-C_{12}**), 66.0 (**CH_2-C_7**), 60.9 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 22.7 Hz, **CH_2-C_{13}**), 52.9 (**CH_2-C_{14}**), 52.5 (**CH_2-C_9**), 32.9 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 22.2 Hz, **CH_2-C_{11}**), 28.7 (**CH_2-C_8**).

^{19}F NMR (376 MHz, $CDCl_3$) δ -167.48 – -168.31 (m).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{13}H_{20}FN_2O$ $[M+H]^+$: 239.1554, found: 239.1555.

(*R*)-3-(3-(3-Fluoropyrrolidin-1-yl)propoxy)aniline (120)



Chemical Formula: $C_{13}H_{19}FN_2O$
Molecular Weight: 238.31

The reaction was carried out as described in general procedure **D** using nitro compound **108** (226 mg, 0.84 mmol), Pd/C 10 wt.% (89 mg, 0.08 mmol, 0.1 equiv.) in MeOH (4.7 mL) for 3 h to afford compound **120** (175 mg, 0.73 mmol, 87 %) as an orange oil. The product was used without further purification in the next step.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3374, 3216, 2948, 2801, 1599, 1495, 1462, 1291, 1189, 1155, 1090, 986, 833, 762, 688.

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.04 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, **H_5**), 6.36 – 6.26 (m, 3H, **H_2 + H_4 + H_6**), 5.17 (dt, $J_{H\text{-}F}$ = 55.5, *J* = 5.6 Hz, 1H, **H_{12}**), 3.99 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, **H_7**), 3.64 (brs, 2H, **NH_2**), 2.96 – 2.83 (m, 2H, **H_{13a} + H_{14a}**), 2.80 – 2.68 (m, 1H, **H_{13b}**), 2.65 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, **H_9**), 2.50 – 2.41 (m, 1H, **H_{14b}**), 2.23 – 2.02 (m, 2H, **H_{11}**), 2.01 – 1.93 (m, 2H, **H_8**).

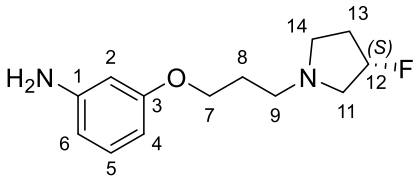
^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 160.3 (**C-C_3**), 147.9 (**C-C_1**), 130.2 (**CH_{Ar}-C_5**), 108.0 (**CH_{Ar}**), 104.8 (**CH_{Ar}**), 101.8 (**CH_{Ar}**), 93.6 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 175.2 Hz, **CH-C_{12}**), 66.0 (**CH_2-C_7**), 60.9 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 22.7 Hz, **CH_2-C_{13}**), 52.9 (**CH_2-C_{14}**), 52.5 (**CH_2-C_9**), 32.9 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 22.2 Hz, **CH_2-C_{11}**), 28.7 (**CH_2-C_8**).

^{19}F NMR (376 MHz, $CDCl_3$) -167.73 – -168.24 (m, 1F).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{13}H_{20}FN_2O$ $[M+H]^+$: 239.1554, found: 239.1556.

$[\alpha]_D^{20}$ +1.9 (*c* 1.0, MeOH).

(*S*)-3-(3-(3-Fluoropyrrolidin-1-yl)propoxy)aniline (121)



Chemical Formula: $C_{13}H_{19}FN_2O$
Molecular Weight: 238.31

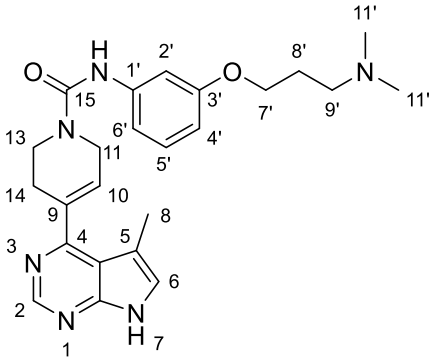
The reaction was carried out as described in general procedure **D** using nitro compound **109** (316 mg, 1.18 mmol), Pd/C 10 wt.% (128 mg, 0.12 mmol, 0.1 equiv.) in MeOH (6.6 mL) for 18 h to afford compound **121** (258 mg, 1.08 mmol, 92 %) as an orange oil. The product was used without further purification in the next step.

The ^{1}H and ^{13}C spectra are identical to the (*R*)-enantiomer.

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{13}H_{20}FN_2O$ $[M+H]^+$: 239.1554, found: 239.1557.

$[\alpha]_D^{20}$ -8.2 (*c* 1.0, MeOH).

N-(3-(3-(Dimethylamino)propoxy)phenyl)-4-(5-methyl-7H-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxamide (122)



Chemical Formula: $C_{24}H_{30}N_6O_2$
Molecular Weight: 434.54

The reaction was carried out as described in general procedure **A** using aniline **117** (67 mg, 0.34 mmol), 4-nitrophenyl chloroformate (83 mg, 0.41 mmol, 1.2 equiv.), DIPEA (212 µL, 1.22 mmol, 3.6 equiv.) and amine **8** (118 mg, 0.41 mmol, 1.2 equiv.) in dry THF (5.0 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH/NH_4OH from 100 up to 92/8/1 to afford compound **122** (32 mg, 0.07 mmol, 22 %) as a beige solid.

R_f (DCM/MeOH/NH_4OH 92/8/1) 0.18.

Mp: 111-113 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3129, 2923, 2856, 1641, 1594, 1533, 1436, 1341, 1234, 1193, 1159, 1057, 966, 824, 731, 689, 612.

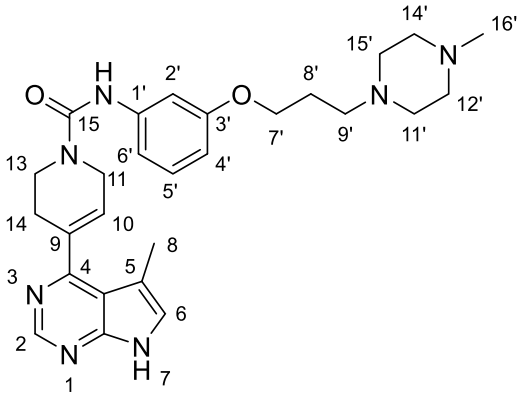
^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-d_6) δ 11.78 (s, 1H, **NH**), 8.60 (s, 1H, **H_2**), 8.49 (s, 1H, **NH**), 7.31 – 7.24 (m, 1H, **H_{Ar}**), 7.17 – 7.13 (m, 1H, **H_{Ar}**), 7.11 – 6.97 (m, 2H, **2 x H_{Ar}**), 6.46 (dt, *J* = 7.3, 2.3 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.06 – 5.95 (m, 1H, **H_{10}**), 4.17 (d, *J* = 3.1 Hz, 2H, **H_{11}**), 3.90 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, **$H_{7'}$**), 3.68 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, **H_{13}**), 2.63 (brs, 2H, **H_{14}**), 2.30 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, **$H_{9'}$**), 2.19 (d, *J* = 1.1 Hz, 3H, **H_8**), 2.10 (s, 6H, **$H_{11'}$**), 1.79 (p, *J* = 6.8 Hz, 2H, **$H_{8'}$**).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-d_6) δ 159.3 (**C**), 158.8 (**C**), 154.9 (**C**), 152.6 (**C**), 150.1 (**CH_{Ar}-C_2**), 141.7 (**C**), 134.2 (**C**), 129.0 (**CH_{Ar}**), 128.3 (**CH-C_{10}**), 125.0 (**CH_{Ar}**), 114.3 (**C**), 111.7 (**CH_{Ar}**), 108.9 (**C**), 107.9 (**CH_{Ar}**), 105.7 (**CH_{Ar}**), 65.6 (**CH_2-$C_{7'}$**), 55.7 (**CH_2-$C_{9'}$**), 45.2 (**2 x CH_3-$C_{11'}$**), 43.6 (**CH_2-C_{11}**), 40.5 (**CH_2-C_{13}**), 27.3 (**CH_2-C_{14}**), 26.9 (**CH_2-$C_{8'}$**), 12.9 (**CH_3-C_8**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{24}H_{31}N_6O_2$ $[M+H]^+$: 435.2503, found: 435.2507.

Purity (HPLC): 99.1 %.

4-(5-Methyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-*N*-(3-(3-(4-methylpiperazin-1-yl)propoxy)phenyl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxamide (123)



Chemical Formula: $C_{27}H_{35}N_7O_2$
Molecular Weight: 489.62

The reaction was carried out as described in general procedure **A** using aniline **113** (178 mg, 0.71 mmol), 4-nitrophenyl chloroformate (173 mg, 0.86 mmol, 1.2 equiv.), DIPEA (0.448 mL, 2.57 mmol, 2.4 equiv.), and amine **8** (246 mg, 0.86 mmol, 1.2 equiv.) in dry THF (10 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH/NH_4OH from 100 up to 90/10/1 to afford compound **123** (77 mg, 0.16 mmol, 22 %) as a beige powder.

R_f (DCM/MeOH/NH_4OH 90/10/1) 0.46.

Mp: 102-104 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) v: 3869, 3645, 2957, 1647, 1533, 1437, 1236, 1055, 650.

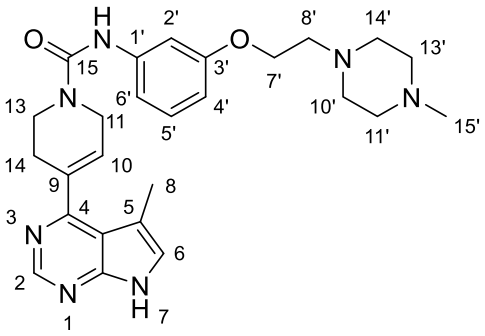
^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-d_6) δ 11.83 (s, 1H, **NH**), 8.64 (s, 1H, **H_2**), 8.54 (s, 1H, **NH**), 7.36 – 7.27 (m, 1H, 1H, **H_6**), 7.20 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H, **$H_{2'}$**), 7.17 – 7.03 (m, 2H, **2 x H_{Ar}**), 6.50 (dt, *J* = 7.5, 2.0 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.09 – 6.00 (m, 1H, **H_{10}**), 4.27 – 4.16 (m, 2H, **H_{11}**), 3.94 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, **$H_{7'}$**), 3.72 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, **H_{13}**), 2.72 – 2.63 (m, 2H, **H_{14}**), 2.49 – 2.27 (m, 10H, **5 x CH_2**), 2.24 (d, *J* = 1.1 Hz, 3H, **H_8**), 2.17 (s, 3H, **$H_{16'}$**), 1.85 (p, *J* = 6.7 Hz, 2H, **$H_{8'}$**).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-d_6) δ 159.4 (**C**), 158.7(**C**), 155.0 (**C**), 152.6 (**C**), 150.1 (**CH_{Ar}-C_2**), 141.7 (**C**), 134.2 (**C**), 129.0 (**CH_{Ar}**), 128.3 (**CH-C_{10}**), 125.0 (**CH_{Ar}-C_6**), 114.3 (**C**), 111.8 (**CH_{Ar}**), 108.9 (**C**), 108.0 (**CH_{Ar}**), 105.8 (**CH_{Ar}-$C_{2'}$**), 65.6 (**CH_2-$C_{7'}$**), 54.6 (**2 x CH_2**), 54.4 (**CH_2**), 52.5 (**2 x CH_2**), 45.5 (**CH_3-$C_{16'}$**), 43.6 (**CH_2-C_{11}**), 40.6 (**CH_2-C_{13}**), 27.3 (**CH_2-C_{14}**), 26.2 (**CH_2-$C_{8'}$**), 12.9 (**CH_3-C_8**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{27}H_{36}N_7O_2$ $[M+H]^+$: 490.2925, found: 490.2922.

Purity (HPLC): 98.0 %.

4-(5-Methyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-*N*-(3-(2-(4-methylpiperazin-1-yl)ethoxy)phenyl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxamide (124)



Chemical Formula: $C_{26}H_{33}N_7O_2$
Molecular Weight: 475.60

The reaction was carried out as described in general procedure **A** using aniline **112** (81 mg, 0.34 mmol), 4-nitrophenyl chloroformate (83 mg, 0.41 mmol, 1.2 equiv.), DIPEA (144 μL, 0.83 mmol, 2.4 equiv.), and amine **8** (104 mg, 0.41 mmol, 1.2 equiv.) in dry THF (5 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH/NH_4OH from 100 up to 80/20/1 following by a preparative TLC using the solvent system DCM/MeOH/NH_4OH 80/20/1 to afford compound **124** (24 mg, 0.05 mmol, 15 %) as a pale orange solid.

R_f (DCM/MeOH/NH_4OH 90/10/1) 0.34.

Mp: degradation 111 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3865, 3656, 2940, 1533, 1435, 1240, 1188, 1053, 688.

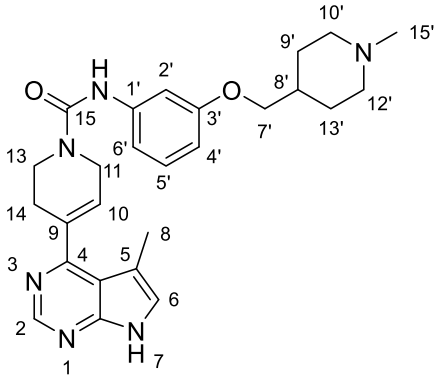
^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-d_6) δ 11.83 (s, 1H, **NH**), 8.64 (s, 1H, **NH**), 8.54 (s, 1H, **H_2**), 7.33 – 7.30 (m, 1H, **H_6**), 7.25 – 7.01 (m, 3H, **3 x H_{Ar}**), 6.52 (dt, *J* = 7.4, 2.3 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.08 – 6.02 (m, 1H, **H_{10}**), 4.21 (m, 2H, **H_{11}**), 4.02 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H, **$H_{7'}$**), 3.72 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, **H_{13}**), 2.68 (t, *J* = 5.6 Hz, 4H, **H_{14}**, **$C_{8'}$**), 2.52-2.49 (m, 4H, **2 x CH_2**), 2.37 (brs, 4H, **2 x CH_2**), 2.24 (d, *J* = 1.1 Hz, 3H, **H_8**), 2.18 (s, 3H, **$H_{15'}$**).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-d_6) δ 159.3 (**C**), 158.5 (**C**), 154.9 (**C**), 152.6 (**C**), 150.1 (**CH_{Ar}-C_2**), 141.7 (**C**), 134.2 (**C**), 129.0 (**CH_{Ar}**), 128.3 (**CH-C_{10}**), 125.0 (**CH_{Ar}-C_6**), 114.3 (**C**), 111.9 (**CH_{Ar}**), 108.9 (**C**), 107.8 (**CH_{Ar}**), 105.9 (**CH_{Ar}**), 65.4 (**CH_2-$C_{7'}$**), 56.5 (**CH_2-$C_{8'}$**), 54.6 (**2 x CH_2**), 52.8 (**2 x CH_2**), 45.5 (**CH_3-$C_{15'}$**), 43.6 (**CH_2-C_{11}**), 40.6 (**CH_2-C_{13}**), 27.3 (**CH_2-C_{14}**), 12.9 (**CH_3-C_8**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{26}H_{34}N_7O_2$ $[M+H]^+$: 476.2768, found: 476.2768.

Purity (HPLC): 98.7 %.

4-(5-Methyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-*N*-(3-((1-methylpiperidin-4-yl)methoxy)phenyl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxamide (125)



Chemical Formula: $C_{26}H_{32}N_6O_2$
Molecular Weight: 460.58

The reaction was carried out as described in general procedure **A** using aniline **111** (113 mg, 0.51 mmol), 4-nitrophenyl chloroformate (124 mg, 0.62 mmol, 1.2 equiv.), DIPEA (322 µL, 3.60 mmol, 3.6 equiv.), and amine **8** (177 mg, 0.62 mmol, 1.2 equiv.) in dry THF (7.3 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH/NH_4OH from 98/2/1 up to 94/6/1 to afford compound **125** (80 mg, 0.17 mmol, 34 %) as a white powder.

R_f (DCM/MeOH/NH_4OH 95/5/1) 0.27.

Mp: degradation 135 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3866, 3650, 2970, 290, 1585, 1435, 1234, 1188, 1047, 964, 768, 689.

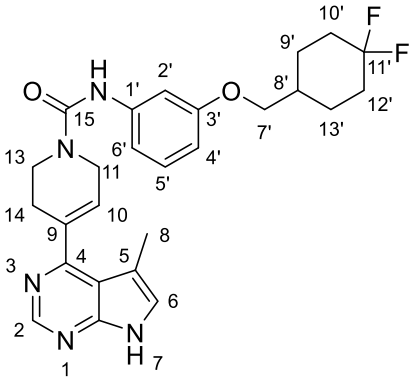
^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-d_6) δ 11.83 (s, 1H, **NH**), 8.64 (s, 1H, **H_2**), 8.54 (s, 1H, **NH**), 7.32 (brs, 1H, **H_{Ar}**), 7.20 (brs, 1H, **H_{Ar}**), 7.16 – 7.02 (m, 2H, **2 x H_{Ar}**), 6.51 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.04 (s, 1H, **C_{10}**), 4.21 (brs, 2H, **C_{11}**), 3.87 – 3.66 (m, 4H, **$H_{7'}$ + H_{13}**), 2.83 (d, *J* = 11.0 Hz, 2H, **CH_2**), 2.67 (brs, 2H, **H_{14}**), 2.23 (s, 3H, **H_8**), 2.20 (s, 3H, **$H_{15'}$**), 1.96 (t, *J* = 11.5 Hz, 2H, **CH_2**), 1.82 – 1.62 (m, 3H, **CH_2+ $H_{8'}$**), 1.41 – 1.19 (m, 2H, **CH_2**).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 159.4 (**C**), 158.8 (**C**), 155.0 (**C**), 152.6 (**C**), 150.1 (**CH_{Ar}-C_2**), 141.7 (**C**), 134.2 (**C**), 129.0 (**CH_{Ar}**), 128.3 (**CH-C_{10}**), 125.0 (**CH_{Ar}**), 114.3 (**C**), 111.8 (**CH_{Ar}**), 108.9 (**C**), 108.0 (**CH_{Ar}**), 105.8 (**CH_{Ar}**), 71.8 (**CH_2-$C_{7'}$**), 54.7 (**2 x CH_2**), 45.9 (**CH_3-$C_{15'}$**), 43.6 (**CH_2-C_{11}**), 40.6 (**CH_2-C_{13}**), 34.6 (**CH_2-$C_{8'}$**), 28.3 (**2 x CH_2**), 27.3 (**CH_2-C_{14}**), 12.9 (**CH_3-C_8**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{26}H_{33}N_6O_2$ $[M+H]^+$: 461.2660, found: 461.2663.

Purity (HPLC): 95.4 %.

N-(3-((4,4-Difluorocyclohexyl)methoxy)phenyl)-4-(5-methyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxamide (126)



Chemical Formula: $C_{26}H_{29}F_2N_5O_2$
Molecular Weight: 481.55

The reaction was carried out as described in general procedure **A** using aniline **110** (101 mg, 0.42 mmol), 4-nitrophenyl chloroformate (101 mg, 0.50 mmol, 1.2 equiv.), DIPEA (175 μL, 1.01 mmol, 2.4 equiv.), and amine **8** (126 mg, 0.50 mmol, 1.2 equiv.) in dry THF (6.0 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 98/2 up to 95/5 to afford compound **126** (119 mg, 0.25 mmol, 59 %) as a white powder.

R_f (DCM/MeOH 95/5) 0.31.

Mp: degradation 223 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3865, 2940, 2805, 1595, 1491, 1437, 1283, 1190, 1153, 1063, 1009, 845, 754, 689.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.82 (s, 1H, **NH**), 8.65 (s, 1H, **H_2**), 8.54 (s, 1H, **NH**), 7.31 (s, 1H, **H_{Ar}**), 7.21 (s, 1H, **H_{Ar}**), 7.17 – 7.05 (m, 2H, **2 x H_{Ar}**), 6.52 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.04 (brs, 1H, **H_{10}**), 4.21 (d, *J* = 3.0 Hz, 2H, **H_{11}**), 3.80 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H, **$H_{7'}$**), 3.72 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, **H_{13}**), 2.67 (brs, 2H, **CH_2**), 2.23 (s, 3H, **H_8**), 2.11 – 1.97 (m, 2H, **CH_2**), 2.0 – 1.7 (m, 5H, **2 x CH_2 + $H_{8'}$**), 1.39 – 1.20 (m, 2H, **CH_2**).

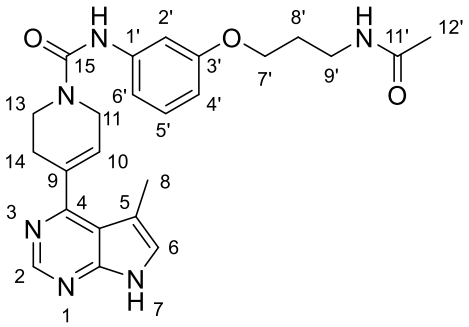
^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 159.3 (**C**), 158.8 (**C**), 154.9 (**C**), 152.6 (**C**), 150.1 (**CH_{Ar}-C_2**), 141.8 (**C**), 134.2 (**C**), 129.0 (**CH_{Ar}**), 128.3 (**CH-C_{10}**), 125.0 (**CH_{Ar}**), 124.3 (dd, $J_{C\text{-}F}$ = 239.6, 121.2, **C-$C_{11'}$**), 114.3 (**C**), 111.9 (**CH_{Ar}**), 108.9 (**C**), 107.9 (**CH_{Ar}**), 105.9 (**CH_{Ar}**), 71.1 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 2.7 Hz, **CH_2-$C_{7'}$**), 43.6 (**CH_2-C_{11}**), 40.6 (**CH_2-C_{13}**), 34.9 (**CH_2-$C_{8'}$**), 32.4 (dd, $J_{C\text{-}F}$ = 25.0, 22.3 Hz, **2 x CH_2-$C_{10'}$ + $C_{12'}$**), 27.3 (**CH_2-C_{14}**), 25.4 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 9.6 Hz, **2 x CH_2-$C_{9'}$ + $C_{13'}$**), 12.9 (**CH_3-C_8**).

^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-d_6) δ -89.18 (d, $J_{F\text{-}H}$ = 232.8 Hz, 1F), -99.58 (dt, $J_{F\text{-}H}$ = 231.8, 34.9 Hz, 1F).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{26}H_{30}F_2N_5O_2$ $[M+H]^+$: 482.2362, found: 482.2363.

Purity (HPLC): > 99.9 %.

N-(3-(3-Acetamidopropoxy)phenyl)-4-(5-methyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxamide (127)



Chemical Formula: $C_{24}H_{28}N_6O_3$
Molecular Weight: 448.53

The reaction was carried out as described in general procedure **A** using aniline **115** (87 mg, 0.42 mmol), 4-nitrophenyl chloroformate (101 mg, 0.50 mmol, 1.2 equiv.), DIPEA (263 µL, 1.51 mmol, 3.6 equiv.), and amine **8** (144 mg, 0.50 mmol, 1.2 equiv.) in dry THF (6.0 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 100 up to 92/8 to afford compound **127** (106 mg, 0.24 mmol, 57 %) as a white powder.

R_f (DCM/MeOH 92/8) 0.16.

Mp: 110-112 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) v: 3117, 2923, 1634, 1538, 1435, 1236, 1194, 1160, 1047, 770, 689, 610.

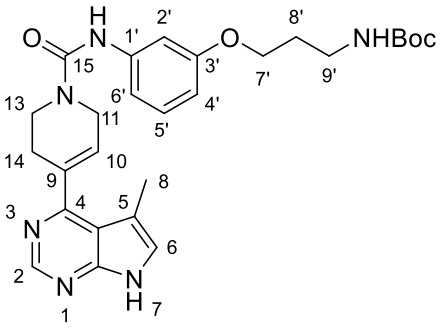
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.83 (s, 1H, **NH**), 8.65 (s, 1H, **H_2**), 8.56 (s, 1H, **NH**), 7.91 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H, **NH**), 7.37 – 7.31 (m, 1H, **H_{Ar}**), 7.24 – 7.18 (m, 1H, **H_{Ar}**), 7.17 – 7.06 (m, 2H, **2 x H_{Ar}**), 6.52 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.10 – 5.99 (m, 1H, **H_{10}**), 4.25 – 4.18 (m, 2H, **H_{11}**), 3.94 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, **$H_{7'}$**), 3.73 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, **H_{13}**), 3.19 (q, *J* = 6.5 Hz, 2H, **$H_{9'}$**), 2.71 – 2.63 (m, 2H, **H_{14}**), 2.24 (s, 3H, **H_8**), 1.91 – 1.76 (m, 5H, **$H_{8'}$ + $H_{12'}$**).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 169.1 (**C**), 159.3 (**C**), 158.7 (**C**), 154.9 (**C**), 152.6 (**C**), 150.1 (**CH_{Ar}-C_2**), 141.7 (**C**), 134.2 (**C**), 128.9 (**CH_{Ar}**), 128.2 (**CH-C_{10}**), 125.0 (**CH_{Ar}**), 114.3 (**C**), 111.9 (**CH_{Ar}**), 108.9 (**C**), 107.9 (**CH_{Ar}**), 105.9 (**CH_{Ar}**), 65.0 (**CH_2-$C_{7'}$**), 43.6 (**CH_2-C_{11}**), 40.6 (**CH_2-C_{13}**), 35.5 (**CH_2-$C_{9'}$**), 28.9 (**CH_2-$C_{8'}$**), 27.3 (**CH_2-C_{14}**), 22.6 (**CH_3-$C_{12'}$**), 12.9 (**CH_3-C_8**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{24}H_{29}N_6O_3$ $[M+H]^+$: 449.2296, found: 449.2288.

Purity (HPLC): > 99.9 %.

tert-Butyl (3-(3-(4-(5-methyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-1,2,3,6-tetrahydropyridine-1-carboxamido)phenoxy)propyl)carbamate (128)



Chemical Formula: $C_{27}H_{34}N_6O_4$
Molecular Weight: 506.61

The reaction was carried out as described in general procedure **A** using aniline **114** (78 mg, 0.29 mmol), 4-nitrophenyl chloroformate (71 mg, 0.35 mmol, 1.2 equiv.), DIPEA (122 µL, 0.70 mmol, 2.4 equiv.), and amine **8** (88 mg, 0.35 mmol, 1.2 equiv.) in dry THF (4.0 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 98/2 up to 95/5 to afford compound **128** (85 mg, 0.17 mmol, 57 %) as a white powder.

R_f (DCM/MeOH 95/5) 0.42.

Mp: degradation 103 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) v: 3863, 2957, 1522, 1437, 1240, 1163, 1055, 966, 689.

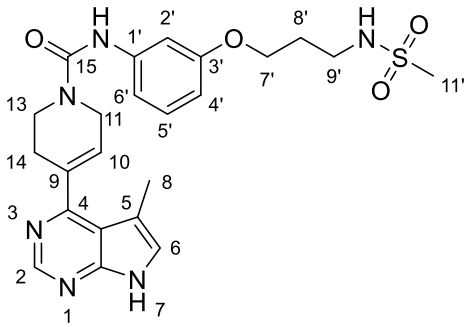
^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-d_6) δ 11.81 (s, 1H, **NH**), 8.64 (s, 1H, **H_2**), 8.54 (s, 1H, **NH**), 7.35 – 7.27 (m, 1H, **H_{Ar}**), 7.24 – 7.16 (m, 1H, **H_{Ar}**), 7.17 – 7.02 (m, 2H, **2 x H_{Ar}**), 6.88 (t, *J* = 5.1 Hz, 1H, **NH**), 6.50 (dt, *J* = 7.6, 2.0 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.12 – 5.99 (m, 1H, **H_{10}**), 4.21 (d, *J* = 2.6 Hz, 2H, **H_{11}**), 3.92 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H, **$H_{7'}$**), 3.73 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, **H_{13}**), 3.07 (q, *J* = 6.6 Hz, 2H, **$H_{9'}$**), 2.68 (brs, 2H, **H_{14}**), 2.24 (s, 3H, **H_8**), 1.82 (p, *J* = 6.6 Hz, 2H, **$H_{8'}$**), 1.37 (s, 9H, ***t*-Bu**).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-d_6) δ 159.4 (**C**), 158.7 (**C**), 155.6 (**C**), 155.0 (**C**), 152.6 (**C**), 150.1 (**CH_{Ar}-C_2**), 141.8 (**C**), 134.3 (**C**), 129.0 (**CH_{Ar}**), 128.3 (**CH-C_{10}**), 125.0 (**CH_{Ar}**), 114.3 (**C**), 111.9 (**CH_{Ar}**), 108.9 (**C**), 107.9 (**CH_{Ar}**), 105.9 (**CH_{Ar}**), 77.5 (**C**), 65.0 (**CH_2-$C_{7'}$**), 43.6 (**CH_2-C_{11}**), 40.6 (**CH_2-C_{13}**), 37.0 (**CH_2-$C_{9'}$**), 29.3 (**CH_2-$C_{8'}$**), 28.2 (**3 x CH_3**), 27.3 (**CH_2-C_{14}**), 12.9 (**CH_3-C_8**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{27}H_{35}N_6O_4$ $[M+H]^+$: 507.2714, found: 507.2709.

Purity (HPLC): 96.4 %.

4-(5-Methyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-*N*-(3-(3-(methylsulfonamido)propoxy)phenyl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxamide (129)



Chemical Formula: $C_{23}H_{28}N_6O_4S$
Molecular Weight: 484.57

The reaction was carried out as described in general procedure **A** using aniline **116** (66 mg, 0.27 mmol), 4-nitrophenyl chloroformate (64 mg, 0.32 mmol, 1.2 equiv.), DIPEA (169 µL, 0.97 mmol, 3.6 equiv.), and amine **8** (93 mg, 0.32 mmol, 1.2 equiv.) in dry THF (3.9 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 100 up to 95/5 to afford compound **129** (87 mg, 0.18 mmol, 67 %) as a white powder.

R_f (DCM/MeOH 95/5) 0.14.

Mp: 105-107 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3140, 2925, 1641, 1595, 1537, 1436, 1309, 1235, 1193, 1147, 1061, 967, 769, 688, 611.

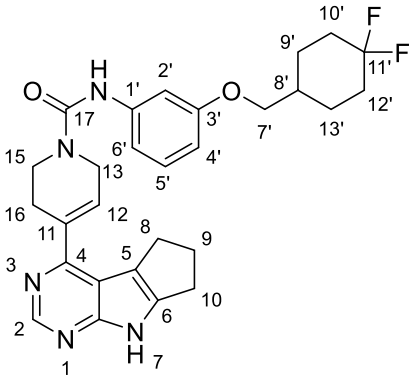
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.82 (s, 1H, **NH**), 8.65 (s, 1H, **H_2**), 8.55 (s, 1H, **NH**), 7.34 – 7.27 (m, 1H, **H_{Ar}**), 7.24 – 7.19 (m, 1H, **H_{Ar}**), 7.16 – 7.03 (m, 3H, **NH + 2 x H_{Ar}**), 6.53 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.07 – 6.02 (m, 1H, **H_{10}**), 4.29 – 4.17 (m, 2H, **H_{11}**), 3.98 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H, **$H_{7'}$**), 3.73 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, **H_{13}**), 3.11 (q, *J* = 6.6 Hz, 2H, **$H_{9'}$**), 2.90 (s, 3H, **$H_{11'}$**), 2.71 – 2.63 (m, 2H, **H_{14}**), 2.24 (s, 3H, **H_8**), 1.91 (p, *J* = 6.6 Hz, 2H, **$H_{8'}$**).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 159.3 (**C**), 158.6 (**C**), 154.9 (**C**), 152.6 (**C**), 150.1 (**CH_{Ar}-C_2**), 141.7 (**C**), 134.2 (**C**), 129.0 (**CH_{Ar}**), 128.2 (**CH-C_{10}**), 125.0 (**CH_{Ar}**), 114.3 (**C**), 111.9 (**CH_{Ar}**), 108.9 (**C**), 107.8 (**CH_{Ar}**), 105.9 (**CH_{Ar}**), 64.5 (**CH_2-$C_{7'}$**), 43.6 (**CH_2-C_{11}**), 40.6 (**CH_2-C_{13}**), 39.4 (**CH_2-$C_{9'}$**), 39.1 (**CH_3-$C_{11'}$**), 29.3 (**CH_2-$C_{8'}$**), 27.3 (**CH_2-C_{14}**), 12.9 (**CH_3-C_8**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{23}H_{29}N_6O_4S$ $[M+H]^+$: 485.1966, found: 485.1964.

Purity (HPLC): 99.0 %.

N-(3-((4,4-Difluorocyclohexyl)methoxy)phenyl)-4-(5,6,7,8-tetrahydrocyclopenta[4,5]pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxamide (130)



Chemical Formula: $C_{28}H_{31}F_2N_5O_2$
Molecular Weight: 507.59

The reaction was carried out as described in general procedure **A** using aniline **110** (90 mg, 0.37 mmol), 4-nitrophenyl chloroformate (87 mg, 0.44 mmol, 1.2 equiv.), DIPEA (232 µL, 1.33 mmol, 3.6 equiv.), and amine **12** (139 mg, 0.44 mmol, 1.2 equiv.) in dry THF (5.3 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 98/2 up to 96/4 to afford compound **130** (156 mg, 0.31 mmol, 84 %) as a beige solid.

R_f (DCM/MeOH 96/4) 0.26.

Mp: 140-142 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3204, 2931, 2858, 1639, 1595, 1538, 1435, 1235, 1193, 1073, 965, 770, 688.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.95 (s, 1H, **NH**), 8.57 (s, 1H, **H_2**), 8.52 (s, 1H, **NH**), 7.20 (brs, 1H, **H_{Ar}**), 7.17 – 7.05 (m, 2H, **2 x H_{Ar}**), 6.57 (brs, 1H, **H_{12}**), 6.55 – 6.48 (m, 1H, **H_{Ar}**), 4.27 – 4.21 (m, 2H, **H_{13}**), 3.80 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H, **$H_{7'}$**), 3.69 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, **H_{15}**), 2.92 – 2.81 (m, 4H, **H_8 + H_{10}**), 2.76 – 2.71 (m, 2H, **H_{16}**), 2.41 (p, *J* = 7.1 Hz, 2H, **H_9**), 2.08 – 1.96 (m, 2H, **$H_{10'/12'}$**), 1.93 – 1.74 (m, 5H, **$H_{8'}$ + $H_{12'/10'}$ + $H_{9'/13'}$**), 1.39 – 1.25 (m, 2H, **$H_{13'/9'}$**).

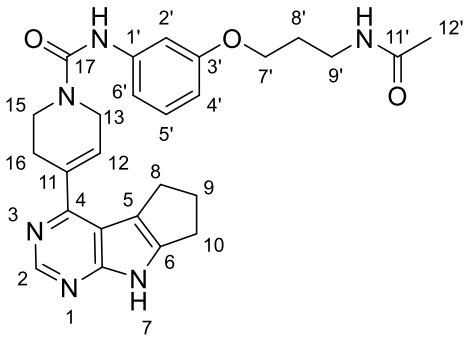
^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 158.7 (**C**), 156.4 (**C**), 154.9 (**C**), 154.8 (**C**), 148.9 (**CH_{Ar}-C_2**), 145.7 (**C**), 141.7 (**C**), 134.9 (**C**), 129.0 (**CH_{Ar}**), 128.6 (**CH-C_{12}**), 124.3 (dd, $J_{C\text{-}F}$ = 241.2, 239.4 Hz, **C-$C_{11'}$**), 115.0 (**C**), 111.9 (**CH_{Ar}**), 111.6 (**C**), 107.9 (**CH_{Ar}**), 105.9 (**CH_{Ar}**), 71.1 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 2.7 Hz, **CH_2-$C_{7'}$**), 43.9 (**CH_2-C_{13}**), 40.5 (**CH_2-C_{15}**), 34.9 (**CH-$C_{8'}$**), 32.4 (dd, $J_{C\text{-}F}$ = 24.9, 22.3 Hz, **2 x CH_2-$C_{10'}$ + $C_{12'}$**), 27.7 (**CH_2-$C_{8/10}$**), 27.2 (**CH_2-C_9**), 26.2 (**CH_2-C_{16}**), 25.5 (**CH_2-$C_{10/8}$**), 25.4 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 9.6 Hz, **2 x CH_2-$C_{9'}$ + $C_{13'}$**).

^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-d_6) δ -89.19 (d, $J_{F\text{-}H}$ = 231.8 Hz, 1F), -99.59 (dt, $J_{F\text{-}H}$ = 233.4, 36.7 Hz, 1F).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{28}H_{32}F_2N_5O_2$ $[M+H]^+$: 508.2519, found: 508.2523.

Purity (HPLC): 99.0 %.

N-(3-(3-Acetamidopropoxy)phenyl)-4-(5,6,7,8-tetrahydrocyclopenta[4,5]pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxamide (131)



Chemical Formula: $C_{26}H_{30}N_6O_3$
Molecular Weight: 474.57

The reaction was carried out as described in general procedure **A** using aniline **115** (103 mg, 0.49 mmol), 4-nitrophenyl chloroformate (119 mg, 0.59 mmol, 1.2 equiv.), DIPEA (307 μL, 1.76 mmol, 3.6 equiv.) and amine **12** (186 mg, 0.59 mmol, 1.2 equiv.) in dry THF (7.0 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 100 up to 95/5 to afford compound **131** (117 mg, 0.25 mmol, 50 %) as a white solid.

R_f (DCM/MeOH 95/5) 0.18.

Mp: 231-233 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3360, 3316, 3119, 3025, 2946, 2869, 1636, 1601, 1440, 1377, 1285, 1248, 1201, 1161, 1065, 970, 670, 754, 688, 606.

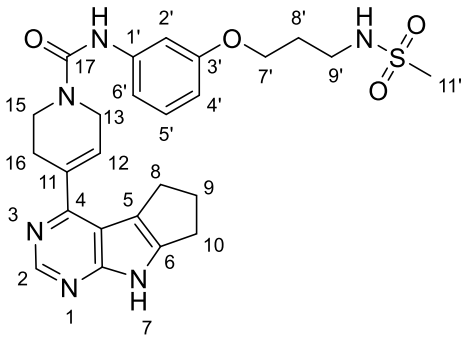
^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-d_6) δ 11.96 (s, 1H, **NH**), 8.57 (s, 1H, **H_2**), 8.53 (s, 1H, **NH**), 7.91 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H, **NH**), 7.20 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 7.18 – 7.03 (m, 2H, **2 x H_{Ar}**), 6.60 – 6.54 (m, 1H, **H_{12}**), 6.57 – 6.45 (m, 1H, **H_{Ar}**), 4.24 (d, *J* = 3.2 Hz, 2H, **H_{13}**), 3.93 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, **$H_{7'}$**), 3.70 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H, **H_{15}**), 3.18 (q, *J* = 6.5 Hz, 2H, **$H_{9'}$**), 2.93 – 2.80 (m, 4H, **H_8 + H_{10}**), 2.73 (brs, 2H, **H_{16}**), 2.40 (p, *J* = 7.2 Hz, 2H, **H_9**), 1.90 – 1.74 (m, 5H, **$H_{8'}$ + $H_{12'}$**).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-d_6) δ 169.1 (**C-$C_{11'}$**), 158.7 (**C**), 156.4 (**C**), 154.9 (**C**), 154.8 (**C**), 148.9 (**CH_{Ar}-C_2**), 145.7 (**C**), 141.7 (**C**), 134.9 (**C**), 129.0 (**CH_{Ar}**), 128.6 (**CH-C_{12}**), 115.0 (**C**), 111.9 (**CH_{Ar}**), 111.6 (**C**), 107.9 (**CH_{Ar}**), 105.9 (**CH_{Ar}**), 65.0 (**CH_2-$C_{7'}$**), 43.9 (**CH_2-C_{13}**), 40.5 (**CH_2-C_{15}**), 35.5 (**CH_2-$C_{9'}$**), 28.9 (**CH_2-$C_{8'}$**), 27.7 (**CH_2-$C_{8/10}$**), 27.2 (**CH_2-C_9**), 26.2 (**CH_2-C_{16}**), 25.5 (**CH_2-$C_{10/8}$**), 22.6 (**CH_3-$C_{12'}$**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{26}H_{31}N_6O_3$ $[M+H]^+$: 475.2452, found: 475.2452.

Purity (HPLC): 99.2 %.

N-(3-(3-(Methylsulfonamido)propoxy)phenyl)-4-(5,6,7,8-tetrahydrocyclopenta[4,5]pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxamide (132)



Chemical Formula: $C_{25}H_{30}N_6O_4S$
Molecular Weight: 510.61

The reaction was carried out as described in general procedure **A** using aniline **116** (63 mg, 0.26 mmol), 4-nitrophenyl chloroformate (62 mg, 0.31 mmol, 1.2 equiv.), DIPEA (164 µL, 0.94 mmol, 3.6 equiv.) and amine **12** (98 mg, 0.31 mmol, 1.2 equiv.) in dry THF (3.7 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 100 up to 96/4 to afford compound **132** (87 mg, 0.17 mmol, 65 %) as an orange solid.

R_f (DCM/MeOH 95/5) 0.32.

Mp: 135-137 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3129, 2929, 1636, 1594, 1533, 1435, 1310, 1236, 1192, 1146, 1072, 967, 766, 688, 601, 575, 563.

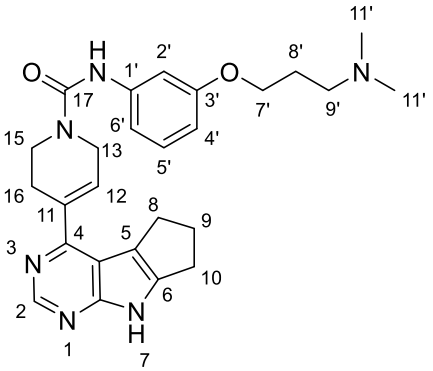
^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-d_6) δ 11.96 (s, 1H, **NH**), 8.57 (s, 1H, **H_2**), 8.53 (s, 1H, **NH**), 7.27 – 7.17 (m, 1H, **H_{Ar}**), 7.20 – 7.00 (m, 3H, **NH + 2 x H_{Ar}**), 6.62 – 6.54 (m, 1H, **H_{12}**), 6.58 – 6.47 (m, 1H, **H_{Ar}**), 4.24 (d, *J* = 2.3 Hz, 2H, **H_{13}**), 3.98 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H, **$H_{7'}$**), 3.70 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H, **H_{15}**), 3.11 (q, *J* = 6.6 Hz, 2H, **$H_{9'}$**), 2.98 – 2.80 (m, 7H, **H_8 + H_{10} + $H_{11'}$**), 2.73 (brs, 2H, **H_{16}**), 2.49 – 2.33 (m, 2H, **H_9**), 1.90 (p, *J* = 6.5 Hz, 2H, **$H_{8'}$**).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 158.6 (**C**), 156.5 (**C**), 154.9 (**C**), 154.9 (**C**), 149.0 (**CH_{Ar}-C_2**), 145.7 (**C**), 141.7 (**C**), 134.9 (**C**), 129.0 (**CH_{Ar}**), 128.6 (**CH-C_{12}**), 115.0 (**C**), 111.9 (**CH_{Ar}**), 111.6 (**C**), 107.8 (**CH_{Ar}**), 105.9 (**CH_{Ar}**), 64.5 (**CH_2-$C_{7'}$**), 43.9 (**CH_2-C_{13}**), 40.5 (**CH_2-C_{15}**), 39.5 (**CH_2-$C_{9'}$**), 39.2 (**CH_3-$C_{11'}$**), 29.3 (**CH_2-$C_{8'}$**), 27.7 (**CH_2-$C_{8/10}$**), 27.2 (**CH_2-C_9**), 26.2 (**CH_2-C_{16}**), 25.5 (**CH_2-$C_{10/8}$**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{25}H_{31}N_6O_4S$ $[M+H]^+$: 511.2122, found: 511.2123.

Purity (HPLC): > 99.9 %.

N-(3-(3-(Dimethylamino)propoxy)phenyl)-4-(5,6,7,8-tetrahydrocyclopenta[4,5]pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxamide (133)



Chemical Formula: $C_{26}H_{32}N_6O_2$
Molecular Weight: 460.58

The reaction was carried out as described in general procedure **A** using aniline **117** (88 mg, 0.45 mmol), 4-nitrophenyl chloroformate (109 mg, 0.54 mmol, 1.2 equiv.), DIPEA (282 µL, 1.62 mmol, 3.6 equiv.) and amine **12** (170 mg, 0.54 mmol, 1.2 equiv.) in dry THF (6.4 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH/NH_4OH from 98/2/1 up to 93/7/1 to afford compound **133** (55 mg, 0.12 mmol, 27 %) as an orange solid.

R_f (DCM/MeOH/NH_4OH 95/5/1) 0.09.

Mp: 123-125 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3120, 2944, 2856, 1636, 1594, 1539, 1435, 1409, 1235, 1193, 1159, 1057, 966, 838, 770, 688, 627.

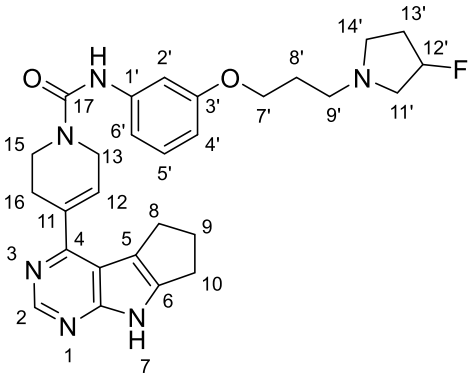
^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-d_6) δ 11.97 (s, 1H, **NH**), 8.57 (s, 1H, **H_2**), 8.52 (s, 1H, **NH**), 7.24 – 7.15 (m, 1H, **H_{Ar}**), 7.16 – 7.04 (m, 2H, **2 x H_{Ar}**), 6.57 (brs, 1H, **H_{12}**), 6.50 (dt, *J* = 6.9, 2.5 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 4.24 (d, *J* = 3.2 Hz, 2H, **H_{13}**), 3.94 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, **$H_{7'}$**), 3.70 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H, **H_{15}**), 2.94 – 2.79 (m, 4H, **H_8 + H_{10}**), 2.73 (brs, 2H, **H_{16}**), 2.48 – 2.28 (m, 4H, **H_9 + $H_{9'}$**), 2.14 (s, 6H, **$H_{11'}$**), 1.83 (p, *J* = 6.7 Hz, 2H, **$H_{8'}$**).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-d_6) δ 158.7 (**C**), 156.4 (**C**), 154.9 (**C**), 154.8 (**C**), 148.9 (**CH_{Ar}-C_2**), 145.7 (**C**), 141.7 (**C**), 134.9 (**C**), 128.9 (**CH_{Ar}**), 128.6 (**CH-C_{12}**), 115.0 (**C**), 111.7 (**CH_{Ar}**), 111.6 (**C**), 107.9 (**CH_{Ar}**), 105.7 (**CH_{Ar}**), 65.6 (**CH_2-$C_{7'}$**), 55.7 (**CH_2-$C_{9'}$**), 45.1 (**2 x CH_3-$C_{11'}$**), 43.9 (**CH_2-C_{13}**), 40.5 (**CH_2-C_{15}**), 27.7 (**CH_2-$C_{8/10}$**), 27.2 (**CH_2-C_9**), 26.9 (**CH_2-$C_{8'}$**), 26.2 (**CH_2-C_{16}**), 25.5 (**CH_2-$C_{10/8}$**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{26}H_{33}N_6O_2$ $[M+H]^+$: 461.2660, found: 461.2656.

Purity (HPLC): 95.8 %.

N-(3-(3-(3-Fluoropyrrolidin-1-yl)propoxy)phenyl)-4-(5,6,7,8-tetrahydrocyclopenta[4,5]pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxamide (134)



Chemical Formula: $C_{28}H_{33}FN_6O_2$
Molecular Weight: 504.61

The reaction was carried out as described in general procedure **A** using aniline **119** (78 mg, 0.33 mmol), 4-nitrophenyl chloroformate (81 mg, 0.40 mmol, 1.2 equiv.), DIPEA (207 µL, 1.19 mmol, 3.6 equiv.) and amine **12** (126 mg, 0.40 mmol, 1.2 equiv.) in dry THF (4.7 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH/NH_4OH from 100 up to 96/4/1 to afford compound **134** (58 mg, 0.11 mmol, 35 %) as a beige solid.

R_f (DCM/MeOH/NH_4OH 95/5/1) 0.21.

Mp: 152-154 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3217, 2922, 2853, 1636, 1594, 1435, 1286,1235, 1192, 1159, 1071, 965, 842, 771, 688, 604, 580, 572, 552.

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-d_6) δ 11.96 (s, 1H, **NH**), 8.57 (s, 1H, **H_2**), 8.52 (s, 1H, **NH**), 7.25 – 7.18 (m, 1H, **H_{Ar}**), 7.19 – 7.01 (m, 2H, **2 x**, **H_{Ar}**), 6.62 – 6.54 (m, 1H, **H_{12}**), 6.50 (dt, *J* = 7.3, 2.2 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 5.18 (d, $J_{H\text{-}F}$ = 56.1 Hz, 1H, **$H_{12'}$**), 4.30 – 4.18 (m, 2H, **H_{13}**), 3.96 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, **$H_{7'}$**), 3.70 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, **H_{15}**), 2.92 – 2.54 (m, 11H, **6 x CH_2**), 2.47 – 2.22 (m, 3H, **2 x CH_2**), 2.21 – 1.99 (m, 1H, **CH_2**), 1.98 – 1.72 (m, 3H, **2 x CH_2**).

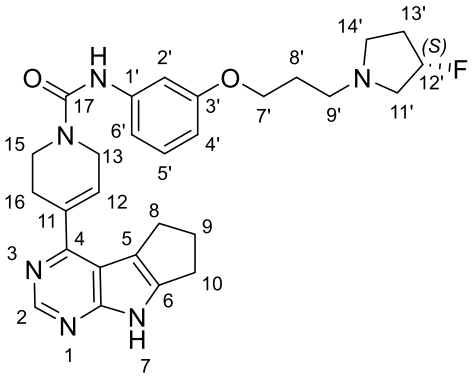
^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-d_6) δ 158.7 (**C**), 156.4 (**C**), 154.9 (**C**), 154.8 (**C**), 148.9 (**CH_{Ar}-C_2**), 145.7 (**C**), 141.7 (**C**), 134.9 (**C**), 129.0 (**CH_{Ar}**), 128.6 (**CH-C_{12}**), 115.0 (**C**), 111.8 (**CH_{Ar}**), 111.6 (**C**), 107.9 (**CH_{Ar}**), 105.7 (**CH_{Ar}**), 93.4 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 173.5 Hz, **CH-$C_{12'}$**), 65.5 (**CH_2-$C_{7'}$**), 60.2 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 22.1 Hz, **CH_2-$C_{11'/13'}$**), 51.9 (**2 x CH_2**), 43.9 (**CH_2-C_{13}**), 40.5 (**CH_2-C_{15}**), 32.3 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 21.6 Hz **CH_2-$C_{13'/11'}$**), 28.0 (**CH_2**), 27.7 (**CH_2**), 27.2 (**CH_2**), 26.2 (**CH_2**), 25.5 (**CH_2**).

^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-d_6) δ -165.95 – -166.63 (m, 1F).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{28}H_{34}FN_6O_2$ $[M+H]^+$: 505.2722, found: 505.2722.

Purity (HPLC): 99.3 %.

(*S*)-*N*-(3-(3-(3-Fluoropyrrolidin-1-yl)propoxy)phenyl)-4-(5,6,7,8-tetrahydrocyclopenta[4,5]pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxamide (135)



Chemical Formula: $C_{28}H_{33}FN_6O_2$
Molecular Weight: 504.61

The reaction was carried out as described in general procedure **A** using aniline **121** (110 mg, 0.46 mmol), 4-nitrophenyl chloroformate (111 mg, 0.55 mmol, 1.2 equiv.), DIPEA (289 µL, 1.66 mmol, 3.6 equiv.) and amine **12** (173 mg, 0.55 mmol, 1.2 equiv.) in dry THF (6.6 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH/NH_4OH from 100 up to 96/4/1 to afford compound **135** (81 mg, 0.16 mmol, 43 %) as a pale yellow powder.

R_f (DCM/MeOH/NH_4OH 95/5/1) 0.28.

Mp: 142 – 144 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3205, 2930, 2092, 1704, 1636, 1598, 1539, 1436, 1387, 1236, 1180, 1161, 1049, 963, 752, 730, 688, 600.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 11.96 (s, 1H, **NH**), 8.57 (s, 1H, **H_2**), 8.52 (s, 1H, **NH**), 7.23 – 7.18 (m, 1H, **H_{Ar}**), 7.16 – 7.05 (m, 2H, **2 x**, **H_{Ar}**), 6.60 – 6.55 (m, 1H, **H_{12}**), 6.51 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 5.18 (dt, $J_{H\text{-}F}$ = 55.9, *J* = 5.9 Hz, 1H, **$H_{12'}$**), 4.28 – 4.19 (m, 2H, **H_{13}**), 3.96 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, **$H_{7'}$**), 3.70 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, **H_{15}**), 2.92 – 2.54 (m, 11H, **6 x CH_2**), 2.47 – 2.22 (m, 3H, **2 x CH_2**), 2.21 – 1.99 (m, 1H, **CH_2**), 1.98 – 1.72 (m, 3H, **2 x CH_2**).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 158.7 (**C**), 156.5 (**C**), 154.9 (**C**), 154.9 (**C**), 148.9 (**CH_{Ar}-C_2**), 145.7 (**C**), 141.7 (**C**), 134.9 (**C**), 129.0 (**CH_{Ar}**), 128.6 (**CH-C_{12}**), 115.0 (**C**), 111.8 (**CH_{Ar}**), 111.6 (**C**), 108.0 (**CH_{Ar}**), 105.7 (**CH_{Ar}**), 93.4 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 173.5 Hz, **CH-$C_{12'}$**), 65.5 (**CH_2-$C_{7'}$**), 60.2 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 22.2 Hz, **CH_2-$C_{11'/13'}$**), 51.9 (**2 x CH_2**), 43.9 (**CH_2-C_{13}**), 40.5 (**CH_2-C_{15}**), 32.3 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 21.7 Hz **CH_2-$C_{13'/11'}$**), 28.0 (**CH_2**), 27.7 (**CH_2**), 27.2 (**CH_2**), 26.2 (**CH_2**), 25.5 (**CH_2**).

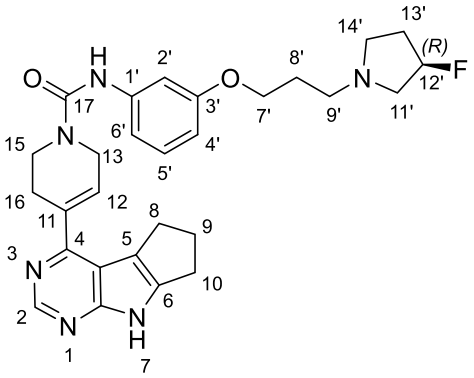
^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-*d*$_6$) -165.9 – -166.5 (m, 1F).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{28}H_{34}FN_6O_2$ $[M+H]^+$: 505.2722, found: 505.2716.

$[\alpha]_D^{20}$ -2.1 (*c* 1.0, DMSO).

Purity (HPLC): 99.2 %.

(*R*)-*N*-(3-(3-(3-Fluoropyrrolidin-1-yl)propoxy)phenyl)-4-(5,6,7,8-tetrahydrocyclopenta[4,5]pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxamide (136)



Chemical Formula: $C_{28}H_{33}FN_6O_2$
Molecular Weight: 504.61

The reaction was carried out as described in general procedure **A** using aniline **120** (88 mg, 0.37 mmol), 4-nitrophenyl chloroformate (89 mg, 0.44 mmol, 1.2 equiv.), DIPEA (232 µL, 1.33 mmol, 3.6 equiv.) and amine **12** (139 mg, 0.44 mmol, 1.2 equiv.) in dry THF (5.3 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH/NH_4OH from 100 up to 96/4/1 to afford compound **136** (81 mg, 0.16 mmol, 43 %) as a pale yellow solid.

R_f (DCM/MeOH/NH_4OH 95/5/1) 0.24.

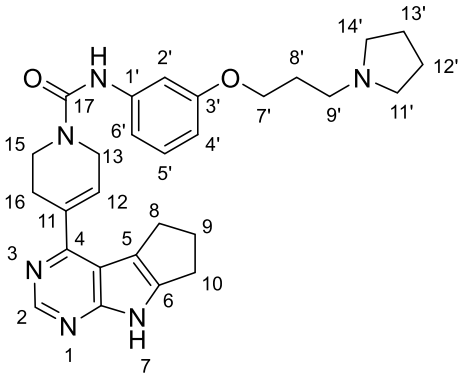
The ^1H and ^{13}C spectra are identical to the (*S*)-enantiomer.

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{28}H_{34}FN_6O_2$ $[M+H]^+$: 505.2722, found: 505.2719.

$[\alpha]_D^{20}$ +0.5 (*c* 1.0, DMSO).

Purity (HPLC): 99.3 %.

N-(3-(3-(Pyrrolidin-1-yl)propoxy)phenyl)-4-(5,6,7,8-tetrahydrocyclopenta[4,5]pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxamide (137)



Chemical Formula: $C_{28}H_{34}N_6O_2$
Molecular Weight: 486.62

The reaction was carried out as described in general procedure **A** using aniline **118** (84 mg, 0.38 mmol), 4-nitrophenyl chloroformate (93 mg, 0.46 mmol, 1.2 equiv.), DIPEA (239 µL, 1.37 mmol, 3.6 equiv.) and amine **12** (145 mg, 0.46 mmol, 1.2 equiv.) in dry THF (5.4 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH/NH_4OH from 100 up to 95/5/1 to afford compound **137** (61 mg, 0.13 mmol, 33 %) as a white powder.

R_f (DCM/MeOH/NH_4OH 95/5/1) 0.13.

Mp: 167-169 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3446, 3011, 2952, 2798, 1652, 1603, 1532, 1493, 1436, 1382, 1288, 1231, 1193, 1159, 1059, 964, 850, 769, 688, 571, 560, 552, 546.

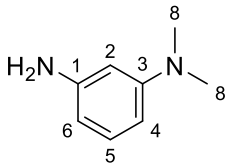
^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-d_6) δ 11.96 (s, 1H, **NH**), 8.57 (s, 1H, **H_2**), 8.52 (s, 1H, **NH**), 7.26 – 7.18 (m, 1H, **H_{Ar}**), 7.17 – 7.03 (m, 2H, **2 x H_{Ar}**), 6.60 – 6.54 (m, 1H, **H_{12}**), 6.50 (dt, *J* = 7.3, 2.2 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 4.24 (d, *J* = 2.9 Hz, 2H, **H_{13}**), 3.95 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, **$H_{7'}$**), 3.70 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, **H_{15}**), 2.97 – 2.80 (m, 4H, **H_8 + H_{10}**), 2.73 (brs, 2H, **H_{16}**), 2.56 – 2.51 (m, 2H, **$H_{9'}$**), 2.46 – 2.36 (m, 6H, **H_9 + $H_{11'}$ + $H_{14'}$**), 1.87 (p, *J* = 6.7 Hz, 2H, **$H_{8'}$**), 1.73 – 1.61 (m, 4H, **$H_{12'}$ + $H_{13'}$**).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-d_6) δ 158.7 (**C**), 156.4 (**C**), 154.9 (**C**), 154.8 (**C**), 148.9 (**CH_{Ar}-C_2**), 145.7 (**C**), 141.7 (**C**), 134.9 (**C**), 128.9 (**CH_{Ar}**), 128.6 (**CH-C_{12}**), 115.0 (**C**), 111.7 (**CH_{Ar}**), 111.6 (**C**), 108.0 (**CH_{Ar}**), 105.7 (**CH_{Ar}**), 65.6 (**CH_2-$C_{7'}$**), 53.6 (**2 x CH_2-$C_{11'}$ + $C_{14'}$**), 52.2 (**CH_2-$C_{9'}$**), 43.9 (**CH_2-C_{13}**), 40.5 (**CH_2-C_{15}**), 28.2 (**CH_2-$C_{8'}$**), 27.6 (**CH_2-$C_{8/10}$**), 27.2 (**CH_2-C_9**), 26.2 (**CH_2-C_{16}**), 25.5 (**CH_2-$C_{10/8}$**), 23.1 (**2 x CH_2- $C_{12'}$ + $C_{13'}$**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{28}H_{35}N_6O_2$ $[M+H]^+$: 487.2816, found: 487.2819.

Purity (HPLC): 95.5 %.

N^1,N^1-Dimethylbenzene-1,3-diamine (138)



Chemical Formula: $C_8H_{12}N_2$
Molecular Weight: 136.20

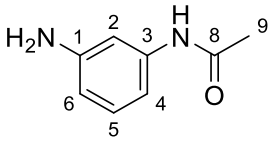
The reaction was carried out as described in general procedure **D** using N,N-dimethyl-3-nitro-aniline (760 mg, 4.57 mmol), Pd/C 10 wt.% (486 mg, 0.46 mmol, 0.1 equiv.) in MeOH (25 mL) for 3 h. The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of PE/EtOAc from 100 up to 80/20 to afford compound **138** (122 mg, 0.90 mmol, 20 %) as a dark brown oil.

R_f (PE/EtOAc 80/20) 0.30.

^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 7.07 – 6.99 (m, 1H, **H_{Ar}**), 6.20 (ddd, *J* = 8.3, 2.3, 1.0 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.15 – 6.06 (m, 2H, **2 x H_{Ar}**), 3.58 (s, 2H, **NH_2**), 2.91 (s, 6H, **H_8**).

All spectral data corresponded to the literature values as found in Bhagwanth, S.; Adjabeng, G. M.; Hornberger, K. R. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50* (14), 1582–1585.

N-(3-Aminophenyl)acetamide (140)



Chemical Formula: $C_8H_{10}N_2O$
Molecular Weight: 150.18

The reaction was carried out as described in general procedure **D** using **141** (400 mg, 2.22 mmol), Pd/C 10 wt.% (234 mg, 0.22 mmol, 0.1 equiv.) in MeOH (12 mL) for 2 h to afford compound **140** (325 mg, 2.16 mmol, 97 %) as a colourless oil. The product was used without further purification in the next step.

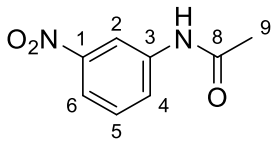
IR (ATR diamond, cm^{-1}) v: 3314, 1609, 1548, 1493, 1265, 1163, 775.

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.24 (s, 1H, **NH**), 7.15 (d, *J* = 2.15 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 7.06 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.45 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, **H_{Ar}**) 6.42 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 3.69 (s, 2H, **NH_2**), 2.14 (s, 3H, **H_9**).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 168.3 (**C-C_8**), 147.3 (**C**), 140.0 (**C**), 129.7 (**CH_{Ar}**), 111.1 (**CH_{Ar}**), 109.7 (**CH_{Ar}**), 106.6 (**CH_{Ar}**), 24.7 (**CH_3-C_9**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_8H_{11}N_2O$ $[M+H]^+$: 151.0866, found: 151.0869.

N-(3-Nitrophenyl)acetamide (141)



Chemical Formula: $C_8H_8N_2O_3$
Molecular Weight: 180.16

3-nitroaniline (500 mg, 3.62 mmol) was dissolved in Ac_2O (7.24 mL) and the reaction mixture was stirred at rt for 5 h until full conversion. The reaction mixture was diluted with cold H_2O then basified to pH 14 with a 1 M aqueous solution of KOH. The aqueous layer was extracted with DCM (3 x 35 mL), then the combined organic layers were washed with a saturated aqueous solution of $NaHCO_3$, brine, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo* to afford compound **141** (588 mg, 3.26 mmol, 90 %) as a yellow solid. The product was used without further purification in the next step.

Mp: 151-153 °C.

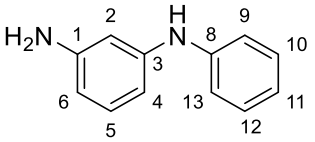
IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3310, 3261, 3097, 1672, 1574, 1526, 1079, 1017, 737.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 10.41 (s, 1H, **NH**), 8.61 (t, *J* = 1.9 Hz, 1H, **H$_{Ar}$**), 7.83 – 7.91 (m, 2H, **2 x H$_{Ar}$**), 7.58 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H, **H$_{Ar}$**), 2.09 (s, 3H, **H$_9$**).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 169.5 (**C-C$_8$**), 148.4 (**C**), 140.9 (**C**), 130.6 (**CH$_{Ar}$**), 125.3 (**CH$_{Ar}$**), 118.0 (**CH$_{Ar}$**), 113.4 (**CH$_{Ar}$**), 24.5 (**CH$_3$-C$_9$**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_8H_9N_2O_3$ $[M+H]^+$: 181.0608, found: 181.0611.

N-Phenylbenzene-1,3-diamine (143)



Chemical Formula: $C_{12}H_{12}N_2$
Molecular Weight: 184.24

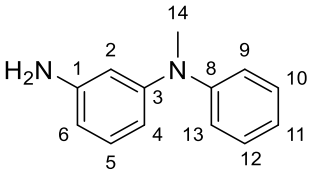
The reaction was carried out as described in general procedure **D** using nitro compound **146** (179 mg, 0.84 mmol), Pd/C 10 wt.% (89 mg, 0.08 mmol, 0.1 equiv.) in MeOH (5 mL) for 3 h. The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of PE/EtOAc from 100 up to 80/20 to afford **143** (100 mg, 0.54 mmol, 65 %) as an orange oil.

R_f (PE/EtOAc 90/10) 0.13.

^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 7.31 – 7.20 (m, 2H, **2 x H_{Ar}**), 7.12 – 6.99 (m, 3H, **3 x H_{Ar}**), 6.96 – 6.87 (m, 1H, **H_{Ar}**), 6.46 (ddd, *J* = 7.9, 2.2, 0.9 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.42 (t, *J* = 2.2 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.27 (ddd, *J* = 7.9, 2.2, 0.9 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 5.61 (s, 1H, **NH**), 3.61 (brs, 2H, **NH_2**).

All spectral data corresponded to the literature values as found in Kuhl, S.; Fort, Y.; Schneider, R. *J. Organomet. Chem.* **2005**, *690* (24–25), 6169–6177.

N-Methyl-*N*-phenylbenzene-1,3-diamine (144)



Chemical Formula: $C_{13}H_{14}N_2$
Molecular Weight: 198.27

The reaction was carried out as described in general procedure **D** using nitro compound **147** (305 mg, 1.34 mmol), Pd/C 10 wt.% (143 mg, 0.13 mmol, 0.1 equiv.) in MeOH (7.4 mL) for 3 h to afford compound **144** (240 mg, 1.21 mmol, 90 %) as an orange oil. The product was used without further purification in the next step.

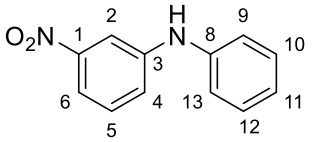
IR (ATR diamond, cm^{-1}) v: 3362, 3033, 2930, 2810, 1582, 1490, 1346, 1276, 1219, 1126, 830, 751, 691, 595.

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.33 – 7.27 (m, 3H, **3 x H_{Ar}**), 7.11 – 7.05 (m, 3H, **3 x H_{Ar}**), 6.99 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.44 – 6.39 (m, 1H, **H_{Ar}**), 6.36 (t, *J* = 2.2 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.35 – 6.31 (m, 1H, **H_{Ar}**), 3.61 (s, 2H, **NH_2**), 3.31 (s, 3H, **H_{14}**).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 150.3 (**C**), 149.2 (**C**), 147.4 (**C**), 130.1 (**CH_{Ar}**), 129.2 (**2 x CH_{Ar}**), 121.5 (**CH_{Ar}**), 121.1 (**2 x CH_{Ar}**), 110.8 (**CH_{Ar}**), 108.5 (**CH_{Ar}**), 107.0 (**CH_{Ar}**), 40.3 (**CH_3-C_{14}**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{13}H_{15}N_2$ $[M+H]^+$: 199.1230, found: 199.1234.

3-Nitro-*N*-phenylaniline (146)



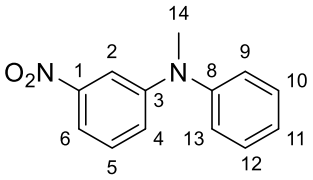
Chemical Formula: $C_{12}H_{10}N_2O_2$
Molecular Weight: 214.22

To a 5 mL microwave reaction vial were added 1-chloro-3-nitrobenzene (473 mg, 3.0 mmol), Pd_2dba_3 (14 mg, 0.015 mmol, 0.5 mol%), XPhos (29 mg, 0.06 mmol, 2 mol%) and KOH (252 mg, 4.5 mmol, 1.5 equiv.). The vial was evacuated, backfilled with argon 3 times then aniline (328 µL, 3.6 mmol, 1.2 equiv.) and degassed H_2O (1.5 mL) were added. The vial was sealed and the reaction mixture was stirred at 110 °C for 18 h. After completion, the reaction mixture was dissolved in Et_2O (100 mL), H_2O (25 mL) was added then the organic layer was separated, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of PE/EtOAc from 100 up to 90/10 to afford **146** (586 mg, 2.74 mmol, 91 %) as a bright orange solid.

^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 7.84 (t, *J* = 2.2 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 7.74 – 7.64 (m, 1H, **H_{Ar}**), 7.42 – 7.27 (m, 4H, **4 x H_{Ar}**), 7.19 – 7.03 (m, 3H, **3 x H_{Ar}**), 5.93 (s, 1H, **NH**).

All spectral data corresponded to the literature values as found in Huang, X.; Anderson, K. W.; Zim, D.; Jiang, L.; Klapars, A.; Buchwald, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (22), 6653–6655.

N-Methyl-3-nitro-*N*-phenylaniline (147)



Chemical Formula: $C_{13}H_{12}N_2O_2$
Molecular Weight: 228.25

To a 5 mL microwave reaction vial were added 1-chloro-3-nitrobenzene (473 mg, 3.0 mmol), Pd_2dba_3 (14 mg, 0.015 mmol, 0.5 mol%), XPhos (29 mg, 0.06 mmol, 2 mol%) and KOH (252 mg, 4.5 mmol, 1.5 equiv.). The vial was evacuated, backfilled with argon 3 times then N-methylaniline (390 µL, 3.6 mmol, 1.2 equiv.) and degassed H_2O (1.5 mL) were added. The vial was sealed and the reaction mixture was stirred at 110 °C for 18 h. After completion, the reaction mixture was dissolved in Et_2O (100 mL), H_2O (25 mL) was added then the organic layer was separated, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of PE/EtOAc from 100 up to 95/5 to afford **147** (616 mg, 2.70 mmol, 90 %) as an orange oil.

R_f (DCM/MeOH 90/10) 0.62.

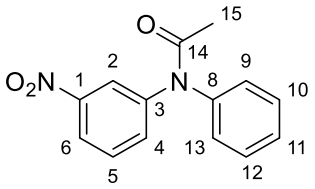
IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 2881, 1618, 1569, 1521, 1493, 1345, 1249, 1133, 838, 733, 698, 580.

^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 7.68 – 7.57 (m, 2H, **2 x H_{Ar}**), 7.45 – 7.35 (m, 2H, **2 x H_{Ar}**), 7.34 – 7.14 (m, 4H, **4 x H_{Ar}**), 7.12 – 7.04 (m, 1H, **H_{Ar}**), 3.37 (s, 3H, **H_{14}**).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 150.1 (**C**), 149.4 (**C**), 147.7 (**C**), 130.1 (**2 x CH_{Ar}**), 129.5 (**CH_{Ar}**), 125.3 (**CH_{Ar}**), 125.1 (**2 x CH_{Ar}**), 121.6 (**CH_{Ar}**), 113.3 (**CH_{Ar}**), 109.7 (**CH_{Ar}**), 40.5 (**CH_3-C_{14}**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{13}H_{13}N_2O_2$ $[M+H]^+$: 229.0972, found: 229.0974.

N-(3-Nitrophenyl)-*N*-phenylacetamide (148)



Chemical Formula: $C_{14}H_{12}N_2O_3$
Molecular Weight: 256.26

In a 2 mL microwave reaction vial loaded with acetyl chloride (294 µL, 4.13 mmol, 3.5 equiv.) were added **146** (252 mg, 1.18 mmol) and iodine (30 mg, 0.12 mmol, 0.1 equiv.). The compact reaction mixture was stirred vigorously at rt for 18 h under Ar then diluted with Et_2O (30 mL) and quenched with a saturated aqueous solution of Na_2SO_3 (10 mL) and a saturated aqueous solution of $NaHCO_3$ (10 mL). After the gas evolution ceased, the organic layer was separated then washed with a saturated aqueous solution of $NaHCO_3$ (4 x 20 mL), dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo* to afford compound **148** (273 mg, 1.07 mmol, 91 %) as an orange oil.

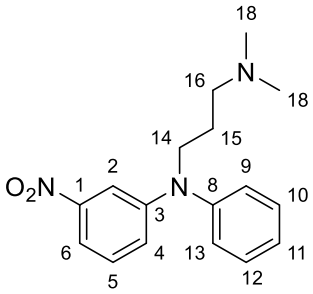
IR (ATR diamond, cm^{-1}) v: 3086, 1677, 1525, 1352, 1305, 1276, 701, 682.

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.15 – 8.09 (m, 1H, **H_{Ar}**), 8.03 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 7.67 – 7.60 (m, 1H, **H_{Ar}**), 7.53 – 7.43 (m, 3H, **3 x H_{Ar}**), 7.44 – 7.35 (m, 1H, **H_{Ar}**), 7.32 – 7.27 (m, 2H, **2 x H_{Ar}**), 2.08 (s, 3H, **H_{15}**).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 170.6 (**C-C_{14}**), 148.7 (**C**), 143.9 (**C**), 142.3 (**C**), 132.2 (**CH_{Ar}**), 130.3 (**3 x CH_{Ar}**), 129.7 (**CH_{Ar}**), 128.6 (**2 x CH_{Ar}**), 121.3 (**CH_{Ar}**), 120.9 (**CH_{Ar}**), 24.1 (**CH_3-C_{15}**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{14}H_{13}N_2O_3$ $[M+H]^+$: 257.0921, found: 257.0919.

N^1,N^1-Dimethyl-N^3-(3-nitrophenyl)-N^3-phenylpropane-1,3-diamine (149)



Chemical Formula: $C_{17}H_{21}N_3O_2$
Molecular Weight: 299.37

In a 20 mL microwave reaction vial was dissolved **146** (200 mg, 0.93 mmol) in dry DMF (6.2 mL) then NaH (60 % in mineral oil, 56 mg, 1.40 mmol, 1.5 equiv.) was added at rt to the orange solution. The vial was sealed and the obtained dark blue solution was left to stir at rt. After 1 h, a solution of 3-chloro-N,N-dimethylpropan-1-amine (226 mg, 1.86 mmol, 2.0 equiv.) in dry DMF (3.0 mL) was slowly added to the reaction mixture then the solution was stirred at 60 °C for an additional hour. The resulting dark yellow solution was cooled to rt and most of the DMF was removed by co-evaporation with heptane (3 x 30 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 100 up to 95/5 to afford compound **149** (245 mg, 0.82 mmol, 88 %) as an orange oil.

R_f (DCM/MeOH 95/5) 0.18.

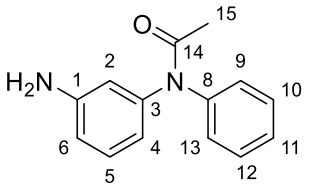
IR (ATR diamond, cm^{-1}) v: 2942, 2858, 2816, 2766, 1523, 1491, 1343, 1215, 828, 733, 699, 676.

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.75 – 7.70 (m, 1H, **H_{Ar}**), 7.63 – 7.57 (m, 1H, **H_{Ar}**), 7.42 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H, **H_9 + H_{13}**), 7.32 – 7.24 (m, 1H, **H_{Ar}**), 7.23 – 7.18 (m, 3H, **H_9 + H_{11} + H_{13}**), 7.09 (dd, *J* = 8.4, 2.4 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 3.84 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, **H_{14}**), 2.35 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, **H_{16}**), 2.25 (s, 6H, **H_{18}**), 1.84 (p, *J* = 7.1 Hz, 2H, **H_{15}**).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 149.6 (**C**), 149.5 (**C**), 146.3 (**C-C_8**), 130.2 (**2 x CH_{Ar}-C_9 + C_{13}**), 129.6 (**CH_{Ar}**), 125.9 (**2 x CH_{Ar}-C_{10} + C_{12}**), 125.4 (**CH_{Ar}-C_{11}**), 121.8 (**CH_{Ar}**), 112.9 (**CH_{Ar}**), 110.1 (**CH_{Ar}**), 56.9 (**CH_2-C_{16}**), 50.5 (**CH_2-C_{14}**), 45.6 (**2 x CH_3-C_{18}**), 25.4 (**CH_2-C_{15}**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{17}H_{22}N_3O_2$ $[M+H]^+$: 300.1707, found: 300.1711.

N-(3-aminophenyl)-*N*-phenylacetamide (151)



Chemical Formula: $C_{14}H_{14}N_2O$
Molecular Weight: 226.28

The reaction was carried out as described in general procedure **D** using nitro compound **148** (411 mg, 1.60 mmol), Pd/C 10 wt.% (213 mg, 0.16 mmol, 0.1 equiv.) in MeOH (9.0 mL) for 4 h to afford compound **151** (311 mg, 1.37 mmol, 86 %) as a pale brown solid which was used in the next step without further purification.

Mp: 38-42 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3439, 3336, 3224, 1659, 1630, 1488, 1374, 1326, 1250, 781, 706, 696.

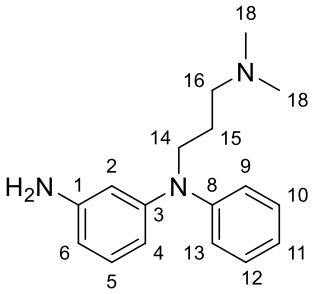
^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-d_6) δ 7.49 – 7.16 (m, 5H, **5 x H_{Ar}**), 7.12 – 6.97 (m, 1H, **H_{Ar}**), 6.61 – 6.39 (m, 3H, **3 x H_{Ar}**), 5.27 (s, 2H, **NH_2**), 1.93 (s, 3H, **H_{15}**).

Chemical shifts for the carbon spectra are described from the carbon spectra and the correlation spots seen in the HSQC spectra.

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-d_6) δ 169.0 (**C-C_{14}**), 149.6 (**C**), 143.8 (**C**), 143.2 (**C**), 129.6 (**CH_{Ar}**), 128.9 (**2 x CH_{Ar}**), 127.0 (**3 x CH_{Ar}**), 115.2 (**CH_{Ar}**), 113.1 (**2 x CH_{Ar}**), 23.2 (**CH_3-C_{15}**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{14}H_{15}N_2O$ $[M+H]^+$: 227.1179, found: 227.1180.

N^1-(3-(Dimethylamino)propyl)-N^1-phenylbenzene-1,3-diamine (152)



Chemical Formula: $C_{17}H_{23}N_3$
Molecular Weight: 269.39

The reaction was carried out as described in general procedure D using the nitro compound **149** (199 mg, 0.66 mmol), Pd/C 10 wt.% (74 mg, 0.07 mmol, 0.1 equiv.) in MeOH (3.7 mL) for 3 h to afford compound **152** (163 mg, 0.61 mmol, 92 %) as a colourless oil. The product was used without further purification in the next step.

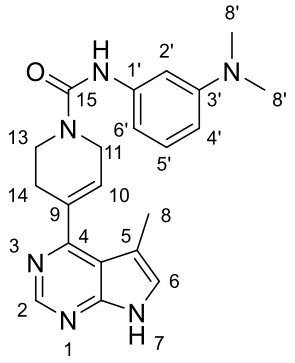
IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3365, 3033, 2942, 2858, 2816, 2767, 1590, 1490, 1461, 1363, 1207, 1154, 748, 691.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.31 – 7.25 (m, 2H, **2 x H_{Ar}**), 7.10 – 7.02 (m, 3H, **3 x H_{Ar}**), 6.96 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.43 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.36 – 6.33 (m, 1H, **H_{Ar}**), 6.31 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H, **2 x H_{Ar}**), 3.74 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, **H_{14}**), 3.59 (brs, 2H, **NH**), 2.33 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, **H_{16}**), 2.23 (s, 6H, **H_{18}**), 1.88 – 1.79 (m, 2H, **H_{15}**).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 149.4 (**C**), 148.2 (**C**), 147.5 (**C**), 130.1 (**CH_{Ar}**), 129.3 (**2 x CH_{Ar}**), 121.7 (**2 x CH_{Ar}**), 121.4 (**CH_{Ar}**), 111.3 (**CH_{Ar}**), 108.4 (**CH_{Ar}**), 107.6 (**CH_{Ar}**), 57.3 (**CH_2-C_{16}**), 50.3 (**CH_2-C_{14}**), 45.7 (**2 x CH_3-C_{18}**), 25.9 (**CH_2-C_{15}**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{17}H_{24}N_3$ $[M+H]^+$: 270.1965, found: 270.1966.

N-(3-(Dimethylamino)phenyl)-4-(5-methyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxamide (153)



Chemical Formula: $C_{21}H_{24}N_6O$
Molecular Weight: 376.46

The reaction was carried out as described in general procedure **A** using aniline **138** (66 mg, 0.48 mmol), 4-nitrophenyl chloroformate (117 mg, 0.58 mmol, 1.2 equiv.), DIPEA (301 µL, 1.73 mmol, 2.4 equiv.) and amine **8** (167 mg, 0.58 mmol, 1.2 equiv.) in dry THF (6.9 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 100 up to 95/5 to afford compound **153** (86 mg, 0.23 mmol, 78 %) as a brown solid.

R_f (DCM/MeOH 95/5) 0.41.

Mp: 157-159 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3121, 2919, 1628, 1601, 1540, 1495, 1434, 1342, 1241, 1062, 962, 830, 761, 753, 687.

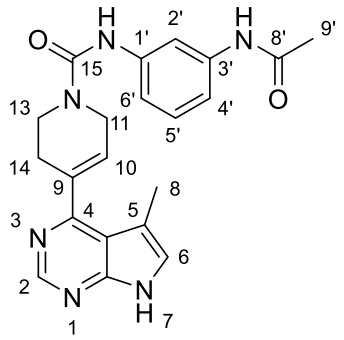
^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-d_6) δ 11.84 (s, 1H, **NH**), 8.65 (s, 1H, **H_2**), 8.38 (s, 1H, **NH**), 7.34 – 7.30 (m, 1H, **H_{Ar}**), 7.03 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.94 (t, *J* = 2.2 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.91 – 6.85 (m, 1H, **H_{Ar}**), 6.35 (dd, *J* = 8.2, 1.6 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.11 – 5.99 (m, 1H, **H_{10}**), 4.21 (d, *J* = 3.2 Hz, 2H, **H_{11}**), 3.72 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, **H_{13}**), 2.86 (s, 6H, **$H_{8'}$**), 2.67 (brs, 2H, **H_{14}**), 2.24 (d, *J* = 1.1 Hz, 3H, **H_8**).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-d_6) δ 159.3 (**C**), 155.1 (**C**), 152.6 (**C**), 150.7 (**C**), 150.1 (**CH_{Ar} -C_2**), 141.1 (**C**), 134.1 (**C**), 128.6 (**CH-C_{10}**), 128.4 (**CH_{Ar}**), 125.1 (**CH_{Ar}**), 114.3 (**C**), 108.9 (**C**), 108.4 (**CH_{Ar}**), 106.6 (**CH_{Ar}**), 104.2 (**CH_{Ar}**), 43.6 (**CH_2-C_{11}**), 40.8 (**CH_2-C_{13}**), 40.2 (**CH_3-C_8**), 27.4 (**CH_2-C_{14}**), 12.9 (**2 x CH_3-$C_{8'}$**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{21}H_{25}N_6O$ $[M+H]^+$: 377.2084, found: 377.2083.

Purity (HPLC): > 99.9 %.

N-(3-Acetamidophenyl)-4-(5-methyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxamide (154)



Chemical Formula: $C_{21}H_{22}N_6O_2$
Molecular Weight: 390.45

The reaction was carried out as described in general procedure **A** using aniline **140** (81 mg, 0.54 mmol), 4-nitrophenyl chloroformate (133 mg, 0.65 mmol, 1.2 equiv.), DIPEA (345 µL, 1.98 mmol, 3.6 equiv.) and amine **8** (190 mg, 0.65 mmol, 1.2 equiv.) in dry THF (7.7 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 100 up to 98/2 to afford compound **154** (79 mg, 0.20 mmol, 37 %) as a beige solid.

R_f (DCM/MeOH 95/5) 0.40.

Mp: 123-125 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3362, 3115, 2852, 1643, 1602, 1537, 1486, 1420, 788.

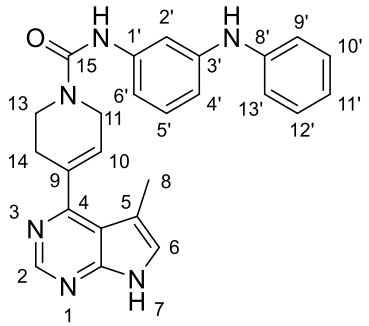
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.84 (s, 1H, **NH**), 9.86 (s, 1H, **NH**), 8.65 (s, 1H, **H_2**), 8.61 (s, 1H, **NH**), 7.80 (s, 1H, **H_{Ar}**), 7.32 (dd, *J* = 2.3, 1.2 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 7.24 – 7.08 (m, 3H, **3 x H_{Ar}**), 6.05 (s, 1H, **H_{10}**), 4.22 (d, *J* = 3.2 Hz, 2H, **H_{11}**), 3.73 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H, **H_{13}**), 2.67 (brs, 2H, **H_{14}**), 2.23 (d, *J* = 1.1 Hz, 3H, **H_8**), 2.02 (s, 3H, **$H_{9'}$**).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 168.3 (**C**), 159.5 (**C**), 155.2 (**C**), 152.6 (**C**), 150.2 (**CH_{Ar}-C_2**), 140.8 (**C**), 139.4 (**C**), 134.3 (**C**), 128.4 (**CH_{Ar}**), 128.4 (**CH-C_{10}**), 125.1 (**CH_{Ar}**), 114.9 (**CH_{Ar}**), 114.4 (**C**), 113.0 (**CH_{Ar}**), 111.1 (**CH_{Ar}**), 109.0 (**C**), 43.7 (**CH_2-C_{11}**), 40.7 (**CH_2-C_{13}**), 27.4 (**CH_2-C_{14}**), 24.0 (**CH_3-$C_{9'}$**), 12.9 (**CH_3-C_8**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{21}H_{23}N_6O_2$ $[M+H]^+$: 391.1877, found: 391.1880.

Purity (HPLC): > 99.9 %.

4-(5-Methyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-*N*-(3-(phenylamino)phenyl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxamide (155)



Chemical Formula: $C_{25}H_{24}N_6O$
Molecular Weight: 424.51

The reaction was carried out as described in general procedure **A** using aniline **143** (85 mg, 0.46 mmol), 4-nitrophenyl chloroformate (111 mg, 0.55 mmol, 1.2 equiv.), DIPEA (289 µL, 1.66 mmol, 2.4 equiv.) and amine **8** (158 mg, 0.55 mmol, 1.2 equiv.) in dry THF (6.6 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 100 up to 95/5 to afford compound **155** (154 mg, 0.36 mmol, 79 %) as a white powder.

R_f (DCM/MeOH 96/4) 0.34.

Mp: 139-141 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3121, 1639, 1592, 1531, 1494, 1449, 1414, 1330, 1234, 1194, 1060, 966, 745, 689.

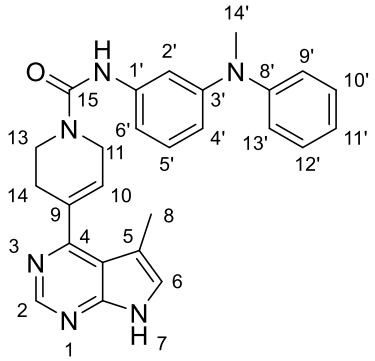
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.82 (s, 1H, **NH**), 8.64 (s, 1H, **H_2**), 8.48 (s, 1H, **NH**), 8.07 (s, 1H, **NH**), 7.40 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 7.33 – 7.30 (m, 1H, **H_{Ar}**), 7.25 – 7.18 (m, 2H, **2 x H_{Ar}**), 7.13 – 7.04 (m, 3H, **3 x H_{Ar}**), 6.97 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.80 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.65 (dd, *J* = 8.0, 2.2 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.07 – 6.01 (m, 1H, **H_{10}**), 4.21 (d, *J* = 2.8 Hz, 2H, **H_{11}**), 3.72 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, **H_{13}**), 2.67 (s, 2H, **H_{14}**), 2.24 (s, 3H, **H_8**).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 159.4 (**C**), 155.1 (**C**), 152.6 (**C**), 150.1 (**CH_{Ar}-C_2**), 143.6 (**C**), 143.4 (**C**), 141.3 (**C**), 134.2 (**C**), 129.0 (**2 x CH_{Ar}**), 128.8 (**CH_{Ar}**), 128.3 (**CH-C_{10}**), 125.0 (**CH_{Ar}-C_6**), 119.3 (**CH_{Ar}**), 116.7 (**2 x CH_{Ar}**), 114.3 (**C**), 111.5 (**CH_{Ar}**), 110.9 (**CH_{Ar}**), 108.9 (**C**), 108.1 (**CH_{Ar}**), 43.6 (**CH_2-C_{11}**), 40.6 (**CH_2-C_{13}**), 27.3 (**CH_2-C_{14}**), 12.9 (**CH_3-C_8**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{25}H_{25}N_6O$ $[M+H]^+$: 425.2084, found: 425.2087.

Purity (HPLC): 99.0 %.

N-(3-(Methyl(phenyl)amino)phenyl)-4-(5-methyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxamide (156)



Chemical Formula: $C_{26}H_{26}N_6O$
Molecular Weight: 438.54

The reaction was carried out as described in general procedure **A** using aniline **144** (85 mg, 0.43 mmol), 4-nitrophenyl chloroformate (105 mg, 0.52 mmol, 1.2 equiv.), DIPEA (270 µL, 1.55 mmol, 2.4 equiv.) and amine **8** (149 mg, 0.52 mmol, 1.2 equiv.) in dry THF (6.1 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 100 up to 96/4 to afford compound **156** (130 mg, 0.30 mmol, 69 %) as a white powder.

R_f (DCM/MeOH 95/5) 0.20.

Mp: 131-133 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3139, 1637, 1591, 1533, 1488, 1435, 1341, 1235, 1128, 1060, 964, 830, 750, 692.

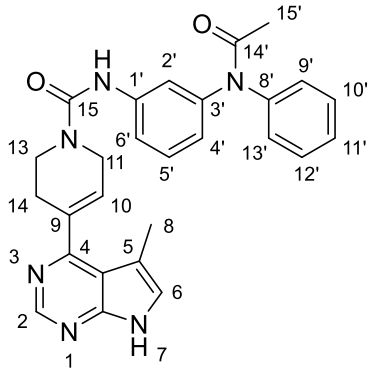
^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-d_6) δ 11.82 (s, 1H, **NH**), 8.64 (s, 1H, **H_2**), 8.51 (s, 1H, **NH**), 7.35 – 7.08 (m, 6H, **6 x H_{Ar}**), 7.04 – 6.92 (m, 2H, **2 x H_{Ar}**), 6.97 – 6.83 (m, 1H, **H_{Ar}**), 6.62 (dt, *J* = 6.5, 2.4 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.07 – 5.99 (m, 1H, **H_{10}**), 4.23 – 4.16 (m, 2H, **H_{11}**), 3.70 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H, **H_{13}**), 3.24 (s, 3H, **$H_{14'}$**), 2.66 (s, 2H, **H_{14}**), 2.22 (s, 3H, **H_8**).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-d_6) δ 159.4 (**C**), 155.0 (**C**), 152.6 (**C**), 150.1 (**CH_{Ar}-C_2**), 148.7 (**C**), 148.7 (**C**), 141.4 (**C**), 134.2 (**C**), 129.1 (**2 x CH_{Ar}**), 128.9 (**CH_{Ar}**), 128.3 (**CH-C_{10}**), 125.0 (**CH_{Ar}**), 120.6 (**CH_{Ar}**), 119.5 (**2 x CH_{Ar}**), 114.4 (**CH_{Ar}**), 114.3 (**C**), 113.3 (**CH_{Ar}**), 112.2 (**CH_{Ar}**), 108.9 (**C**), 43.6 (**CH_2-C_{11}**), 40.6 (**CH_2-C_{13}**), 40.1 (**CH_3-$C_{14'}$**), 27.3 (**CH_2-C_{14}**), 12.9 (**CH_3-C_8**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{26}H_{27}N_6O$ $[M+H]^+$: 439.2241, found: 439.2243.

Purity (HPLC): 99.0 %.

4-(5-Methyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-*N*-(3-(*N*-phenylacetamido)phenyl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxamide (157)



Chemical Formula: $C_{27}H_{26}N_6O_2$
Molecular Weight: 466.55

The reaction was carried out as described in general procedure **A** using aniline **151** (100 mg, 0.44 mmol), 4-nitrophenyl chloroformate (107 mg, 0.53 mmol, 1.2 equiv.), DIPEA (275 µL, 1.58 mmol, 3.6 equiv.) and amine **8** (152 mg, 0.53 mmol, 1.2 equiv.) in dry THF (6.3 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 100 up to 95/5 to afford compound **157** (149 mg, 0.32 mmol, 73 %) as a beige powder.

R_f (DCM/MeOH 95/5) 0.17.

Mp: 149-151 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3129, 2922, 2864, 2220, 1636, 1533, 1343, 1234, 1069, 727, 693, 612.

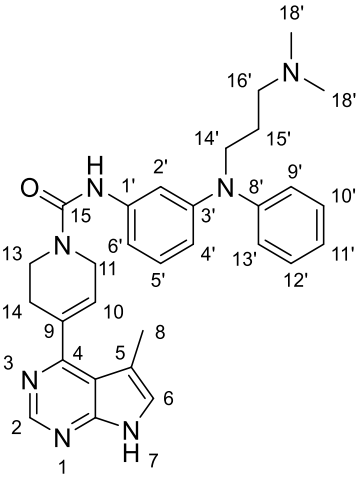
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.82 (s, 1H, **NH**), 8.69 (s, 1H, **NH**), 8.64 (s, 1H, **H_2**), 7.61 – 7.15 (m, 9H, **9 x H_{Ar}**), 7.08 – 6.86 (m, 1H, **H_{Ar}**), 6.07 – 5.99 (m, 1H, **H_{10}**), 4.25 – 4.17 (m, 2H, **H_{11}**), 3.72 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, **H_{13}**), 2.71 – 2.63 (m, 2H, **H_{14}**), 2.22 (s, 3H, **H_8**), 1.96 (s, 3H, **$H_{15'}$**).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 169.2 (**C-$C_{14'}$**), 159.3 (**C**), 154.8 (**C**), 152.6 (**C**), 150.1 (**CH_{Ar}-C_2**), 143.1 (**C**), 143.0 (**C**), 141.5 (**C**), 134.2 (**C**), 129.07 (**3 x CH_{Ar}**), 128.2 (**CH-C_{10}**), 126.9 (**3 x CH_{Ar}**), 125.0 (**CH-C_6**), 121.2 (**CH_{Ar}**), 118.7 (2 x **CHAr**), 114.3 (**C**), 108.9 (**C**), 43.5 (**CH_2-C_{11}**), 40.6 (**CH_2-C_{13}**), 27.3 (**CH_2-C_{14}**), 23.3 (**CH_3- $C_{15'}$**), 12.9 (**CH_3-C_8**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{27}H_{27}N_6O_2$ $[M+H]^+$: 467.2190, found: 467.2190.

Purity (HPLC): > 99.9 %.

N-(3-((3-(Dimethylamino)propyl)(phenyl)amino)phenyl)-4-(5-methyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxamide (158)



Chemical Formula: $C_{30}H_{35}N_7O$
Molecular Weight: 509.66

The reaction was carried out as described in general procedure **A** using aniline **152** (54 mg, 0.20 mmol), 4-nitrophenyl chloroformate (48 mg, 0.24 mmol, 1.2 equiv.), DIPEA (125 µL, 0.72 mmol, 3.6 equiv.) and amine **8** (69 mg, 0.24 mmol, 1.2 equiv.) in dry THF (2.9 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 100 up to 95/5 then DCM/MeOH/NH_4OH from 98/2/1 to 95/5/1 to afford compound **158** (22 mg, 0.04 mmol, 20 %) as a pale yellow solid.

R_f (DCM/MeOH/NH_4OH 95/5/1) 0.26.

Mp: 115-117 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 2945, 2858, 1639, 1591, 1538, 1488, 1434, 1341, 1234, 1204, 1059, 965, 749, 692, 611.

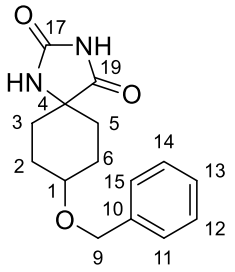
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.82 (s, 1H, **NH**), 8.64 (s, 1H, **H_2**), 8.50 (s, 1H, **NH**), 7.30 brs, 1H, **H_{Ar}**), 7.27 – 7.10 (m, 5H, **5 x H_{Ar}**), 6.95 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, **2 x H_{Ar}**), 6.86 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.62 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.06 – 6.00 (m, 1H, **H_{10}**), 4.25 – 4.12 (m, 2H, **H_{11}**), 3.77 – 3.64 (m, 4H, **H_{13} + $H_{14'}$**), 2.70 – 2.61 (m, 2H, **H_{14}**), 2.30 – 2.19 (m, 5H, **H_8 + $H_{16'}$**), 2.10 (s, 6H, **$H_{18'}$**), 1.68 (p, *J* = 7.0 Hz, 2H, **$H_{15'}$**).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 159.4 (**C**), 155.0 (**C**), 152.6 (**C**), 150.1 (**CH_{Ar}-C_2**), 147.9 (**C**), 147.6 (**C**), 141.5 (**C**), 134.2 (**C**), 129.1 (**2 x CH_{Ar}-$C_{9'}$ + $C_{13'}$**), 129.0 (**CH_{Ar}**), 128.3 (**CH-C_{10}**), 125.0 (**CH_{Ar}**), 120.2 (**CH_{Ar}**), 119.7 (**2 x CH_{Ar}-$C_{10'}$ + $C_{12'}$**), 115.1 (**CH_{Ar}**), 114.3 (**C**), 113.4 (**CH_{Ar}**), 113.0 (**CH_{Ar}**), 108.9 (**C**), 56.3 (**CH_2-$C_{16'}$**), 49.5 (**CH_2-$C_{14'}$**), 45.1 (**2 x CH_3-$C_{18'}$**), 43.6 (**CH_2-C_{11}**), 40.6 (**CH_2-C_{13}**), 27.3 (**CH_2-C_{14}**), 24.9 (**CH_2-$C_{15'}$**), 12.9 (**CH_3-C_8**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{30}H_{36}N_7O$ $[M+H]^+$: 510.2976, found: 510.2975.

Purity (HPLC): > 99.9 %.

8-(Benzyloxy)-1,3-diazaspiro[4.5]decane-2,4-dione (172)



Chemical Formula: $C_{15}H_{18}N_2O_3$
Molecular Weight: 274.32

In a 2 L round bottom flask, **174** (7.41 g, 36.3 mmol) was dissolved in EtOH (303 mL) then a solution of ammonium carbonate (13.94 g, 145.1 mmol, 4.0 equiv.) and ammonium chloride (3.88 g, 72.6 mmol, 2.0 equiv.) in H_2O (303 mL) was added. The reaction mixture was stirred at rt for 45 min then potassium cyanide (2.84 g, 43.6 mmol, 1.2 equiv.) was added. The reaction mixture was stirred at rt for 48 h until full completion. The reaction mixture was concentrated *in vacuo* (under fume hood) to dryness then the residue was rinsed with H_2O (5 x 50 mL) and dried under high vacuum at 50 °C for 18 h to afford **172** (7.53 g, 27.4 mmol, 75 %) as a white powder. The product was used in the next step without further purification.

Mp: 245-247 °C.

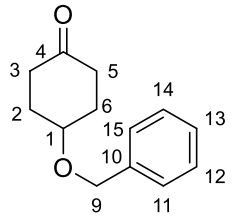
IR (ATR diamond, cm^{-1}) v: 3474, 3257, 3069, 2953, 2881, 2760, 1774, 1732, 1707, 1412, 1281; 1207, 1110, 1055, 857, 777, 694, 643.

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-d_6) δ 10.56 (s, 1H, **NH**), 8.41 (s, 1H, **NH**), 7.45 – 7.15 (m, 5H, **5 x H_{Ar}**), 4.58 – 4.44 (m, 2H, **H_9**), 3.64 – 3.35 (m, 1H, **H_1**), 2.05 – 1.80 (m, 3H, **2 x CH_2**), 1.79 – 1.27 (m, 5H, **3 x CH_2**).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-d_6) δ 178.4 (**C-$C_{17/19}$**), 156.3 (**C-$C_{19/17}$**), 139.1 (**C-C_{10}**), 128.2 (**CH_{Ar}**), 128.2 (**CH_{Ar}**), 127.3 (**CH_{Ar}**), 127.3 (**CH_{Ar}**), 127.2 (**CH_{Ar}**), 75.0 (**CH-C_1**), 68.9 (**CH_2-C_9**), 61.3 (**C-C_4**), 31.4 (**CH_2**), 28.2 (**CH_2**), 26.8 (**CH_2**), 24.8 (**CH_2**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{15}H_{19}N_2O_3$ $[M+H]^+$: 275.1390, found: 275.1397.

4-(Benzyloxy)cyclohexan-1-one (174)



Chemical Formula: $C_{13}H_{16}O_2$
Molecular Weight: 204.27

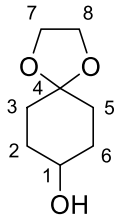
To a solution of **176** (10.6 g, 42.7 mmol) in THF (174 mL) was added an aqueous solution of HCl 1M (104 mL, 2.4 equiv.). The resulting solution was stirred at rt for 24 h. After completion, the reaction mixture was quenched with a saturated aqueous solution of $NaHCO_3$ until pH ~ 7 then the aqueous layer was separated and extracted with EtOAc (3 x 60 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a solvent system of PE/EtOAc 90/10 to afford compound **174** (7.87 g, 38.5 mmol, 90 %) as a yellow liquid.

R_f (PE/EtOAc 90/10) 0.24.

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 7.43 – 7.27 (m, 5H, **5 x H_{Ar}**), 4.61 (s, 2H, **H_9**), 3.83 (tt, *J* = 5.6, 2.9 Hz, 1H, **H_1**), 2.73 – 2.54 (m, 2H, **CH_2**), 2.36 – 2.08 (m, 4H, **2 x CH_2**), 2.04 – 1.89 (m, 2H, **CH_2**).

All spectral data corresponded to the literature values as found in Beaver, M. G.; Buscagan, T. M.; Lavinda, O.; Woerpel, K. A. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2016**, *55* (5), 1816–1819.

1,4-Dioxaspiro[4.5]decan-8-ol (175)



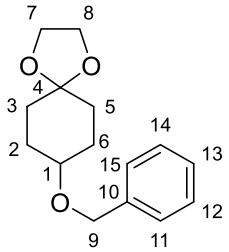
Chemical Formula: $C_8H_{14}O_3$
Molecular Weight: 158.20

To a solution of 1,4-cyclohexanedione monoethylene acetal (10.0 g, 64.0 mmol) in MeOH (144 mL) cooled to 0 °C was added $NaBH_4$ (2.42 g, 64.0 mmol, 1.0 equiv.) by portions (gas evolution). The reaction mixture was stirred at 0 °C for 1 h then concentrated *in vacuo*. The residue was quenched by H_2O (40 mL) and NaOH 2M (32 mL) then EtOAc (150 mL) was added. The aqueous layer was separated and extracted with EtOAc (4 x 100 mL) and the combined organic layers were washed with brine (40 mL), dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo* to afford **175** (9.52 g, 60.2 mmol, 94 %) as a colourless oil.

^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 3.96 – 3.92 (m, 4H, **2 x CH_2**), 3.86 – 3.73 (m, 1H, **H_1**), 1.95 – 1.75 (m, 4H, **2 x CH_2**), 1.72 – 1.52 (m, 4H, **2 x CH_2**), 1.37 (s, 1H, **OH**).

All spectral data corresponded to the literature values as found in Beaver, M. G.; Buscagan, T. M.; Lavinda, O.; Woerpel, K. A. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2016**, *55* (5), 1816–1819.

8-(Benzyloxy)-1,4-dioxaspiro[4.5]decane (176)



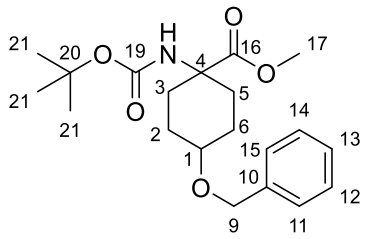
Chemical Formula: $C_{15}H_{20}O_3$
Molecular Weight: 248.32

To a solution of **175** (3.42 g, 21.6 mmol) in dry THF (38 mL) cooled to 0 °C was added NaH (60 % in mineral oil, 1.38 g, 34.6 mmol, 1.6 equiv.). The white suspension was stirred at 0 °C for 1 h (slight gas evolution) then benzyl bromide (3.03 mL, 25.5 mmol, 1.18 equiv.) was added dropwise. The resulting mixture was stirred at 0 °C for 1 h then at rt for 18 h. The reaction mixture was quenched by a saturated aqueous solution of NH_4Cl (15 mL) until pH ~ 9 then the aqueous layer was separated and extracted with EtOAc (3 x 60 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of PE/EtOAc from 100 up to 90/10 to afford compound **176** (4.33 g, 17.4 mmol, 81 %) as a yellow liquid.

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 7.40 – 7.19 (m, 5H, **5 x H$_{Ar}$**), 4.48 (s, 2H, **H$_9$**), 3.85 (d, *J* = 1.0 Hz, 4H, **2 x CH$_2$**), 3.49 (tt, *J* = 6.7, 3.2 Hz, 1H, **H$_1$**), 1.85 – 1.40 (m, 8H, **4 x CH$_2$**).

All spectral data corresponded to the literature values as found in Beaver, M. G.; Buscagan, T. M.; Lavinda, O.; Woerpel, K. A. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2016**, *55* (5), 1816–1819.

Methyl 4-(benzyloxy)-1-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)cyclohexane-1-carboxylate (177)



Chemical Formula: $C_{20}H_{29}NO_5$
Molecular Weight: 363.45

Step 1: In a 20 mL microwave reaction vial loaded with **172** (630 mg, 2.29 mmol) was added an aqueous solution of NaOH 3M (7.6 mL). The vial was sealed and the reaction mixture was stirred at 120 °C for 20 h. After completion, the reaction mixture was used as is in the next step.

Step 2: To the previous reaction mixture were added an aqueous solution of NaOH 3M (5.4 mL) and 1,4-dioxane (26 mL). The reaction mixture was cooled to 0 °C, Boc_2O (2.51 g, 11.5 mmol, 5.0 equiv.) was added then the reaction mixture was allowed to come to rt over 18 h. After completion, the reaction mixture was quenched with an aqueous solution of $KHSO_4$ until pH ~ 3 then the aqueous layer was separated and extracted with DCM (3 x 100 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude product was used without purification in the next step.

Step 3: Under Ar, to a solution of the previous crude intermediate in a mixture of dry DCM (4.6 mL) and dry MeOH (1.2 mL) was slowly added a solution of trimethylsilyldiazomethane (2M in Et_2O) (1.72 mL, 3.44 mmol, 1.5 equiv.) at rt (gas evolution). The reaction mixture was stirred at rt for 3 h then quenched slowly with AcOH until gas evolution ceased. The reaction mixture was concentrated *in vacuo* then the crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of PE/EtOAc from 100 up to 70/30 to afford compound **177** (600 mg, 1.65 mmol, 72 %) as a colourless oil.

R_f (PE/EtOAc 90/10) 0.14.

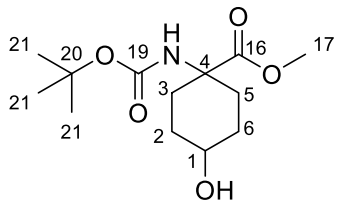
IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3369, 2948, 2866, 1740, 1704, 1497, 1454, 1366, 1275, 1168, 1093, 1076, 737, 698.

^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 7.37 – 7.16 (m, 5H, **5 x H_{Ar}**), 4.72 (s, 1H, **NH**), 4.55 (s, 2H, **H_9**), 3.71 (s, 3H, **H_{17}**), 3.49 – 3.32 (m, 1H, **H_1**), 2.21 – 2.05 (m, 2H, **CH_2**), 2.04 – 1.91 (m, 2H, **CH_2**), 1.91 – 1.75 (m, 2H, **CH_2**), 1.69 – 1.47 (m, 2H, **CH_2**), 1.42 (s, 9H, **H_{21}**).

^{13}C NMR (63 MHz, $CDCl_3$) δ 175.0 (**C-C_{16}**), 154.9 (**C-C_{19}**), 138.9 (**C-C_{10}**), 128.5 (**2 x CH_{Ar}**), 127.7 (**3 x CH_{Ar}**), 80.1 (**C-C_{20}**), 75.6 (**CH-C_1**), 70.2 (**CH_2-C_9**), 58.3 (**C-C_4**), 52.4 (**CH_3-C_{17}**), 30.8 (**2 x CH_2**), 28.4 (**3 x CH_3-C_{21}**), 27.2 (**2 x CH_2**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{20}H_{30}NO_5$ $[M+H]^+$: 364.2118, found: 364.2118

Methyl 1-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-4-hydroxycyclohexane-1-carboxylate (178)



Chemical Formula: $C_{13}H_{23}NO_5$
Molecular Weight: 273.33

A 50 mL round bottom flask was loaded with **177** (1.24 g, 3.41 mmol) then a suspension of 10 wt.% Pd/C (363 mg, 0.34 mmol, 0.1 equiv.) in MeOH (18 mL) was added. The flask was flushed with hydrogen then stirred at rt under hydrogen gas for 3 h. The reaction mixture was then filtered through Celite, washed with methanol then concentrated under vacuum to afford **178** (910 mg, 3.33 mmol, 98 %) as a colourless oil. The product was used in the next step without further purification.

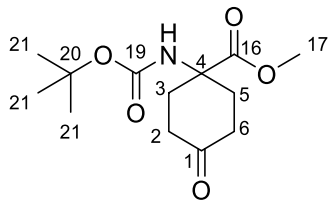
IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3517, 3329, 2976, 2950, 1708, 1515, 1452, 1366, 1269, 1226, 1170, 1157, 1073, 983, 967, 874, 759, 744.

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-d_6) δ 7.08 (s, 1H, **NH**), 4.58 – 4.34 (m, 1H, **OH**), 3.57 (s, 3H, **H_{17}**), 3.45 – 3.36 (m, 1H, **H_1**), 2.07 – 1.92 (m, 2H, **CH_2**), 1.68 – 1.50 (m, 4H, **2 x CH_2**), 1.42 – 1.32 (m, 11H, **CH_2 + H_{21}**).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-d_6) δ 175.2 (**C-C_{16}**), 155.0 (**C-C_{19}**), 78.0 (**C-C_{20}**), 67.6 (**CH-C_1**), 57.6 (**C-C_4**), 51.6 (**CH_3-C_{17}**), 30.1 (**2 x CH_2**), 28.7 (**2 x CH_2**), 28.1 (**3 x CH_3-C_{21}**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{13}H_{24}NO_5$ $[M+H]^+$: 274.1649, found: 274.1645.

Methyl 1-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-4-oxocyclohexane-1-carboxylate (179)



Chemical Formula: $C_{13}H_{21}NO_5$
Molecular Weight: 271.31

Under Ar, to a solution of **178** (907 mg, 3.32 mmol) in dry DCM (33 mL) cooled to 0 °C was added Dess-Martin periodinane (1.97 g, 4.65 mmol, 1.4 equiv.) by portions. The resulting white suspension was stirred at 0 °C for 1.5 h then at rt for 3 h. The reaction mixture was quenched with an aqueous solution of $Na_2S_2O_3$ (58 mL) and a saturated aqueous solution of $NaHCO_3$ (100 mL). The resulting cloudy solution was stirred until two clear layers were obtained. The aqueous layer was separated and extracted with DCM (3 x 60 mL) then the combined organic layers were dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of PE/EtOAc from 100 up to 70/30 to afford compound **179** (792 mg, 2.92 mmol, 88 %) as a white solid.

R_f (PE/EtOAc 70/30) 0.47.

Mp: 115-117 °C.

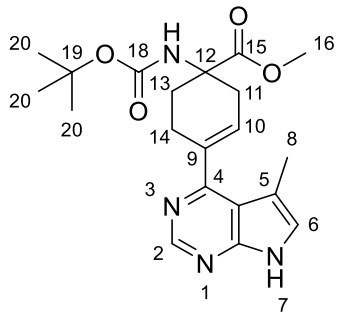
IR (ATR diamond, cm^{-1}) v: 3301, 2974, 1735, 1707, 1687, 1520, 1434, 1271, 1160, 1059, 954, 779, 676.

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-d_6) δ 7.52 (s, 1H, **NH**), 3.62 (s, 3H, **H_{17}**), 2.48 – 2.34 (m, 2H, **CH_2**), 2.34 – 1.97 (m, 6H, **3 x CH_2**), 1.39 (s, 9H, **H_{21}**).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-d_6) δ 209.1 (**C-C_1**), 174.2 (**C-C_{16}**), 155.3 (**C-C_{19}**), 78.6 (**C-C_{20}**), 57.2 (**C-C_4**), 52.0 (**CH_3-C_{17}**), 36.1 (**2 x CH_2**), 31.6 (**2 x CH_2**), 28.1 (**3 x CH_3-C_{21}**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{13}H_{21}NNaO_5$ $[M+Na]^+$: 294.1312, found: 294.1311.

Methyl 1-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-4-(5-methyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)cyclohex-3-ene-1-carboxylate (187)



Chemical Formula: $C_{20}H_{26}N_4O_4$
Molecular Weight: 386.45

Step 1: To a solution of **179** (600 mg, 2.20 mmol) in dry THF (24 mL) cooled to 0 °C were slowly added DBU (658 µL, 4.40 mmol, 2.0 equiv.) and perfluorobutanesulfonyl fluoride (810 µL, 4.40 mmol, 2.0 equiv.). The reaction mixture was allowed to come to rt over 18 h. TLC monitoring indicated incomplete conversion, so the reaction mixture was cooled again to 0 °C then DBU (329 µL, 2.20 mmol, 1.0 equiv.) and perfluorobutanesulfonyl fluoride (405 µL, 2.20 mmol, 2.0 equiv.) were added with further stirring at 0 °C for 10 min then at rt for 1 h. After full completion, the reaction mixture was quenched with H_2O (40 mL) and the aqueous layer was extracted with Et_2O (3 x 100 mL). The combined organic layers were dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo* to afford **188** (1.11 g, 2.00 mmol) as an orange oil. The product was used immediately without further purification.

Step 2: A solution of **188** (1.11 g, 2.00 mmol) in dry 1,4-dioxane (12.5 mL) was degassed for 15 min then molecular sieves 4Å, bis(pinacolato)diboron (584 mg, 2.30, 1.15 equiv.), KOAc (628 mg, 6.40 mmol, 3.2 equiv.), Pd(dppf)Cl_2.DCM (49 mg, 0.06 mmol, 3 mol%), and dppf (33 mg, 0.06 mmol, 3 mol%) were added. The vial was flushed with argon then sealed and stirred at 80 °C for 18 h. The reaction mixture was filtered through a pad of celite, washed with DCM and concentrated *in vacuo*. The crude reaction mixture was filtered on silica gel, with a liquid deposit, using a gradient solvent system of PE/EtOAc from 100 up to 80/20 to afford compound **186** (623 mg, 1.63 mmol) as an orange oil. The intermediate boronate was used immediately in the next step.

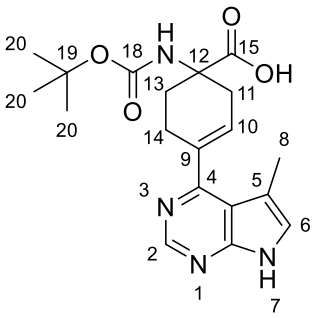
Step 3: The reaction was carried out as described in general procedure **E** using **186** (595 mg, 1.56 mmol), 4-chloro-5-methyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidine (300 mg, 1.79 mmol, 1.15 equiv.), Pd(PPh_3)$_4$ (185 mg, 0.16 mmol, 10 mol%.) in THF (6.2 mL) and a 2 M aqueous solution of Na_2CO_3 (2.3 mL, 4.68 mmol, 3.0 equiv.). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 100 up to 97/3 to afford compound **187** (432 mg, 1.12 mmol, 72 % over 3 steps) as a yellow powder.

R_f (DCM/MeOH 96/4) 0.26. **Mp:** 113-115 °C. **IR (ATR diamond, cm^{-1})** ν: 3218, 2975, 1705, 1558, 1516, 1450, 1345, 1283, 1253, 1164, 1059, 800, 742, 612, 567.

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 10.22 (s, 1H, **NH**), 8.78 (s, 1H, **H_2**), 7.10 (brs, 1H, **H_6**), 5.96 – 5.89 (m, 1H, **H_{10}**), 5.13 (s, 1H, **NH**), 3.78 (s, 3H, **H_{16}**), 3.04 – 2.90 (m, 1H, **CH_2**), 2.76 – 2.60 (m, 3H, **2 x CH_2**), 2.45 – 2.35 (m, 1H, **CH_2**), 2.29 (s, 3H, **H_8**), 2.21 – 2.09 (m, 1H, **CH_2**), 1.43 (s, 9H, **H_{20}**).**^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 174.7 (**C-C_{15}**), 161.4 (**C**), 155.2 (**C**), 153.1 (**C**), 150.8 (**CH_{Ar}-C_2**), 135.5 (**C**), 127.6 (**CH-C_{10}**), 123.7 (**CH_{Ar}-C_6**), 115.6 (**C**), 111.0 (**C**), 79.9 (**C-C_{19}**), 57.0 (**C-C_{12}**), 52.6 (**CH_3-C_{16}**), 33.8 (**CH_2**), 29.2 (**CH_2**), 28.4 (**3 x CH_3-C_{20}**), 24.3 (**CH_2**), 13.0 (**CH_3-C_8**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{20}H_{27}N_4O_4$ $[M+H]^+$: 387.2027, found: 387.2032.

1-((*tert*-Butoxycarbonyl)amino)-4-(5-methyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)cyclohex-3-ene-1-carboxylic acid (193)



Chemical Formula: $C_{19}H_{24}N_4O_4$
Molecular Weight: 372.43

To a solution of **187** (500 mg, 1.29 mmol) in a mixture of THF (3.4 mL) and MeOH (3.4 mL) was added an aqueous solution of NaOH 1M (3.9 mL, 3.9 mmol, 3.0 equiv.). The solution was stirred at 45 °C for 4 h. The reaction mixture was concentrated *in vacuo*, the residue was suspended in H_2O (25 mL) and acidified to pH ~ 6 with a saturated aqueous solution of NaH_2PO_4. The aqueous layer was separated, extracted with EtOAc (3 x 100 mL) then the combined organic layers were dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo* to afford **193** (416 mg, 1.12 mmol, 87 %) as a white solid. The product was used in the next step without further purification.

Mp: > 260 °C.

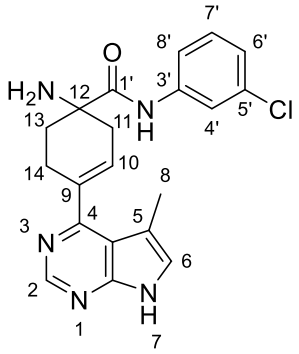
IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3291, 2928, 2359, 1710, 1596, 1568, 1455, 1366, 1343, 1263, 1165, 1052, 1023, 840, 747, 696.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 12.35 (s, 1H, **COOH**), 11.74 (s, 1H, **NH**), 8.59 (s, 1H, **H$_2$**), 7.26 (s, 1H, **H$_6$**), 7.11 (s, 1H, **NH**), 5.87 – 5.74 (m, 1H, **H$_{10}$**), 2.82 – 2.56 (m, 3H, **2 x CH$_2$**), 2.49 – 2.41 (m, 1H, **CH$_2$**), 2.25 – 2.14 (m, 4H**, CH$_2$ + H$_8$**), 2.01 – 1.86 (m, 1H, **CH$_2$**), 1.39 (s, 9H, **H$_{20}$**).

^{13}C NMR (101 MHz, dept, DMSO-*d*$_6$) δ 150.0 (**CH$_{Ar}$-C$_2$**), 128.2 (**CH-C$_{10}$**), 124.6 (**CH$_{Ar}$-C$_6$**), 32.3 (**CH$_2$**), 28.8 (**CH$_2$**), 28.2 (**3 x CH$_3$-C$_{20}$**), 23.6 (**CH$_2$**), 12.7 (**CH$_3$-C$_8$**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{19}H_{25}N_4O_4$ $[M+H]^+$: 373.1870, found: 373.1871.

1-Amino-*N*-(3-chlorophenyl)-4-(5-methyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)cyclohex-3-ene-1-carboxamide (196)



Chemical Formula: $C_{20}H_{20}ClN_5O$
Molecular Weight: 381.86

Step 1: To a solution of **193** (70 mg, 0.19 mmol, 1.0 equiv.) in dry DMF (1.3 mL) were added 3-chloroaniline (40 µL, 0.38 mmol, 2.0 equiv.), HATU (144 mg, 0.38 mmol, 2.0 equiv.) and DIPEA (99 µL, 0.57 mmol, 3.0 equiv.). The solution was stirred at rt for 18 h then concentrated *in vacuo*. The crude reaction mixture was filtered on silica gel using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 100 up to 96/4 to afford compound **195** (88 mg, 0.18 mmol) as a yellow powder which was used without further purification in the next step.

Step 2: To a solution of **195** (82 mg, 0.17 mmol) in dry DCM (4.4 mL) cooled to 0 °C was added HCl 4N in 1,4-dioxane (0.44 mL, 1.76 mmol, 10.4 equiv.). The cloudy solution was stirred at rt for 2 h. After completion, the reaction mixture was concentrated *in vacuo* then the residue was dissolved in DCM/MeOH 90/10 and NH_4OH was added until the crude product was completely dissolved. Silica gel was then added to form a solid deposit, and the crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH/NH_4OH from 98/2/1 up to 95/5/1 to afford compound **196** (25 mg, 0.07 mmol, 37 % over 2 steps) as a white solid.

R_f (DCM/MeOH/NH_4OH 95/5/1) 0.32.

Mp: > 260 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3351, 3281, 3091, 2922, 1685, 1595, 1507, 1447, 1425, 1059, 877, 775, 725, 692, 613.

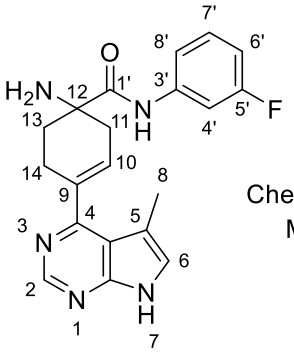
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.77 (s, 1H, **NH**), 8.62 (s, 1H, **H_2**), 7.96 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H, **$H_{4'}$**), 7.61 (brd, *J* = 8.3 Hz, 1H, **$H_{8'}$**), 7.35 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H, **$H_{7'}$**), 7.28 (s, 1H, **H_6**), 7.12 (dd, *J* = 8.0, 2.0 Hz, 1H, **$H_{6'}$**), 5.97 – 5.87 (m, 1H, **H_{10}**), 2.82 (dd, *J* = 18.1, 2.3 Hz, 1H, **CH_2**), 2.71 – 2.61 (m, 2H, **H_{14}**), 2.24 (s, 3H, **H_8**), 2.23 – 2.19 (m, 1H, **CH_2**), 2.16 – 2.05 (m, 1H, **CH_2**), 1.86 – 1.77 (m, 1H, **CH_2**).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 176.4 (**C**), 160.6 (**C**), 152.5 (**C**), 150.0 (**CH_{Ar}-C_2**), 140.3 (**C**), 134.3 (**C**), 133.0 (**C**), 130.3 (**CH_{Ar}-$C_{7'}$**), 128.6 (**CH-C_{10}**), 124.7 (**CH_{Ar}-C_6**), 123.0 (**CH_{Ar}-$C_{6'}$**), 118.8 (**CH_{Ar}-$C_{4'}$**), 117.8 (**CH_{Ar}-$C_{8'}$**), 114.4 (**C**), 109.1 (**C**), 55.7 (**C-C_{12}**), 35.6 (**CH_2**), 30.8 (**CH_2**), 23.3 (**CH_2**), 12.9 (**CH_3-C_8**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{20}H_{21}ClN_5O$ $[M+H]^+$: 382.1429, found: 382.1435.

Purity (HPLC): 96.5 %.

1-Amino-*N*-(3-fluorophenyl)-4-(5-methyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)cyclohex-3-ene-1-carboxamide (197)



Chemical Formula: $C_{20}H_{20}FN_5O$
Molecular Weight: 365.41

Step 1: To a solution of **193** (87 mg, 0.23 mmol, 1.0 equiv.) in dry DMF (1.5 mL) were added 3-fluoroaniline (44 µL, 0.46 mmol, 2.0 equiv.), HATU (175 mg, 0.46 mmol, 2.0 equiv.) and DIPEA (120 µL, 0.69 mmol, 3.0 equiv.). The solution was stirred at rt for 18 h then diluted with DCM (60 mL) and washed with a saturated aqueous solution of $NaHCO_3$ (2 x 10 mL), H_2O (10 mL) then dried over $MgSO_4$ filtered and concentrated *in vacuo*. The crude reaction mixture was filtered on silica gel using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 100 up to 95/5 to afford the intermediate carbamate (100 mg, 0.21 mmol) as a pale-yellow solid which was used in the next step without further purification.

Step 2: To a suspension of the crude carbamate (100 mg, 0.21 mmol) in dry DCM (2.1 mL) cooled to 0 °C was added HCl 4N in 1,4-dioxane (0.42 mL, 1.68 mmol, 8.0 equiv.). The reaction mixture was stirred at rt for 3 h. After completion, the reaction mixture was concentrated *in vacuo* then the residue was dissolved in DCM/MeOH 90/10 and NH_4OH was added until the crude product was completely dissolved. Silica gel was then added to form a solid deposit, and the crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH/NH_4OH from 98/2/1 up to 95/5/1 to afford compound **197** (20 mg, 0.05 mmol, 24 % over 2 steps) as a white solid.

R_f (DCM/MeOH/NH_4OH 90/10/1) 0.36.

Mp: > 260 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3313, 3121, 2922, 2840, 1668, 1613, 1596, 1515, 1439, 1259, 1141, 880, 840, 775, 714, 680, 612.

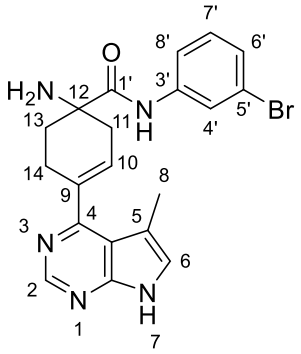
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.77 (s, 1H, **NH**), 8.63 (s, 1H, **H_2**), 7.75 (dt, J_{H-F} = 11.9, J = 2.3 Hz, 1H, **$H_{4'}$**), 7.53 – 7.44 (m, 1H, **$H_{8'}$**), 7.41 – 7.32 (m, 1H, **$H_{7'}$**), 7.31 – 7.26 (m, 1H, **H_6**), 6.89 (td, J_{H-F} = 8.6, J = 2.9 Hz, 1H, **$H_{6'}$**), 5.96 – 5.89 (m, 1H, **H_{10}**), 2.82 (m, 1H, **CH_2**), 2.74 – 2.59 (m, 2H, **CH_2**), 2.25 (d, J = 1.1 Hz, 3H, **H_8**), 2.25 – 2.19 (m, 1H, **CH_2**), 2.15 – 2.05 (m, 1H, **CH_2**), 1.87 – 1.76 (m, 1H, **CH_2**).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 176.4 (**C-$C_{1'}$**), 162.1 (d, J_{C-F} = 241.2 Hz, **C-$_{5'}$**), 160.6 (**C**), 152.5 (**C**), 150.0 (**CH_{Ar}-C_2**), 140.6 (d, J_{C-F} = 11.1 Hz, **C-$C_{3'}$**), 134.3 (**C**), 130.2 (d, J_{C-F} = 9.4 Hz, **CH_{Ar}-$C_{7'}$**), 128.6 (**CH-C_{10}**), 124.7 (**CH_{Ar}-C_6**), 115.1 (d, J_{C-F} = 2.7 Hz, **CH_{Ar}-$C_{8'}$**), 114.4 (**C**), 109.6 (d, J_{C-F} = 21.1 Hz, **CH_{Ar}-$C_{6'}$**), 109.1 (**C**), 106.0 (d, J_{C-F} = 26.2 Hz, **CH_{Ar}-$C_{4'}$**), 55.6 (**C-C_{12}**), 35.7 (**CH_2**), 30.9 (**CH_2**), 23.3 (**CH_2**), 12.9 (**CH_3-C_8**).

^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-d_6) δ -112.23 (s, 1F).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{20}H_{21}FN_5O$ $[M+H]^+$: 366.1725, found: 366.1729. **Purity (HPLC):** 96.0 %.

1-Amino-*N*-(3-bromophenyl)-4-(5-methyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)cyclohex-3-ene-1-carboxamide (198)



Chemical Formula: $C_{20}H_{20}BrN_5O$
Molecular Weight: 426.32

Step 1: To a solution of **193** (80 mg, 0.21 mmol, 1.0 equiv.) in dry DMF (1.4 mL) were added 3-bromoaniline (46 µL, 0.42 mmol, 2.0 equiv.), HATU (160 mg, 0.42 mmol, 2.0 equiv.) and DIPEA (110 µL, 0.63 mmol, 3.0 equiv.). The solution was stirred at rt for 72 h then concentrated *in vacuo* and co-evaporated with heptane (2 x 60 mL). The crude reaction mixture was filtered on silica gel using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 100 up to 95/5 to afford the intermediate carbamate (47 mg, 0.09 mmol) as a brown solid.

Step 2: To a suspension of the intermediate carbamate (45 mg, 0.09 mmol) in dry DCM (1.0 mL) cooled at 0 °C was added HCl 4N in 1,4-dioxane (0.17 mL, 0.68 mmol, 8.0 equiv.). The reaction mixture was stirred at rt for 3 h. After completion, the reaction mixture was concentrated *in vacuo* then the residue was dissolved in DCM/MeOH 90/10 and NH_4OH was added until the crude product was completely dissolved. Silica gel was then added to form a solid deposit, and the crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH/NH_4OH from 98/2/1 up to 95/5/1 to afford compound **198** (26 mg, 0.06 mmol, 29 % over 2 steps) as a white solid.

R_f (DCM/MeOH/NH_4OH 95/5/1) 0.28.

Mp: 257-259 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) v: 3348, 3280, 2918, 1685, 1594, 1575, 1506, 1447, 1421, 1061, 876, 791, 726, 677, 612, 601.

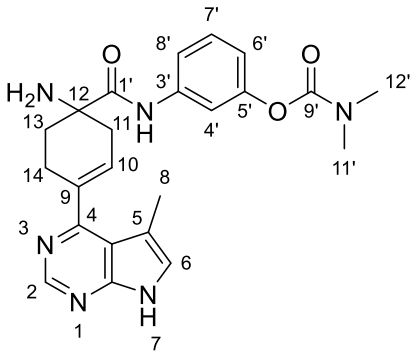
^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-d_6) δ 11.76 (s, 1H, **NH**), 8.62 (s, 1H, **H_2**), 8.10 (t, *J* = 1.9 Hz, 1H, **$H_{4'}$**), 7.65 (dt, *J* = 7.4, 2.0 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 7.35 – 7.19 (m, 3H, **3 x H_{Ar}**), 5.97 – 5.85 (m, 1H, **H_{10}**), 2.91 – 2.73 (m, 1H, **CH_2**), 2.73 – 2.59 (m, 2H, **CH_2**), 2.24 (s, 3H, **H_8**), 2.22 – 2.15 (m, 1H, **CH_2**), 2.12 – 2.02 (m, 1H, **CH_2**), 1.87 – 1.71 (m, 1H, **CH_2**).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-d_6) δ 176.5 (**C**), 160.6 (**C**), 152.5 (**C**), 150.0 (**CH_{Ar}-C_2**), 140.5 (**C**), 134.3 (**C**), 130.6 (**CH_{Ar}**), 128.6 (**CH-C_{10}**), 125.8 (**CH_{Ar}**), 124.7 (**CH_{Ar}**), 121.6 (**CH_{Ar}-$C_{4'}$**), 121.5 (**C**), 118.2 (**CH_{Ar}**), 114.4 (**C**), 109.1 (**C**), 55.6 (**C-C_{12}**), 35.7 (**CH_2**), 30.9 (**CH_2**), 23.4 (**CH_2**), 12.9 (**CH_3-C_8**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{20}H_{21}BrN_5O$ $[M+H]^+$: 426.0924, found: 426.0921.

Purity (HPLC): 96.3 %.

3-(1-Amino-4-(5-methyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)cyclohex-3-ene-1-carboxamido)phenyl dimethylcarbamate (199)



Chemical Formula: $C_{23}H_{26}N_6O_3$
Molecular Weight: 434.50

Step 1: To a solution of **193** (87 mg, 0.23 mmol, 1.0 equiv.) in dry DMF (1.5 mL) were added 3-aminophenyl *N*,*N*-dimethylcarbamate (83 mg, 0.46 mmol, 2.0 equiv.), HATU (175 mg, 0.46 mmol, 2.0 equiv.) and DIPEA (120 µL, 0.69 mmol, 3.0 equiv.). The solution was stirred at rt for 20 h then concentrated *in vacuo* and co-evaporated with heptane (2 x 60 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 100 up to 96/4 to afford the intermediate carbamate (25 mg, 0.06 mmol) as a pale brown solid.

Step 2 :To a solution of the intermediate carbamate (29 mg, 0.05 mmol) in dry DCM (1.0 mL) cooled at 0 °C was added HCl 4N in 1,4-dioxane (0.10 mL, 0.40 mmol, 8.0 equiv.). The reaction mixture was stirred at rt for 4 h. After completion, the reaction mixture was concentrated *in vacuo* then the residue was dissolved in DCM/MeOH 90/10 and NH_4OH was added until the crude product was completely dissolved. Silica gel was then added to form a solid deposit, and the crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using solvent system of DCM/MeOH/NH_4OH 95/5/1 to afford compound **199** (15 mg, 0.03 mmol, 13 % over 2 steps) as a white solid.

R_f (DCM/MeOH/NH_4OH 95/5/1) 0.23.

Mp: 108-110 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3272, 2923, 1712, 1674, 1520, 1440, 1387, 1254, 1173, 1061, 779, 612.

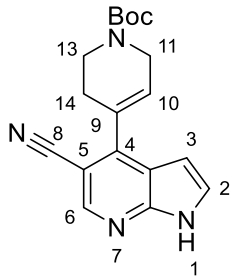
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.76 (s, 1H, **NH**), 8.62 (s, 1H, **H_2**), 7.65 (t, *J* = 2.2 Hz, 1H, **$H_{4'}$**), 7.53 – 7.40 (m, 1H, **$H_{8'}$**), 7.32 – 7.25 (m, 2H, **$H_{7'}$ + H_6**), 6.81 (dd, *J* = 8.1, 1.4 Hz, 1H, **$H_{6'}$**), 5.94 – 5.87 (m, 1H, **H_{10}**), 3.04 (s, 3H, **$H_{12'}$**), 2.91 (s, 3H, **$H_{11'}$**), 2.85 – 2.78 (m, 1H, **CH_2**), 2.69 – 2.62 (m, 2H, **CH_2**), 2.24 (s, 3H, **H_8**), 2.23 – 2.18 (m, 1H, **CH_2**), 2.12 – 2.05 (m, 1H, **CH_2**), 1.82 – 1.75 (m, 1H, **CH_2**).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 176.3 (**C**), 160.6 (**C**), 153.9 (**C**), 152.5 (**C**), 151.5 (**C**), 150.0 (**CH_{Ar}-C_2**), 139.6 (**C**), 134.3 (**C**), 129.1 (**CH_{Ar}-$C_{7'}$**), 128.7 (**CH-C_{10}**), 124.7 (**CH_{Ar}-C_6**), 116.6 (**CH_{Ar}-$C_{6'}$**), 115.9 (**CH_{Ar}-$C_{8'}$**), 114.4 (**C**), 112.8 (**CH_{Ar}-$C_{4'}$**), 109.1 (**C**), 55.5 (**C-C_{12}**), 36.3 (**CH_2-$C_{11'}$**), 36.1 (**CH_2-$C_{12'}$**), 35.7 (**CH_2**), 30.9 (**CH_2**), 23.3 (**CH_2**), 12.9 (**CH_3-C_8**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{23}H_{27}N_6O_3$ $[M+H]^+$: 435.2139, found: 435.2139.

Purity (HPLC): 98.6 %.

tert-Butyl 4-(5-cyano-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-4-yl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxylate (206)



Chemical Formula: $C_{18}H_{20}N_4O_2$
Molecular Weight: 324.38

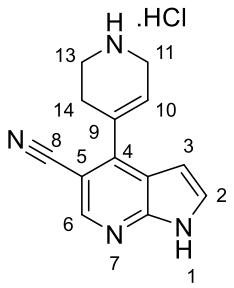
The reaction was carried out as described in general procedure **E** using 4-chloro-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carbonitrile (601 mg, 3.38 mmol), *N*-Boc,1,2,3,6-tetrahydropyridine-4-boronic acid pinacol ester (1.20 g, 3.89 mmol, 1.15 equiv.), $Pd(PPh_3)_4$ (393 mg, 0.34 mmol, 10 mol%.) in THF (11 mL) and a 2 M aqueous solution of Na_2CO_3 (5.0 mL, 10.14 mmol, 3.0 equiv.). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/acetone from 100 up to 90/10 to afford compound **206** (890 mg, 2.74 mmol, 81 %) as a yellow solid.

R_f (DCM/acetone 90/10) 0.28.

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-d_6) δ 12.34 (s, 1H), 8.56 (s, 1H), 7.67 (dd, *J* = 3.6, 2.3 Hz, 1H), 6.62 (dd, *J* = 3.6, 1.7 Hz, 1H), 6.12 (brs, 1H), 4.14 – 4.02 (m, 2H), 3.61 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H), 2.61 – 2.53 (m, 2H), 1.45 (s, 9H).

All spectral data correspond to the values found in the thesis of Champiré A. defended in Orléans on November 30th 2018.

4-(1,2,3,6-Tetrahydropyridin-4-yl)-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carbonitrile hydrochloride (207)



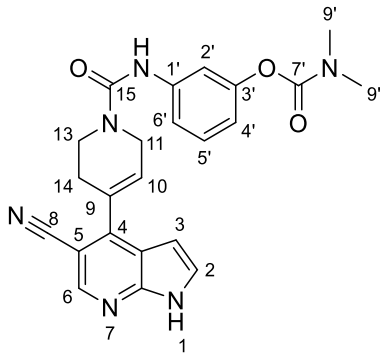
Chemical Formula: $C_{13}H_{13}ClN_4$
Molecular Weight: 260.73

To a 4 M solution of HCl in 1,4-dioxane (2.38 mL, 9.52 mmol, 8.0 equiv.) was added **206** (385 mg, 1.19 mmol). The reaction mixture was stirred at rt for 2 h. After completion, the reaction mixture was concentrated *in vacuo*, the residue was triturated in Et_2O, filtered and washed with Et_2O to afford compound **207** (273 mg, 1.05 mmol, 88 %) as a yellow powder.

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-d_6) δ 12.43 (s, 1H), 9.61 (brs, 2H), 8.60 (s, 1H), 7.71 (dd, *J* = 3.6, 2.5 Hz, 1H), 6.74 (dd, *J* = 3.6, 1.8 Hz, 1H), 6.15 – 6.07 (m, 1H), 3.91 – 3.76 (m, 2H), 3.42 – 3.29 (m, 2H), 2.86 – 2.74 (m, 2H).

All spectral data correspond to the values found in the thesis of Champiré A. defended in Orléans on November 30th 2018.

3-(4-(5-Cyano-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-4-yl)-1,2,3,6-tetrahydropyridine-1-carboxamido)phenyl dimethylcarbamate (208)



Chemical Formula: $C_{23}H_{22}N_6O_3$
Molecular Weight: 430.47

The reaction was carried out as described in general procedure **A** using 3-aminophenyl *N*,*N*-dimethylcarbamate (80 mg, 0.44 mmol), 4-nitrophenyl chloroformate (107 mg, 0.53 mmol, 1.2 equiv.), DIPEA (275 µL, 1.58 mmol, 3.6 equiv.) and amine **207** (158 mg, 0.53 mmol, 1.2 equiv.) in dry THF (6.0 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 100 up to 95/5 to afford compound **208** (145 mg, 0.34 mmol, 77 %) as a white solid.

R_f (DCM/MeOH 95/5) 0.30.

Mp: 216-218 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3134, 2917, 2218, 1727, 1641, 1539, 1441, 1385, 1342, 1232, 1159, 771 750, 612.

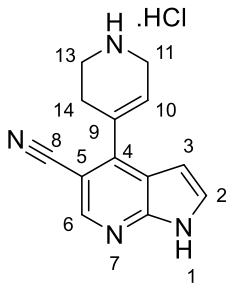
^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-d_6) δ 12.35 (s, 1H, **NH**), 8.72 (s, 1H, **NH**), 8.58 (s, 1H, **H_6**), 7.69 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H, **H_2**), 7.38 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H, **$H_{2'}$**), 7.33 (ddd, *J* = 8.2, 2.0, 1.2 Hz, 1H, **$H_{4'/6'}$**), 7.23 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, **$H_{6'/4'}$**), 6.70 (ddd, *J* = 7.9, 2.3, 1.1 Hz, 1H, **$H_{5'}$**), 6.66 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H, **H_3**), 6.23 – 6.16 (m, 1H, **H_{10}**), 4.30 – 4.19 (m, 2H, **H_{11}**), 3.75 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H, **H_{13}**), 3.04 (s, 3H, **$H_{9'}$**), 2.91 (s, 3H, **$H_{9'}$**), 2.72 – 2.60 (m, 2H, **H_{14}**).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-d_6) δ 154.7 (**C**), 154.0 (**C**), 151.3 (**C**), 149.3 (**C**), 146.3 (**CH_{Ar}-C_6**), 146.0 (**C**), 141.4 (**C**), 131.9 (**C**), 128.7 (**CH_{Ar}**), 128.6 (**CH_{Ar}-C_2**), 128.1 (**CH-C_{10}**), 118.7 (**C**), 117.3 (**C**), 116.0 (**CH_{Ar}**), 115.0 (**CH_{Ar}**), 113.0 (**CH_{Ar}**), 100.6 (**CH_{Ar}-C_3**), 97.9 (**C**), 43.7 (**CH_2-C_{11}**), 40.4 (**CH_2-C_{13}**), 36.3 (**CH_3-$C_{9'}$**), 36.1 (**CH_3-$C_{9'}$**), 28.4 (**CH_2-C_{14}**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{23}H_{23}N_6O_3$ $[M+H]^+$: 431.1826, found: 431.1826.

Purity (HPLC): 99.1 %.

4-(5-Cyano-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-4-yl)-N-(3-(trifluoromethoxy)phenyl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxamide (209)



Chemical Formula: $C_{13}H_{13}ClN_4$
Molecular Weight: 260.73

To a suspension of **207** (82 mg, 0.31 mmol) in dry DCM (3.4 mL) cooled to 0 °C were added DIPEA (167 µL, 0.96 mmol, 3.1 equiv.) and a solution of 1-isocyanato-3-(trifluoromethoxy)benzene (69 mg, 0.34 mmol, 1.1 equiv.) in dry DCM (1.0 mL) dropwise. The reaction mixture was stirred at 0 °C for 1 h then concentrated *in vacuo*. The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 100 up to 98/2 to afford compound **209** (25 mg, 0.06 mmol, 19 %) as a white solid.

Note: The isocyanate must be diluted in dry DCM to prevent any secondary reactions.

R_f (DCM/MeOH 98/2) 0.21.

Mp: 198-200 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3122, 2999, 2865, 2215, 1639, 1540, 1446, 1343, 1251, 1233, 1214, 1162, 745, 702, 612.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 12.35 (s, 1H, **NH**), 8.89 (s, 1H, **NH**), 8.58 (s, 1H, **H_6**), 7.72 – 7.65 (m, 2H, **H_2 + H_{Ar}**), 7.52 (dd, *J* = 8.6, 1.9 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 7.37 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.95 – 6.87 (m, 1H, **H_{Ar}**), 6.66 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H, **H_3**), 6.22 – 6.15 (m, 1H, **H_{10}**), 4.26 (d, *J* = 2.9 Hz, 2H, **H_{11}**), 3.77 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H, **H_{13}**), 2.69 – 2.62 (m, 2H, **H_{14}**).

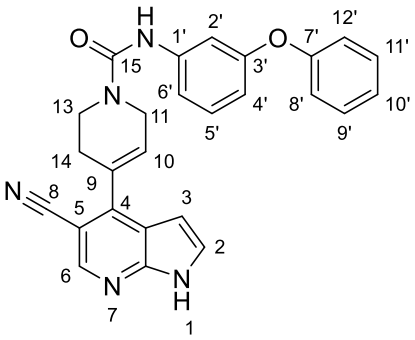
^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 154.6 (**C**), 149.3 (**C**), 148.5 (**C**), 146.3 (**CH_{Ar}-C_6**), 146.0 (**C**), 142.4 (**C**), 131.9 (**C**), 129.9 (**CH_{Ar}**), 128.6 (**CH_{Ar}-C_2**), 128.0 (**CH-C_{10}**), 120.1 (d, J_{C-F} = 255.7 Hz, **C-$C_{7'}$**), 118.7 (**C**), 117.9 (**CH_{Ar}**), 117.3 (**C**), 113.6 (**CH_{Ar}**), 111.4 (**CH_{Ar}**), 100.6 (**CH_{Ar}-C_3**), 97.9 (**C**), 43.7 (**CH_2-C_{11}**), 40.4 (**CH_2-C_{13}**), 28.4 (**CH_2-C_{14}**).

^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-d_6) δ -56.57 (s, 3F).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{21}H_{17}F_3N_5O_2$ $[M+H]^+$: 428.1329, found: 428.1325.

Purity (HPLC): > 99.9 %.

4-(5-Cyano-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-4-yl)-*N*-(3-phenoxyphenyl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxamide (210)



Chemical Formula: $C_{26}H_{21}N_5O_2$
Molecular Weight: 435.49

To a suspension of **207** (85 mg, 0.29 mmol) in dry DCM (4.0 mL) cooled at 0 °C were added DIPEA (157 µL, 0.90 mmol, 3.1 equiv.) then 3-phenoxyphenyl isocyanate (58 µL, 0.32 mmol, 1.1 equiv.) dropwise. The reaction mixture was stirred at 0 °C for 1.5 h then concentrated *in vacuo*. The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 100 up to 96/4 to afford compound **210** (44 mg, 0.10 mmol, 35 %) as a white solid.

R_f (DCM/MeOH 98/2) 0.20.

Mp: 171-173 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3128, 2998, 2862, 2220, 1635, 1588, 1532, 1437, 1343, 1231, 1214, 975, 770, 741, 688, 612.

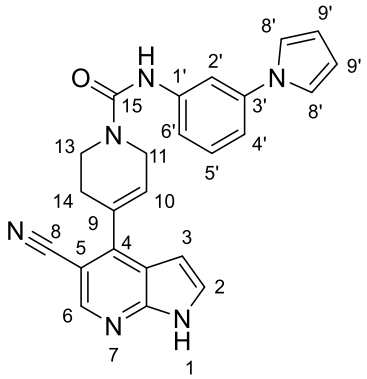
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 12.34 (s, 1H, **NH**), 8.68 (s, 1H, **NH**), 8.58 (s, 1H, **H_6**), 7.68 (brs, 1H, **H_2**), 7.39 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H, **2 x H_{Ar}**), 7.34 – 7.21 (m, 3H, **3 x H_{Ar}**), 7.16 – 7.09 (m, 1H, **H_{Ar}**), 7.02 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, **2 x H_{Ar}**), 6.67 – 6.59 (m, 2H, **H_3 + H_{Ar}**), 6.17 (brs, 1H, **H_{10}**), 4.25 – 4.19 (m, 2H, **H_{11}**), 3.73 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H, **H_{13}**), 2.68 – 2.61 (m, 2H, **H_{14}**).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 156.7 (**2 x C**), 154.7 (**C**), 149.3 (**C**), 146.3 (**CH_{Ar}-C_6**), 146.0 (**C**), 142.2 (**C**), 131.8 (**C**), 130.0 (**2 x CH_{Ar}**), 129.6 (**CH_{Ar}**), 128.5 (**CH_{Ar}**), 128.1 (**CH_{Ar}**), 123.3 (**CH_{Ar}**), 118.6 (**C + 2 x CH_{Ar}**), 117.3 (**C**), 114.5 (**CH_{Ar}**), 111.9 (**CH_{Ar}**), 109.6 (**CH_{Ar}**), 100.6 (**CH_{Ar}**), 97.9 (**C**), 43.7 (**CH_2-C_{11}**), 40.3 (**CH_2-C_{13}**), 28.4 (**CH_2-C_{14}**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{26}H_{22}N_5O_2$ $[M+H]^+$: 436.1768, found: 436.1769.

Purity (HPLC): 98.6 %.

N-(3-(1*H*-Pyrrol-1-yl)phenyl)-4-(5-cyano-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-4-yl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxamide (211)



Chemical Formula: $C_{24}H_{20}N_6O$
Molecular Weight: 408.47

The reaction was carried out as described in general procedure **A** using 3-(1*H*-pyrrol-1-yl)aniline (59 mg, 0.37 mmol), 4-nitrophenyl chloroformate (87 mg, 0.44 mmol, 1.2 equiv.), DIPEA (232 µL, 1.33 mmol, 3.6 equiv.) and amine **207** (106 mg, 0.41 mmol, 1.1 equiv.) in dry THF (5.3 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 100 up to 98/2 to afford compound **211** (78 mg, 0.19 mmol, 51 %) as a white solid.

R_f (DCM/MeOH 98/2) 0.21.

Mp: 169-171 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3131, 2865, 2222, 1636, 1584, 1534, 1498, 1445, 1343, 1291, 1234, 1069, 777, 719, 695, 604.

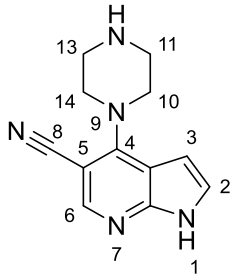
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 12.36 (s, 1H, **NH**), 8.76 (s, 1H, **NH**), 8.59 (s, 1H, **H_6**), 7.80 – 7.72 (m, 1H, **H_{Ar}**), 7.72 – 7.65 (m, 1H, **H_2**), 7.42 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 7.33 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 7.28 – 7.22 (m, 2H, **$H_{8'}$**), 7.14 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.66 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, **H_3**), 6.30 – 6.24 (m, 2H, **$H_{9'}$**), 6.24 – 6.17 (m, 1H, **H_{10}**), 4.33 – 4.22 (m, 2H, **H_{11}**), 3.78 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H, **H_{13}**), 2.72 – 2.62 (m, 2H, **H_{14}**).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 154.8 (**C**), 149.3 (**C**), 146.3 (**CH_{Ar}-C_6**), 146.0 (**C**), 141.8 (**C**), 140.1 (**C**), 131.9 (**C**), 129.5 (**CH_{Ar}**), 128.6 (**CH_{Ar}-C_2**), 128.1 (**CH-C_{10}**), 118.9 (**2 x CH-$C_{8'}$**), 118.7 (**C**), 117.3 (**C**), 116.5 (**CH_{Ar}**), 113.0 (**CH_{Ar}**), 110.8 (**CH_{Ar}-C_3**), 110.3 (**2 x CH-$C_{9'}$**), 100.6 (**CH_{Ar}**), 97.9 (**C**), 43.7 (**CH_2-C_{11}**), 40.4 (**CH_2-C_{13}**), 28.4 (**CH_2-C_{14}**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{24}H_{21}N_6O$ $[M+H]^+$: 409.1771, found: 409.1771.

Purity (HPLC): > 99.9 %.

4-(Piperazin-1-yl)-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carbonitrile (212)



Chemical Formula: $C_{12}H_{13}N_5$
Molecular Weight: 227.27

To a 5 mL microwave reaction vial were added 4-chloro-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carbonitrile (131 mg, 0.74 mmol), piperazine (510 mg, 5.92 mmol, 8.0 equiv.) and *i*-PrOH (2.5 mL). The vial was sealed and submitted to microwave irradiation at 100 °C for 30 min then concentrated *in vacuo*. The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH/NH_4OH from 100 up to 95/5/1 to afford compound **212** (159 mg, 0.70 mmol, 95 %) as a white powder.

R_f (DCM/MeOH/NH_4OH 95/5/1) 0.20.

Mp: 223-225 °C.

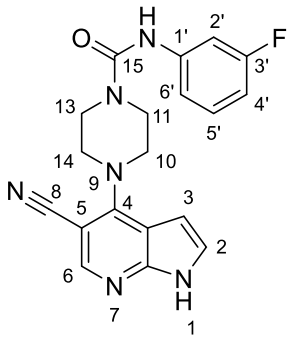
IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3291, 3042, 2925, 2818, 2676, 2207, 1574, 1486, 1446, 1315, 1238, 1121, 866, 823, 716, 612.

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-d_6) δ 11.98 (s, 1H, **NH**), 8.21 (s, 1H, **H_6**), 7.37 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H, **H_2**), 6.63 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H, **H_3**), 3.67 – 3.55 (m, 4H, **H_{10} + H_{14}**), 2.94 – 2.81 (m, 4H, **H_{11} + H_{13}**).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-d_6) δ 154.1 (**C-C_4**), 150.5 (**C-$C_{4a/7a}$**), 148.5 (**CH_{Ar}-C_6**), 124.2 (**CH_{Ar}-C_2**), 119.8 (**C-C_8**), 109.7 (**C-$C_{7a/4a}$**), 101.6 (**CH_{Ar}-C_3**), 89.1 (**C-C_5**), 52.2 (**2 x CH_2-C_{10} + C_{14}**), 46.0 (**2 x CH_2-C_{11} + C_{13}**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{12}H_{14}N_5$ $[M+H]^+$: 228.1244, found: 228.1244.

4-(5-Cyano-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-4-yl)-*N*-(3-fluorophenyl)piperazine-1-carboxamide (213)



Chemical Formula: $C_{19}H_{17}FN_6O$
Molecular Weight: 364.38

To a suspension of **212** (83 mg, 0.37 mmol) in dry DCM (4.1 mL) cooled at 0 °C were added DIPEA (200 µL, 1.15 mmol, 3.1 equiv.) and a solution of 3-fluorophenyl isocyanate (47 µL, 0.41 mmol, 1.1 equiv.) in dry DCM (1.2 mL) dropwise. The reaction mixture was stirred at 0 °C for 1 h then concentrated *in vacuo*. The suspension was filtered and the solid was washed successively with DCM, H_2O and DCM/MeOH (9/1) to afford compound **213** (40 mg, 0.11 mmol, 30 %) as a white solid.

Note: The isocyanate must be diluted in dry DCM to prevent any secondary reactions.

Mp: > 260 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3392, 3186, 3108, 2993, 2866, 2202, 1690, 1573, 1492, 1432, 1357, 1262, 1208, 1148, 896, 836, 766, 740, 683, 589.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 12.06 (s, 1H, **NH**), 8.85 (s, 1H, **NH**), 8.27 (s, 1H, **H$_6$**), 7.58 – 7.44 (m, 1H, **H$_{4'}$**), 7.45 – 7.40 (m, 1H, **H$_2$**), 7.34 – 7.21 (m, 2H, **H$_{5'}$ + H$_{6'}$**), 6.81 – 6.72 (m, 1H, **H$_{2'}$**), 6.72 – 6.66 (m, 1H, **H$_3$**), 3.83 – 3.72 (m, 4H, **2 x CH$_2$**), 3.72 – 3.61 (m, 4H, **2 x CH$_2$**).

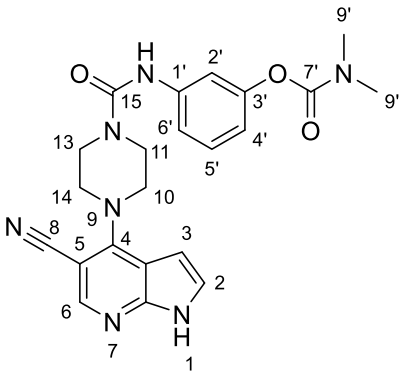
^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 162.2 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 240.3 Hz, **C-C$_{3'}$**), 154.6 (**C**), 153.6 (**C**), 150.5 (**C**), 148.4 (**CH$_{Ar}$-C$_6$**), 142.4 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 11.4 Hz, **C-C$_{1'}$**), 129.8 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 9.4 Hz, **CH$_{Ar}$-C$_{5'}$**), 124.6 (**CH$_{Ar}$-C$_2$**), 119.8 (**C**), 115.0 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 2.1 Hz, **CH$_{Ar}$-C$_{6'}$**), 109.9 (**C**), 108.0 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 21.4 Hz, **CH$_{Ar}$-C$_{2'}$**), 105.9 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 26.4 Hz, **CH$_{Ar}$-C$_{4'}$**), 101.5 (**CH$_{Ar}$-C$_3$**), 89.5 (**C**), 50.5 (**2 x CH$_2$-**, 44.2 (**2 x CH$_2$**).

^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ -112.74 – -112.91 (m, 1F).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{19}H_{18}FN_6O$ $[M+H]^+$: 365.1521, found: 365.1523.

Purity (HPLC): 98.4 %.

3-(4-(5-Cyano-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-4-yl)piperazine-1-carboxamido)phenyl dimethylcarbamate (214)



Chemical Formula: $C_{22}H_{23}N_7O_3$
Molecular Weight: 433.47

The reaction was carried out as described in general procedure **A** using 3-aminophenyl dimethylcarbamate (41 mg, 0.23 mmol), 4-nitrophenyl chloroformate (56 mg, 0.28 mmol, 1.2 equiv.), DIPEA (145 µL, 0.83 mmol, 3.6 equiv.) and amine **212** (57 mg, 0.25 mmol, 1.1 equiv.) in dry THF (3.3 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH/NH_4OH from 100 up to 98/2/1 to afford compound **214** (73 mg, 0.17 mmol, 73 %) as a white powder.

R_f (DCM/MeOH/NH_4OH 98/2/1) 0.17.

Mp: 251-253 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3387, 3079, 2847, 2208, 1713, 1664, 1575, 1490, 1251, 1239, 1177, 1152, 1000, 882, 838, 758, 600, 580.

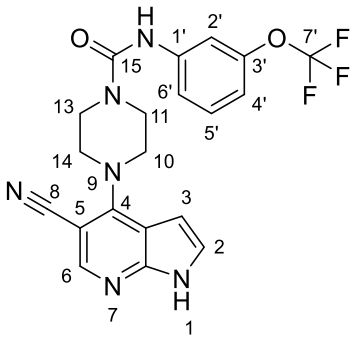
^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-d_6) δ 12.06 (s, 1H, **NH**), 8.76 (s, 1H, **NH**), 8.27 (s, 1H, **H_6**), 7.47 – 7.40 (m, 1H, **H_2**), 7.37 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 7.34 – 7.27 (m, 1H, **H_{Ar}**), 7.22 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.74 – 6.65 (m, 2H, **H_3 + H_{Ar}**), 3.82 – 3.71 (m, 4H, **2 x CH_2**), 3.71 – 3.63 (m, 4H, **2 x CH_2**), 3.04 (s, 3H, **$H_{9'}$**), 2.91 (s, 3H, **$H_{9'}$**).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-d_6) δ 154.7 (**C**), 154.0 (**C**), 153.6 (**C**), 151.4(**C**) , 150.5 (**C**), 148.4 (**CH_{Ar}-C_6**), 141.4 (**C**), 128.7 (**CH_{Ar}**), 124.6 (**CH_{Ar}-C_2**), 119.8 (**C**), 115.9 (**CH_{Ar}**), 115.0 (**CH_{Ar}**), 112.8 (**CH_{Ar}**), 109.9 (**C**), 101.5 (**CH_{Ar}-C_3**), 89.5 (**C**), 50.5 (**2 x CH_2**), 44.2 (**2 x CH_2**), 36.3 (**CH_3-$C_{9'}$**), 36.1 (**CH_3-$C_{9'}$**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{22}H_{24}N_7O_3$ $[M+H]^+$: 434.1935, found: 434.1936.

Purity (HPLC): > 99.9 %.

4-(5-Cyano-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-4-yl)-*N*-(3-(trifluoromethoxy)phenyl)piperazine-1-carboxamide (215)



Chemical Formula: $C_{20}H_{17}F_3N_6O_2$
Molecular Weight: 430.39

To a suspension of **212** (60 mg, 0.26 mmol) in dry DCM (2.8 mL) cooled to 0 °C were added DIPEA (141 µL, 0.81 mmol, 3.1 equiv.) and a solution of 1-isocyanato-3-(trifluoromethoxy)benzene (59 mg, 0.29 mmol, 1.1 equiv.) in dry DCM (0.9 mL) dropwise. The reaction mixture was stirred at 0 °C for 1 h then concentrated *in vacuo*. The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH/NH_4OH from 100 up to 98/2/1 to afford compound **215** (98 mg, 0.23 mmol, 88 %) as a white powder.

Note: The isocyanate must be diluted to prevent any secondary reactions.

R_f (DCM/MeOH/NH_4OH 98/2/1) 0.16.

Mp: 157-159 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 2996, 2866, 2209, 1644, 1532, 1489, 1443, 1234, 1209, 1154, 994, 896, 757, 609.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 12.06 (s, 1H, **NH**), 8.93 (s, 1H, **NH**), 8.27 (s, 1H, **H_6**), 7.66 (brs, 1H, **H_{Ar}**), 7.49 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 7.43 (t, *J* = 3.0 Hz, 1H, **H_2**), 7.37 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.91 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.73 – 6.67 (m, 1H, **H_3**), 3.79 – 3.73 (m, 4H, **2 x CH_2**), 3.73 – 3.65 (m, 4H, **2 x CH_2**).

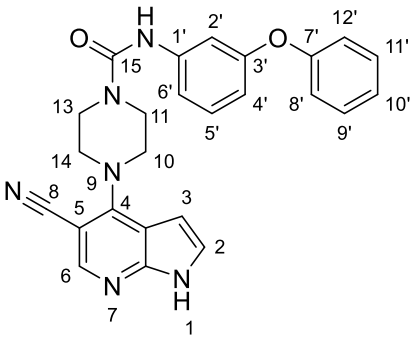
^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 154.6 (**C**), 153.6 (**C**), 150.5 (**C**), 148.4 (**C**), 148.4 (**CH_{Ar}-C_6**), 142.3 (**C**), 129.9 (**CH_{Ar}**), 124.6 (**CH_{Ar}-C_2**), 120.1 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 256.1 Hz, **C-$C_{7'}$**), 119.8 (**C**), 117.8 (**CH_{Ar}**), 113.6 (**CH_{Ar}**), 111.2 (**CH_{Ar}**), 109.9 (**C**), 101.5 (**CH_{Ar}-C_3**), 89.5 (**C**), 50.5 (**2 x CH_2**), 44.1 (**2 x CH_2**).

^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-d_6) δ -56.57 (s, 1F).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{20}H_{18}F_3N_6O_2$ $[M+H]^+$: 431.1438, found: 431.1438.

Purity (HPLC): > 99.9 %.

4-(5-Cyano-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-4-yl)-*N*-(3-phenoxyphenyl)piperazine-1-carboxamide (216)



Chemical Formula: $C_{25}H_{22}N_6O_2$
Molecular Weight: 438.49

To a suspension of **212** (72 mg, 0.32 mmol) in dry DCM (3.6 mL) cooled at 0 °C were added DIPEA (172 µL, 0.99 mmol, 3.1 equiv.) and a solution of 3-phenoxyphenyl isocyanate (63 µL, 0.35 mmol, 1.1 equiv.) in dry DCM (1.0 mL) dropwise. The reaction mixture was stirred at 0 °C for 1.5 h then concentrated *in vacuo*. The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH/NH_4OH from 100 up to 95/5/1 to afford compound **216** (65 mg, 0.15 mmol, 46 %) as a white powder.

Note: The isocyanate must be diluted to prevent any side reaction.

R_f (DCM/MeOH/NH_4OH 98/2/1) 0.21.

Mp: 129-131 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3115, 2988, 2860, 2206, 1637, 1575, 1540, 1486, 1435, 1237, 1212, 1149, 994, 755, 689, 610.

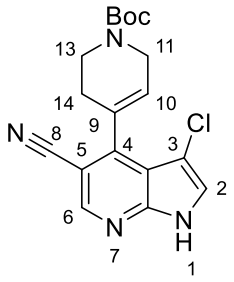
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 12.05 (s, 1H, **NH**), 8.72 (s, 1H, **NH**), 8.26 (s, 1H, **H_6**), 7.44 – 7.36 (m, 3H, **H_2 + 2 x H_{Ar}**), 7.32 – 7.22 (m, 3H, **3 x H_{Ar}**), 7.13 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 7.02 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, **2 x H_{Ar}**), 6.72 – 6.66 (m, 1H, **H_3**), 6.61 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 3.77 – 3.69 (m, 4H, **2 x CH_2**), 3.69 – 3.61 (m, 4H, **2 x CH_2**).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 156.8 (**C**), 156.7 (**C**), 154.7 (**C**), 153.6 (**C**), 150.5 (**C**), 148.4 (**CH_{Ar}-C_6**), 142.1 (**C**), 130.0 (**2 x CH_{Ar}-$C_{8'}$ + $C_{12'}$**), 129.6 (**CH_{Ar}**), 124.6 (**CH_{Ar}-C_2**), 123.3 (**CH_{Ar}**), 119.8 (**C**), 118.6 (**2 x CH_{Ar}-$C_{9'}$ + $C_{11'}$**), 114.3 (**CH_{Ar}**), 111.9 (**CH_{Ar}**), 109.9 (**C**), 109.4 (**CH_{Ar}**), 101.5 (**CH_{Ar}-C_3**), 89.4 (**C**), 50.5 (**2 x CH_2**), 44.1 (**2 x CH_2**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{25}H_{23}N_6O_2$ $[M+H]^+$: 439.1877, found: 439.1878.

Purity (HPLC): > 99.9 %.

tert-Butyl 4-(3-chloro-5-cyano-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-4-yl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxylate (217)



Chemical Formula: $C_{18}H_{19}ClN_4O_2$
Molecular Weight: 358.83

To a cloudy solution of **206** (323 mg, 1.00 mmol) in dry DMF (6.0 mL) was added *N*-chlorosuccinimide (140 mg, 1.05 mmol, 1.05 equiv.). The reaction mixture was stirred at 70 °C for 4 h then quenched with ice-cold water (40 mL). EtOAc (180 mL) was added, the layers were separated and the aqueous layer was extracted with EtOAc (3 x 90 mL). The combined organic layers were dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was co-evaporated with heptane (3 x 40 mL) then the solid was solubilized in EtOAc (90 mL) and washed with a saturated aqueous solution of $NaHCO_3$ (4 x 15 mL), brine (3 x 10 mL), dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo* to afford compound **217** (271 mg, 0.76 mmol, 75 %) as a pale brown powder.

Mp: 172-174 °C.

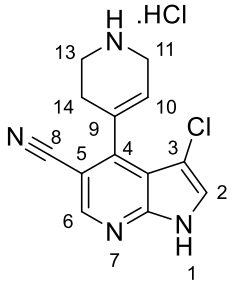
IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3114, 2975, 2856, 2224, 1695, 1572, 1393, 1365, 1333, 1236, 1167, 1114, 782, 762, 608.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 12.70 (s, 1H, **NH**), 8.64 (s, 1H, **H_6**), 7.89 (s, 1H, **H_2**), 5.96 – 5.86 (s, 1H, **H_{10}**), 4.21 – 3.92 (m, 2H, **H_{11}**), 3.32 (s, 2H, **H_{13}**), 2.45 – 2.38 (m, 2H, **H_{14}**), 1.44 (s, 9H, ***t*Bu**).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 154.1 (**C**), 147.5 (**C**), 146.7 (**C + CH_{Ar}-C_6**), 129.9 (**C**), 127.1 (**CH-C_{10}**), 126.5 (**CH_{Ar}-C_2**), 117.4 (**C**), 113.5 (**C**), 102.9 (**C**), 100.5 (**C**), 79.1 (**C**), 43.1 (**CH_2-C_{11}**), 39.9 (**CH_2-C_{13}**), 29.5 (**CH_2-C_{14}**), 28.1 (**3 x CH_3-*t*Bu)**.

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{18}H_{20}ClN_4O_2$ $[M+H]^+$: 359.1269, found: 359.1269.

3-Chloro-4-(1,2,3,6-tetrahydropyridin-4-yl)-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carbonitrile hydrochloride (218)



Chemical Formula: $C_{13}H_{12}Cl_2N_4$
Molecular Weight: 295.17

To a 4 M solution of HCl in 1,4-dioxane (1.46 mL, 5.84 mmol, 8.0 equiv.) was added **217** (262 mg, 0.73 mmol). The reaction mixture was stirred at rt for 3 h. After completion, the reaction mixture was concentrated *in vacuo*, the residue was triturated in Et_2O, filtered and washed with Et_2O to afford compound **218** (194 mg, 0.66 mmol, 90 %) as an orange solid.

Mp: 199-201 °C.

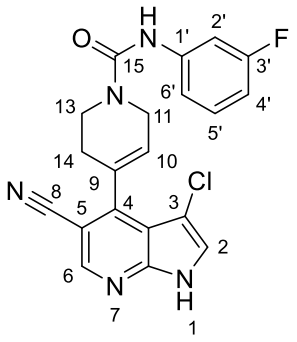
IR (ATR diamond, cm^{-1}) v: 3294, 2929, 2856, 1627, 1529, 1435, 1236, 1086, 850, 606, 568.

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-d_6) δ 12.83 (s, 1H, **NH**), 9.60 (brs, 2H, **NH + H+**), 8.67 (s, 1H, **H_6**), 8.00 – 7.86 (m, 1H, **H_2**), 6.03 – 5.91 (m, 1H, **H_{10}**), 3.82 – 3.73 (m, 2H, **H_{11}**), 3.38 – 3.27 (m, 2H, **H_{13}**), 2.71 – 2.59 (m, 2H, **H_{14}**).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-d_6) δ 147.6 (**C**), 146.8 (**CH_{Ar}-C_6**), 145.3 (**C**), 129.9 (**C**), 126.7 (**CH_{Ar}-C_2**), 123.6 (**CH-C_{10}**), 117.3 (**C**), 113.5 (**C**), 102.9 (**C**), 100.3 (**C**), 40.7 (**CH_2-C_{11}**), 39.6 (**CH_2-C_{13}**), 26.2 (**CH_2-C_{14}**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{13}H_{12}ClN_4$ $[M+H]^+$: 259.0745, found: 259.0747.

4-(3-Chloro-5-cyano-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-4-yl)-*N*-(3-fluorophenyl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxamide (219)



Chemical Formula: $C_{20}H_{15}ClFN_5O$
Molecular Weight: 395.82

The reaction was carried out as described in general procedure **A** using aniline 3-fluoroaniline (24 µL, 0.25 mmol), 4-nitrophenyl chloroformate (60 mg, 0.30 mmol, 1.2 equiv.), DIPEA (105 µL, 0.60 mmol, 2.4 equiv.) and amine **218** (90 mg, 0.30 mmol, 1.2 equiv.) in dry THF (3.6 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 100 up to 98/2 to afford compound **219** (62 mg, 0.16 mmol, 64 %) as a beige powder.

R_f (DCM/MeOH 98/2) 0.15.

Mp: 237-239 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3128, 2924, 2857, 2221, 1639, 1601, 1538, 1492, 1438, 1397, 1233, 1193, 1147, 969, 814, 775, 683, 606.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 12.72 (s, 1H, **NH**), 8.82 (s, 1H, **NH**), 8.66 (s, 1H, **H_6**), 7.91 (s, 1H, **H_2**), 7.52 – 7.45 (m, 1H, **$H_{4'}$**), 7.34 – 7.22 (m, 2H, **$H_{5'}$ + $H_{6'}$**), 6.80 – 6.72 (m, 1H, **$H_{2'}$**), 6.00 – 5.95 (m, 1H, **H_{10}**), 4.32 – 4.13 (m, 2H, **H_{11}**), 3.93 – 3.63 (m, 2H, **H_{13}**), 2.56 – 2.51 (m, 2H, **H_{14}**).

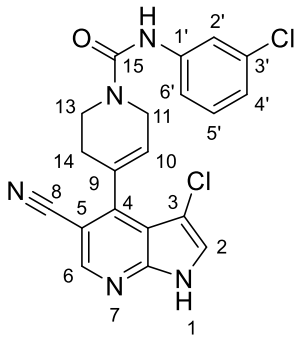
^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 162.2 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 239.9 Hz, **C-$C_{3'}$**), 154.8 (**C**), 147.6 (**C**), 146.8 (**CH_{Ar}-C_6**), 146.7 (**C**), 142.5 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 11.3 Hz, **C-$C_{1'}$**), 130.1 (**C**), 129.8 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 9.7 Hz, **CH_{Ar}-$C_{5'}$**), 127.0 (**CH-C_{10}**), 126.6 (**CH_{Ar}-C_2**), 117.5 (**C**), 115.1 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 2.5 Hz, **CH_{Ar}-$C_{6'}$**), 113.6 (**C**), 108.0 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 21.0 Hz, **CH_{Ar}-$C_{2'}$**), 106.0 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 26.4 Hz, **CH_{Ar}-$C_{4'}$**), 103.0 (**C**), 100.6 (**C**), 43.6 (**CH_2-C_{11}**), 40.3 (**CH_2-C_{13}**), 29.9 (**CH_2-C_{14}**).

^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-d_6) δ -112.8 – -113.0 (m, 1F).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{20}H_{16}ClFN_5O$ $[M+H]^+$: 396.1022, found: 396.1020.

Purity (HPLC): 95.0 %.

4-(3-Chloro-5-cyano-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-4-yl)-*N*-(3-chlorophenyl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxamide (220)



Chemical Formula: $C_{20}H_{15}Cl_2N_5O$
Molecular Weight: 412.27

The reaction was carried out as described in general procedure **A** using 3-chloroaniline (44 μL, 0.23 mmol), 4-nitrophenyl chloroformate (54 mg, 0.27 mmol, 1.2 equiv.), DIPEA (94 μL, 0.54 mmol, 2.4 equiv.) and amine **218** (80 mg, 0.27 mmol, 1.2 equiv.) in dry THF (3.3 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 100 up to 98/2 to afford compound **220** (47 mg, 0.11 mmol, 48 %) as a white powder.

R_f (DCM/MeOH 98/2) 0.15.

Mp: 245-248 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3131, 2927, 2227, 1712, 1640, 1590, 1538, 1431, 1388, 1233, 1164, 774, 751, 608.

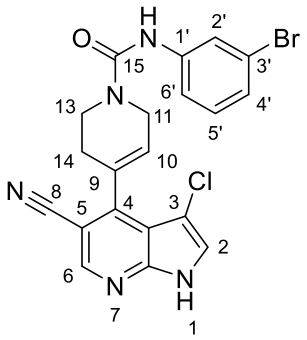
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 12.70 (brs, 1H, **NH**), 8.80 (s, 1H, **NH**), 8.66 (s, 1H, **H_6**), 7.91 (s, 1H, **H_2**), 7.69 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 7.49 – 7.41 (m, 1H, **H_{Ar}**), 7.27 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 7.02 – 6.96 (m, 1H, **H_{Ar}**), 6.03 – 5.93 (m, 1H, **H_{10}**), 4.22 (brs, 2H, **H_{11}**), 3.77 (brs, 2H, **H_{13}**), 2.56 – 2.51 (m, 2H, **H_{14}**).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 154.7 (**C**), 147.6 (**C**), 146.7 (**CH_{Ar}-C_6**), 146.7 (**C**), 142.1 (**C**), 132.7 (**C**), 130.1 (**C**), 129.9 (**CH_{Ar}**), 127.0 (**CH-C_{10}**), 126.6 (**CH_{Ar}-C_2**), 121.3 (**CH_{Ar}**), 118.9 (**CH_{Ar}**), 117.7 (**CH_{Ar}**), 117.5 (**C**), 113.6 (**C**), 102.9 (**C**), 100.6 (**C**), 43.6 (**CH_2-C_{11}**), 40.3 (**CH_2-C_{13}**), 29.9 (**CH_2-C_{14}**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{20}H_{16}Cl_2N_5O$ $[M+H]^+$: 412.0726, found: 412.0728.

Purity (HPLC): 98.2 %.

4-(3-Chloro-5-cyano-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-4-yl)-*N*-(3-bromophenyl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxamide (221)



Chemical Formula: $C_{20}H_{15}BrClN_5O$
Molecular Weight: 456.73

The reaction was carried out as described in general procedure **A** using 3-bromoaniline (25 µL, 0.23 mmol), 4-nitrophenyl chloroformate (54 mg, 0.27 mmol, 1.2 equiv.), DIPEA (94 µL, 0.54 mmol, 2.4 equiv.) and amine **218** (80 mg, 0.27 mmol, 1.2 equiv.) in dry THF (3.3 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 100 up to 98/2. The fractions containing the desired product were combined, concentrated under vacuum then the obtained beige solid was triturated in DCM and filtered to afford compound **221** (32 mg, 0.07 mmol, 30 %) as a white solid.

R_f (DCM/MeOH 98/2) 0.21.

Mp: 219-221 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3128, 3000, 2846, 2227, 1712, 1639, 1582, 1520, 1476, 1428, 1336, 1235, 773, 750, 688, 609.

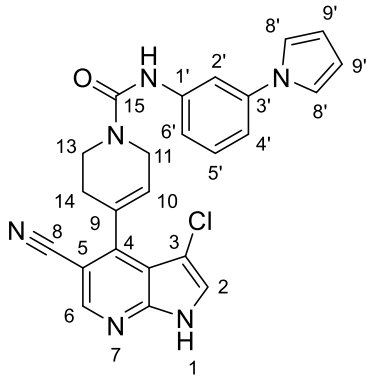
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 12.72 (brs, 1H, **NH**), 8.79 (s, 1H, **NH**), 8.66 (s, 1H, **H_6**), 7.91 (s, 1H, **H_2**), 7.87 – 7.78 (m, 1H, **H_{Ar}**), 7.49 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 7.21 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 7.12 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.01 – 5.94 (m, 1H, **H_{10}**), 4.29 – 4.13 (m, 2H, **H_{11}**), 3.77 (brs, 2H, **H_{13}**), 2.56 – 2.50 (m, 2H, **H_{14}**).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 154.7 (**C**), 147.6 (**C**), 146.8 (**CH_{Ar}-C_6**), 146.7 (**C**), 142.3 (**C**), 130.3 (**CH_{Ar}**), 130.1 (**C**), 127.0 (**CH-C_{10}**), 126.6 (**CH_{Ar}-C_2**), 124.2 (**CH_{Ar}**), 121.7 (**CH_{Ar}**), 121.2 (**C**), 118.2 (**CH_{Ar}**), 117.5 (**C**), 113.6 (**C**), 103.0 (**C**), 100.6 (**C**), 43.6 (**CH_2-C_{11}**), 40.3 (**CH_2-C_{13}**), 29.9 (**CH_2-C_{14}**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{20}H_{16}BrClN_5O$ $[M+H]^+$: 456.0221, found: 456.0219.

Purity (HPLC): 92.3 %.

N-(3-(1*H*-Pyrrol-1-yl)phenyl)-4-(3-Chloro-5-cyano-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-4-yl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxamide (222)



Chemical Formula: $C_{24}H_{19}ClN_6O$
Molecular Weight: 442.91

The reaction was carried out as described in general procedure **A** using 3-(1*H*-pyrrol-1-yl)aniline (36 mg, 0.23 mmol), 4-nitrophenyl chloroformate (54 mg, 0.27 mmol, 1.2 equiv.), DIPEA (94 µL, 0.54 mmol, 2.4 equiv.) and amine **218** (80 mg, 0.27 mmol, 1.2 equiv.) in dry THF (3.3 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 100 up to 98/2. The fractions containing the desired product were combined, concentrated under vacuum then the obtained white solid was purified by reverse phase chromatography on C18 using a gradient solvent system of H_2O/MeCN from 80/20 to 5/95 to afford compound **222** (23 mg, 0.05 mmol, 22 %) as a white solid.

R_f (DCM/MeOH 98/2) 0.17.

Mp: 154-156 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3118, 2922, 2851, 2225, 1639, 1605, 1497, 1440, 1335, 1237, 779, 750, 723, 688, 609.

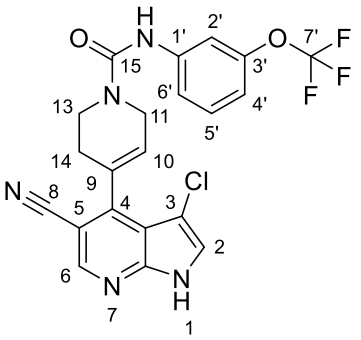
^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-d_6) δ 12.70 (brs, 1H, **NH**), 8.77 (s, 1H, **NH**), 8.66 (s, 1H, **H_6**), 7.91 (s, 1H, **H_2**), 7.77 – 7.72 (m, 1H, **H_{Ar}**), 7.41 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 7.32 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 7.24 (t, *J* = 2.2 Hz, 2H, **$H_{8'}$**), 7.14 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.26 (t, *J* = 2.2 Hz, 2H, **$H_{9'}$**), 6.03 – 5.95 (m, 1H, **H_{10}**), 4.34 – 4.17 (m, 2H, **H_{11}**), 3.92 – 3.68 (m, 2H, **H_{13}**), 2.58 – 2.51 (m, 2H, **H_{14}**).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-d_6) δ 154.9 (**C**), 147.6 (**C**), 146.7 (**C + CH_{Ar}-C_6**), 141.7 (**C**), 140.1 (**C**), 130.1 (**C**), 129.5 (**CH_{Ar}**), 127.1 (**CH-C_{10}**), 126.6 (**CH_{Ar}-C_2**), 118.9 (**2 x CH_{Ar}-$C_{8'}$**), 117.5 (**C**), 116.4 (**CH_{Ar}**), 113.6 (**C**), 113.0 (**CH_{Ar}**), 110.7 (**CH_{Ar}**), 110.3 (**2 x CH_{Ar}-$C_{9'}$**), 102.9 (**C**), 100.6 (**C**), 43.6 (**CH_2-C_{11}**), 40.3 (**CH_2-C_{13}**), 29.9 (**CH_2-C_{14}**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{24}H_{20}ClN_6O$ $[M+H]^+$: 443.1382, found: 443.1278.

Purity (HPLC): 99.0 %.

4-(3-Chloro-5-cyano-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-4-yl)-*N*-(3-(trifluoromethoxy)phenyl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxamide (223)



Chemical Formula: $C_{21}H_{15}ClF_3N_5O_2$
Molecular Weight: 461.83

To a suspension of **218** (51 mg, 0.17 mmol) in dry DCM (1.9 mL) cooled to 0 °C were added DIPEA (92 µL, 0.53 mmol, 3.1 equiv.) and a solution of 1-isocyanato-3-(trifluoromethoxy)benzene (39 mg, 0.19 mmol, 1.1 equiv.) in dry DCM (0.5 mL) dropwise. The reaction mixture was stirred at 0 °C for 1 h then concentrated *in vacuo*. The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH/NH_4OH from 100 up to 98/2/1 to afford compound **223** (33 mg, 0.07 mmol, 42 %) as a white powder.

Note: The isocyanate must be diluted to prevent any secondary reactions.

R_f (DCM/MeOH/NH_4OH 98/2/1) 0.19.

Mp: 230-232 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3129, 2924, 2853, 2226, 1639, 1599, 1537, 1440, 1256, 1237, 1158, 1049, 964, 774, 687, 610, 574, 556.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 12.72 (s, 1H, **NH**), 8.91 (s, 1H, **NH**), 8.66 (s, 1H, **H_6**), 7.91 (s, 1H, **H_2**), 7.69 – 7.63 (m, 1H, **H_{Ar}**), 7.51 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 7.37 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.95 – 6.88 (m, 1H, **H_{Ar}**), 6.02 – 5.94 (m, 1H, **H_{10}**), 4.23 (brs, 2H, **H_{11}**), 3.93 – 3.62 (m, 2H, **H_{13}**), 2.55 – 2.51 (m, 2H, **H_{14}**).

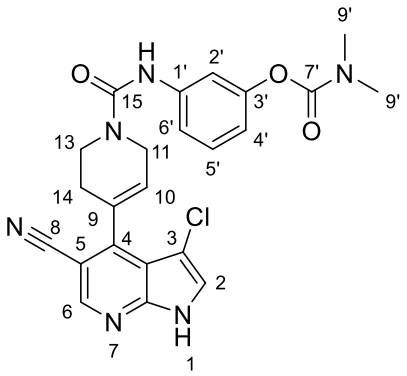
^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 154.7 (**C**), 148.4 (**C**), 148.4 (**C**), 147.6 (**C**), 146.8 (**CH_{Ar}-C_6**), 146.7 (**C**), 142.4 (**C**), 130.1 (**C**), 129.9 (**CH_{Ar}**), 127.0 (**CH-C_{10}**), 126.6 (**CH_{Ar}-C_2**), 120.1 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 256.0 Hz, **C-$C_{7'}$**), 117.9 (**CH_{Ar}**), 117.5 (**C**), 113.6 (**CH_{Ar}**), 111.4 (**CH_{Ar}**), 103.0 (**C-C_3**), 100.6 (**C**), 43.6 (**CH_2-C_{11}**), 40.3 (**CH_2-C_{13}**), 29.9 (**CH_2-C_{14}**).

^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-d_6) δ -56.57 (s, 3F).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{21}H_{16}ClF_3N_5O_2$ $[M+H]^+$: 462.0939, found: 462.0938.

Purity (HPLC): > 99.9 %.

3-(4-(3-Chloro-5-cyano-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-4-yl)-1,2,3,6-tetrahydropyridine-1-carboxamido)phenyl dimethylcarbamate (224)



Chemical Formula: $C_{23}H_{21}ClN_6O_3$
Molecular Weight: 464.91

The reaction was carried out as described in general procedure **A** using 3-aminophenyl dimethylcarbamate (27 mg, 0.15 mmol), 4-nitrophenyl chloroformate (36 mg, 0.18 mmol, 1.2 equiv.), DIPEA (94 µL, 0.54 mmol, 3.6 equiv.) and amine **218** (51 mg, 0.17 mmol, 1.1 equiv.) in dry THF (2.1 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH/NH_4OH from 100 up to 98/2/1 to afford compound **224** (37 mg, 0.08 mmol, 53 %) as a white powder.

R_f (DCM/MeOH/NH_4OH 95/5/1) 0.25.

Mp: 155-157 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3129, 2999, 2837, 2227, 1728, 1638, 1532, 1442, 1385, 1336, 1230, 1160, 773, 749, 690, 607.

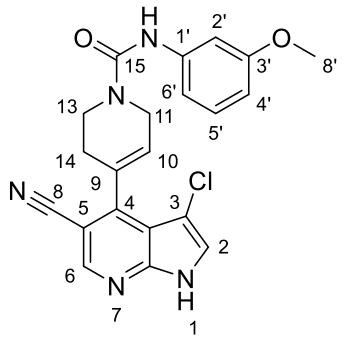
^{1}H NMR (250 MHz DMSO-d_6) δ 12.72 (s, 1H, **NH**), 8.73 (s, 1H, **NH**), 8.67 (s, 1H, **H_6**), 7.92 (s, 1H, **H_2**), 7.40 – 7.37 (m, 1H, **H_{Ar}**), 7.33 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 7.24 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.70 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.00 – 5.95 (m, 1H, **H_{10}**), 4.35 – 4.10 (m, 2H, **H_{11}**), 3.92 – 3.63 (m, 2H, **H_{13}**), 3.05 (s, 3H, **$H_{9'}$**), 2.92 (s, 3H, **$H_{9'}$**), 2.56 – 2.51 (m, 2H, **H_{14}**).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-d_6) δ 154.8 (**C**), 154.0 (**C**), 151.4 (**C**), 147.6 (**C**), 146.8 (**C + CH_{Ar}-C_6**), 141.4 (**C**), 130.1 (**C**), 128.7 (**CH_{Ar}**), 127.1 (**CH-C_{10}**), 126.6 (**CH_{Ar}-C_2**), 117.5 (**C**), 116.0 (**CH_{Ar}**), 115.0 (**CH_{Ar}**), 113.6 (**C**), 112.9 (**CH_{Ar}**), 103.0 (**C**), 100.6 (**C**), 43.6 (**CH_2-C_{11}**), 40.3 (**CH_2-C_{13}**), 36.3 (**CH_3-$C_{9'}$**), 36.1 (**CH_3-$C_{9'}$**), 29.9 (**CH_2-C_{14}**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{23}H_{22}ClN_6O_3$ $[M+H]^+$: 465.1436, found: 465.1435.

Purity (HPLC): > 99.9 %.

4-(3-Chloro-5-cyano-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-4-yl)-*N*-(3-methoxyphenyl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxamide (225)



Chemical Formula: $C_{21}H_{18}ClN_5O_2$
Molecular Weight: 407.86

The reaction was carried out as described in general procedure **A** using 3-methoxyaniline (25 µL, 0.23 mmol), 4-nitrophenyl chloroformate (54 mg, 0.27 mmol, 1.2 equiv.), DIPEA (94 µL, 0.54 mmol, 2.4 equiv.) and amine **218** (80 mg, 0.27 mmol, 1.2 equiv.) in dry THF (3.3 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 100 up to 98/2 to afford compound **225** (68 mg, 0.17 mmol, 74 %) as an orange powder.

R_f (DCM/MeOH 98/2) 0.13.

Mp: 115-117 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3121, 2997, 2833, 2225, 1633, 1538, 1434, 1336, 1238, 1161, 1047, 771, 754, 690, 609.

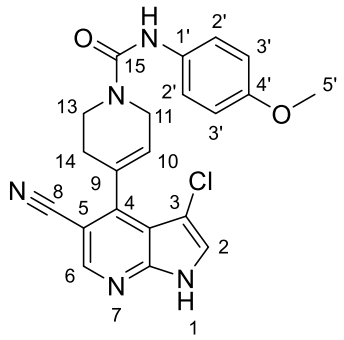
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 12.71 (s, 1H, **NH**), 8.66 (s, 1H, **H_6**), 8.58 (s, 1H, **NH**), 7.90 (s, 1H, **H_2**), 7.23 – 7.18 (m, 1H, **H_{Ar}**), 7.18 – 7.06 (m, 2H, **2 x H_{Ar}**), 6.53 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.00 – 5.92 (m, 1H, **H_{10}**), 4.31 – 4.12 (m, 2H, **H_{11}**), 3.87 – 3.60 (m, 5H, **H_{13} + $H_{8'}$**), 2.57 – 2.50 (m, 2H, **H_{14}**).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 159.4 (**C**), 155.0 (**C**), 147.6 (**C**), 146.8 (**C + CH_{Ar}-C_6**), 141.7 (**C**), 130.1 (**C**), 129.0 (**CH_{Ar}**), 127.1 (**CH-C_{10}**), 126.6 (**CH_{Ar}-C_2**), 117.5 (**C**), 113.6 (**C**), 111.9 (**CH_{Ar}**), 107.3 (**CH_{Ar}**), 105.3 (**CH_{Ar}**), 103.0 (**C**), 100.6 (**C**), 54.9 (**CH_3-$C_{8'}$**), 43.6 (**CH_2-C_{11}**), 40.3 (**CH_2-C_{13}**), 29.9 (**CH_2-C_{14}**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{21}H_{19}ClN_5O_2$ $[M+H]^+$: 408.1222, found: 408.1224.

Purity (HPLC): 98.3 %.

4-(3-Chloro-5-cyano-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-4-yl)-*N*-(4-methoxyphenyl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxamide (226)



Chemical Formula: $C_{21}H_{18}ClN_5O_2$
Molecular Weight: 407.86

The reaction was carried out as described in general procedure **A** using 4-methoxyaniline (30 mg, 0.23 mmol), 4-nitrophenyl chloroformate (54 mg, 0.27 mmol, 1.2 equiv.), DIPEA (94 µL, 0.54 mmol, 2.4 equiv.) and amine **218** (80 mg, 0.27 mmol, 1.2 equiv.) in dry THF (3.3 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 100 up to 98/2 to afford compound **226** (44 mg, 0.11 mmol, 48 %) as a beige powder.

R_f (DCM/MeOH 98/2) 0.23.

Mp: 219-221 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3188, 3110, 2989, 2833, 2223, 1628, 1532, 1513, 1418, 1333, 1234, 1037, 817, 750, 608.

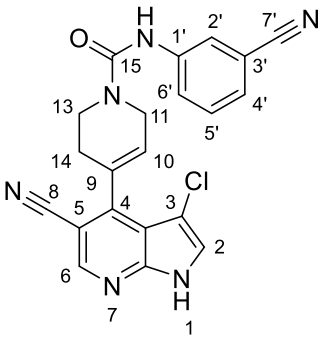
^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-d_6) δ 12.71 (brs, 1H, **NH**), 8.66 (s, 1H, **H_6**), 8.45 (s, 1H, **NH**), 7.91 (s, 1H, **H_2**), 7.43 – 7.33 (m, 2H, **$H_{2'}$**), 6.91 – 6.79 (m, 2H, **$H_{3'}$**), 6.02 – 5.92 (m, 1H, **H_{10}**), 4.30 – 4.11 (m, 2H, **H_{11}**), 3.84 – 3.66 (m, 5H, **H_{13} + $H_{5'}$**), 2.51 – 2.44 (m, 2H, **H_{14}**).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-d_6) δ 155.3 (**C**), 154.5 (**C**), 147.6 (**C**), 146.8 (**C**), 146.7 (**CH_{Ar}-C_6**), 133.4 (**C**), 130.1 (**C**), 127.2 (**CH-C_{10}**), 126.6 (**CH_{Ar}-C_2**), 121.7 (**2 x CH_{Ar}-$C_{2'}$**), 117.5 (**C**), 113.6 (**C**), 113.5 (**2 x CH_{Ar}-$C_{3'}$**), 103.0 (**C**), 100.6 (**C**), 55.1 (**CH_3-$C_{5'}$**), 43.6 (**CH_2-C_{11}**), 40.1 (**CH_2-C_{13}**), 29.9 (**CH_2-C_{14}**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{21}H_{19}ClN_5O_2$ $[M+H]^+$: 408.1222, found: 408.1222.

Purity (HPLC): > 99.9 %.

4-(3-Chloro-5-cyano-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-4-yl)-*N*-(3-cyanophenyl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxamide (227)



Chemical Formula: $C_{21}H_{15}ClN_6O$
Molecular Weight: 402.84

The reaction was carried out as described in general procedure **A** using 3-aminobenzonitrile (35 mg, 0.30 mmol), 4-nitrophenyl chloroformate (73 mg, 0.36 mmol, 1.2 equiv.), DIPEA (125 µL, 0.72 mmol, 2.4 equiv.) and amine **218** (106 mg, 0.36 mmol, 1.2 equiv.) in dry THF (4.3 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 100 up to 97/3. The fractions containing the desired product were combined, concentrated under vacuum then the obtained white solid was purified by reverse phase chromatography on C18 using a gradient solvent system of H_2O/MeCN from 40/60 to 5/95 to afford compound **227** (19 mg, 0.05 mmol, 17 %) as a pale yellow solid.

R_f (DCM/MeOH 95/5) 0.30.

Mp: > 260 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3377, 3128, 2919, 2851, 2240, 2225, 1671, 1582, 1549, 1429, 1335, 1195, 791, 735, 677, 575.

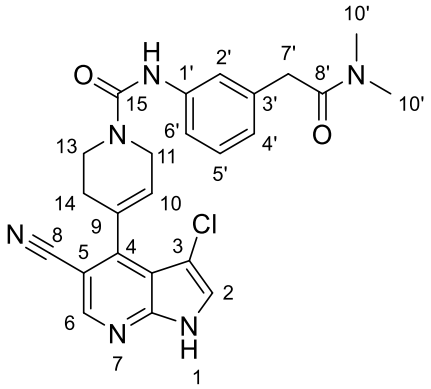
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 12.71 (s, 1H, **NH**), 8.97 (s, 1H, **NH**), 8.66 (s, 1H, **H_6**), 8.01 – 7.95 (m, 1H, **H_{Ar}**), 7.91 (s, 1H, **H_2**), 7.80 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 7.47 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 7.39 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.02 – 5.94 (m, 1H, **H_{10}**), 4.23 (brs, 2H, **H_{11}**), 3.91 – 3.64 (m, 2H, **H_{13}**), 2.55 – 2.51 (m, 2H, **H_{14}**).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 154.7 (**C**), 147.6 (**C**), 146.7 (**CH_{Ar}-C_6**), 146.6 (**C**), 141.5 (**C**), 130.1 (**C**), 129.8 (**CH_{Ar}**), 126.9 (**CH-C_{10}**), 126.6 (**CH_{Ar}-C_2**), 125.1 (**CH_{Ar}**), 124.0 (**CH_{Ar}**), 122.1 (**CH_{Ar}**), 118.9 (**C**), 117.5 (**C**), 113.6 (**C**), 111.2 (**C**), 102.9 (**C**), 100.6 (**C**), 43.6 (**CH_2-C_{11}**), 40.3 (**CH_2-C_{13}**), 29.8 (**CH_2-C_{14}**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{21}H_{16}ClN_6O$ $[M+H]^+$: 403.1069, found: 403.1070.

Purity (HPLC): 97.5 %.

4-(3-Chloro-5-cyano-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-4-yl)-*N*-(3-(2-(dimethylamino)-2-oxoethyl)phenyl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxamide (228)



Chemical Formula: $C_{24}H_{23}ClN_6O_2$
Molecular Weight: 462.94

The reaction was carried out as described in general procedure **A** using **232** (60 mg, 0.34 mmol), 4-nitrophenyl chloroformate (81 mg, 0.40 mmol, 1.2 equiv.), DIPEA (139 µL, 0.8 mmol, 2.4 equiv.) and amine **218** (119 mg, 0.40 mmol, 1.2 equiv.) in dry THF (4.9 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 100 up to 96/4. The fractions containing the desired product were combined, concentrated under vacuum then the obtained white solid was purified by reverse phase chromatography on C18 using a gradient solvent system of H_2O/MeCN from 80/20 to 5/95 to afford compound **228** (33 mg, 0.07 mmol, 21 %) as a pale white solid.

Mp: 136-138 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) 3116, 2923, 2849, 2223, 1628, 1539, 1435, 1395, 1336, 1235, 1137, 776, 745, 601.

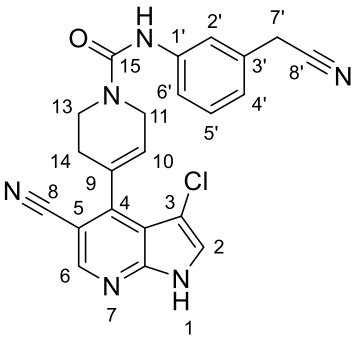
^{1}H NMR (400 MHz DMSO-*d*$_6$) δ 12.72 (s, 1H, **NH**), 8.66 (s, 1H, **H$_6$**), 8.61 (s, 1H, **NH**), 7.91 (s, 1H, **H$_2$**), 7.44 – 7.33 (m, 2H, **2 x H$_{Ar}$**), 7.17 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, **H$_{Ar}$**), 6.82 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, **H$_{Ar}$**), 6.03 – 5.93 (m, 1H, **H$_{10}$**), 4.30 – 4.11 (m, 2H, **H$_{11}$**), 3.88 – 3.66 (m, 2H, **H$_{13}$**), 3.63 (s, 2H, **H$_{7'}$**), 2.99 (s, 3H, **H$_{10'}$**), 2.83 (s, 3H, **H$_{10'}$**), 2.56 – 2.50 (m, 2H, **H$_{14}$**).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 170.2 (**C**), 155.0 (**C**), 147.6 (**C**), 146.8 (**C + CH$_{Ar}$-C$_6$**), 140.5 (**C**), 135.9 (**C**), 130.1 (**C**), 128.2 (**CH$_{Ar}$**), 127.2 (**CH-C$_{10}$**), 126.6 (**CH$_{Ar}$-C$_2$**), 122.5 (**CH$_{Ar}$**), 120.2 (**CH$_{Ar}$**), 117.9 (**CH$_{Ar}$**), 117.5 (**C**), 113.6 (**C**), 103.0 (**C**), 100.6 (**C**), 43.6 (**CH$_2$-C$_{11}$**), 40.3 (**CH$_2$-C$_{13}$**), 40.1 (**CH$_2$-C$_{7'}$**), 37.2 (**CH$_3$-C$_{10'}$**), 35.0 (**CH$_3$-C$_{10'}$**), 30.0 (**CH$_2$-C$_{14}$**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{24}H_{24}ClN_6O_2$ $[M+H]^+$: 463.1644, found: 463.1638.

Purity (HPLC): 98.5 %.

4-(3-Chloro-5-cyano-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-4-yl)-*N*-(3-(cyanomethyl)phenyl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxamide (229)



Chemical Formula: $C_{22}H_{17}ClN_6O$
Molecular Weight: 416.87

The reaction was carried out as described in general procedure **A** using **233** (42 mg, 0.32 mmol), 4-nitrophenyl chloroformate (77 mg, 0.38 mmol, 1.2 equiv.), DIPEA (132 µL, 0.76 mmol, 2.4 equiv.) and amine **218** (112 mg, 0.38 mmol, 1.2 equiv.) in dry THF (4.6 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 100 up to 98/2 to afford compound **229** (87 mg, 0.21 mmol, 66 %) as a pale yellow powder.

R_f (DCM/MeOH 98/2) 0.19.

Mp: 183-185 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3127, 3006, 2856, 2223, 1637, 1546, 1446, 1336, 1238, 779, 692, 606.

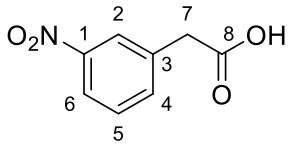
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 12.72 (s, 1H, **NH**), 8.73 (s, 1H, **NH**), 8.66 (s, 1H, **H_6**), 7.91 (s, 1H, **H_2**), 7.60 – 7.53 (m, 1H, **H_{Ar}**), 7.47 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 7.26 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.91 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.01 – 5.93 (m, 1H, **H_{10}**), 4.32 – 4.11 (m, 2H, **H_{11}**), 4.00 (s, 2H, **$H_{7'}$**), 3.90 – 3.61 (m, 2H, **H_{13}**), 2.50 – 2.43 (m, 2H, **H_{14}**).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 154.9 (**C**), 147.6 (**C**), 146.8 (**C+CH_{Ar}-C_6**), 141.1 (**C**), 131.3 (**C**), 130.1 (**C**), 128.9 (**CH_{Ar}**), 127.1 (**CH-C_{10}**), 126.6 (**CH_{Ar}-C_2**), 121.3 (**CH_{Ar}**), 119.2 (**C**), 119.0 (**CH_{Ar}**), 118.7 (**CH_{Ar}**), 117.5 (**C**), 113.6 (**C**), 103.0 (**C**), 100.6 (**C**), 43.6 (**CH_2-C_{11}**), 40.3 (**CH_2-C_{13}**), 29.9 (**CH_2-C_{14}**), 22.5 (**CH_2-$C_{7'}$**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{22}H_{18}ClN_6O$ $[M+H]^+$: 417.1225, found: 417.1223.

Purity (HPLC): 96.7 %.

2-(3-Nitrophenyl)acetic acid (230)



Chemical Formula: $C_8H_7NO_4$
Molecular Weight: 181.15

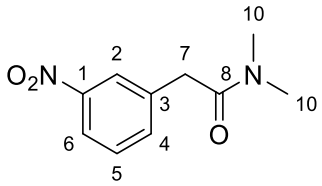
A 20 mL microwave reaction vial was charged with 2-(3-nitrophenyl)acetonitrile (1.02 g, 6.29 mmol) then H_2O (3.5 mL), H_2SO_4 (3.5 mL) and AcOH (3.5 mL) were added. The vial was sealed and the reaction mixture was stirred at 110 °C for 4.5 h. The reaction mixture was cooled to rt then diluted with H_2O (40 mL). The aqueous layer was extracted with EtOAc (3 x 35 mL) then the combined organic layers were washed with H_2O (4 x 30 mL), brine (30 mL), dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo* to afford compound **230** (1.10 g, 6.07 mmol, 97 %) as a white powder.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3070, 2929, 1703, 1523, 1348, 1238, 1206, 884, 807, 714, 665, 609.

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.20 – 8.12 (m, 2H, **2 x H_{Ar}**), 7.66 – 7.59 (m, 1H, **H_{Ar}**), 7.57 – 7.48 (m, 1H, **H_{Ar}**), 3.78 (s, 2H, **H_7**)

All spectral data corresponded to the literature values as found in Hartrampf, F. W. W.; Barber, D. M.; Gottschling, K.; Leippe, P.; Hollmann, M.; Trauner, D. *Tetrahedron* **2017**, *73* (33), 4905–4912.

N,*N*-Dimethyl-2-(3-nitrophenyl)acetamide (231)



Chemical Formula: $C_{10}H_{12}N_2O_3$
Molecular Weight: 208.22

To a solution of **230** (315 mg, 1.74 mmol) in dry THF (10 mL) was added 1,1'-carbonyldiimidazole (423 mg, 2.61 mmol, 1.5 equiv.). The reaction mixture was stirred at 50 °C for 1 h then cooled to rt following by the addition of dimethylamine hydrochloride (170 mg, 2.09 mmol, 1.2 equiv.) and Et_3N (243 µL, 1.74 mmol, 1.0 equiv.). The yellow suspension was stirred at rt for 18 h. The reaction mixture was concentrated *in vacuo* and the crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of PE/(EtOAc/EtOH 3:1) from 100 up to 40/40. The fractions containing the desired product were combined and concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in EtOAc (60 mL), the organic layer was washed with H_2O (4 x 20 mL), dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo* to afford **231** (244 mg, 1.17 mmol, 67 %) as an orange oil.

R_f [PE/(EtOAc/EtOH 3:1) 7/3] 0.24.

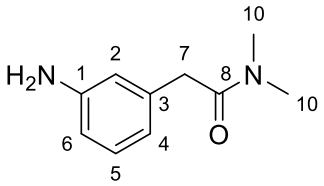
IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 2931, 1640, 1523, 1396, 1347, 1136, 809, 730, 687, 674.

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.15 – 8.08 (m, 2H, **2 x H_{Ar}**), 7.64 – 7.58 (m, 1H, **H_{Ar}**), 7.49 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 3.80 (s, 2H, **H_7**), 3.08 (s, 3H, **H_{10}**), 2.99 (s, 3H, **H_{10}**).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 169.7 (**C-C_8**), 148.5 (**C-C_1**), 137.3 (**C-C_3**), 135.7 (**CH_{Ar}**), 129.5 (**CH_{Ar}**), 124.4 (**CH_{Ar}**), 122.1 (**CH_{Ar}**), 40.0 (**CH_2-C_7**), 37.7 (**CH_3-C_{10}**), 35.9 (**CH_3-C_{10}**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{10}H_{13}N_2O_3$ $[M+H]^+$: 209.0921, found: 209.0922.

2-(3-Aminophenyl)-*N*,*N*-dimethylacetamide (232)



Chemical Formula: $C_{10}H_{14}N_2O$
Molecular Weight: 178.24

The reaction was carried out as described in general procedure D using the nitro compound **231** (209 mg, 1.00 mmol), Pd/C 10 wt.% (106 mg, 0.1 mmol, 0.1 equiv.) in MeOH (5.6 mL) for 3.5 h to afford compound **232** (159 mg, 0.89 mmol, 89 %) as a colourless oil. The product was used without further purification in the next step.

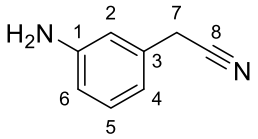
IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3344, 3232, 2930, 1625, 1602, 1493, 1396, 1132, 772, 693.

^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 7.06 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.62 – 6.57 (m, 2H, **2 x H_{Ar}**), 6.59 – 6.48 (m, 2H, **2 x H_{Ar}**), 3.81 – 3.44 (m, 4H, **NH_2 + H_7**), 2.95 (s, 3H, **H_{10}**), 2.93 (s, 3H, **H_{10}**).

^{13}C NMR (63 MHz, $CDCl_3$) δ 171.2 (**C-C_8**), 146.9 (**C-C_1**), 136.2 (**C-C_3**), 129.6 (**CH_{Ar}**), 118.9 (**CH_{Ar}**), 115.2 (**CH_{Ar}**), 113.6 (**CH_{Ar}**), 41.2 (**CH_2-C_7**), 37.8 (**CH_3-C_{10}**), 35.7 (**CH_3-C_{10}**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{10}H_{15}N_2O$ $[M+H]^+$: 179.1179, found: 179.1179.

2-(3-Aminophenyl)acetonitrile (233)



Chemical Formula: $C_8H_8N_2$
Molecular Weight: 132.17

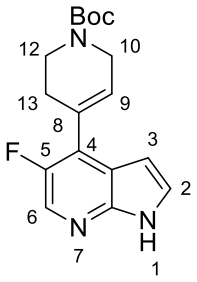
The reaction was carried out as described in general procedure **D** using 2-(3-nitrophenyl)acetonitrile (341 mg, 2.10 mmol), Pd/C 10 wt.% (223 mg, 0.21 mmol, 0.1 equiv.) in MeOH (12 mL) for 2 h. The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of PE/EtOAc from 100 up to 70/30 to afford compound **233** (179 mg, 1.35 mmol, 64 %) as a yellow liquid.

R_f (PE/EtOAc 70/30) 0.30.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) 7.20 – 7.07 (m, 1H, **H_{Ar}**), 6.75 – 6.57 (m, 3H, **3 x H_{Ar}**), 3.75 (brs, 2H, **NH_2**), 3.65 (s, 2H, **H_7**).

All spectral data corresponded to the literature values as found in Genovese, F.; Lazzari, S.; Venturi, E.; Costantino, L.; Blazquez, J.; Ibacache-Quiroga, C.; Costi, M. P.; Tondi, D. *Med. Chem. Res.* **2017**, *26* (5), 975–986.

tert-Butyl 4-(5-fluoro-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-4-yl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxylate (235)



Chemical Formula: $C_{17}H_{20}FN_3O_2$
Molecular Weight: 317.36

The reaction was carried out as described in general procedure **E** using 4-chloro-5-fluoro-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine (500 mg, 2.93 mmol), *N*-Boc,1,2,3,6-tetrahydropyridine-4-boronic acid pinacol ester (1.04 g, 3.37 mmol, 1.15 equiv.) and $Pd(PPh_3)_4$ (335 mg, 0.29 mmol, 10 mol%.) in a mixture of THF (12 mL) and a 2 M aqueous solution of Na_2CO_3 (4.4 mL, 8.79 mmol, 3.0 equiv.). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of PE/EtOAc from 90/10 up to 65/35 to afford compound **235** (544 mg, 1.71 mmol, 58 %) as a yellow solid.

R_f (PE/EtOAc 70/30) 0.29.

Mp: 157-159 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3153, 2939, 2864, 1683, 1600, 1397, 1339, 1277, 1236, 1167, 1115, 1059, 972, 760, 734, 693, 603.

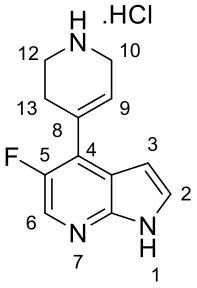
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 11.79 (s, 1H, **NH**), 8.15 (d, $J_{H\text{-}F}$ = 3.2 Hz, 1H, **H_6**), 7.57 – 7.50 (m, 1H, **$H_{2/3}$**), 6.51 – 6.45 (m, 1H, **$H_{3/2}$**), 6.16 – 6.04 (m, 1H, **H_9**), 4.12 – 4.03 (m, 2H, **H_{13}**), 3.58 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, **H_{12}**), 2.55 – 2.50 (m, 2H, **H_{10}**), 1.44 (s, 9H, ***t*-Bu**).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 153.9 (**C**), 151.4 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 239.2 Hz, **C-C_5**), 145.5 (**C**), 131.2 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 30.9 Hz, **CH_{Ar}-C_6**), 128.9 (**C**), 128.1 (**CH_{Ar}-$C_{2/3}$**), 127.4 (**CH-C_9**), 127.2 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 14.3 Hz, **C-C_4**), 117.9 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 4.0 Hz, **C**), 99.7 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 4.7 Hz, **CH_{Ar}-$C_{3/2}$**), 79.0 (**C**), 43.4 (**CH_2-C_{13}**), 39.8 (**CH_2-C_{12}**), 28.2 (**CH_2-C_{10}**), 28.1 (**3 x CH_3-*t*-Bu**).

^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ -144.11 – -144.21 (m, 1F).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{17}H_{21}FN_3O_2$ $[M+H]^+$: 318.1612, found: 318.1615.

5-Fluoro-4-(1,2,3,6-tetrahydropyridin-4-yl)-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine hydrochloride (236)



Chemical Formula: $C_{12}H_{13}ClFN_3$
Molecular Weight: 253.71

To a solution of **235** (180 mg, 0.57 mmol) in dry DCM (5.7 mL) cooled to 0 °C was slowly added a 4 M solution of HCl in 1,4-dioxane (1.14 mL, 4.56 mmol, 8.0 equiv.). The reaction mixture was stirred at rt for 3 h. After completion, the precipitate was filtered then washed with DCM (2 x 8 mL) and dried under vacuum to afford compound **236** (119 mg, 0.47 mmol, 82 %) as a yellow powder. The product was used without further purification in the next step.

Mp: 259 – 261 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3003, 2922, 2781, 2336, 1939, 1638, 1600, 1483, 1330, 1310, 1276, 728, 592.

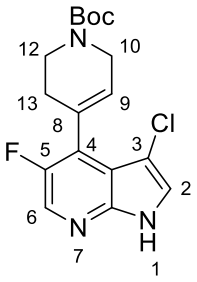
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 11.92 (s, 1H, **NH**), 9.65 (brs, 2H, **NH + H+**), 8.20 (d, $J_{H\text{-}F}$ = 3.2 Hz, 1H, **H$_6$**), 7.58 (t, J = 3.0 Hz, 1H, **H$_{2/3}$**), 6.58 – 6.55 (m, 1H, **H$_{3/2}$**), 6.14 – 6.09 (m, 1H, **H$_9$**), 3.86 – 3.72 (m, 2H, **H$_{10}$**), 3.36 – 3.26 (m, 2H, **H$_{12}$**), 2.79 – 2.70 (m, 2H, **H$_{13}$**).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 151.3 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 239.8 Hz, **C-C$_5$**), 145.2 (**C**), 130.9 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 31.2 Hz, **CH$_{Ar}$-C$_6$**), 129.1 (**CH$_{Ar}$**), 128.6 (**C**), 126.5 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 14.5 Hz, **C-C$_4$**), 123.5 (**CH-C$_9$**), 118.1 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 3.8 Hz, **C**), 99.8 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 4.5 Hz, **CH$_{Ar}$**), 41.1 (**CH$_2$-C$_{10}$**), 39.8 (**CH$_2$-C$_{12}$**), 24.6 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 4.1 Hz, **CH$_2$-C$_{13}$**).

^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ -143.86 (d, $J_{F\text{-}H}$ = 3.6 Hz, 1F).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{12}H_{13}FN_3$ $[M+H]^+$: 218.1088, found: 218.1087.

tert-Butyl 4-(3-chloro-5-fluoro-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-4-yl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxylate (237)



Chemical Formula: $C_{17}H_{19}ClFN_3O_2$
Molecular Weight: 351.81

To a solution of **235** (435 mg, 1.37 mmol) in dry DMF (8.0 mL) was added *N*-chlorosuccinimide (192 mg, 1.44 mmol, 1.05 equiv.). The reaction mixture was stirred at 70 °C for 4 h and then concentrated *in vacuo*. The residue was partitioned between EtOAc (100 mL) and H_2O (40 mL). The aqueous layer was extracted with EtOAc (3 x 90 mL). The combined organic layers were dried over $MgSO_4$, filtered, concentrated *in vacuo* and co-evaporated with heptane (2 x 30 mL). The residue was partitioned between EtOAc (100 mL) and H_2O (40 mL), the aqueous layer was separated and extracted with EtOAc (2 x 30 mL) then the combined organic layers were washed with brine (4 x 25 mL), dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of PE/EtOAc from 100 up to 65/35 to afford compound **237** (350 mg, 0.99 mmol, 72 %) as a pale yellow solid.

R_f (PE/EtOAc 70/30) 0.40.

Mp: 205-207 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3140, 2924, 2862, 1680, 1597, 1506, 1409, 1367, 1284, 1238, 1150, 1119, 964, 915, 817, 786, 771, 603.

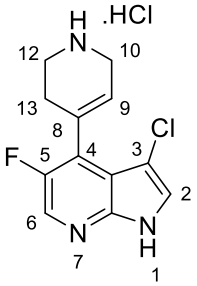
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 10.48 (s, 1H, **NH**), 8.20 (d, $J_{H\text{-}F}$ = 2.3 Hz, 1H, **H_6**), 7.36 (s, 1H, **H_2**), 5.90 – 5.71 (m, 1H, **H_9**), 4.22 – 4.05 (m, 2H, **H_{10}**), 3.82 – 3.64 (m, 2H, **H_{12}**), 2.57 – 2.42 (m, 2H, **H_{13}**), 1.51 (s, 9H, ***t*-Bu**).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 155.2 (**C**), 152.7 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 241.4 Hz, **C-C_5**), 144.1 (**C**), 132.9 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 31.8 Hz, **CH_{Ar}-C_6**), 130.1 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 18.3 Hz, **C-C_4**), 127.2 (**CH-C_9**), 124.6 (**CH_{Ar}-C_2**), 115.5 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 3.9 Hz, **C**), 104.5 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 4.6 Hz, **C**), 79.9 (**C**), 77.4 (**C**), 43.7 (**CH_2-C_{13}**), 40.3 (**CH_2-C_{12}**), 29.8 (**CH_2-C_{10}**), 28.7 (**3 x CH_3-*t*-Bu**).

^{19}F NMR (376 MHz, $CDCl_3$) δ -142.94 – -143.22 (m, 1F).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{17}H_{20}ClFN_3O_2$ $[M+H]^+$: 352.1223, found: 352.1225.

3-Chloro-5-fluoro-4-(1,2,3,6-tetrahydropyridin-4-yl)-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine hydrochloride (238)



Chemical Formula: $C_{12}H_{12}Cl_2FN_3$
Molecular Weight: 288.15

To a solution of **237** (350 mg, 1.10 mmol) in dry DCM (11 mL) cooled to 0 °C was slowly added a 4 M solution of HCl in 1,4-dioxane (2.20 mL, 8.80 mmol, 8.0 equiv.). The reaction mixture was stirred at rt for 3.5 h then a 4 M solution of HCl in 1,4-dioxane (2.20 mL, 8.80 mmol, 8.0 equiv.) was added at rt and the reaction mixture was left to stir at rt for 18 h. After completion, the precipitate was filtered then washed with DCM (2 x 10 mL) and dried under vacuum to afford compound **238** (290 mg, 1.01 mmol, 92 %) as a beige solid. The product was used without further purification in the next step.

Mp: > 260°C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) v: 3009, 2760, 2699, 2640, 2577, 2453, 1946, 1853, 1780, 1636, 1590, 1485, 1447, 1329, 1266, 1211, 1142, 1106, 939, 926, 915, 894, 841, 833, 666, 588, 548.

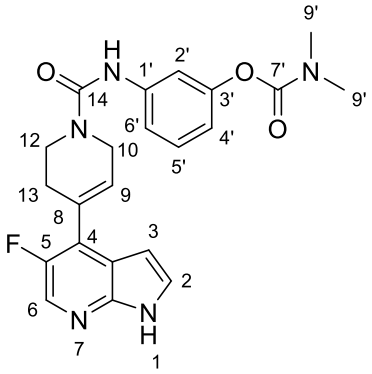
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 12.27 (s, 1H, **NH**), 9.61 (brs, 2H, **NH + H+**), 8.29 (d, $J_{H\text{-}F}$ = 2.3 Hz, 1H, **H_6**), 7.76 (d, J = 2.8 Hz, 1H, **H_2**), 5.90 – 5.84 (m, 1H, **H_9**), 3.87 – 3.69 (m, 2H, **H_{10}**), 3.39 – 3.23 (m, 2H, **H_{12}**), 2.66 – 2.55 (m, 2H, **H_{13}**).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 151.5 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 240.2 Hz, **C-C_5**), 143.7 (**C**), 132.5 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 30.6 Hz, **CH_{Ar}-C_6**), 126.8 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 18.0 Hz, **C-C_4**), 126.4 (**CH_{Ar}-C_2**), 126.1 (**C**), 123.4 (**CH-C_9**), 113.9 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 3.7 Hz, **C**), 101.6 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 4.6 Hz, **C**), 40.8 (**CH_2-C_{10}**), 39.6 (**CH_2-C_{12}**), 26.0 (**CH_2-C_{13}**).

^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-d_6) δ -143.91 (d, $J_{F\text{-}H}$ = 2.6 Hz).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{12}H_{12}ClFN_3$ $[M+H]^+$: 252.0698, found: 252.0699.

3-(4-(5-Fluoro-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-4-yl)-1,2,3,6-tetrahydropyridine-1-carboxamido)phenyl dimethylcarbamate (240)



Chemical Formula: $C_{22}H_{22}FN_5O_3$
Molecular Weight: 423.45

The reaction was carried out as described in general procedure **A** using 3-aminophenyl *N*,*N*-dimethylcarbamate (36 mg, 0.20 mmol), 4-nitrophenyl chloroformate (79 mg, 0.39 mmol, 2.0 equiv.), DIPEA (136 µL, 0.78 mmol, 3.9 equiv.) and amine **236** (99 mg, 0.39 mmol, 2.0 equiv.) in dry THF (2.9 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 100 up to 98/2 to afford compound **240** (53 mg, 0.13 mmol, 65 %) as a beige powder.

R$_f$ (DCM/MeOH 98/2) 0.17.

Mp: 119-121 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3201, 2928, 1709, 1646, 1599, 1540, 1486, 1435, 1386, 1233, 1165, 1149, 752, 687, 595.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 11.80 (s, 1H, **NH**), 8.69 (s, 1H, **NH**), 8.17 (d, $J_{H\text{-}F}$ = 3.1 Hz, 1H, **H$_6$**), 7.58 – 7.52 (m, 1H, **H$_{Ar}$**), 7.41 – 7.36 (m, 1H, **H$_{Ar}$**), 7.32 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, **H$_{Ar}$**), 7.23 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H, **H$_{Ar}$**), 6.69 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, **H$_{Ar}$**), 6.55 – 6.50 (m, 1H, **H$_{Ar}$**), 6.21 – 6.16 (m, 1H, **H$_9$**), 4.26 – 4.19 (m, 2H, **H$_{10}$**), 3.72 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H, **H$_{12}$**), 3.04 (s, 3H, **H$_{9'}$**), 2.91 (s, 3H, **H$_{9'}$**), 2.64 – 2.55 (m, 2H, **H$_{13}$**).

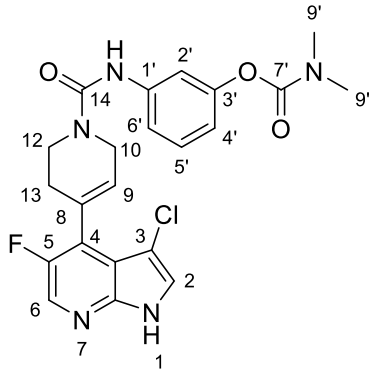
^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 154.7 (**C**), 154.0 (**C**), 151.4 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 239.4 Hz, **C-C$_5$**), 151.3 (**C**), 145.5 (**C**), 141.5 (**C**), 131.2 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 31.0 Hz, **CH$_{Ar}$-C$_6$**), 129.2 (**C**), 128.7 (**CH$_{Ar}$**), 128.1 (**CH$_{Ar}$**), 127.3 (**CH-C$_9$**), 127.1 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 14.3 Hz, **C-C$_4$**), 117.9 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 4.0 Hz, **C**), 116.0 (**CH$_{Ar}$**), 114.9 (**CH$_{Ar}$**), 112.9 (**CH$_{Ar}$**), 99.7 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 4.4 Hz, **CH$_{Ar}$**), 43.8 (**CH$_2$-C$_{10}$**), 40.4 (**CH$_2$-C$_{12}$**), 36.2 (**CH$_3$-C$_{9'}$**), 36.1 (**CH$_3$-C$_{9'}$**), 28.5 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 3.7 Hz, **CH$_2$-C$_{13}$**).

^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ -144.10 (d, $J_{F\text{-}H}$ = 3.2 Hz, 1F).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{22}H_{23}FN_5O_3$ $[M+H]^+$: 424.1779, found: 424.1783.

Purity (HPLC): 99.2 %.

3-(4-(3-Chloro-5-fluoro-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-4-yl)-1,2,3,6-tetrahydropyridine-1-carboxamido)phenyl dimethylcarbamate (241)



Chemical Formula: $C_{22}H_{21}ClFN_5O_3$
Molecular Weight: 457.89

The reaction was carried out as described in general procedure **A** using 3-aminophenyl *N*,*N*-dimethylcarbamate (52 mg, 0.29 mmol), 4-nitrophenyl chloroformate (71 mg, 0.35 mmol, 1.2 equiv.), DIPEA (122 µL, 0.70 mmol, 2.4 equiv.) and amine **238** (100 mg, 0.35 mmol, 1.2 equiv.) in dry THF (4.1 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 100 up to 98/2 to afford compound **241** (84 mg, 0.18 mmol, 62 %) as a white powder.

R$_f$ (DCM/MeOH 98/2) 0.27.

Mp: 217-219 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3197, 2927, 1712, 1651, 1599, 1543, 1484, 1435, 1386, 1164, 1149, 894, 773, 595.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d$_6$*) δ 12.18 (s, 1H, **NH**), 8.70 (s, 1H, **NH**), 8.31 – 8.20 (m, 1H, **H$_6$**), 7.75 (s, 1H, **H$_2$**), 7.39 – 7.35 (m, 1H, **H$_{Ar}$**), 7.32 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, **H$_{Ar}$**), 7.23 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H, **H$_{Ar}$**), 6.69 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, **H$_{Ar}$**), 5.94 – 5.83 (m, 1H, **H$_9$**), 4.24 – 4.13 (m, 2H, **H$_{10}$**), 3.75 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, **H$_{12}$**), 3.04 (s, 3H, **H$_{9'}$**), 2.91 (s, 3H, **H$_{9'}$**), 2.49 – 2.42 (m, 2H, **H$_{13}$**).

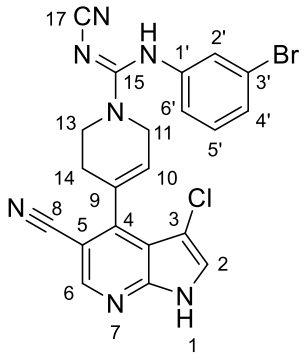
^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d$_6$*) δ 154.8 (**C**), 154.0 (**C**), 151.7 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 239.1 Hz, **C-C$_5$**), 151.3 (**C**), 143.8 (**C**), 141.5 (**C**), 132.4 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 30.8 Hz, **CH$_{Ar}$-C$_6$**), 128.7 (**CH$_{Ar}$**), 128.0 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 18.2 Hz, **C-C$_4$**), 127.0 (**CH-C$_9$**), 126.2 (**C + CH$_{Ar}$-C$_2$**), 116.0 (**CH$_{Ar}$**), 114.9 (**CH$_{Ar}$**), 114.1 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 3.8 Hz, **C**), 112.9 (**CH$_{Ar}$**), 101.6 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 4.5 Hz, **C**), 43.6 (**CH$_2$-C$_{10}$**), 40.3 (**CH$_2$-C$_{12}$**), 36.3 (**CH$_3$-C$_{9'}$**), 36.1 (**CH$_3$-C$_{9'}$**), 29.7 (**CH$_2$-C$_{13}$**).

^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-*d$_6$*) δ -144.37 (d, $J_{F\text{-}H}$ = 2.4 Hz, 1F).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{22}H_{22}ClFN_5O_3$ $[M+H]^+$: 458.1390, found: 458.1387.

Purity (HPLC): 95.6 %.

N-(3-Bromophenyl)-4-(3-chloro-5-cyano-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-4-yl)-*N*'-cyano-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboximidamide (242)



Chemical Formula: $C_{21}H_{15}BrClN_7$
Molecular Weight: 480.75

Step 1: To a solution of 3-bromoaniline (316 mg, 1.84 mmol) in dry MeCN (4.6 mL) was added diphenyl *N*-cyanocarbonimidate (438 mg, 1.84 mmol) at rt. The reaction mixture was stirred at 50 °C for 18 h then cooled to rt. The precipitate was filtered, washed with MeCN (2 x 10 mL) and dried under vacuum to afford **phenyl *N*-(3-bromophenyl)-*N*'-cyanocarbamimidate** (166 mg, 0.53 mmol, 29 %) as a white powder which was engaged immediately in the next step.

Step 2: To a solution of **phenyl *N*-(3-bromophenyl)-*N*'-cyanocarbamimidate** (82 mg, 0.26 mmol, 1.1 equiv.) in dry MeCN (3.7 mL) were added successively Et_3N (67 µL, 0.48 mmol, 2.0 equiv.) and amine **218** (72 mg, 0.24 mmol). The reaction mixture was stirred under reflux for 2 h then cooled to rt and concentrated *in vacuo*. The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH/NH_4OH from 100 up to 98/2/1 to afford compound **242** (51 mg, 0.11 mmol, 42 %) as a beige solid.

R_f (DCM/MeOH/NH_4OH 98/2/1) 0.21.

Mp: 177-179 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3119, 2224, 2170, 1567, 1512, 1440, 1303, 1254, 776.

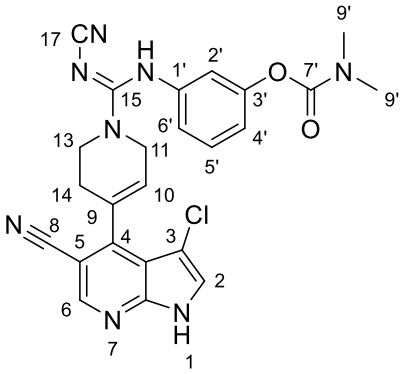
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 12.73 (s, 1H, **NH**), 9.62 (s, 1H, **NH**), 8.67 (s, 1H, **H_6**), 7.93 (s, 1H, **H_2**), 7.33 – 7.22 (m, 3H, **3 x H_{Ar}**), 7.13 – 7.06 (m, 1H, **H_{Ar}**), 5.96 – 5.91 (m, 1H, **H_{10}**), 4.26 – 4.17 (m, 2H, **H_{11}**), 3.90 – 3.77 (m, 2H, **H_{13}**), 2.62 – 2.53 (m, 2H, **H_{14}**).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 157.7 (**C**), 147.6 (**C**), 146.7 (**CH_{Ar}-C_6**), 146.1 (**C**), 140.7 (**C**), 130.9 (**CH_{Ar}**), 130.1 (**C**), 126.7 (**CH_{Ar}-C_2**), 126.3 (**CH-C_{10}**), 125.9 (**CH_{Ar}**), 122.8 (**CH_{Ar}**), 121.7 (**C**), 119.2 (**CH_{Ar}**), 117.4 (**C**), 115.8 (**C**), 113.5 (**C**), 102.9 (**C**), 100.5 (**C**), 46.2 (**CH_2-C_{11}**), 43.3 (**CH_2-C_{13}**), 29.4 (**CH_2-C_{14}**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{20}H_{16}BrClN_7$ $[M+H]^+$: 480.0334, found: 480.0331.

Purity (HPLC): 95.5 %.

3-(4-(3-Chloro-5-cyano-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-4-yl)-*N*'-cyano-1,2,3,6-tetrahydropyridine-1-carboximidamido)phenyl dimethylcarbamate (243)



Chemical Formula: $C_{24}H_{21}ClN_8O_2$
Molecular Weight: 488.94

Step 1: To a solution of 3-aminophenyl dimethylcarbamate (255 mg, 1.42 mmol) in dry MeCN (3.6 mL) was added diphenyl *N*-cyanocarbonimidate (338 mg, 1.42 mmol) at rt. The reaction mixture was stirred at 50 °C for 18 h then cooled to rt. The solution was concentrated *in vacuo* and the crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 100 up to 98/2 to afford **3-(((cyanoimino)(phenoxy)methyl)amino)phenyl dimethylcarbamate** (393 mg, 1.21 mmol, 85 %) as a white powder which was engaged immediately in the next step.

Step 2: To a solution of **3-(((cyanoimino)(phenoxy)methyl)amino)phenyl dimethylcarbamate** (104 mg, 0.32 mmol, 1.1 equiv.) in dry MeCN (4.2 mL) were added successively Et_3N (81 µL, 0.58 mmol, 2.0 equiv.) and amine **218** (87 mg, 0.29 mmol). The reaction mixture was stirred under reflux for 1 h then cooled to rt and concentrated *in vacuo*. The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH/NH_4OH from 100 up to 98/2/1 to afford compound **RB453** (47 mg, 0.10 mmol, 31 %) as a beige solid.

R_f (DCM/MeOH/NH_4OH 98/2/1) 0.13.

Mp: 169-171 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3117, 2929, 2224, 2171, 1704, 1572, 1441, 1388, 1163, 607.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 12.73 (s, 1H, **NH**), 9.58 (s, 1H, **NH**), 8.66 (s, 1H, **H_6**), 7.92 (s, 1H, **H_2**), 7.32 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.96 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.88 – 6.85 (m, 1H, **H_{Ar}**), 6.82 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 5.96 – 5.88 (m, 1H, **H_{10}**), 4.26 – 4.11 (m, 2H, **H_{11}**), 3.90 – 3.70 (m, 2H, **H_{13}**), 3.04 (s, 3H, **$H_{9'}$**), 2.89 (s, 3H, **$H_{9'}$**), 2.59 – 2.52 (m, 2H, **H_{14}**).

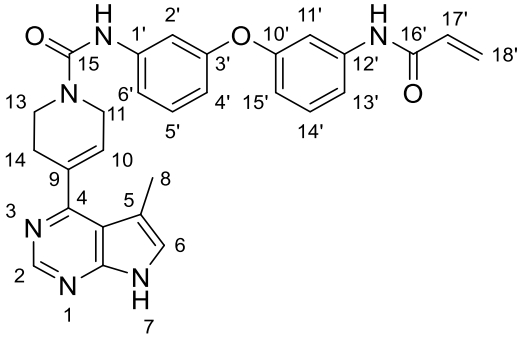
^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 158.1 (**C**), 153.8 (**C-$C_{7'}$**), 151.8 (**C**), 147.5 (**C**), 146.7 (**CH_{Ar}-C_6**), 146.2 (**C**), 140.0 (**C**), 130.1 (**C**), 129.6 (**CH_{Ar}**), 126.7 (**CH_{Ar}-C_2**), 126.3 (**CH-C_{10}**), 117.4 (**C**), 116.9 (**CH_{Ar}**), 116.7 (**CH_{Ar}**), 116.1 (**C**), 113.8 (**CH_{Ar}**), 113.5 (**C**), 102.9 (**C**), 100.5 (**C**), 46.2 (**CH_2-C_{11}**), 43.4 (**CH_2-C_{13}**), 36.3(**CH_3-$C_{9'}$**), 36.1 (**CH_3-$C_{9'}$**), 29.3 (**CH_2-C_{14}**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{24}H_{22}ClN_8O_2$ $[M+H]^+$: 489.1549, found: 489.1546.

Purity (HPLC): 99.2 %.

N-(3-(3-Acrylamidophenoxy)phenyl)-4-(5-methyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxamide

246(OM145)



Chemical Formula: $C_{28}H_{26}N_6O_3$
Molecular Weight: 494.56

Step 1: To a solution of **254** (200 mg, 0.56 mmol, 1.0 equiv.) in dry DCM (1 mL) cooled at 0 °C was added TFA (1 mL, 13.1 mmol, 23 equiv.). The reaction mixture was stirred at 0°C for 1 hour and solvent were removed *in vacuo*. The resulting TFA salt **256** (black oil) was engaged in the next step without further purification and the yield was considered quantitative.

Step 2: The reaction was carried out as described in general procedure **A** using aniline-TFA salt **256** (208 mg, 0.56 mmol, 1.0 equiv.), 4-nitrophenyl chloroformate (137 mg, 0.68 mmol, 1.2 equiv.), DIPEA (448 µL, 2.60 mmol, 3.6 equiv.) and amine **8** (195 mg, 0.68 mmol, 1.2 equiv.) in dry THF (8.0 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH/NH_4OH from 100 up to 95/5/1 to afford compound **246(OM145)** (222 mg, 0.45 mmol, 80 %) as a white powder.

R_f (DCM/MeOH/NH_4OH 94/5/1): 0.27.

Mp: 185-187 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3674, 3427, 3285, 3221, 2327, 2259, 2163, 2022, 1988, 1648, 1616, 1596, 1554, 1543, 1534, 1437, 1276, 1218, 1207, 753.

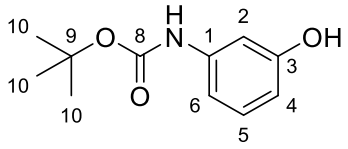
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.81 (s, 1H, **NH**), 10.20 (s, 1H, **NH**), 8.68 (s, 1H, **NH**), 8.64 (s, 1H, **H_2**), 7.45 – 7.37 (m, 2H, **$H_{6'}$+$H_{15'}$**), 7.35 – 7.25 (m, 5H, **H_6 + $H_{4'}$ + $H_{11'}$ + $H_{13'}$ + $H_{2'}$**), 6.77 – 6.72 (m, 1H, **$H_{14'}$**), 6.64 (ddd, *J* = 8.0, 2.5, 1.2 Hz, 1H, **$H_{5'}$**), 6.40 (dd, *J* = 16.9, 10.1 Hz, 1H, **$H_{17'}$**), 6.24 (dd, *J* = 17.0, 2.0 Hz, 1H, **$H_{18'a}$**), 6.02 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H, **H_{10}**), 5.74 (dd, *J* = 10.1, 2.0 Hz, 1H, **$H_{18'b}$**), 4.20 (brs, 2H, **H_{11}**), 3.71 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, **H_{13}**), 2.66 (s, 2H, **H_{14}**), 2.22 (s, 3H, **H_8**).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 163.2 (**C**), 159.3 (**C**), 157.2 (**C**), 156.5 (**C**), 154.9 (**C**), 152.6 (**C**), 150.1 (**CH_{Ar}-C_2**), 142.3 (**C**), 140.5 (**C-$C_{12'}$**), 134.2 (**C**), 131.7 (**CH-$C_{17'}$**), 130.1 (**CH_{Ar}-$C_{2'}$**), 129.6 (**CH_{Ar}-$C_{13'}$**), 128.2 (**CH-C_{10}**), 127.2 (**CH_2-$C_{18'}$**), 125.0 (**CH_{Ar}-C_6**), 114.7 (**C**), 114.3 (**C**), 114.0 (**CH_{Ar}-$C_{6'}$**), 113.6 (**CH_{Ar}-$C_{14'}$**), 112.2 (**CH_{Ar}-$C_{5'}$**), 109.9 (**CH_{Ar}-$C_{11'}$**), 109.2 (**CH_{Ar}-$C_{15'}$**), 108.9 (**C**), 43.6 (**CH_2-C_{11}**), 40.6 (**CH_2-C_{13}**), 27.3 (**CH_2-C_{14}**), 12.9 (**CH_3-C_8**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{28}H_{27}N_6O_3$ $[M+H]^+$: 495.2139, found: 495.2139.

Purity (HPLC): 96.0 %.

tert-Butyl (3-hydroxyphenyl)carbamate (250)



Chemical Formula: $C_{11}H_{15}NO_3$
Molecular Weight: 209.25

To a solution of 3-aminophenol (1.00 g, 9.16 mmol, 1.0 equiv.) in THF (18 mL) was added Boc_2O (2.53 mL, 11.0 mmol, 1.2 equiv.) and the mixture was stirred at reflux for 16 h. After completion, the reaction was quenched by addition of HCl 0.1 M until pH 5 was reached. The solution was diluted with EtOAc (30 mL), the organic layer was separated and washed with H_2O (20 mL), an aqueous saturated solution of $NaHCO_3$ (20 mL) and brine (20mL). The organic phase was dried on $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash chromatography on silica gel using a solvent system of PE/EtOAc (6/4) to afford **250** (1.90 g, 9.16 mmol, 99 %) as a yellow oil.

R_f (PE/EtOAc 6/4): 0.75.

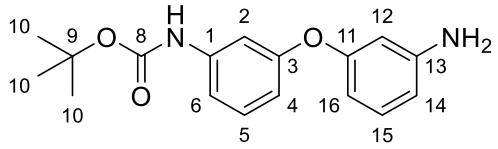
IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3331, 2979, 1805, 1693, 1603, 1533, 1496, 1447, 1393, 1368, 1332, 1287, 1244, 1154, 1120, 1069, 977, 942, 871, 772.

^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 7.18 – 7.05 (m, 2H, **H_2+H_6**), 6.73 – 6.71 (m, 1H, **H_5**), 6.55-6.51 (m, 2H, **H_4+NH**), 1.52 (s, 9H, **H_{10}**).

^{13}C NMR (63 MHz, $CDCl_3$) δ 156.6 (**C-C_8**), 152.9 (**C-C_3**), 139.6 (**C-C_1**), 130.0 (**CH_{Ar}-C_6**), 110.8 (**CH_{Ar}-C_5**), 110.3 (**CH_{Ar}-C_4**), 105.9 (**CH_{Ar}-C_2**), 80.9 (**C-C_9**), 28.4 (**3 x CH_3-C_{10}**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{11}H_{15}NO_3Na$ $[M+Na]^+$: 232.0944, found: 232.0946.

tert-Butyl (3-(3-aminophenoxy)phenyl)carbamate (251)



Chemical Formula: $C_{17}H_{20}N_2O_3$
Molecular Weight: 300.36

The reaction was carried out as described in general procedure **G** using **250** (1.15 g, 5.48 mmol, 1.2 equiv.), iodoaniline (0.55 mL, 4.57 mmol, 1.0 equiv.), CuI (44 mg, 0.23 mmol, 5 mol%), picolinic acid (56 mg, 0.46 mmol, 10 mol%) and K_3PO_4 (1.37 g, 9.13 mmol, 2.0 equiv.). The residue was purified by flash chromatography on silica gel using a solvent system of PE/EtOAc (7/3) to afford **251** (957 mg, 3.84 mmol, 70 %) as a yellow oil.

R_f (PE/EtOAc 7/3): 0.50.

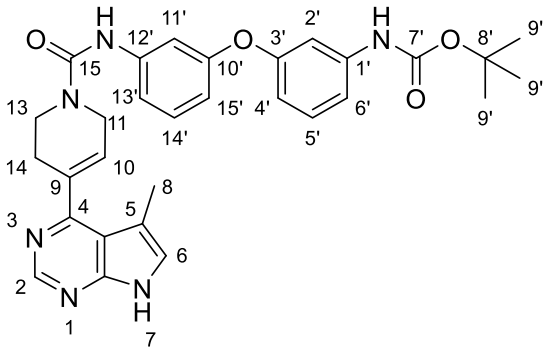
IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3375, 2978, 1705, 1600, 1524, 1487, 1438, 1416, 1392, 1367, 1270, 1234, 1150, 1051, 983, 969, 908, 868, 768, 728, 684.

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.21 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H, **H_6**), 7.13 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H, **H_2**), 7.08 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, **H_5**), 7.01 (t, *J* = 2.2 Hz, 1H, **H_{15}**), 6.68 (ddd, *J* = 8.1, 2.3, 1.1 Hz, 1H, **H_{12}**), 6.53 – 6.49 (m, 1H, **NH**), 6.44 – 6.38 (m, 2H, **H_4+H_{16}**), 6.33 (t, *J* = 2.2 Hz, 1H, **H_{14}**), 1.50 (s, 9H, **H_{10}**).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 158.2 (**C**), 157.8 (**C**), 152.6 (**C-C_8**), 147.7 (**C-C_{13}**), 139.7 (**C-C_1**), 130.3 (**CH_{Ar}-C_5**), 129.9 (**CH_{Ar}**), 113.5 (**CH_{Ar}-C_{12}**), 113.3 (**CH_{Ar}**), 110.3 (**CH_{Ar}**), 109.4 (**CH_{Ar}-C_{15}**), 109.2 (**CH_{Ar}**), 105.8 (**CH_{Ar}-C_{14}**), 80.7 (**C-C_9**), 28.3 (**3 x CH_3-C_{10}**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{17}H_{20}N_2O_3Na$ $[M+Na]^+$: 323.1366, found: 323.1367.

tert-Butyl (3-(3-(4-(5-methyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-1,2,3,6-tetrahydropyridine-1-carboxamido)phenoxy)phenyl)carbamate (252)



Chemical Formula: $C_{30}H_{32}N_6O_4$
Molecular Weight: 540.62

The reaction was carried out as described in general procedure **A** using aniline **251** (223 mg, 0.74 mmol, 1.0 equiv.), 4-nitrophenyl chloroformate (179 mg, 0.89 mmol, 1.2 equiv.), DIPEA (454 µL, 2.67 mmol, 3.6 equiv.) and amine **8** (256 mg, 0.89 mmol, 1.2 equiv.) in dry THF (10 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH/NH_4OH from 100 up to 95/5/1 to afford compound **252** (287 mg, 0.53 mmol, 72 %) as a white powder.

R_f (DCM/MeOH/NH_4OH 94/5/1): 0.57.

Mp: 175-177 °C.

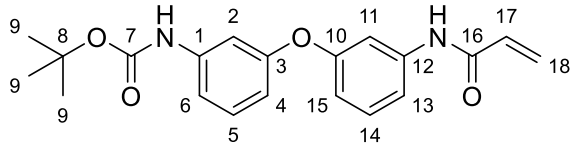
IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3252, 2976, 1704, 1644, 1594, 1537, 1487, 1437, 1343, 1392, 1367, 1273, 1237, 1184, 1155, 1061, 966, 871, 827, 774, 735, 687.

^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 9.80 (s, 1H, **NH**), 8.78 (s, 1H, **H_2**), 7.25 – 7.09 (m, 5H, **H_6+$H_{6'}$+$H_{2'}$+ $H_{5'}$+$H_{13'}$**), 7.07 – 6.97 (m, 2H, **$H_{14'}$+$H_{11'}$**), 6.76 (s, 1H, **NH**), 6.71 – 6.61 (m, 2H, **$H_{4'}$+$H_{15'}$**), 6.02 (brs, 1H, **H_{10}**), 4.26 (d, *J* = 3.0 Hz, 2H, **H_{11}**), 3.80 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, **H_{13}**), 2.82 (s, 2H, **H_{14}**), 2.27 (s, 3H, **H_8**), 1.49 (s, 9H, **$H_{9'}$**).

^{13}C NMR (63 MHz, $CDCl_3$) δ 159.4 (**C**), 157.8 (**C**), 157.7 (**C**), 155.0 (**C**), 153.0 (**C**), 152.8 (**C**),150.2 (**CH_{Ar}-C_2**), 140.6 (**C**), 139.9 (**C**), 130.1 (**CH_{Ar}-$C_{5'}$**), 130.0 (**CH_{Ar}-$C_{2'}$**), 128.2 (**CH-C_{10}**), 124.3 (**CH_{Ar}-C_6**), 115.3 (**CH_{Ar}-$C_{13'}$**), 115.2 (**C**), 113.8 (**CH_{Ar}-$C_{6'}$**), 113.6 (**2 x CH_{Ar}-$C_{4'}$+$C_{15'}$**), 111.2 (**C**), 110.8 (**CH_{Ar}**), 109.6 (**CH_{Ar}**), 80.8 (**C-$C_{8'}$**), 43.9 (**CH_2-C_{11}**), 41.1 (**CH_2-C_{13}**), 28.4 (**CH_2-C_{14}**), 28.1 (**CH_3-$C_{9'}$**), 13.1 (**CH_3-C_8**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{30}H_{33}N_6O_4$ $[M+H]^+$: 541.2558, found: 541.2559.

tert-Butyl (3-(3-acrylamidophenoxy)phenyl)carbamate (254)



Chemical Formula: $C_{20}H_{22}N_2O_4$
Molecular Weight: 354.41

251 (300 mg, 1.00 mmol, 1 equiv.) was dissolved in dry THF (5 mL) then DIPEA (340 µL, 2.00 mmol, 2 equiv.) and acryloyl chloride (163 µL, 2.00 mmol, 2.0 equiv.) were added. The reaction was stirred at rt for 16 h. EtOAc was added (20 mL) and the organic layer was washed with a saturated aqueous solution of NH_4Cl (2 x 15 mL), brine (2 x 15 mL), dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash chromatography on silica gel PE/EtOAc (75/25) to afford **254** as a yellow oil (235 mg, 0.66 mmol, 66 %).

R_f (PE/EtOAc 7/3): 0.22.

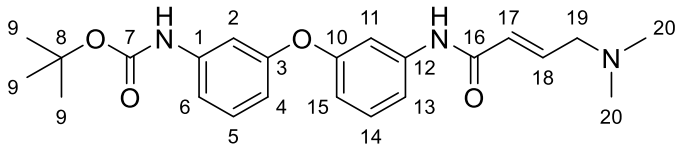
IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3300, 2978, 1697, 1668, 1595, 1533, 1487, 1438, 1392, 1367, 1273, 1217, 1153, 1052, 983, 910, 872, 775, 732, 686.

^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 7.52 (s, 1H, **NH**), 7.37 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, **H_6**), 7.26 – 7.20 (m, 2H, **H_2+H_{13}**), 7.17 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H, **H_{11}**), 7.14 – 7.03 (m, 2H, **H_{15}+H_4**), 6.76 (ddd, *J* = 8.0, 2.4, 1.1 Hz, 1H, **H_{14}**), 6.68 (ddd, *J* = 8.1, 2.3, 1.1 Hz, 1H, **H_5**), 6.55 (s, 1H, **NH**), 6.40 (dd, *J* = 16.8, 1.5 Hz, 1H, **H_{18a}**), 6.21 (dd, *J* = 16.9, 10.1 Hz, 1H, **H_{17}**), 5.74 (dd, *J* = 10.1, 1.5 Hz, 1H, **H_{18b}**), 1.49 (s, 9H, **H_9**).

^{13}C NMR (63 MHz, $CDCl_3$) δ 163.6 (**C-C_{16}**), 157.9 (**C**), 157.6 (**C**), 152.8 (**C-C_7**), 139.9 (**C-C_1**), 139.2 (**C-C_{12}**), 131.1 (**CH-C_{17}**), 130.2 (**CH_{Ar}-C_2**), 130.2 (**CH_{Ar}-C_{13}**), 128.1 (**CH_2-C_{18}**), 115.0 (**2 x CH_{Ar}-C_6+C_{14}**), 113.9 (**2 x CH_{Ar}-C5+C4**), 110.5 (**CH_{Ar}-C_{11}**), 109.8 (**CH_{Ar}-C_{15}**), 80.9 (**C-C8**), 28.4 (**3 x CH_3-C9**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{20}H_{22}N_2O_4Na$ $[M+Na]^+$: 377.1472, found: 377.1472.

tert-Butyl (*E*)-(3-(3-(4-(dimethylamino)but-2-enamido)phenoxy)phenyl)carbamate (258)



Chemical Formula: $C_{23}H_{29}N_3O_4$
Molecular Weight: 411.50

To a solution of 4-(dimethylamino)-2-butenoic acid hydrochloride (90 mg, 0.54 mmol, 1.0 equiv.) in dry DCM (3 mL) were added DIPEA (355 µL, 2.09 mmol, 3.9 equiv.) and HATU (397 mg, 1.05 mmol, 1.9 equiv.) then the reaction mixture was stirred at rt for 1 h. A solution of **251** (314 mg, 1.05 mmol, 1.9 eq.) in dry DCM (1 mL) was added dropwise and the reaction was stirred at room temperature for 16 h. DCM (20 mL) was added and the organic layer was washed with brine (3 x 15 mL), dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude reaction mixture was purified by flash chromatography on silica gel using a solvent system of PE/EtOAc (7/3) to afford **258** (115 mg, 0.28 mmol, 52 %) as a black oil.

R_f (PE/EtOAc 7/3): 0.75.

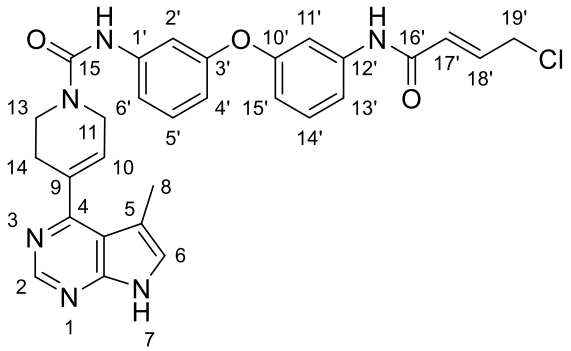
IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 2973, 2931, 1686, 1500, 1391, 1365, 1270, 1244, 1150, 1128, 1069, 1001, 955, 876, 852, 800, 733, 700.

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.90 (s, 1H, **NH**), 7.36 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, **H_6**), 7.25 – 7.09 (m, 4H, **H_5 + H_{11} + H_{13}+ H_{14}**), 7.00 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, **H_2**), 6.95 – 6.84 (m, 2H, **H_{18} + NH**), 6.76 – 6.70 (m, 1H, **H_{15}**), 6.69 – 6.62 (m, 1H, **H_4**), 6.07 (d, *J* = 15.4 Hz, 1H, **H_{17}**), 3.04 (dd, *J* = 6.1, 1.5 Hz, 2H, **H_{19}**), 2.23 (s, 6H, **H_{20}**), 1.48 (s, 9H, **H_9**).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ. 163.8 (**C**), 157.6 (**C**), 157.5 (**C**), 152.8 (**C**), 142.4 (**CH-C_{18}**), 139.9 (**C**), 139.4 (**C**), 130.0 (**CH_{Ar}-C_{14}**), 130.0 (**CH_{Ar}-C_5**), 125.9 (**CH-C_{17}**), 115.0 (**CH_{Ar}-C_6**), 114.7 (**CH_{Ar}-C_{15}**), 113.8 (**CH_{Ar}-C_{13}**), 113.6 (**CH_{Ar}-C_4**), 110.5 (**CH_{Ar}-C_{11}**), 109.6 (**CH_{Ar}-C_2**), 80.7 (**C-C_8**), 60.3 (**CH_2-C_{19}**), 45.4 (**2 x CH_3-C_{20}**), 28.3 (**3 x CH_3-C_9**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{23}H_{30}N_3O_4$ $[M+H]^+$: 412.2231, found: 412.2230.

(*E*)-*N*-(3-(3-(4-Chlorobut-2-enamido)phenoxy)phenyl)-4-(5-methyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxamide (262)



Chemical Formula: $C_{29}H_{27}ClN_6O_3$
Molecular Weight: 543.02

Step 1: To a solution of **258** (486 mg, 1.18 mmol, 1.0 equiv.) in 1,4-dioxane (2.5 mL) cooled to 0 °C was added a 4 M solution of HCl in 1,4-dioxane (2.5 mL, 10.0 mmol, 8.4 equiv.). The reaction mixture was stirred at rt for 4 h then the solvent was removed *in vacuo*. The resulting HCl salt **259** (white solid) was engaged in the next step without further purification. The yield was considered quantitative.

Step 2: To a solution of triphosgene (120 mg, 0.40 mmol, 1.0 equiv.) in dry THF (4 mL) was added **259** (171 mg, 0.44 mmol, 1.1 equiv.) and triethylamine (170 µL, 1.21 mmol, 3.0 equiv.). The reaction mixture was stirred at 30 °C for 1 h then a solution of amine **8** (128 mg, 0.44 mmol, 1.1 equiv.) in dry THF (1 mL) was added to the reaction mixture. The obtained suspension was stirred at 35 °C for 16 h. The reaction mixture was quenched with a saturated aqueous solution of $NaHCO_3$ (15 mL) then diluted with DCM (20 mL). The organic layer was separated, washed with brine (3 x 15 mL), dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH/NH_4OH from 100 up to 95/5/1 to afford **262** (23 mg, 0.04 mmol, 10 %) as white solid.

R_f (DCM/MeOH/NH_4OH 94/5/1) 0.30.

Mp: 177-179 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3258, 2355, 2065, 1636, 1588, 1536, 1487, 1438, 1322, 1277, 1206, 1156, 849, 581.

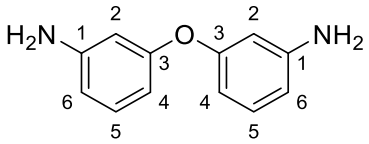
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.88 (s, 1H, **NH**), 10.31 (s, 1H, **NH**), 8.69 (s, 1H, **NH**), 8.65 (s, 1H, **H_2**), 7.34 (dd, *J* = 17.8, 10.2 Hz, 7H, **H_6 + $H_{2'}$ + $H_{4'}$ + $H_{6'}$ + $H_{11'}$ + $H_{13'}$ + $H_{15'}$),** 6.84 (dt, *J* = 15.1, 5.9 Hz, 1H, **$H_{18'}$**), 6.76 – 6.69 (m, 1H, **$H_{14'}$**), 6.64 (dd, *J* = 7.8, 2.5 Hz, 1H, **$H_{5'}$**), 6.38 (d, *J* = 15.0 Hz, 1H, **$H_{17'}$**), 6.04 (s, 1H, **H_{10}**), 4.43 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H, **$H_{19'}$**), 4.20 (d, *J* = 3.4 Hz, 2H, **H_{11}**), 3.71 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, **H_{13}**), 2.66 (s, 2H, **H_{14}**), 2.22 (s, 3H, **H_8**).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-d_6) δ 162.6 (**C**), 159.1 (**C**), 157.2 (**C**), 156.5 (**C**), 154.9 (**C**), 152.6 (**C**), 149.9 (**CH_{Ar}-C_2**), 142.3 (**C**), 140.5 (**C**), 138.8 (**C**), 133.9 (**CH-$C_{18'}$**), 130.1 (**CH_{Ar}-$C_{2'}$**), 129.6 (**CH_{Ar}-$C_{13'}$**), 128.4 (**CH-C_{10}**), 126.7 (**CH-$C_{17'}$**), 125.2 (**CH_{Ar}-C_6**), 114.7 (**C**), 114.3 (**C**), 114.1 (**CH_{Ar}-$C_{6'}$**), 113.6 (**CH_{Ar}-$C_{14'}$**), 112.2 (**CH_{Ar}-$C_{5'}$**), 109.8 (**CH_{Ar}-$C_{11'}$**), 109.2 (**CH_{Ar}-$C_{15'}$**), 109.1 (**C**), 43.4 (**CH_2-$C_{19'}$**), 43.4 (**CH_2-C_{11}**), 40.5 (**CH_2-C_{13}**), 27.3 (**CH_2-C_{14}**), 12.9 (**CH_3-C_8**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{29}H_{28}ClN_6O_3$ $[M+H]^+$: 543.1906, found: 543.1899.

Purity (HPLC): 95.5 %.

3,3'-Oxydianiline (272)



Chemical Formula: $C_{12}H_{12}N_2O$
Molecular Weight: 200.24

The reaction was carried out as described in general procedure **G** using 3-aminophenol (299 mg, 2.74 mmol, 1.2 equiv.), iodoaniline (275 µL, 2.28 mmol, 1.0 equiv.), CuI (22 mg, 0.11 mmol, 5 mol%), picolinic acid (28 mg, 0.23 mmol, 10 mol%) and K_3PO_4 (970 mg, 4.57 mmol, 2.0 equiv.). The residue was purified by flash chromatography on silica gel using a solvent system of PE/EtOAc (7/3) to afford **272** (395 mg, 1.98 mmol, 87 %) as an orange solid.

R_f (PE/EtOAc 6/4): 0.25.

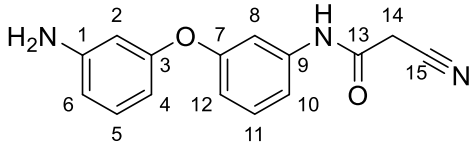
IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3432, 3357, 3219, 1621, 1602, 1582, 1461, 1313, 1283, 1184, 1154, 1138, 996, 975, 847, 772, 686.

^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 7.08 (t, *J* = 8.0 Hz, 4H, **H_5**), 6.45 – 6.37 (m, 8H, **H_2 + H_6**), 6.34 (t, *J* = 2.2 Hz, 4H, **H_4**).

^{13}C NMR (63 MHz, $CDCl_3$) δ 158.4 (**C-C_3**), 148.0 (**C-C_1**), 130.4 (**2 x CH_{Ar}-C_5**), 110.1 (**2 x CH_{Ar}-$C_{2/6}$**), 109.3 (**2 x CH_{Ar}-$C_{6/2}$**), 105.8 (**2 x CH_{Ar}-C_4**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{12}H_{13}N_2O$ $[M+H]^+$: 201.1022, found: 201.1022.

N-(3-(3-Aminophenoxy)phenyl)-2-cyanoacetamide (274)



Chemical Formula: $C_{15}H_{13}N_3O_2$
Molecular Weight: 267.29

In a 20 mL microwave reaction vial, **272** (291 mg, 1.45 mmol, 1.2 equiv.) was dissolved in dry THF (1.2 mL) then methyl cyanoacetate (120 mg, 1.21 mmol, 1.0 equiv.) and DABAl-Me_3 (148 mg, 0.97 mmol, 0.8 equiv..) were successively added. The vial was sealed and the reaction mixture was submitted to microwave irradiations at 130 °C for 8 min. The reaction was cooled to rt, quenched with addition of a 1 M HCl aqueous solution (8 mL), diluted with H_2O (10 mL) and the aqueous layer was extracted with DCM (3 x 10 mL). The combined organic layers were dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash chromatography on silica gel PE/EtOAc (50/50) to afford **274** (165 mg, 0.62 mmol, 51 %) as a colourless oil.

R_f (PE/EtOAc 6/4): 0.20.

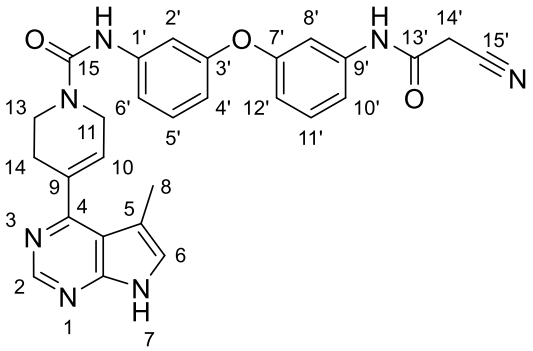
IR (ATR diamond, cm^{-1}) v: 2972, 2048, 1684, 1684, 1601, 1553, 1484, 1442, 1277, 1153, 1043, 878, 777.

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-d_6) δ 0.32 (s, 1H, **NH**), 7.33 – 7.23 (m, 2H, **H_{11}+H_4**), 7.23 – 7.15 (m, 1H, **H_{12}**), 7.00 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, **H_5**), 6.73 (dt, *J* = 6.8, 2.5 Hz, 1H, **H_{10}**), 6.34 (ddd, *J* = 8.0, 2.1, 1.0 Hz, 1H, **H_6**), 6.19 (t, *J* = 2.2 Hz, 1H, **H_2**), 6.14 (ddd, *J* = 8.0, 2.4, 1.0 Hz, 1H, **H_8**), 5.22 (s, 2H, **NH_2**), 3.86 (s, 2H, **H_{14}**).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-d_6) δ 161.1 (**C-C_{13}**), 157.5 (**C**), 157.2 (**C**), 150.5 (**C-C_1**), 139.7 (**C-C_9**), 130.1 (**CH_{Ar}-C_5**), 130.1 (**CH_{Ar}-C_{11}**), 115.8 (**C-C_{15}**), 113.8 (**CH_{Ar}-C_{10}**), 113.5 (**CH_{Ar}-C_4**), 109.6 (**CH_{Ar}-C_6**), 108.9 (**CH_{Ar}-C_{12}**), 106.1 (**CH_{Ar}-C_8**), 104.2 (**CH_{Ar}-C_2**), 26.8 (**CH_2-C_{14}**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{15}H_{14}N_3O_2$ $[M+H]^+$: 268.1085 found: 268.1081.

N-(3-(3-(2-Cyanoacetamido)phenoxy)phenyl)-4-(5-methyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxamide (275)



Chemical Formula: $C_{28}H_{25}N_7O_3$
Molecular Weight: 507.55

The reaction was carried out as described in general procedure **A** using aniline **274** (164 mg, 0.62 mmol, 1.0 equiv.), 4-nitrophenyl chloroformate (149 mg, 0.74 mmol, 1.2 equiv.), DIPEA (379 µL, 2.23 mmol, 3.6 equiv.) and amine **8** (213 mg, 0.74 mmol, 1.2 equiv.) in dry THF (8.8 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH/NH_4OH from 100 up to 95/5/1 to afford compound **275** (162 mg, 0.32 mmol, 52 %) as a white powder.

R_f (DCM/MeOH/NH_4OH 94/6/1): 0.50.

Mp: 189-191 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3997, 2257, 1987, 1645, 1597, 1542, 1534, 1488, 1439, 1227, 1064.

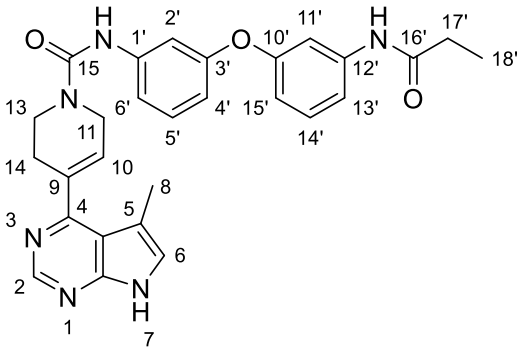
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.83 (s, 1H, **NH**), 10.35 (s, 1H, **NH**), 8.68 (s, 1H, **NH**), 8.64 (s, 1H, **H_2**), 7.36 – 7.20 (m, 7H, **H_6 + $H_{12'}$ + $H_{11'}$ + $H_{4'}$ + $H_{6'}$+ $H_{5'}$ + $H_{10'}$**), 6.77 (dt, *J* = 7.6, 2.0 Hz, 1H, **$H_{2'}$**), 6.66 – 6.61 (m, 1H, **$H_{8'}$**), 6.08 – 5.99 (m, 1H, **H_{10}**), 4.20 (d, *J* = 3.0 Hz, 2H, **H_{11}**), 3.87 (s, 2H, **$H_{14'}$**), 3.71 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, **H_{13}**), 2.66 (brs, 2H, **H14**), 2.22 (s, 3H, **H_8**).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 161.2 (**C**), 159.3 (**C**), 157.4 (**C**), 156.4 (**C**), 154.8 (**C**), 152.6 (**C**), 150.0 (**CH_{Ar}-C_2**), 142.3 (**C**), 139.8 (**C**), 134.1 (**C**), 130.3 (**CH_{Ar}-$C_{11'}$**), 129.6 (**CH_{Ar}-$C_{5'}$**), 128.3 (**CH-C_{10}**), 125.1 (**CH_{Ar}-C_6**), 115.8 (**CH_{Ar}-$C_{15'}$**), 114.8 (**C**), 114.3 (**C**), 113.9 (**CH_{Ar}-$C_{10'}$**), 113.8 (**CH_{Ar}-$C_{2'}$**), 112.3 (**CH_{Ar}-$C_{8'}$**), 110.0 (**CH_{Ar}-$C_{6'}$**), 109.0 (**C**), 108.9 (**CH_{Ar}-$C_{12'}$**), 43.6 (**CH_2-C_{11}**), 40.6 (**CH_2-C_{13}**), 27.3 (**CH_2-C_{14}**), 26.8 (**CH_2-$C_{14'}$**), 12.9 (**CH_3-C_8**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{28}H_{26}N_7O_3$ $[M+H]^+$: 508.2092, found: 508.2093.

Purity (HPLC): 96.6 %.

4-(5-Methyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-*N*-(3-(3-propionamidophenoxy)phenyl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxamide (278)



Chemical Formula: $C_{28}H_{28}N_6O_3$
Molecular Weight: 496.57

Step 1: To a solution of **280** (193 mg, 0.54 mmol, 1.0 equiv.) in 1,4-dioxane (1 mL) cooled at 0 °C was added a solution of HCl 4N in dioxane (1.1 mL, 4.32 mmol, 8.0 equiv.). The reaction mixture was stirred at rt for 4 h then the solvent was removed *in vacuo*. The resulting HCl salt **281** (white solid) was used in the next step without further purification. The yield was considered quantitative.

Step 2: The reaction was carried out as described in general procedure **A** using aniline-HCl salt **281** (158 mg, 0.54 mmol), 4-nitrophenyl chloroformate (131 mg, 0.65 mmol, 1.2 equiv.), DIPEA (338 µL, 1.94 mmol, 3.6 equiv.) and amine **8** (186 mg, 0.65 mmol, 1.2 equiv.) in dry THF (8 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH/NH_4OH from 100 up to 95/5/1 to afford compound **278** (155 mg, 0.31 mmol, 57 %) as a white powder.

R_f (DCM/MeOH/NH_4OH 28% 94/5/1): 0.25.

Mp: 161-163 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3689, 3001, 2184, 2154, 2010, 1966, 1923, 1414, 1081, 1068, 1058, 1048, 656, 648, 630.

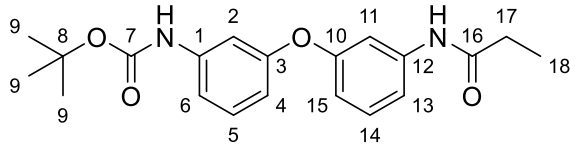
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.82 (s, 1H, **NH**), 9.91 (s, 1H, **NH**), 8.67 (s, 1H, **NH**), 8.64 (s, 1H, **H_2**), 7.37 – 7.23 (m, 7H, **H_6 + $H_{2'}$ + $H_{4'}$ + $H_{6'}$ + $H_{11'}$ + $H_{13'}$ + $H_{15'}$**), 6.72 – 6.65 (m, 1H, **$H_{14'}$**), 6.65 – 6.58 (m, 1H, **$H_{5'}$**), 6.03 (s, 1H, **H_{10}**), 4.20 (s, 2H, **H_{11}**), 3.71 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H, **H_{13}**), 2.66 (s, 2H, **H_{14}**), 2.29 (q, *J* = 7.6 Hz, 2H, **$H_{17'}$**), 2.22 (s, 3H, **H_8**), 1.05 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H, **$H_{18'}$**).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-d_6) δ 172.1 (**C**), 159.3 (**C**), 157.1 (**C**), 156.6 (**C**), 154.8 (**C**), 152.6 (**C**), 150.1 (**CH_{Ar}-C_2**), 142.2 (**C**), 140.9 (**C**), 134.2 (**C**), 129.9 (**CH_{Ar}-$C_{2'}$**), 129.5 (**CH_{Ar}-$C_{13'}$**), 128.2 (**CH-C_{10}**), 125.0 (**CH_{Ar}-C_6**), 114.6 (**C**), 114.3 (**C**), 113.7 (**CH_{Ar}-$C_{6'}$**), 113.0 (**CH_{Ar}-$C_{14'}$**), 112.1 (**CH_{Ar}-$C_{5'}$**), 109.8 (**CH_{Ar}-$C_{11'}$**), 109.0 (**CH_{Ar}-$C_{15'}$**), 108.9 (**C**), 43.6 (**CH_2-C_{11}**), 40.6 (**CH_2-C_{13}**), 29.5 (**CH_2-$C_{17'}$**), 27.3 (**CH_2-C_{14}**), 12.9 (**CH_3-C_8**), 9.5 (**CH_3-$C_{18'}$**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{28}H_{29}N_6O_3$ $[M+H]^+$: 497.2296, found: 497.2290.

Purity (HPLC): 96.4 %.

tert-Butyl (3-(3-propionamidophenoxy)phenyl)carbamate (280)



Chemical Formula: $C_{20}H_{24}N_2O_4$
Molecular Weight: 356.42

To a solution of **251** (240 mg, 0.80 mmol) in dry THF (4 mL) were added DIPEA (272 µL, 1.60 mmol, 2.0 equiv.) and propionyl chloride (140 µL, 1.60 mmol, 2.0 equiv.) and the reaction was stirred at rt for 16 h. EtOAc was added (20 mL) then the organic phase was washed with a saturated aqueous solution of NH_4Cl (2 x 15 mL),brine (2 x 15 mL), dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash chromatography on silica gel using a solvent system of PE/EtOAc (7/3) to afford **280** (193 mg, 0.54 mmol, 68 %) as a yellow oil

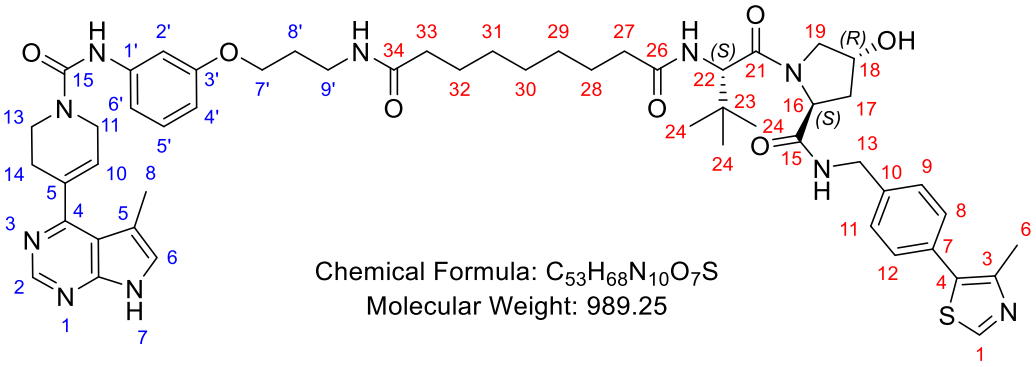
R_f (PE/EtOAc 7/3): 0.48.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3309, 2978, 2927, 1698, 1670, 1597, 1537, 1487, 1438, 1392, 1367, 1272, 1236, 1154, 1052, 983, 911, 873, 775, 732.

^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 9.90 (s, 1H, **NH**), 9.42 (s, 1H, **NH**), 7.39 – 7.15 (m, 6H, **H_6 + H_4 + H_2 + H_{11} + H_{15} + H_{13}**), 6.73 – 6.53 (m, 2H, **H_5 + H_{14}**), 2.28 (q, *J* = 7.6 Hz, 2H, **H_{17}**), 1.45 (s, 9H, **H_9**), 1.05 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H, **H_{18}**).

^{13}C NMR (63 MHz, $CDCl_3$) δ 157.8 (**C**), 157.6 (**C**), 152.7 (**C**), 139.9 (**C**), 139.4 (**C**), 130.2 (2CH-**C2** + **C13**), 114.6 (**CH_{Ar}**), 114.4 (**CH_{Ar}**), 113.8 (**CH_{Ar}**), 110.4 (**CH_{Ar}**), 109.7 (**CH_{Ar}**), 80.9 (**C-C_8**), 30.8 (**CH_2-C_{17}**), 28.4 (**3 x CH_3-C_9**), 9.7 (**CH_3-C_{18}**).

N-((*S*)-1-((2*S*,4*R*)-4-Hydroxy-2-((4-(4-methylthiazol-5-yl)benzyl)carbamoyl)pyrrolidin-1-yl)-3,3-dimethyl-1-oxobutan-2-yl)-*N*-(3-(3-(4-(5-methyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-1,2,3,6-tetrahydropyridine-1-carboxamido)phenoxy)propyl)nonanediamide (283)



Step 1: Amine deprotection

To a solution of **128** (93 mg, 0.18 mmol) in dry DCM (1.8 mL) cooled at 0 °C was added a 4 M solution of HCl in 1,4-dioxane (0.37 mL, 1.47 mmol, 8.0 equiv.). The reaction mixture was stirred at rt for 1 h then the precipitate was filtered, washed with Et_2O (3 x 20 mL) and dried to afford the corresponded amine (crude). The yield was considered quantitative and the product was used without further purification in the amide step formation.

Step 2: Ester hydrolysis

To a solution of **286** (170 mg, 0.26 mmol) in dry DCM (2.6 mL) cooled at 0 °C was added a 4 M solution of HCl in 1,4-dioxane (0.52 mL, 2.08 mmol, 8.0 equiv.). The reaction mixture was stirred at rt for 4 h then the reacton mixture was concentrated *in vacuo* and co-evaporated with Et_2O (3 x 20 mL) to afford the carboxylic acid **287** (crude). The yield was considered quantitative and the product was used without further purification in the amide step formation.

Step 3: Amide formation

To a suspension of the crude amine and the crude carboxylic acid **287** in dry DMF (1.8 mL), cooled at 0 °C, were added DIPEA (125 µL, 0.72 mmol, 4.0 equiv.) and HATU (137 mg, 0.36 mmol, 2.0 equiv.). The resulting solution was left to come to rt and stirred at rt for 18 h. The reaction mixture was diluted with H_2O (15 mL), the aqueous layer was separated and extracted with DCM (3 x 40 mL). The combined organic layers were dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 100 up to 90/10. The fractions containing the desired product were combined and concentrated *in vacuo* (purity: 63%). The residue was purified by reverse phase chromatography on C18 using a gradient solvent system of (H_2O + 0.2 % *i*-$PrNH_2$)/EtOH from 60/40 to 2/98. The desired fractions were combined, concentrated and lyophilized (purity: 85 %). The residue was purified by preparative SFC on C18 using a gradient solvent system of CO_2/EtOH from 80/20 to 57/43 to afford **283** (8.5 mg, 8.6 x 10^{-3} mmol, 5 %) as a white solid.

R_f (DCM/MeOH 90/10) 0.40.

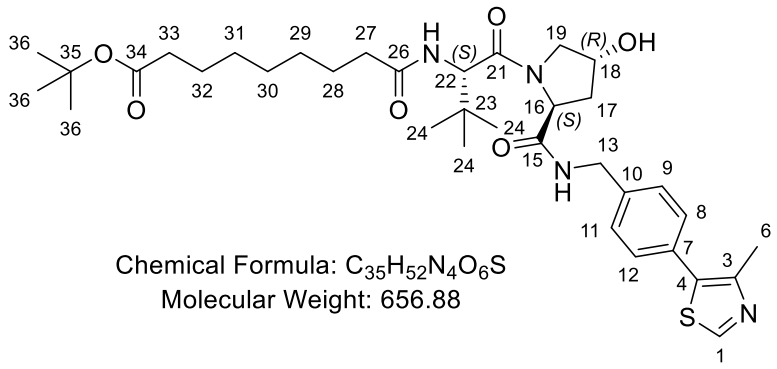
^{1}H NMR (700 MHz, DMSO-d_6) δ 11.82 (s, 1H, **NH**), 8.98 (s, 1H, H_1), 8.64 (s, 1H, H_2), 8.57 – 8.53 (m, 2H, **2 x NH**), 7.87 – 7.80 (m, 2H, **2 x NH**), 7.44 – 7.36 (m, 4H, H_8 + H_9 + H_{11} + H_{12}), 7.33 – 7.30 (m, 1H, H_{Ar}), 7.20 (t, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.12 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.09 – 7.05 (m, 1H, H_{Ar}), 6.50 (dd, *J* = 8.1, 2.6 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.06 – 6.02 (m, 1H, H_{10}), 5.11 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H, **OH**), 4.53 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H, H_{22}), 4.45 – 4.39 (m, 2H, H_{16} + H_{13a}), 4.36 – 4.33 (m, 1H, H_{18}), 4.25 – 4.18 (m, 3H, H_{11} + H_{13b}), 3.92 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, $H_{7'}$), 3.72 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, H_{13}), 3.69 – 3.61 (m, 2H, H_{19}), 3.21 – 3.15 (m, 2H, $H_{9'}$), 2.68 – 2.66 (m, 2H, H_{14}), 2.44 (s, 3H, H_6), 2.28 – 2.21 (m, 4H, H_8 + CH_2), 2.13 – 2.06 (m, 1H, CH_2), 2.06 – 1.99 (m, 3H, H_{17a} + CH_2), 1.93 – 1.86 (m, 1H, H_{17b}), 1.82 (p, *J* = 6.6 Hz, 2H, $H_{8'}$), 1.52 – 1.41 (m, 4H, **2 x** CH_2), 1.25 – 1.19 (m, 6H, **3 x** CH_2), 0.92 (s, 9H, H_{24}).

^{13}C NMR (176 MHz, DMSO-d_6) δ 172.1 (**C**), 172.1 (**C**), 171.9 (**C**), 169.7 (**C**-C_{21}), 159.4 (**C**), 158.7 (**C**), 155.0 (**C**), 152.6 (**C**), 151.4 (CH_{Ar}-C_1), 150.1 (CH_{Ar}-C_2), 147.7 (**C**-C_3), 141.7 (**C**), 139.5 (**C**-C_{10}), 134.2 (**C**), 131.2 (**C**-C_4), 129.6 (**C**-C_7), 129.0 (CH_{Ar}), 128.6 (**2 x** CH_{Ar}-C_8 + C_{12}), 128.3 (**CH**-C_{10}), 127.4 (**2 x** CH_{Ar}-C_9 + C_{11}), 125.0 (CH_{Ar}), 114.3 (**C**), 111.9 (CH_{Ar}), 108.9 (**C**), 107.8 (CH_{Ar}), 105.9 (CH_{Ar}), 68.8 (**CH**-C_{18}), 65.0 (CH_2-$C_{7'}$), 58.7 (**CH**-C_{16}), 56.3 (CH_2-C_{19} + **CH**-C_{22}), 43.6 (CH_2-C_{11}), 41.6 (CH_2-C_{13}), 40.6 (CH_2-C_{13}), 37.9 (CH_2-C_{17}), 35.4 (CH_2-$C_{9'}$ + CH_2), 35.2 (**C**-C_{23}), 34.8 (CH_2), 29.0 (CH_2-$C_{8'}$), 28.6 (**2 x** CH_2), 28.5 (CH_2), 27.3 (CH_2-C_{14}), 26.4 (**3 x** CH_3-C_{24}), 25.4 (CH_2), 25.3 (CH_2), 15.9 (CH_3-C_6), 12.9 (CH_3-C_8).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{53}H_{69}N_{10}O_7S$ $[M+H]^+$: 989.5066, found: 989.5065.

Purity (HPLC): 90.9 %.

tert-Butyl 9-(((*S*)-1-((2*S*,4*R*)-4-hydroxy-2-((4-(4-methylthiazol-5-yl)benzyl)carbamoyl)pyrrolidin-1-yl)-3,3-dimethyl-1-oxobutan-2-yl)amino)-9-oxononanoate (286)



To a suspension of **284** (CAS: 1448189-80-7) (160 mg, 0.34 mmol) in dry DMF (3.4 mL) cooled at 0 °C were added 9-(*tert*-butoxy)-9-oxononanoic acid (164 µL, 0.68 mmol, 2.0 equiv.), DIPEA (178 µL, 1.02 mmol, 3.0 equiv.) and HATU (259 mg, 0.68 mmol, 2.0 equiv.). The resulting solution was allowed to come to rt, then stirred at rt for 18 h. The reaction mixture was diluted with H_2O (15 mL), the aqueous layer was separated and extracted with EtOAc (3 x 30 mL). The combined organic layers were dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 100 up to 95/5 to afford compound **286** (184 mg, 0.28 mmol, 82 %) as a colourless oil.

R_f (DCM/MeOH 98/2) 0.25.

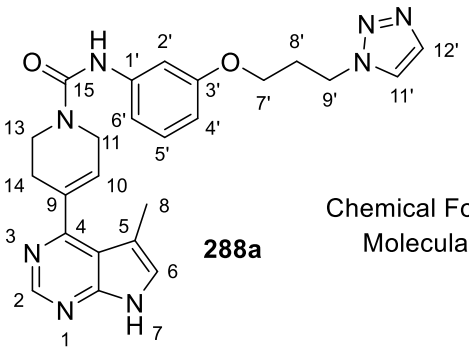
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 8.70 (s, 1H, **H_1**), 7.60 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H, **NH**), 7.35 (s, 4H, **H_8 + H_9 + H_{11} + H_{12}**), 6.57 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, **NH**), 4.68 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, **H_{16}**), 4.60 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, **H_{22}**), 4.57 – 4.48 (m, 2H, **H_{18} + H_{13a}**), 4.35 (dd, *J* = 15.2, 5.4 Hz, 1H, **H_{13b}**), 4.01 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H, **H_{19a}**), 3.73 – 3.65 (m, 1H, **H_{19b}**), 2.50 (s, 3H, **H_6**), 2.40 – 2.27 (m, 1H, **H_{17a}**), 2.23 – 2.09 (m, 5H, **H_{17b} + 2 x CH_2**), 1.65 – 1.50 (m, 4H, **2 x CH_2**), 1.43 (s, 9H, **H_{36}**), 1.31 – 1.25 (m, 6H, **3 x CH_2**), 0.97 (s, 9H, **H_{24}**).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 173.6 (**C-C_{34}**), 173.3 (**C-C_{26}**), 171.5 (**C-C_{21}**), 171.3 (**C-C_{15}**), 150.4 (**CH_{Ar}-C_1**), 148.2 (**C-C_3**), 138.3 (**C-C_{10}**), 131.6 (**C-C_4**), 130.6 (**C-C_7**), 129.3 (**2 x CH_{Ar}-C_8 + C_{12}**), 127.9 (**2 x CH_{Ar}-C_9 + C_{11}**), 79.9 (**C-C_{35}**), 69.8 (**CH-C_{18}**), 58.9 (**CH-C_{16}**), 57.3 (**CH-C_{22}**), 56.8 (**CH_2-C_{19}**), 43.0 (**CH_2-C_{13}**), 36.6 (**CH_2-C_{17}**), 36.3 (**CH_2**), 35.4 (**CH_2**), 35.3 (**C-C_{23}**), 28.9 (**CH_2**), 28.8 (**CH_2**), 28.8 (**CH_2**), 28.0 (**3 x CH_3-C_{36}**), 26.4 (**3 x CH_3-C_{24}**), 25.5 (**CH_2**), 24.9 (**CH_2**), 15.9 (**CH_3-C_6**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{35}H_{53}N_4O_6S$ $[M+H]^+$: 657.3680, found: 657.3681.

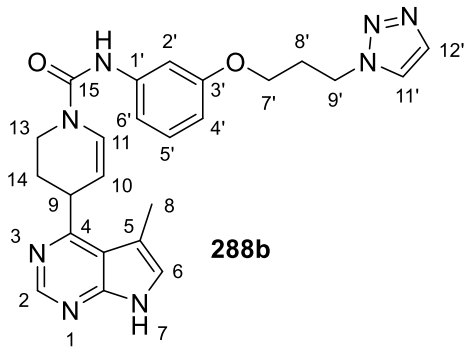
N-(3-(3-(1H-1,2,3-Triazol-1-yl)propoxy)phenyl)-4-(5-methyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxamide (288a)

N-(3-(3-(1*H*-1,2,3-Triazol-1-yl)propoxy)phenyl)-4-(5-methyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-3,4-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxamide (288b)



288a

Chemical Formula: $C_{24}H_{26}N_8O_2$
Molecular Weight: 458.53



288b

In a 5 mL microwave reaction vial loaded with **290** (70 mg, 0.16 mmol) were added MeOH (1.0 mL) and DMF (1.5 mL). The solution was degassed with argon for 15 min then K_2CO_3 (26 mg, 0.19 mmol, 1.2 equiv.), $CuSO_4.5H_2O$ (5 mg, 0.03 mmol, 0.2 equiv.) and trimethylsilylacetylene (27 µL, 0.19 mmol, 1.2 equiv.) were added. The vial was sealed and the reaction mixture was stirred at rt for 56 h. The reaction mixture was diluted with DCM (40 mL) and the organic layer was washed with an aqueous solution of NH_4OH 5% (10 mL). The aqueous layer was extracted with DCM (2 x 15 mL) and the combined organic layers were dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH/NH_4OH from 100 up to 95/5/1 to afford compounds **288a** (11 mg, 0.03 mmol, 16 %) and **288b** (22 mg, 0.05 mmol, 31 %) as white powders.

- **288a:**

R_f (DCM/MeOH/NH_4OH 95/5/1) 0.25.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 11.82 (s, 1H, **NH**), 8.64 (s, 1H, **H_2**), 8.55 (s, 1H, **NH**), 8.16 (s, 1H, **$H_{11'}$**), 7.73 (s, 1H, **$H_{12'}$**), 7.31 (brs, 1H, **H_{Ar}**), 7.21 (brs, 1H, **H_{Ar}**), 7.16 – 7.06 (m, 2H, **2 x H_{Ar}**), 6.51 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 6.04 (brs, 1H, **H_{10}**), 4.56 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, **$H_{9'}$**), 4.24 – 4.18 (m, 2H, **H_{11}**), 3.92 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H, **$H_{7'}$**), 3.72 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, **H_{13}**), 2.71 – 2.63 (m, 2H, **H_{14}**), 2.32 – 2.26 (m, 2H, **$H_{8'}$**), 2.23 (s, 3H, **H_8**).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 159.3 (**C**), 158.4 (**C**), 154.9 (**C**), 152.6 (**C**), 150.1 (**CH_{Ar}-C_2**), 141.8 (**C**), 134.2 (**C**), 133.2 (**CH-$C_{12'}$**), 129.0 (**CH_{Ar}**), 128.2 (**CH-C_{10}**), 125.0 (**CH_{Ar}**), 124.8 (**CH-$C_{11'}$**), 114.3 (**C**), 112.1 (**CH_{Ar}**), 108.9 (**C**), 107.8 (**CH_{Ar}**), 105.8 (**CH_{Ar}**), 64.2 (**CH_2-$C_{7'}$**), 46.3 (**CH_2-$C_{9'}$**), 43.6 (**CH_2-C_{11}**), 40.6 (**CH_2-C_{13}**), 29.6 (**CH_2-$C_{8'}$**), 27.3 (**CH_2-C_{14}**), 12.9 (**CH_3-C_8**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{24}H_{27}N_8O_2$ $[M+H]^+$: 459.2251, found: 459.2252.

Purity (HPLC): 95.7 %.

- **288b:**

R_f (DCM/MeOH/NH_4OH 95/5/1) 0.28.

Mp: 124-126 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3121, 2970, 2360, 2089, 1637, 1597, 1538, 1436, 1339, 1232, 1191, 1063, 965, 773, 687, 612, 600, 569.

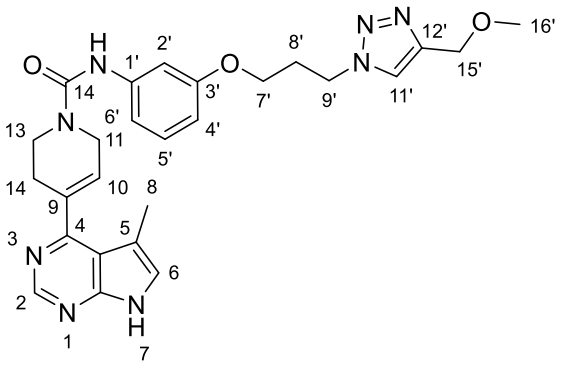
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.75 (s, 1H, **NH**), 8.82 (s, 1H, **NH**), 8.61 (s, 1H, **H_2**), 8.16 (brs, 1H, **$H_{11'}$**), 7.73 (brs, 1H, **$H_{12'}$**), 7.30 – 7.24 (m, 1H, **H_{Ar}**), 7.23 – 7.07 (m, 3H, **3 x H_{Ar}**), 7.07 (dd, *J* = 8.3, 2.1 Hz, 1H, **H_{11}**), 6.59 – 6.51 (m, 1H, **H_6**), 4.94 (dd, *J* = 8.4, 3.1 Hz, 1H, **H_{10}**), 4.56 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, **$H_{9'}$**), 4.30 – 4.20 (m, 1H, **H_9**), 4.09 – 3.98 (m, 1H, **H_{13a}**), 3.92 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H, **$H_{7'}$**), 3.71 – 3.60 (m, 1H, **H_{13b}**), 2.44 (s, 3H, **H_8**), 2.29 (p, *J* = 6.5 Hz, 2H, **$H_{8'}$**), 2.22 – 2.13 (m, 2H, **H_{14}**).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 163.7 (**C**), 158.4 (**C**), 152.3 (**C**), 151.7 (**C**), 150.6 (**CH_{Ar}-C_2**), 141.1 (**C**), 133.3 (**CH-$C_{12'}$**), 129.1 (**CH_{Ar}**), 125.7 (**CH-C_{11}**), 124.8 (**CH-$C_{11'}$**), 124.0 (**CH_{Ar}**), 115.4 (**C**), 112.5 (**CH_{Ar}**), 108.5 (**C**), 108.4 (**CH_{Ar}-C_6**), 106.3 (**CH-C_{10}**), 106.3 (**CH_{Ar}**), 64.2 (**CH_2-$C_{7'}$**), 46.3 (**CH_2-$C_{9'}$**), 40.6 (**CH_2-C_{13}**), 36.0 (**CH-C_9**), 29.6 (**CH_2-$C_{8'}$**), 27.3 (**CH_2-C_{14}**), 12.3 (**CH_3-C_8**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{24}H_{27}N_8O_2$ $[M+H]^+$: 459.2251, found: 459.2253.

Purity (HPLC): > 99.9 %.

N-(3-(3-(4-(Methoxymethyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)propoxy)phenyl)-4-(5-methyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxamide (289)



Chemical Formula: $C_{26}H_{30}N_8O_3$
Molecular Weight: 502.58

In a 20 mL microwave reaction vial, **290** (90 mg, 0.21 mmol) was dissolved in a mixture of *t*-BuOH/H_2O/DMF (3.15/2.1/3.15 mL) then methyl propargyl ether (19 µL, 0.23 mmol, 1.1 equiv.), sodium ascorbate (50 mg, 0.25 mmol, 1.2 equiv.) and $CuSO_4.5H_2O$ (10 mg, 0.04 mmol, 0.2 equiv.) were added under argon atmosphere. The vial was sealed and the reaction mixture was stirred at rt for 18 h. Most of the solvent was removed *in vacuo* by co-evaporation with heptane (3 x 20 mL) then the residue was suspended in DCM/MeOH (30 mL) and H_2O (15 mL) was added. The precipitate formed was filtered, washed with DCM and the filtrate was concentrated *in vacuo*. The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH/NH_4OH from 100 up to 96/4/1 to afford compound **289** (31 mg, 0.06 mmol, 29 %) as an orange solid.

R_f (DCM/MeOH/NH_4OH 95/5/1) 0.25.

Mp: 99-101 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) v: 3138, 2924, 1643, 1594, 1537, 1436, 1233, 1193, 1160, 1093, 1048, 772, 689, 612.

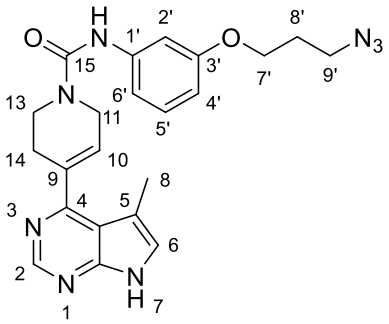
^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-d_6) δ 11.82 (s, 1H, **NH**), 8.65 (s, 1H, **H_2**), 8.56 (s, 1H, **NH**), 8.14 (s, 1H, **$H_{11'}$**), 7.37 – 7.30 (m, 1H, **H_{Ar}**), 7.24 – 7.19 (m, 1H, **H_{Ar}**), 7.19 – 7.06 (m, 2H, **2 x H_{Ar}**), 6.57 – 6.47 (m, 1H, **H_{Ar}**), 6.09 – 6.01 (m, 1H, **H_{10}**), 4.53 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, **$H_{9'}$**), 4.45 (s, 2H, **$H_{15'}$**), 4.28 – 4.17 (m, 2H, **H_{11}**), 3.93 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, **$H_{7'}$**), 3.73 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, **H_{13}**), 3.26 (s, 3H, **$H_{16'}$**), 2.74 – 2.63 (m, 2H, **H_{14}**), 2.35 – 2.20 (m, 5H, **H_8 + $H_{8'}$**).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-d_6) δ 159.3 (**C**), 158.4 (**C**), 154.9 (**C**), 152.6 (**C**), 150.1 (**CH_{Ar}-C_2**), 143.8 (**C**), 141.7 (**C**), 134.2 (**C**), 129.0 (**CH_{Ar}**), 128.2 (**CH-C_{10}**), 125.0 (**CH_{Ar}**), 123.9 (**CH_{Ar}-$C_{11'}$**), 114.3 (**C**), 112.1 (**CH_{Ar}**), 108.8 (**C**), 107.8 (**CH_{Ar}**), 105.9 (**CH_{Ar}**), 64.9 (**CH_2-$C_{15'}$**), 64.2 (**CH_2-$C_{7'}$**), 57.2 (**CH_3-$C_{16'}$**), 46.5 (**CH_2-$C_{9'}$**), 43.6 (**CH_2-C_{11}**), 40.6 (**CH_2-C_{13}**), 29.5 (**CH_2-$C_{8'}$**), 27.3 (**CH_2-C_{14}**), 12.9 (**CH_3-C_8**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{26}H_{31}N_8O_3$ $[M+H]^+$: 503.2514, found: 503.2516.

Purity (HPLC): 99.0 %.

N-(3-(3-Azidopropoxy)phenyl)-4-(5-methyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxamide (290)



Chemical Formula: $C_{22}H_{24}N_8O_2$
Molecular Weight: 432.49

The reaction was carried out as described in general procedure **A** using aniline **292** (388 mg, 2.02 mmol), 4-nitrophenyl chloroformate (488 mg, 2.42 mmol, 1.2 equiv.), DIPEA (1.27 mL, 7.27 mmol, 3.6 equiv.) and amine **8** (695 mg, 2.42 mmol, 1.2 equiv.) in dry THF (29 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 100 up to 96/4 to afford compound **290** (688 mg, 1.59 mmol, 79 %) as a beige powder.

R_f (DCM/MeOH 95/5) 0.33.

Mp: 219-221 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3127, 2927, 2872, 2092, 1629, 1599, 1539, 1440, 1395, 1269, 1239, 1178, 1061, 963, 800, 732, 611, 600, 576, 569.

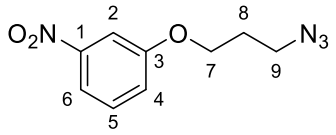
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d_6*) δ 11.82 (s, 1H, **NH**), 8.64 (s, 1H, **H_2**), 8.55 (s, 1H, **NH**), 7.34 – 7.28 (m, 1H, **H_{Ar}**), 7.22 (t, *J* = 2.2 Hz, 1H, **H_{Ar}**), 7.18 – 7.05 (m, 2H, **2 x H_{Ar}**), 6.57 – 6.49 (m, 1H, **H_{Ar}**), 6.08 – 6.01 (m, 1H, **H_{10}**), 4.25 – 4.18 (m, 2H, **H_{11}**), 3.99 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H, **$H_{7'}$**), 3.73 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, **H_{13}**), 3.51 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, **$H_{9'}$**), 2.70 – 2.65 (m, 2H, **H_{14}**), 2.24 (s, 3H, **H_8**), 1.98 (p, *J* = 6.5 Hz, 2H, **$H_{8'}$**).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d_6*) δ 159.3 (**C**), 158.5 (**C**), 154.9 (**C**), 152.6 (**C**), 150.1 (**CH_{Ar}-C_2**), 141.8 (**C**), 134.2 (**C**), 129.0 (**CH_{Ar}**), 128.3 (**CH-C_{10}**), 125.0 (**CH_{Ar}**), 114.3 (**C**), 112.0 (**CH_{Ar}**), 108.9 (**C**), 107.8 (**CH_{Ar}**), 105.8 (**CH_{Ar}**), 64.4 (**CH_2-$C_{7'}$**), 47.7 (**CH_2-$C_{9'}$**), 43.6 (**CH_2-C_{11}**), 40.6 (**CH_2-C_{13}**), 28.2 (**CH_2-$C_{8'}$**), 27.3 (**CH_2-C_{14}**), 12.9 (**CH_3-C_8**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{22}H_{25}N_8O_2$ $[M+H]^+$:, found:.

Purity (HPLC): > 99.9 %.

1-(3-Azidopropoxy)-3-nitrobenzene (291)



Chemical Formula: $C_9H_{10}N_4O_3$
Molecular Weight: 222.20

To a solution of **92** (1.39 g, 5.34 mmol) in dry DMF (11 mL) was added sodium azide (694 mg, 10.68 mmol, 2.0 equiv.) in one portion. The reaction mixture was stirred at 40 °C for 18 h then cooled to rt, diluted with EtOAc (220 mL) then washed with H_2O (2 x 10 mL) and brine (4 x 60 mL). The organic layer was dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo* to afford compound **291** (1.18 g, 5.31 mmol, 99 %) as a yellow oil. The product was used without further purification in the next step.

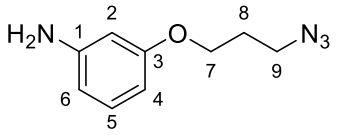
IR (ATR diamond, cm^{-1}) v: 2938, 2094, 1524, 1347, 1242, 1042, 860, 815, 736, 671.

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.83 (ddd, *J* = 8.2, 2.1, 0.9 Hz, 1H, **H_6**), 7.73 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H, **H_2**), 7.43 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H, **H_5**), 7.23 (ddd, *J* = 8.2, 2.5, 0.9 Hz, 1H, **H_4**), 4.14 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H, **H_7**), 3.55 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, **H_9**), 2.10 (p, *J* = 6.2 Hz, 2H, **H_8**).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 159.3 (**C-C_3**), 149.4 (**C-C_1**), 130.1 (**CH_{Ar}-C_5**), 121.7 (**CH_{Ar}-C_4**), 116.1 (**CH_{Ar}-C_6**), 108.9 (**CH_{Ar}-C_2**), 65.4 (**CH_2-C_7**), 48.2 (**CH_2-C_9**), 28.7 (**CH_2-C_8**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_9H_{11}N_4O_3$ $[M+H]^+$: 223.0826, found: 223.0828.

3-(3-Azidopropoxy)aniline (292)



Chemical Formula: $C_9H_{12}N_4O$
Molecular Weight: 192.22

A 0.75 mM solution of 4,4'-bipyridine was prepared by dissolving 24 mg of 4,4'-bipyridine in 20 mL of DMF.

291 was dissolved in the 4,4'-bipyridine solution [16 mL of the previous stock solution, 4,4'-bipyridine (1.2×10^{-2} mmol, 0.5 mol%)] then $B_2(OH)_4$ (651 mg, 7.26 mmol, 3.0 equiv.) was added. The reaction mixture was stirred at rt for 15 min then the solvent was mostly removed *in vacuo*. The residue was partitioned between EtOAc (60 mL) and H_2O (15 mL). The aqueous layer was extracted with EtOAc (2 x 40 mL) then the combined organic layers were dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of petroleum ether/EtOAc from 100 up to 70/30 to afford compound **292** (373 mg, 1.94 mmol, 80 %) as an orange liquid.

$\mathbf{R_f}$ (petroleum ether/EtOAc 80/20) 0.44.

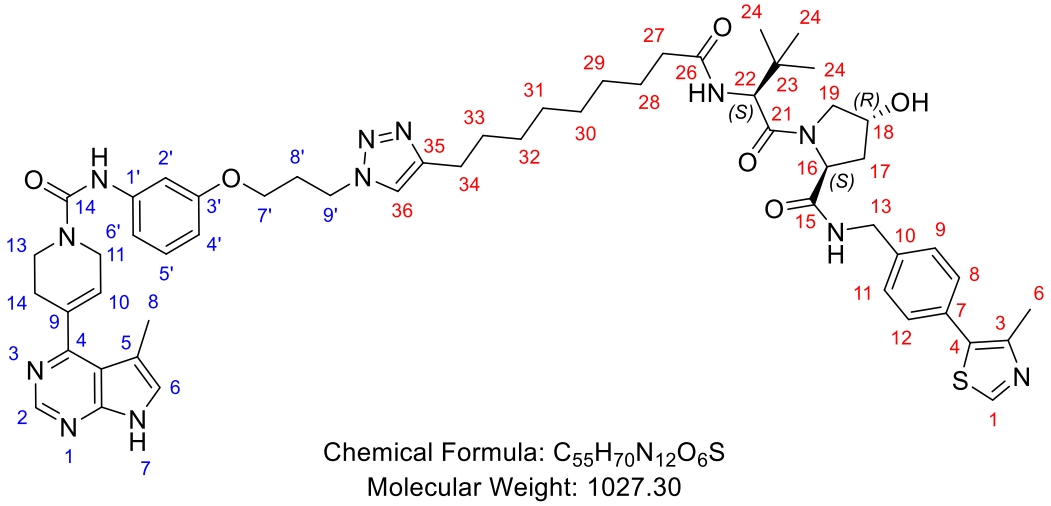
IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3370, 2933, 2878, 2093, 1621, 1599, 1494, 1463, 1288, 1186, 1155, 1042, 831, 760, 686.

^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 7.03 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, **H_5**), 6.35 – 6.24 (m, 2H, **H_4 + H_6**), 6.21 (t, *J* = 2.2 Hz, 1H, **H_2**), 3.98 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, **H_7**), 3.63 (brs, 2H, **NH_2**), 3.47 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, **H_9**), 2.00 (p, *J* = 6.4 Hz, 2H, **H_8**).

^{13}C NMR (63 MHz, $CDCl_3$) δ 160.0 (**C-C_3**), 147.9 (**C-C_1**), 130.3 (**CH_{Ar}-C_5**), 108.3 (**CH_{Ar}-$C_{4/6}$**), 104.7 (**CH_{Ar}-$C_{6/4}$**), 101.8 (**CH_{Ar}-C_2**), 64.4 (**CH_2-C_7**), 48.5 (**CH_2-C_9**), 29.0 (**CH_2-C_8**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_9H_{13}N_4O$ $[M+H]^+$: 193.1084, found: 193.1085.

N-(3-(3-(4-(9-(((*S*)-1-((2*S*,4*R*)-4-Hydroxy-2-((4-(4-methylthiazol-5-yl)benzyl)carbamoyl)pyrrolidin-1-yl)-3,3-dimethyl-1-oxobutan-2-yl)amino)-9-oxononyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)propoxy)phenyl)-4-(5-methyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxamide (295)



Chemical Formula: $C_{55}H_{70}N_{12}O_6S$
Molecular Weight: 1027.30

To a solution of **290** (56 mg, 0.13 mmol) in a mixture of *t*-BuOH/H_2O/DMF (2.25/1.5/2.25 mL) were added under argon atmosphere **300** (79 mg, 0.13 mmol), sodium ascorbate (32 mg, 0.16 mmol, 1.2 equiv.) and $CuSO_4.5H_2O$ (8 mg, 0.03 mmol, 0.2 equiv.). The reaction mixture was stirred at rt for 56 h then most of the solvent was removed *in vacuo* by co-evaporation with heptane (3 x 20 mL). The residue was dissolved DCM/MeOH (75 mL) and the organic layer was washed with H_2O (20 mL). The aqueous layer was separated and extracted with DCM (2 x 20 mL) then the combined organic layers were dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 100 up to 92/8 to afford compound **295** (79 mg, 0.08 mmol, 62 %) as a beige powder.

R_f (DCM/MeOH 95/5) 0.10.

Mp: 129-131 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) v: 3275, 2924, 2855, 1634, 1532, 1435, 1234, 1193, 1058, 772, 689.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.82 (s, 1H, **NH**), 8.97 (s, 1H, H_1), 8.65 (s, 1H, H_2), 8.60 – 8.49 (m, 2H, **2 x NH**), 7.86 (s, 1H, H_{36}), 7.82 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H, **NH**), 7.45 – 7.35 (m, 4H, H_8 + H_9 + H_{11} + H_{12}), 7.33 – 7.28 (m, 1H, H_{Ar}), 7.24 – 7.18 (m, 1H, H_{Ar}), 7.16 – 7.05 (m, 2H, **2 x** H_{Ar}), 6.50 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.08 – 6.00 (m, 1H, H_{10}), 5.11 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H, **OH**), 4.54 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H, H_{22}), 4.49 – 4.39 (m, 4H, H_{13a} + H_{16} + $H_{9'}$), 4.35 (brs, 1H, H_{18}), 4.26 – 4.17 (m, 3H, H_{11} + H_{13b}), 3.91 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H, $H_{7'}$), 3.72 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, H_{13}), 3.70 – 3.61 (m, 2H, H_{19}), 2.71 – 2.64 (m, 2H, H_{14}), 2.58 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, H_{34}), 2.44 (s, 3H, H_6), 2.30 – 2.20 (m, 6H, H_8 + $H_{8'}$ + CH_2), 2.15 – 2.07 (m, 1H, CH_2), 2.06 – 1.98 (m, 1H, H_{17a}), 1.95 – 1.86 (m, 1H, H_{17b}), 1.61 – 1.52 (m, 2H, CH_2), 1.51 – 1.41 (m, 2H, CH_2), 1.32 – 1.15 (m, 8H, **4 x** CH_2), 0.93 (s, 9H, H_{24}).

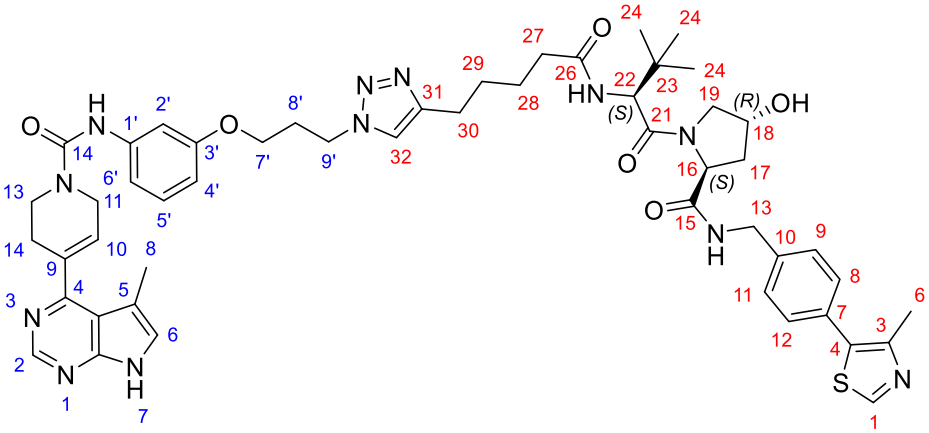
^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 172.1 (**C**), 171.9 (**C**), 169.7 (C-C_{21}), 159.3 (**C**), 158.4 (**C**), 154.9 (**C**), 152.6 (**C**), 151.4 (CH_{Ar}-C_1), 150.1 (CH_{Ar}-C_2), 147.7 (C-C_3), 146.9 (C-C_{35}), 141.8 (**C**), 139.5 (C-C_{10}), 134.2 (**C**), 131.1 (C-C_4), 129.6 (C-C_7), 129.0 (CH_{Ar}), 128.6 (**2 x** CH_{Ar}-C_8 + C_{12}), 128.2 (CH-C_{10}), 127.4 (**2 x** CH_{Ar}-C_9 + C_{11}), 125.0 (CH_{Ar}), 121.8 (CH-C_{36}), 114.3 (**C**), 112.1 (CH_{Ar}), 108.9 (**C**), 107.8 (CH_{Ar}), 105.9 (CH_{Ar}), 68.8 (CH-C_{18}), 64.2 (CH_2-$C_{7'}$), 58.7 (CH-

C_{16}), 56.3 (CH_2-C_{19} + CH-C_{22}), 46.3 (CH_2-$C_{9'}$), 43.6 (CH_2-C_{11}), 41.6 (CH_2-C_{13}), 40.6 (CH_2-C_{13}), 37.9 (CH_2-C_{17}), 35.2 (C-C_{23}), 34.9 (CH_2), 29.5 (CH_2-$C_{8'}$), 28.9 (CH_2), 28.7 (CH_2), 28.7 (CH_2), 28.6 (CH_2), 28.6 (CH_2), 27.3 (CH_2-C_{14}), 26.4 (3 x CH_3-C_{24}), 25.4 (CH_2), 25.0 (CH_2-C_{34}), 15.9 (CH_3-C_6), 12.9 (CH_3-C_8).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{55}H_{71}N_{12}O_6S$ $[M+H]^+$: 1027.5335, found: 1027.5324.

Purity (HPLC): > 99.9 %.

N-(3-(3-(4-(5-(((*S*)-1-((2*S*,4*R*)-4-Hydroxy-2-((4-(4-methylthiazol-5-yl)benzyl)carbamoyl)pyrrolidin-1-yl)-3,3-dimethyl-1-oxobutan-2-yl)amino)-5-oxopentyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)propoxy)phenyl)-4-(5-methyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxamide (296)



Chemical Formula: $C_{51}H_{62}N_{12}O_6S$
Molecular Weight: 971.19

To a solution of **290** (61 mg, 0.14 mmol) in a mixture of *t*-BuOH/H_2O/DMF (2.25/1.5/2.25 mL) were added under argon atmosphere **RB392** (75 mg, 0.14 mmol), sodium ascorbate (34 mg, 0.17 mmol, 1.2 equiv.) and $CuSO_4.5H_2O$ (7 mg, 0.03 mmol, 0.2 equiv.). The reaction mixture was stirred at rt for 24 h then most of the solvent was removed *in vacuo*. The residue was partitioned between DCM (60 mL) and H_2O (5 mL), the aqueous layer was separated and extracted with DCM (2 x 15 mL) then the combined organic layers were dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 100 up to 80/20 to afford compound **296** (100 mg, 0.10 mmol, 71 %) as a pale yellow solid.

R_f (DCM/MeOH 95/5) 0.32.

Mp: 140-142 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) v: 3271, 2922, 2853, 2217, 1634, 1537, 1440, 1235, 1194, 1059, 966, 690, 612, 582, 565, 552.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.81 (s, 1H, **NH**), 8.97 (s, 1H, H_1), 8.64 (s, 1H, H_2), 8.58 – 8.51 (m, 2H, **2 x NH**), 7.87 – 7.81 (m, 2H, **NH +** H_{32}), 7.44 – 7.35 (m, 4H, H_8 + H_9 + H_{11} + H_{12}), 7.33 – 7.29 (m, 1H, H_{Ar}), 7.22 – 7.19 (m, 1H, H_{Ar}), 7.16 – 7.05 (m, 2H, **2 x** H_{Ar}), 6.53 – 6.48 (m, 1H, H_{Ar}), 6.06 – 6.01 (m, 1H, H_{10}), 5.13 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H, **OH**), 4.53 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H, H_{22}), 4.49 – 4.39 (m, 4H, H_{13a} + H_{16} + $H_{9'}$), 4.38 – 4.32 (m, 1H, H_{18}), 4.25 – 4.18 (m, 3H, H_{11} + H_{13b}), 3.91 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H, $H_{7'}$), 3.72 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, H_{13}), 3.68 – 3.62 (m, 2H, H_{19}), 2.70 – 2.64 (m, 2H, H_{14}), 2.63 – 2.56 (m, 2H, H_{30}), 2.44 (s, 3H, H_6), 2.33 – 2.21 (m, 6H, H_8 + $H_{8'}$ + H_{27a}), 2.20 – 2.10 (m, 1H, H_{27b}), 2.07 – 1.99 (m, 1H, H_{17a}), 1.94 – 1.86 (m, 1H, H_{17b}), 1.62 – 1.46 (m, 4H, H_{28} + H_{29}), 0.92 (s, 9H, H_{24}).

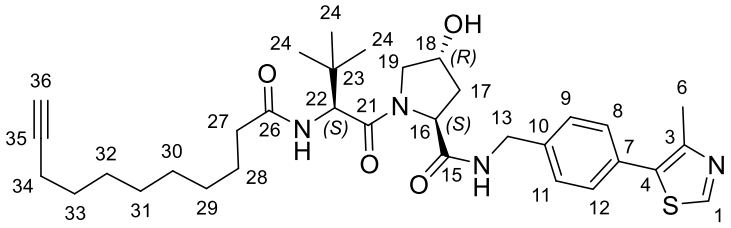
^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 172.0 (**C**), 171.9 (**C**), 169.7 (**C-**C_{21}), 159.4 (**C**), 158.5 (**C**), 155.0 (**C**), 152.6 (**C**), 151.4 (CH_{Ar}-C_1), 150.1 (CH_{Ar}-C_2), 147.7 (**C-**C_3), 146.8 (**C-**C_{31}), 141.8 (**C**), 139.5 (**C-**C_{10}), 134.2 (**C**), 131.1 (**C-**C_4), 129.6 (**C-**C_7), 129.0 (CH_{Ar}), 128.6 (**2 x** CH_{Ar}-C_8 + C_{12}), 128.2 (**CH-**C_{10}), 127.4 (**2 x** CH_{Ar}-C_9 + C_{11}), 125.0 (CH_{Ar}), 121.8

(**CH-C_{32}**), 114.3 (**C**), 112.1 (**CH_{Ar}**), 108.9 (**C**), 107.9 (**CH_{Ar}**), 105.9 (**CH_{Ar}**), 68.9 (**CH-C_{18}**), 64.2 (**CH_2-$C_{7'}$**), 58.7 (**CH-C_{16}**), 56.3 (**CH_2-C_{19} + CH-C_{22}**), 46.3 (**CH_2-$C_{9'}$**), 43.6 (**CH_2-C_{11}**), 41.7 (**CH_2-C_{13}**), 40.6 (**CH_2-C_{13}**), 37.9 (**CH_2-C_{17}**), 35.2 (**C-C_{23}**), 34.6 (**CH_2-C_{27}**), 29.6 (**CH_2-$C_{8'}$**), 28.6 (**CH_2-C_{29}**), 27.3 (**CH_2-C_{14}**), 26.4 (**3 x CH_3-C_{24}**), 25.0 (**CH_2-C_{28}**), 24.8 (**CH_2-C_{30}**), 15.9 (**CH_3-C_6**), 12.9 (**CH_3-C_8**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{51}H_{63}N_{12}O_6S$ $[M+H]^+$: 971.4709, found: 971.4706.

Purity (HPLC): 99.7 %.

(2*S*,4*R*)-1-((*S*)-3,3-Dimethyl-2-(undec-10-ynamido)butanoyl)-4-hydroxy-*N*-(4-(4-methylthiazol-5-yl)benzyl)pyrrolidine-2-carboxamide (299)



Chemical Formula: $C_{33}H_{46}N_4O_4S$
Molecular Weight: 594.82

To a solution of 10-undecynoic acid (58 mg, 0.32 mmol) in dry DMF (4.6 mL) were added HATU (122 mg, 0.32 mmol, 1.0 equiv.) and DIPEA (120 µL, 0.69 mmol, 2.0 equiv.). The solution was stirred at rt for 1 h then a solution of **284** (CAS: 1448189-80-7) (215 mg, 0.46 mmol, 1.5 equiv.) and DIPEA (120 µL, 0.69 mmol, 2.0 equiv.) in dry DMF (2.3 mL) was slowly added. The resulting solution was stirred at rt for 18 h then the reaction mixture was concentrated *in vacuo* and co-evaporated with heptane (2 x 20 mL). The residue was dissolved in DCM (60 mL) and the organic layer was washed with an aqueous saturated solution of $NaHCO_3$ (15 mL), H_2O (15 mL), brine (3 x 15 mL) dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 100 up to 95/5 to afford compound **300** (143 mg, 0.24 mmol, 75 %) as a white powder.

R_f (DCM/MeOH 95/5) 0.40.

Mp: 89-91 °C.

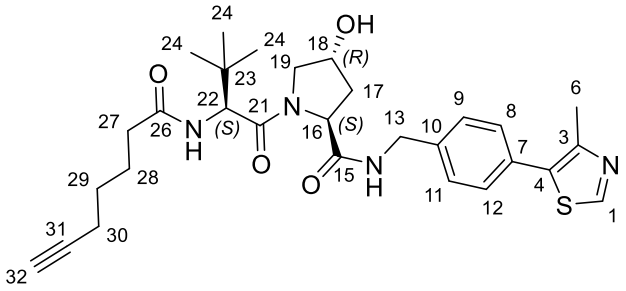
IR (ATR diamond, cm^{-1}) v: 3297, 2929, 2856, 2099, 1623, 1532, 1435, 1417, 1234, 1087, 1031, 938, 850, 633.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.98 (s, 1H, **H_1**), 8.55 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H, **NH**), 7.82 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H, **NH**), 7.44 – 7.35 (m, 4H, **H_8 + H_9 + H_{11} + H_{12}**), 5.15 – 5.07 (m, 1H, **OH**), 4.54 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H, **H_{22}**), 4.48 – 4.38 (m, 2H, **H_{16} + H_{13a}**), 4.35 (brs, 1H, **H_{18}**), 4.22 (dd, *J* = 15.9, 5.5 Hz, 1H, **H_{13b}**), 3.71 – 3.61 (m, 2H, **H_{19}**), 2.75 – 2.68 (m, 1H, **H_{36}**), 2.44 (s, 3H, **H_6**), 2.31 – 2.21 (m, 1H, **CH_2**), 2.17 – 1.99 (m, 4H, **H_{17a} + H_{34} + CH_2**), 1.95 – 1.87 (m, 1H, **H_{17b}**), 1.55 – 1.38 (m, 4H, **2 x CH_2**), 1.32 (dd, *J* = 9.3, 5.1 Hz, 2H, **CH_2**), 1.27 – 1.19 (m, 6H, **3 x CH_2**), 0.93 (s, 9H, **H_{24}**).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 172.1 (**C**), 171.9 (**C**), 169.7 (**C-C_{21}**), 151.4 (**CH_{Ar}-C_1**), 147.7 (**C-C_3**), 139.5 (**C-C_{10}**), 131.1 (**C-C_4**), 129.6 (**C-C_7**), 128.6 (**2 x CH_{Ar}-C_8 + C_{12}**), 127.4 (**2 x CH_{Ar}-C_9 + C_{11}**), 84.5 (**C-C_{35}**), 71.0 (**CH-C_{36}**), 68.8 (**CH-C_{18}**), 58.7 (**CH-C_{16}**), 56.3 (**CH_2-C_{19}**), 56.3 (**CH-C_{22}**), 41.6 (**CH_2-C_{13}**), 37.9 (**CH_2-C_{17}**), 35.2 (**C-C_{23}**), 34.8 (**CH_2**), 28.6 (**CH_2**), 28.6 (**CH_2**), 28.4 (**CH_2**), 28.1 (**CH_2**), 27.9 (**CH_2**), 26.4 (**3 x CH_3-C_{24}**), 25.4 (**CH_2**), 17.7 (**CH_2-C_{34}**), 15.9 (**CH_3-C_6**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{33}H_{47}N_4O_4S$ $[M+H]^+$: 595.3313, found: 595.3306.

(2*S*,4*R*)-1-((*S*)-2-(Hept-6-ynamido)-3,3-dimethylbutanoyl)-4-hydroxy-*N*-(4-(4-methylthiazol-5-yl)benzyl)pyrrolidine-2-carboxamide (300)



Chemical Formula: $C_{29}H_{38}N_4O_4S$
Molecular Weight: 538.71

To a solution of 6-heptynoic acid (87 µL, 0.69 mmol, 1.5 equiv.) in dry DMF (4.6 mL) were added HATU (262 mg, 0.69 mmol, 1.5 equiv.) and DIPEA (240 µL, 1.38 mmol, 3.0 equiv.). The yellow solution was stirred at rt for 1 h then a suspension of **284** (CAS: 1448189-80-7) (214 mg, 0.46 mmol) in dry DMF (2.3 mL) was slowly added. The resulting solution was stirred at rt for 18 h then the reaction mixture was concentrated *in vacuo* and co-evaporated with heptane (2 x 20 mL). The residue was dissolved in DCM/MeOH (60 mL), the organic layer was washed with H_2O (2 x 15 mL) then the aqueous layer was extracted with DCM (2 x 20 mL). The combined organic layers were dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 100 up to 96/4 to afford compound **299** (167 mg, 0.31 mmol, 67 %) as a white solid.

R_f (DCM/MeOH 95/5) 0.32.

Mp: 90-92 °C.

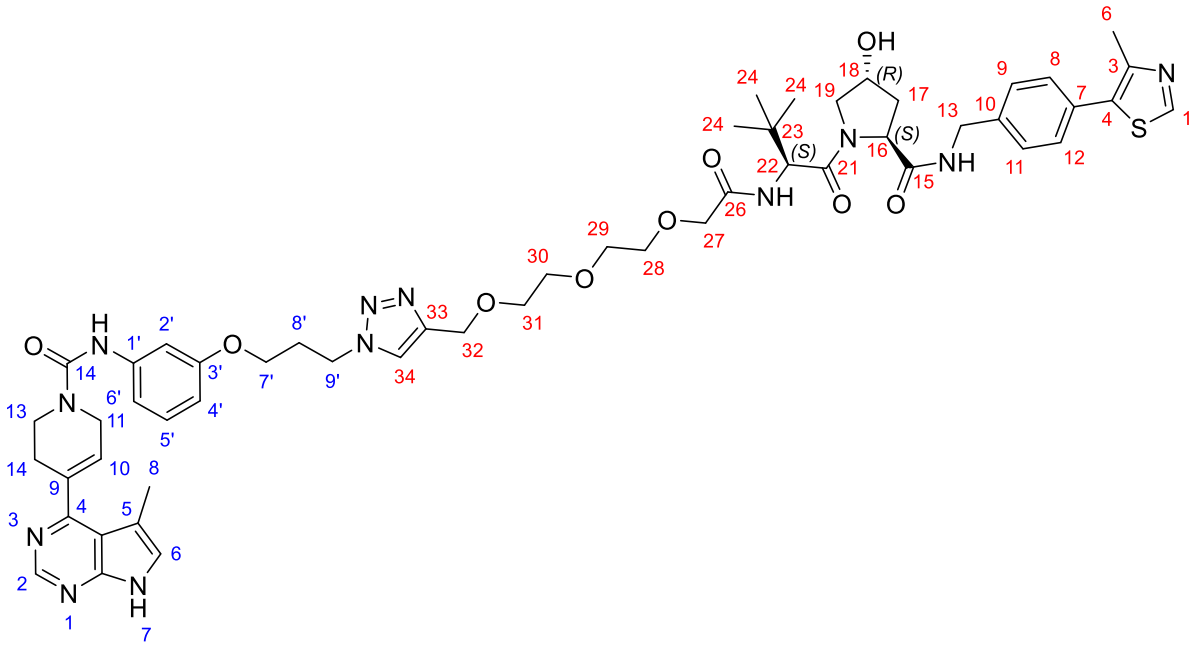
IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3293, 2951, 2100, 1622, 1531, 1434, 1232, 1086, 626.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.98 (s, 1H, **H_1**), 8.55 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H, **NH**), 7.86 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H, **NH**), 7.46 – 7.35 (m, 4H, **H_8 + H_9 + H_{11} + H_{12}**), 5.11 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H, **OH**), 4.54 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H, **H_{22}**), 4.49 – 4.38 (m, 2H, **H_{16} + H_{13a}**), 4.37 – 4.32 (m, 1H, **H_{18}**), 4.21 (dd, *J* = 15.8, 5.4 Hz, 1H, **H_{13b}**), 3.69 – 3.60 (m, 2H, **H_{19}**), 2.73 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H, **H_{32}**), 2.44 (s, 3H, **H_6**), 2.34 – 2.19 (m, 1H, **H_{27a}**), 2.20 – 2.07 (m, 3H, **H_{27b} + H_{30}**), 2.08 – 1.98 (m, 1H, **H_{17a}**), 1.96 – 1.84 (m, 1H, **H_{17b}**), 1.64 – 1.50 (m, 2H, **H_{28}**), 1.48 – 1.37 (m, 2H, **H_{29}**), 0.94 (s, 9H, **H_{24}**).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 171.9 (**C**), 171.8 (**C**), 169.7 (**C-C_{21}**), 151.4 (**CH_{Ar}-C_1**), 147.7 (**C-C_3**), 139.5 (**C-C_{10}**), 131.1 (**C-C_4**), 129.6 (**C-C_7**), 128.6 (**2 x CH_{Ar}-C_8 + C_{12}**), 127.4 (**2 x CH_{Ar}-C_9 + C_{11}**), 84.4 (**C-C_{31}**), 71.1 (**CH-C_{32}**), 68.8 (**CH-C_{18}**), 58.7 (**CH-C_{16}**), 56.3 (**CH_2-C_{19}**), 56.3 (**CH-C_{22}**), 41.6 (**CH_2-C_{13}**), 37.9 (**CH_2-C_{17}**), 35.2 (**C-C_{23}**), 34.2 (**CH_2-C_{27}**), 27.5 (**CH_2-C_{29}**), 26.4 (**3 x CH_3-C_{24}**), 24.5 (**CH_2-C_{28}**), 17.4 (**CH_2-C_{30}**), 15.9 (**CH_3-C_6**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{29}H_{39}N_4O_4S$ $[M+H]^+$: 539.2687, found: 539.2680.

N-(3-(3-(4-((*S*)-12-((2*S*,4*R*)-4-Hydroxy-2-((4-(4-methylthiazol-5-yl)benzyl)carbamoyl)pyrrolidine-1-carbonyl)-13,13-dimethyl-10-oxo-2,5,8-trioxa-11-azatetradecyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)propoxy)phenyl)-4-(5-methyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxamide (301)



To a solution of **290** (56 mg, 0.13 mmol) in a mixture of *t*-BuOH/H_2O/DMF (2.25/1.5/2.25 mL) were added under argon atmosphere **303** (80 mg, 0.13 mmol), sodium ascorbate (32 mg, 0.16 mmol, 1.2 equiv.) and $CuSO_4.5H_2O$ (8 mg, 0.03 mmol, 0.2 equiv.). The reaction mixture was stirred at rt for 56 h then most of the solvent was removed *in vacuo* by co-evaporation with heptane (3 x 20 mL). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 100 up to 90/10 to afford compound **301** (70 mg, 0.07 mmol, 54 %) as a beige powder.

R_f (DCM/MeOH 90/10) 0.18.

Mp: 114-116 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3280, 2922, 2359, 1636, 1532, 1436, 1233, 1088, 1057, 689, 613.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.82 (s, 1H, **NH**), 8.97 (s, 1H, H_1), 8.64 (s, 1H, H_2), 8.62 – 8.52 (m, 2H, **2 x NH**), 8.10 (s, 1H, H_{34}), 7.46 – 7.35 (m, 5H, **NH** + H_8 + H_9 + H_{11} + H_{12}), 7.31 (s, 1H, H_{Ar}), 7.25 – 7.18 (m, 1H, H_{Ar}), 7.16 – 7.05 (m, 2H, **2 x** H_{Ar}), 6.50 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.08 – 6.00 (m, 1H, H_{10}), 5.14 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H, **OH**), 4.59 – 4.49 (m, 5H, $H_{9'}$ + H_{22} + H_{32}), 4.48 – 4.32 (m, 3H, H_{13a} + H_{16} + H_{18}), 4.30 – 4.18 (m, 3H, H_{11} + H_{13b}), 3.96 (s, 2H, H_{27}), 3.92 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, $H_{7'}$), 3.72 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, H_{13}), 3.70 – 3.51 (m, 10H, H_{19} + H_{28} + H_{29} + H_{30} + H_{31}), 2.72 – 2.63 (m, 2H, H_{14}), 2.43 (s, 3H, H_6), 2.31 – 2.21 (m, 5H, H_8 + $H_{8'}$), 2.11 – 2.01 (m, 1H, H_{17a}), 1.95 – 1.86 (m, 1H, H_{17b}), 0.94 (s, 9H, H_{24}).

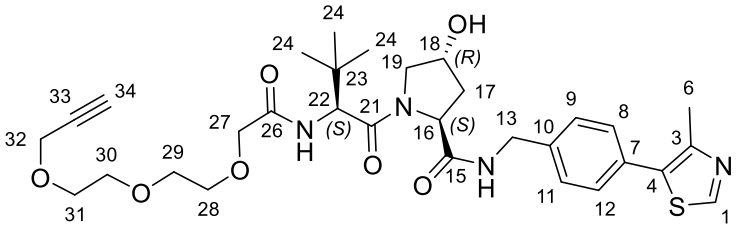
^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 171.7 (C-C_{15}), 169.1 (C-C_{21}), 168.6 (C-C_{26}), 159.3 (**C**), 158.4 (**C**), 154.9 (**C**), 152.6 (**C**), 151.4 (CH_{Ar}-C_1), 150.1 (CH_{Ar}-C_2), 147.7 (C-C_3), 144.0 (C-C_{33}), 141.7 (**C**), 139.4 (C-C_{10}), 134.2 (**C**), 131.1 (C-C_4), 129.7 (C-C_7), 129.0 (CH_{Ar}), 128.6 (**2 x** CH_{Ar}-C_8 + C_{12}), 128.2 (CH-C_{10}), 127.4 (**2 x** CH_{Ar}-C_9 + C_{11}), 125.0 (CH_{Ar}), 123.9 (CH-C_{34}), 114.3 (**C**), 112.1 (CH_{Ar}), 108.9 (**C**), 107.8 (CH_{Ar}), 105.9 (CH_{Ar}), 70.4 (CH_2-C_{28}), 69.7-69.6 (**3 x** CH_{Ar}-

C_{27} + C_{29} + C_{30}), 68.9 (**CH_2-C_{31}**), 68.8 (**CH-C_{18}**), 64.2 (**CH_2-$C_{7'}$**), 63.5 (**CH_2-C_{32}**), 58.7 (**CH-C_{16}**), 56.5 (**CH_2-C_{19}**), 55.7 (**CH-C_{22}**), 46.5 (**CH_2-$C_{9'}$**), 43.6 (**CH_2-C_{11}**), 41.7 (**CH_2-C_{13}**), 40.6 (**CH_2-C_{13}**), 37.9 (**CH_2-C_{17}**), 35.7 (**C-C_{23}**), 29.5 (**CH_2-$C_{8'}$**), 27.3 (**CH_2-C_{14}**), 26.1 (**3 x CH_3-C_{24}**), 15.9 (**CH_3-C_6**), 12.9 (**CH_3-C_8**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{53}H_{67}N_{12}O_9S$ $[M+H]^+$: 1047.4869, found: 1047.4877.

Purity (HPLC): 99.8 %.

(2*S*,4*R*)-1-((*S*)-2-(*tert*-Butyl)-4-oxo-6,9,12-trioxa-3-azapentadec-14-ynoyl)-4-hydroxy-*N*-(4-(4-methylthiazol-5-yl)benzyl)pyrrolidine-2-carboxamide (303)



Chemical Formula: $C_{31}H_{42}N_4O_7S$
Molecular Weight: 614.76

To a solution of 2-(2-(2-(prop-2-yn-1-yloxy)ethoxy)ethoxy)acetic acid (154 mg, 0.76 mmol, 1.5 equiv.) in dry DMF (5.1 mL) were added HATU (289 mg, 0.76 mmol, 1.5 equiv.) and DIPEA (178 µL, 1.02 mmol, 2.0 equiv.). The solution was stirred at rt for 1 h then a solution of **284** (CAS: 1448189-80-7) (238 mg, 0.51 mmol) and DIPEA (88 µL, 0.51 mmol, 1.0 equiv.) in dry DMF (2.5 mL) was slowly added. The resulting solution was stirred at rt for 18 h then the reaction mixture was concentrated *in vacuo* and co-evaporated with heptane (2 x 20 mL). The residue was dissolved in DCM (55 mL) and the organic layer was washed with an aqueous saturated solution of $NaHCO_3$ (2 x 15 mL), H_2O (2 x 15 mL), brine (15 mL) dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography using a gradient solvent system of DCM/MeOH from 100 up to 95/5 to afford compound **303** (174 mg, 0.28 mmol, 55 %) as a white solid.

Note: Highly hygroscopic solid.

R_f (DCM/MeOH 95/5) 0.21.

Mp: 57-59 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν: 3292, 3075, 2920, 2114, 1633, 1522, 1435, 1417, 1233, 1089, 966, 847, 660, 576.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.98 (s, 1H, **H_1**), 8.59 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H, **NH**), 7.45 – 7.36 (m, 5H, **NH + H_8 + H_9 + H_{11} + H_{12}**), 5.14 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H, **OH**), 4.57 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H, **H_{22}**), 4.47 – 4.33 (m, 3H, **H_{16} + H_{18} + H_{13a}**), 4.31 – 4.21 (m, 1H, **H_{13b}**), 4.12 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H, **H_{32}**), 3.97 (s, 2H, **H_{27}**), 3.69 – 3.54 (m, 10H, **H_{19} + H_{28} + H_{29} + H_{30} + H_{31}**), 3.38 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H, **H_{34}**), 2.44 (s, 3H, **H_6**), 2.10 – 2.01 (m, 1H, **H_{17a}**), 1.95 – 1.85 (m, 1H, **H_{17b}**), 0.95 (s, 9H, **H_{24}**).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 171.7 (**C-C_{15}**), 169.1 (**C-C_{21}**), 168.5 (**C-C_{26}**), 151.4 (**CH_{Ar}-C_1**), 147.7 (**C-C_3**), 139.4 (**C-C_{10}**), 131.1 (**C-C_4**), 129.7 (**C-C_7**), 128.7 (**2 x CH_{Ar}-C_8 + C_{12}**), 127.4 (**2 x CH_{Ar}-C_9 + C_{11}**), 80.3 (**C-C_{33}**), 77.0 (**CH-C_{34}**), 70.4 (**CH_2-C_{28}**), 69.6-69.5 (**3 x CH_2-C_{27} + C_{29} + C_{30}**), 68.9 (**CH-C_{18}**), 68.5 (**CH_2-C_{31}**), 58.7 (**CH-C_{16}**), 57.5 (**CH_2-C_{32}**), 56.5 (**CH_2-C_{19}**), 55.7 (**CH-C_{22}**), 41.7 (**CH_2-C_{13}**), 37.9 (**CH_2-C_{17}**), 35.7 (**C-C_{23}**), 26.2 (**3 x CH_3-C_{24}**), 15.9 (**CH_3-C_6**).

HRMS (EI-MS) m/z calcd for $C_{31}H_{43}N_4O_7S$ $[M+H]^+$: 615.2847, found: 615.2841.

Bibliographie

(1) Bhullar, K. S.; Lagarón, N. O.; McGowan, E. M.; Parmar, I.; Jha, A.; Hubbard, B. P.; Rupasinghe, H. P. V. Kinase-Targeted Cancer Therapies: Progress, Challenges and Future Directions. *Mol. Cancer* **2018**, *17* (1), 48. https://doi.org/10.1186/s12943-018-0804-2.

(2) Olsen, J. V.; Blagoev, B.; Gnad, F.; Macek, B.; Kumar, C.; Mortensen, P.; Mann, M. Global, In Vivo, and Site-Specific Phosphorylation Dynamics in Signaling Networks. *Cell* **2006**, *127* (3), 635–648. https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.026.

(3) Manning, G.; Whyte, D. B.; Martinez, R.; Hunter, T.; Sudarsanam, S. The Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Science* **2002**, *298* (5600), 1912–1934. https://doi.org/10.1126/science.1075762.

(4) Zhang, H.; Cao, X.; Tang, M.; Zhong, G.; Si, Y.; Li, H.; Zhu, F.; Liao, Q.; Li, L.; Zhao, J.; Feng, J.; Li, S.; Wang, C.; Kaulich, M.; Wang, F.; Chen, L.; Li, L.; Xia, Z.; Liang, T.; Lu, H.; Feng, X.-H.; Zhao, B. A Subcellular Map of the Human Kinome. *eLife* **2021**, *10*, e64943. https://doi.org/10.7554/eLife.64943.

(5) Ardito, F.; Giuliani, M.; Perrone, D.; Troiano, G.; Muzio, L. L. The Crucial Role of Protein Phosphorylation in Cell Signaling and Its Use as Targeted Therapy (Review). *Int. J. Mol. Med.* **2017**, *40* (2), 271–280. https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3036.

(6) Yarden, Y.; Schlessinger, J. Self-Phosphorylation of Epidermal Growth Factor Receptor: Evidence for a Model of Intermolecular Allosteric Activation. *Biochemistry* **1987**, *26* (5), 1434–1442. https://doi.org/10.1021/bi00379a034.

(7) Downward, J.; Parker, P.; Waterfield, M. D. Autophosphorylation Sites on the Epidermal Growth Factor Receptor. *Nature* **1984**, *311*, 483–485. https://doi.org/10.1038/311483a0.

(8) McClendon, C. L.; Kornev, A. P.; Gilson, M. K.; Taylor, S. S. Dynamic Architecture of a Protein Kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2014**, *111* (43), E4623–E4631. https://doi.org/10.1073/pnas.1418402111.

(9) Kornev, A. P.; Haste, N. M.; Taylor, S. S.; Ten Eyck, L. F. Surface Comparison of Active and Inactive Protein Kinases Identifies a Conserved Activation Mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103* (47), 17783–17788. https://doi.org/10.1073/pnas.0607656103.

(10) Hemmer, W.; McGlone, M.; Tsigelny, I.; Taylor, S. S. Role of the Glycine Triad in the ATP-Binding Site of cAMP-Dependent Protein Kinase. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272* (27), 16946–16954. https://doi.org/10.1074/jbc.272.27.16946.

(11) Huse, M.; Kuriyan, J. The Conformational Plasticity of Protein Kinases. *Cell* **2002**, *109* (3), 275–282. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00741-9.

(12) Adams, J. A. Kinetic and Catalytic Mechanisms of Protein Kinases. *Chem. Rev.* **2001**, *101* (8), 2271–2290. https://doi.org/10.1021/cr000230w.

(13) Hubbard, S. R.; Wei, L.; Hendrickson, W. A. Crystal Structure of the Tyrosine Kinase Domain of the Human Insulin Receptor. *Nature* **1994**, *372*, 746–754. https://doi.org/10.1038/372746a0.

(14) Modi, V.; Dunbrack, R. L. Defining a New Nomenclature for the Structures of Active and Inactive Kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2019**, *116* (14), 6818–6827. https://doi.org/10.1073/pnas.1814279116.

(15) Pucheta-Martínez, E.; Saladino, G.; Morando, M. A.; Martinez-Torrecuadrada, J.; Lelli, M.; Sutto, L.; D'Amelio, N.; Gervasio, F. L. An Allosteric Cross-Talk Between the Activation Loop and the ATP Binding Site Regulates the Activation of Src Kinase. *Sci. Rep.* **2016**, *6* (1), 24235. https://doi.org/10.1038/srep24235.

(16) Cicenas, J.; Zalyte, E.; Bairoch, A.; Gaudet, P. Kinases and Cancer. *Cancers* **2018**, *10* (3), 63. https://doi.org/10.3390/cancers10030063.

(17) Tabit, C. E.; Shenouda, S. M.; Holbrook, M.; Fetterman, J. L.; Kiani, S.; Frame, A. A.; Kluge, M. A.; Held, A.; Dohadwala, M. M.; Gokce, N.; Farb, M. G.; Rosenzweig, J.; Ruderman, N.; Vita, J. A.; Hamburg, N. M. Protein Kinase C-β Contributes to Impaired Endothelial Insulin Signaling in Humans With Diabetes Mellitus. *Circulation* **2013**, *127* (1), 86–95. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.127514.

(18) Sato, S.; Sanjo, H.; Takeda, K.; Ninomiya-Tsuji, J.; Yamamoto, M.; Kawai, T.; Matsumoto, K.; Takeuchi, O.; Akira, S. Essential Function for the Kinase TAK1 in Innate and Adaptive Immune Responses. *Nat. Immunol.* **2005**, *6* (11), 1087–1095. https://doi.org/10.1038/ni1255.

(19) Mueller, B. K.; Mack, H.; Teusch, N. Rho Kinase, a Promising Drug Target for Neurological Disorders. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4* (5), 387–398. https://doi.org/10.1038/nrd1719.
(20) Cohen, P. Immune Diseases Caused by Mutations in Kinases and Components of the Ubiquitin System. *Nat. Immunol.* **2014**, *15* (6), 521–529. https://doi.org/10.1038/ni.2892.
(21) Capdeville, R.; Buchdunger, E.; Zimmermann, J.; Matter, A. Glivec (STI571, Imatinib), a Rationally Developed, Targeted Anticancer Drug. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1* (7), 493–502. https://doi.org/10.1038/nrd839.
(22) Cohen, P.; Cross, D.; Jänne, P. A. Kinase Drug Discovery 20 Years after Imatinib: Progress and Future Directions. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2021**, *20* (7), 551–569. https://doi.org/10.1038/s41573-021-00195-4.
(23) Carles, F.; Bourg, S.; Meyer, C.; Bonnet, P. PKIDB: A Curated, Annotated and Updated Database of Protein Kinase Inhibitors in Clinical Trials. *Molecules* **2018**, *23* (4), 908. https://doi.org/10.3390/molecules23040908.
(24) Roskoski, R. Properties of FDA-Approved Small Molecule Protein Kinase Inhibitors: A 2023 Update. *Pharmacol. Res.* **2023**, *187*, 106552. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2022.106552.
(25) Fabbro, D.; Cowan-Jacob, S. W.; Moebitz, H. Ten Things You Should Know about Protein Kinases: IUPHAR Review 14: Ten Things You Should Know about Protein Kinases. *Br. J. Pharmacol.* **2015**, *172* (11), 2675–2700. https://doi.org/10.1111/bph.13096.
(26) Zhang, J.; Yang, P. L.; Gray, N. S. Targeting Cancer with Small Molecule Kinase Inhibitors. *Nat. Rev. Cancer* **2009**, *9* (1), 28–39. https://doi.org/10.1038/nrc2559.
(27) Zuccotto, F.; Ardini, E.; Casale, E.; Angiolini, M. Through the "Gatekeeper Door": Exploiting the Active Kinase Conformation. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (7), 2681–2694. https://doi.org/10.1021/jm901443h.
(28) Liu, Y.; Gray, N. S. Rational Design of Inhibitors That Bind to Inactive Kinase Conformations. *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2* (7), 358–364. https://doi.org/10.1038/nchembio799.
(29) Cowan-Jacob, S. W.; Möbitz, H.; Fabbro, D. Structural Biology Contributions to Tyrosine Kinase Drug Discovery. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2009**, *21* (2), 280–287. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.01.012.
(30) Gavrin, L. K.; Saiah, E. Approaches to Discover Non-ATP Site Kinase Inhibitors. *MedChemComm* **2013**, *4* (1), 41–51. https://doi.org/10.1039/C2MD20180A.
(31) Lamba, V.; Ghosh, I. New Directions in Targeting Protein Kinases: Focusing Upon True Allosteric and Bivalent Inhibitors. *Curr. Pharm. Des.* **2012**, *18* (20), 2936–2945. https://doi.org/10.2174/138161212800672813.
(32) Roskoski, R. Classification of Small Molecule Protein Kinase Inhibitors Based upon the Structures of Their Drug-Enzyme Complexes. *Pharmacol. Res.* **2016**, *103*, 26–48. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.10.021.
(33) Wu, P.; Nielsen, T. E.; Clausen, M. H. FDA-Approved Small-Molecule Kinase Inhibitors. *Trends Pharmacol. Sci.* **2015**, *36* (7), 422–439. https://doi.org/10.1016/j.tips.2015.04.005.
(34) Attwood, M. M.; Fabbro, D.; Sokolov, A. V.; Knapp, S.; Schiöth, H. B. Trends in Kinase Drug Discovery: Targets, Indications and Inhibitor Design. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2021**, *20* (11), 839–861. https://doi.org/10.1038/s41573-021-00252-y.
(35) Cer, R. Z.; Mudunuri, U.; Stephens, R.; Lebeda, F. J. IC50-to-Ki: A Web-Based Tool for Converting IC50 to Ki Values for Inhibitors of Enzyme Activity and Ligand Binding. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, W441–W445. https://doi.org/10.1093/nar/gkp253.
(36) Johnson, K. A.; Goody, R. S. The Original Michaelis Constant: Translation of the 1913 Michaelis–Menten Paper. *Biochemistry* **2011**, *50* (39), 8264–8269. https://doi.org/10.1021/bi201284u.
(37) Ayala-Aguilera, C. C.; Valero, T.; Lorente-Macías, Á.; Baillache, D. J.; Croke, S.; Unciti-Broceta, A. Small Molecule Kinase Inhibitor Drugs (1995–2021): Medical Indication, Pharmacology, and Synthesis. *J. Med. Chem.* **2022**, *65* (2), 1047–1131. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c00963.
(38) Bournez, C.; Carles, F.; Peyrat, G.; Aci-Sèche, S.; Bourg, S.; Meyer, C.; Bonnet, P. Comparative Assessment of Protein Kinase Inhibitors in Public Databases and in PKIDB. *Molecules* **2020**, *25* (14), 3226. https://doi.org/10.3390/molecules25143226.
(39) Ohashi, K.; Toshima, J.; Tajinda, K.; Nakamura, T.; Mizuno, K. Molecular Cloning of a Chicken Lung cDNA Encoding a Novel Protein Kinase with N-Terminal Two Lim/Double Zinc Finger Motifs. *J. Biochem.* **1994**, *116* (3), 636–642. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a124573.

(40) Okano, I.; Hiraoka, J.; Otera, H.; Nunoue, K.; Ohashi, K.; Iwashita, S.; Hirai, M.; Mizuno, K. Identification and Characterization of a Novel Family of Serine/Threonine Kinases Containing Two N-Terminal LIM Motifs. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270* (52), 31321–31330. https://doi.org/10.1074/jbc.270.52.31321.
(41) Sala, S.; Ampe, C. An Emerging Link between LIM Domain Proteins and Nuclear Receptors. *Cell. Mol. Life Sci.* **2018**, *75* (11), 1959–1971. https://doi.org/10.1007/s00018-018-2774-3.
(42) McConnell, B. V.; Koto, K.; Gutierrez-Hartmann, A. Nuclear and Cytoplasmic LIMK1 Enhances Human Breast Cancer Progression. *Mol. Cancer* **2011**, *10* (1), 75. https://doi.org/10.1186/1476-4598-10-75.
(43) Kadrmas, J. L.; Beckerle, M. C. The LIM Domain: From the Cytoskeleton to the Nucleus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, *5* (11), 920–931. https://doi.org/10.1038/nrm1499.
(44) *Tissue expression of LIMK1 - Summary - The Human Protein Atlas*. https://www.proteinatlas.org/ENSG00000106683-LIMK1/tissue (accessed 2023-06-05).
(45) *Tissue expression of LIMK2 - Summary - The Human Protein Atlas*. https://www.proteinatlas.org/ENSG00000182541-LIMK2/tissue (accessed 2023-06-05).
(46) Scott, R. W.; Olson, M. F. LIM Kinases: Function, Regulation and Association with Human Disease. *J. Mol. Med.* **2007**, *85* (6), 555–568. https://doi.org/10.1007/s00109-007-0165-6.
(47) Bach, I. The LIM Domain: Regulation by Association. *Mech. Dev.* **2000**, *91* (1–2), 5–17. https://doi.org/10.1016/S0925-4773(99)00314-7.
(48) Goyal, P.; Pandey, D.; Siess, W. Phosphorylation-Dependent Regulation of Unique Nuclear and Nucleolar Localization Signals of LIM Kinase 2 in Endothelial Cells. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281* (35), 25223–25230. https://doi.org/10.1074/jbc.M603399200.
(49) Brown, Imogen D. Coghill, Meagan J., S. Role of LIM Domains in Mediating Signaling Protein Interactions. *IUBMB Life Int. Union Biochem. Mol. Biol. Life* **2001**, *51* (6), 359–364. https://doi.org/10.1080/152165401753366113.
(50) Braka, A. Prédiction de La Cinétique Des Inhibiteurs de Protéines Kinases et de Leur Affinité Par Docking Flexible, Orléans, Orléans, 2018.
(51) Ohashi, K.; Nagata, K.; Maekawa, M.; Ishizaki, T.; Narumiya, S.; Mizuno, K. Rho-Associated Kinase ROCK Activates LIM-Kinase 1 by Phosphorylation at Threonine 508 within the Activation Loop. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275* (5), 3577–3582. https://doi.org/10.1074/jbc.275.5.3577.
(52) Sumi, T.; Matsumoto, K.; Nakamura, T. Specific Activation of LIM Kinase 2 via Phosphorylation of Threonine 505 by ROCK, a Rho-Dependent Protein Kinase. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (1), 670–676. https://doi.org/10.1074/jbc.M007074200.
(53) Etienne-Manneville, S.; Hall, A. Rho GTPases in Cell Biology. *Nature* **2002**, *420*, 629–635. https://doi.org/10.1038/nature01148.
(54) Sadok, A.; Marshall, C. J. Rho GTPases: Masters of Cell Migration. *Small GTPases* **2014**, *5* (4), e983878. https://doi.org/10.4161/sgtp.29710.
(55) Bellanger, J.-M.; Schmidt, S.; Estrach, S.; Portales-Casamar, É.; Diriong, S.; Debant, A. Trio : Un Facteur d'échange Des GTPases Rho Aux Multiples Facettes Impliqué Dans Le Guidage Axonal. *Med Sci Paris* **2001**, *17* (12), 1316–1321. https://doi.org/10.1051/medsci/200117121316.
(56) Moriyama, K.; Iida, K.; Yahara, I. Phosphorylation of Ser-3 of Cofilin Regulates Its Essential Function on Actin. *Genes Cells* **1996**, *1* (1), 73–86. https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.1996.05005.x.
(57) Agnew, B. J.; Minamide, L. S.; Bamburg, J. R. Reactivation of Phosphorylated Actin Depolymerizing Factor and Identification of the Regulatory Site. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270* (29), 17582–17587. https://doi.org/10.1074/jbc.270.29.17582.
(58) Hohmann T.; Dehghani F. The Cytoskeleton—A Complex Interacting Meshwork. *Cells* **2019**, *8* (4), 362. https://doi.org/10.3390/cells8040362.
(59) Fletcher, D. A.; Mullins, R. D. Cell Mechanics and the Cytoskeleton. *Nature* **2010**, *463*, 485–492. https://doi.org/10.1038/nature08908.
(60) *Fundamentals of cell biology*. https://alg.manifoldapp.org/read/fundamentals-of-cell-biology/ (accessed 2023-06-07).
(61) Bamburg, J.; Minamide, L.; Wiggan, O.; Tahtamouni, L.; Kuhn, T. Cofilin and Actin Dynamics: Multiple Modes of Regulation and Their Impacts in Neuronal Development and Degeneration. *Cells* **2021**, *10* (10), 2726. https://doi.org/10.3390/cells10102726.

(62) Svitkina, T. M. Filopodia and Lamellipodia. In *Encyclopedia of Cell Biology*, Bradshaw, R. A., Stahl, P. D. Eds.; Academic Press, **2016**; pp 683-693. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394447-4.20066-7.
(63) Nomura, K.; Ono, S. ATP-Dependent Regulation of Actin Monomer–Filament Equilibrium by Cyclase-Associated Protein and ADF/Cofilin. *Biochem. J.* **2013**, *453* (2), 249–259. https://doi.org/10.1042/BJ20130491.
(64) McGough, A.; Pope, B.; Chiu, W.; Weeds, A. Cofilin Changes the Twist of F-Actin: Implications for Actin Filament Dynamics and Cellular Function. *J. Cell Biol.* **1997**, *138* (4), 771–781. https://doi.org/10.1083/jcb.138.4.771.
(65) Didry, D.; Carlier, M.-F.; Pantaloni, D. Synergy between Actin Depolymerizing Factor/Cofilin and Profilin in Increasing Actin Filament Turnover. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273* (40), 25602–25611. https://doi.org/10.1074/jbc.273.40.25602.
(66) Arber, S.; Barbayannis, F. A.; Hanser, H.; Schnelder, C.; Stanyon, C. A.; Bernards, O.; Caroni, P. Regulation of Actin Dynamics through Phosphorylation of Cofilin by LIM- Kinase. *Nature* **1998**, *393*, 805–809. https://doi.org/10.1038/31729.
(67) Amano, T.; Tanabe, K.; Eto, T.; Narumiya, S.; Mizuno, K. LIM-Kinase 2 Induces Formation of Stress Fibres, Focal Adhesions and Membrane Blebs, Dependent on Its Activation by Rho-Associated Kinase-Catalysed Phosphorylation at Threonine-505. *Biochem. J.* **2001**, *354* (1), 149–159. https://doi.org/10.1042/bj3540149.
(68) Huang, T. Y.; DerMardirossian, C.; Bokoch, G. M. Cofilin Phosphatases and Regulation of Actin Dynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2006**, *18* (1), 26–31. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2005.11.005.
(69) Arnal, I.; Sassoon, I.; Tournebize, R. Dynamique du fuseau : vers une cible anti-cancéreuse. *Med Sci Paris* **2002**, *18* (12), 1227–1235. https://doi.org/10.1051/medsci/200218121227.
(70) Vineethakumari, C.; Lüders, J. Microtubule Anchoring: Attaching Dynamic Polymers to Cellular Structures. *Front. Cell Dev. Biol.* **2022**, *10*, 867870. https://doi.org/10.3389/fcell.2022.867870.
(71) Tilney, L. G.; Bryan, J.; Bush, D. J.; Fujiwara, K.; Mooseker, M. S.; Murphy, D. B.; Snyder, D. H. Microtubules: Evidence for 13 Protofilaments. *J. Cell Biol.* **1973**, *59* (2), 267–275. https://doi.org/10.1083/jcb.59.2.267.
(72) Akhmanova, A.; Steinmetz, M. O. Microtubule Minus-End Regulation at a Glance. *J. Cell Sci.* **2019**, *132* (11), jcs227850. https://doi.org/10.1242/jcs.227850.
(73) Brouhard, G. J.; Rice, L. M. Microtubule Dynamics: An Interplay of Biochemistry and Mechanics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2018**, *19* (7), 451–463. https://doi.org/10.1038/s41580-018-0009-y.
(74) Cheeseman, I. M.; Desai, A. Molecular Architecture of the Kinetochore–Microtubule Interface. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9* (1), 33–46. https://doi.org/10.1038/nrm2310.
(75) Pilon, A.; Poüs, C. Compartimentation et Plasticité Du Réseau Microtubulaire. *Med Sci Paris* **2013**, *29* (2), 194–199. https://doi.org/10.1051/medsci/2013292018.
(76) Prosser, S. L.; Pelletier, L. Mitotic Spindle Assembly in Animal Cells: A Fine Balancing Act. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2017**, *18* (3), 187–201. https://doi.org/10.1038/nrm.2016.162.
(77) Wordeman, L.; Vicente, J. J. Microtubule Targeting Agents in Disease: Classic Drugs, Novel Roles. *Cancers* **2021**, *13* (22), 5650. https://doi.org/10.3390/cancers13225650.
(78) Stanton, R. A.; Gernert, K. M.; Nettles, J. H.; Aneja, R. Drugs That Target Dynamic Microtubules: A New Molecular Perspective. *Med. Res. Rev.* **2011**, *31* (3), 443–481. https://doi.org/10.1002/med.20242.
(79) Merino-Casallo, F.; Gomez-Benito, M. J.; Hervas-Raluy, S.; Garcia-Aznar, J. M. Unravelling Cell Migration: Defining Movement from the Cell Surface. *Cell Adhes. Migr.* **2022**, *16* (1), 25–64. https://doi.org/10.1080/19336918.2022.2055520.
(80) Dogterom, M.; Koenderink, G. H. Actin–Microtubule Crosstalk in Cell Biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2019**, *20* (1), 38–54. https://doi.org/10.1038/s41580-018-0067-1.
(81) Seetharaman, S.; Etienne-Manneville, S. Cytoskeletal Crosstalk in Cell Migration. *Trends Cell Biol.* **2020**, *30* (9), 720–735. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.06.004.
(82) Schwartz, M. A.; Horwitz, A. R. Integrating Adhesion, Protrusion, and Contraction during Cell Migration. *Cell* **2006**, *125* (7), 1223–1225. https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.015.
(83) Pimm, M. L.; Hotaling, J.; Henty-Ridilla, J. L. Profilin Choreographs Actin and Microtubules in Cells and Cancer. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **2020**, *355*, 155–204. https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2020.05.005.

(84) Krendel, M.; Zenke, F. T.; Bokoch, G. M. Nucleotide Exchange Factor GEF-H1 Mediates Cross-Talk between Microtubules and the Actin Cytoskeleton. *Nat. Cell Biol.* **2002**, *4* (4), 294–301. https://doi.org/10.1038/ncb773.
(85) Ren, X.-D.; Kiosses, W. B.; Schwartz, M. A. Regulation of the Small GTP-Binding Protein Rho by Cell Adhesion and the Cytoskeleton. *EMBO J.* **1999**, *18* (3), 578–585. https://doi.org/10.1093/emboj/18.3.578.
(86) Gorovoy, M.; Niu, J.; Bernard, O.; Profirovic, J.; Minshall, R.; Neamu, R.; Voyno-Yasenetskaya, T. LIM Kinase 1 Coordinates Microtubule Stability and Actin Polymerization in Human Endothelial Cells. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (28), 26533–26542. https://doi.org/10.1074/jbc.M502921200.
(87) Po'uha, S. T.; Shum, M. S. Y.; Goebel, A.; Bernard, O.; Kavallaris, M. LIM-Kinase 2, a Regulator of Actin Dynamics, Is Involved in Mitotic Spindle Integrity and Sensitivity to Microtubule-Destabilizing Drugs. *Oncogene* **2010**, *29* (4), 597–607. https://doi.org/10.1038/onc.2009.367.
(88) Prunier, C.; Prudent, R.; Kapur, R.; Sadoul, K.; Lafanechère, L. LIM Kinases: Cofilin and Beyond. *Oncotarget* **2017**, *8* (25), 41749–41763. https://doi.org/10.18632/oncotarget.16978.
(89) Mardilovich, K.; Baugh, M.; Crighton, D.; Kowalczyk, D.; Gabrielsen, M.; Munro, J.; Croft, D. R.; Lourenco, F.; James, D.; Kalna, G.; McGarry, L.; Rath, O.; Shanks, E.; Garnett, M. J.; McDermott, U.; Brookfield, J.; Charles, M.; Hammonds, T.; Olson, M. F. LIM Kinase Inhibitors Disrupt Mitotic Microtubule Organization and Impair Tumor Cell Proliferation. *Oncotarget* **2015**, *6* (36), 38469–38486. https://doi.org/10.18632/oncotarget.6288.
(90) *Liste des types de cancers*. Ligue contre le cancer. https://www.ligue-cancer.net/article/26123_liste-des-types-de-cancers (accessed 2023-06-13).
(91) Yoshioka, K.; Foletta, V.; Bernard, O.; Itoh, K. A Role for LIM Kinase in Cancer Invasion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100* (12), 7247–7252. https://doi.org/10.1073/pnas.1232344100.
(92) Zhang, M.; Wang, R.; Tian, J.; Song, M.; Zhao, R.; Liu, K.; Zhu, F.; Shim, J.; Dong, Z.; Lee, M. Targeting LIMK1 with Luteolin Inhibits the Growth of Lung Cancer *in Vitro* and *in Vivo*. *J. Cell. Mol. Med.* **2021**, *25* (12), 5560–5571. https://doi.org/10.1111/jcmm.16568.
(93) Jordan, M. A.; Wilson, L. Microtubules as a Target for Anticancer Drugs. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4* (4), 253–265. https://doi.org/10.1038/nrc1317.
(94) Izdebska, M.; Zielińska, W.; Grzanka, D.; Gagat, M. The Role of Actin Dynamics and Actin-Binding Proteins Expression in Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Its Association with Cancer Progression and Evaluation of Possible Therapeutic Targets. *BioMed Res. Int.* **2018**, *2018*, 1–13. https://doi.org/10.1155/2018/4578373.
(95) Bagheri-Yarmand, R.; Mazumdar, A.; Sahin, A. A.; Kumar, R. LIM Kinase 1 Increases Tumor Metastasis of Human Breast Cancer Cellsvia Regulation of the Urokinase-Type Plasminogen Activator System. *Int. J. Cancer* **2006**, *118* (11), 2703–2710. https://doi.org/10.1002/ijc.21650.
(96) Davila, M.; Jhala, D.; Ghosh, D.; Grizzle, W. E.; Chakrabarti, R. Expression of LIM Kinase 1 Is Associated with Reversible G1/S Phase Arrest, Chromosomal Instability and Prostate Cancer. *Mol. Cancer* **2007**, *6* (1), 40. https://doi.org/10.1186/1476-4598-6-40.
(97) Jensen, P.; Carlet, M.; Schlenk, R. F.; Weber, A.; Kress, J.; Brunner, I.; Słabicki, M.; Grill, G.; Weisemann, S.; Cheng, Y.-Y.; Jeremias, I.; Scholl, C.; Fröhling, S. Requirement for LIM Kinases in Acute Myeloid Leukemia. *Leukemia* **2020**, *34* (12), 3173–3185. https://doi.org/10.1038/s41375-020-0943-5.
(98) Villalonga, E.; Mosrin, C.; Normand, T.; Girardin, C.; Serrano, A.; Žunar, B.; Doudeau, M.; Godin, F.; Bénédetti, H.; Vallée, B. LIM Kinases, LIMK1 and LIMK2, Are Crucial Node Actors of the Cell Fate: Molecular to Pathological Features. *Cells* **2023**, *12* (5), 805. https://doi.org/10.3390/cells12050805.
(99) Seigneurin, A.; Plouvier, S.; Désandes, E.; Amadéo, B.; Delfosse, P.; Lecoffre, C.; Lafay, L.; Mounier, M.; Coureau, G.; Trétarre, B. *Survie Des Personnes Atteintes de Cancer En France Métropolitaine 1989-2018 - Sarcome Des Os*; Institut National du Cancer, 2021.
(100) Cowppli-Bony, A.; Delafosse, P.; Lacour, B.; Baldi, I.; Lecoffre, C.; Lafay, L.; Coureau; Trétarre, B.; Mounier, M. *Survie Des Personnes Atteintes de Cancer En France Métropolitaine 1989-2018 - Système Nerveux Central Glioblastomes*; Institut National du Cancer, 2020.
(101) Zhao, X.; Wu, Q.; Gong, X.; Liu, J.; Ma, Y. Osteosarcoma: A Review of Current and Future Therapeutic Approaches. *Biomed. Eng. OnLine* **2021**, *20* (1), 24. https://doi.org/10.1186/s12938-021-00860-0.

(102) Albuquerque M. Silva, J.; Marchiori, E.; Carvalho De Macedo, F.; Ricardo Garcia Da Silva, P.; Brandão Amorim, V. Pulmonary Metastasis of Osteosarcoma: Multiple Presentations in a Single Patient. *J. Bras. Pneumol.* **2022**, e20210478. https://doi.org/10.36416/1806-3756/e20210478.
(103) Xie, D.; Wang, Z.; Li, J.; Guo, D.; Lu, A.; Liang, C. Targeted Delivery of Chemotherapeutic Agents for Osteosarcoma Treatment. *Front. Oncol.* **2022**, *12*. https://doi.org/10.3389/fonc.2022.843345.
(104) Brion, R.; Regnier, L.; Mullard, M.; Amiaud, J.; Rédini, F.; Verrecchia, F. LIM Kinases in Osteosarcoma Development. *Cells* **2021**, *10* (12), 3542. https://doi.org/10.3390/cells10123542.
(105) Zhang, M.; Chen, L.; Liu, Y.; Chen, M.; Zhang, S.; Kong, D. Sea Cucumber Cucumaria Frondosa Fucoidan Inhibits Osteosarcoma Adhesion and Migration by Regulating Cytoskeleton Remodeling. *Oncol. Rep.* **2020**, *44* (2), 469–476. https://doi.org/10.3892/or.2020.7614.
(106) Zheng, B.; Zhou, C.; Qu, G.; Ren, C.; Yan, P.; Guo, W.; Yue, B. VEGFR2 Promotes Metastasis and PD-L2 Expression of Human Osteosarcoma Cells by Activating the STAT3 and RhoA-ROCK-LIMK2 Pathways. *Front. Oncol.* **2020**, *10*, 543562. https://doi.org/10.3389/fonc.2020.543562.
(107) *PAIR tumeurs cérébrales - Les PAIR*. https://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-la-recherche/Recherche-translationnelle/Les-PAIR/PAIR-tumeurs-cerebrales (accessed 2023-06-22).
(108) Maghe, C.; Jacobs, K. A.; Bidère, N.; Gavard, J. Glioblastome Multiforme: Les Fleurs Du MALT1. *Med Sci* **2020**, *36* (5), 452–454. https://doi.org/10.1051/medsci/2020073.
(109) Rispoli, R.; Conti, C.; Celli, P.; Caroli, E.; Carletti, S. Neural Stem Cells and Glioblastoma. *Neuroradiol. J.* **2014**, *27* (2), 169–174. https://doi.org/10.15274/NRJ-2014-10028.
(110) Park, J.-B.; Agnihotri, S.; Golbourn, B.; Bertrand, K. C.; Luck, A.; Sabha, N.; Smith, C. A.; Byron, S.; Zadeh, G.; Croul, S.; Berens, M.; Rutka, J. T. Transcriptional Profiling of GBM Invasion Genes Identifies Effective Inhibitors of the LIM Kinase-Cofilin Pathway. *Oncotarget* **2014**, *5* (19), 9382–9395. https://doi.org/10.18632/oncotarget.2412.
(111) Chen, J.; Ananthanarayanan, B.; Springer, K. S.; Wolf, K. J.; Sheyman, S. M.; Tran, V. D.; Kumar, S. Suppression of LIM Kinase 1 and LIM Kinase 2 Limits Glioblastoma Invasion. *Cancer Res.* **2020**, *80* (1), 69–78. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-1237.
(112) Carmena, M.; Earnshaw, W. C. The Cellular Geography of Aurora Kinases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2003**, *4* (11), 842–854. https://doi.org/10.1038/nrm1245.
(113) Rybin, M. J.; Laverde-Paz, M. J.; Suter, R. K.; Affer, M.; Ayad, N. G.; Feng, Y.; Zeier, Z. A Dual Aurora and Lim Kinase Inhibitor Reduces Glioblastoma Proliferation and Invasion. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2022**, *61* (2022), 128614. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2022.128614.
(114) Ben Zablah, Y.; Zhang, H.; Gugustea, R.; Jia, Z. LIM-Kinases in Synaptic Plasticity, Memory, and Brain Diseases. *Cells* **2021**, *10* (8), 2079. https://doi.org/10.3390/cells10082079.
(115) Pröschel, C.; Blouin, M. J.; Gutowski, N. J.; Ludwig, R.; Noble, M. Limk1 Is Predominantly Expressed in Neural Tissues and Phosphorylates Serine, Threonine and Tyrosine Residues in Vitro. *Oncogene* **1995**, *11* (7), 1271–1281.
(116) Meng, Y.; Zhang, Y.; Tregoubov, V.; Janus, C.; Cruz, L.; Jackson, M.; Lu, W.-Y.; MacDonald, J. F.; Wang, J. Y.; Falls, D. L.; Jia, Z. Abnormal Spine Morphology and Enhanced LTP in LIMK-1 Knockout Mice. *Neuron* **2002**, *35* (1), 121–133. https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00758-4.
(117) *Maladies neurodégénératives*. https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/maladies-neurodegeneratives (accessed 2023-06-23).
(118) *La maladie d'Alzheimer : qu'est-ce que c'est ?* Institut du Cerveau. https://institutducerveau-icm.org/fr/alzheimer/ (accessed 2023-06-23).
(119) Ma, C.; Hong, F.; Yang, S. Amyloidosis in Alzheimer's Disease: Pathogeny, Etiology, and Related Therapeutic Directions. *Molecules* **2022**, *27* (4), 1210. https://doi.org/10.3390/molecules27041210.
(120) Medeiros, R.; Baglietto-Vargas, D.; LaFerla, F. M. The Role of Tau in Alzheimer's Disease and Related Disorders: Role of Tau in AD and Related Disorders. *CNS Neurosci. Ther.* **2011**, *17* (5), 514–524. https://doi.org/10.1111/j.1755-5949.2010.00177.x.
(121) Heredia, L.; Helguera, P.; De Olmos, S.; Kedikian, G.; Sola Vigo, F.; LaFerla, F.; Staufenbiel, M.; De Olmos, J.; Busciglio, J.; Caceres, A.; Lorenzo, A. Phosphorylation of Actin-Depolymerizing Factor/Cofilin by LIM-Kinase Mediates Amyloid -Induced Degeneration: A Potential Mechanism of Neuronal Dystrophy

in Alzheimer's Disease. *J. Neurosci.* **2006**, *26* (24), 6533–6542. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5567-05.2006.

(122) Henderson, B. W.; Greathouse, K. M.; Ramdas, R.; Walker, C. K.; Rao, T. C.; Bach, S. V.; Curtis, K. A.; Day, J. J.; Mattheyses, A. L.; Herskowitz, J. H. Pharmacologic Inhibition of LIMK1 Provides Dendritic Spine Resilience against β-Amyloid. *Sci. Signal.* **2019**, *12* (587), eaaw9318. https://doi.org/10.1126/scisignal.aaw9318.

(123) Hou, Y.; Zhou, L.; Yang, Q. D.; Du, X. P.; Li, M.; Yuan, M.; Zhou, Z. W. Changes in Hippocampal Synapses and Learning-Memory Abilities in a Streptozotocin-Treated Rat Model and Intervention by Using Fasudil Hydrochloride. *Neuroscience* **2012**, *200*, 120–129. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.10.030.

(124) *Maladie de Parkinson : 2 fois plus de cas en 25 ans*. https://www.santepubliquefrance.fr/liste-des-actualites/maladie-de-parkinson-2-fois-plus-de-cas-en-25-ans (accessed 2023-06-24).

(125) Aarsland, D.; Batzu, L.; Halliday, G. M.; Geurtsen, G. J.; Ballard, C.; Ray Chaudhuri, K.; Weintraub, D. Parkinson Disease-Associated Cognitive Impairment. *Nat. Rev. Dis. Primer* **2021**, *7* (1), 47. https://doi.org/10.1038/s41572-021-00280-3.

(126) Dawson, T. M.; Dawson, V. L. The Role of Parkin in Familial and Sporadic Parkinson's Disease: The Role of Parkin in Familial and Sporadic PD. *Mov. Disord.* **2010**, *25* (S1), S32–S39. https://doi.org/10.1002/mds.22798.

(127) Lim, M. K.; Kawamura, T.; Ohsawa, Y.; Ohtsubo, M.; Asakawa, S.; Takayanagi, A.; Shimizu, N. Parkin Interacts with LIM Kinase 1 and Reduces Its Cofilin-Phosphorylation Activity via Ubiquitination. *Exp. Cell Res.* **2007**, *313* (13), 2858–2874. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2007.04.016.

(128) Hotulainen, P.; Hoogenraad, C. C. Actin in Dendritic Spines: Connecting Dynamics to Function. *J. Cell Biol.* **2010**, *189* (4), 619–629. https://doi.org/10.1083/jcb.201003008.

(129) Huynh, D. P.; Scoles, D. R.; Ho, T. H.; Del Bigio, M. R.; Pulst, S. M. Parkin Is Associated with Actin Filaments in Neuronal and Nonneural Cells. *Ann. Neurol.* **2000**, *48* (5), 737–744.

(130) Datta, D.; Arion, D.; Corradi, J. P.; Lewis, D. A. Altered Expression of CDC42 Signaling Pathway Components in Cortical Layer 3 Pyramidal Cells in Schizophrenia. *Biol. Psychiatry* **2015**, *78* (11), 775–785. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.03.030.

(131) Kozel, B. A.; Barak, B.; Kim, C. A.; Mervis, C. B.; Osborne, L. R.; Porter, M.; Pober, B. R. Williams Syndrome. *Nat. Rev. Dis. Primer* **2021**, *7* (1), 42. https://doi.org/10.1038/s41572-021-00276-z.

(132) Conti, A.; Riva, N.; Pesca, M.; Iannaccone, S.; Cannistraci, C. V.; Corbo, M.; Previtali, S. C.; Quattrini, A.; Alessio, M. Increased Expression of Myosin Binding Protein H in the Skeletal Muscle of Amyotrophic Lateral Sclerosis Patients. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* **2014**, *1842* (1), 99–106. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.10.013.

(133) Yao, F.; Zhang, K.; Feng, C.; Gao, Y.; Shen, L.; Liu, X.; Ni, J. Protein Biomarkers of Autism Spectrum Disorder Identified by Computational and Experimental Methods. *Front. Psychiatry* **2021**, *12*, 554621. https://doi.org/10.3389/fpsyt.2021.554621.

(134) Peduto, C.; Zanobio, M.; Nigro, V.; Perrotta, S.; Piluso, G.; Santoro, C. Neurofibromatosis Type 1: Pediatric Aspects and Review of Genotype–Phenotype Correlations. *Cancers* **2023**, *15* (4), 1217. https://doi.org/10.3390/cancers15041217.

(135) Shilyansky, C.; Lee, Y. S.; Silva, A. J. Molecular and Cellular Mechanisms of Learning Disabilities: A Focus on NF1. *Annu. Rev. Neurosci.* **2010**, *33* (1), 221–243. https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-060909-153215.

(136) Reilly, K. M.; Kim, A.; Blakely, J.; Ferner, R. E.; Gutmann, D. H.; Legius, E.; Miettinen, M. M.; Randall, R. L.; Ratner, N.; Jumbé, N. L.; Bakker, A.; Viskochil, D.; Widemann, B. C.; Stewart, D. R. Neurofibromatosis Type 1–Associated MPNST State of the Science: Outlining a Research Agenda for the Future. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **2017**, *109* (8). https://doi.org/10.1093/jnci/djx124.

(137) Xu, G.; Lin, B.; Tanaka, K.; Dunn, D.; Wood, D.; Gesteland, R.; White, R.; Weiss, R.; Tamanoi, F. The Catalytic Domain of the Neurofibromatosis Type 1 Gene Product Stimulates Ras GTPase and Complements Ira Mutants of S. Cerevisiae. *Cell* **1990**, *63* (4), 835–841. https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90149-9.

(138) Wolkenstein, P. La Neurofibromatose 1. *Med Sci Paris* **2001**, *17* (11), 1158–1167. https://doi.org/10.1051/medsci/200117111158.

(139) Anastasaki, C.; Orozco, P.; Gutmann, D. H. RAS and beyond: The Many Faces of the Neurofibromatosis Type 1 Protein. *Dis. Model. Mech.* **2022**, *15* (2), dmm049362. https://doi.org/10.1242/dmm.049362.
(140) Ozawa, T.; Araki, N.; Yunoue, S.; Tokuo, H.; Feng, L.; Patrakitkomjorn, S.; Hara, T.; Ichikawa, Y.; Matsumoto, K.; Fuji, K.; Saya, H. The Neurofibromatosis Type 1 Gene Product Neurofibromin Enhances Cell Motility by Regulating Actin Filament Dynamics via the Rho-ROCK-LIMK2-Cofilin Pathway. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (47), 39524–39533. https://doi.org/10.1074/jbc.M503707200.
(141) Starinsky-Elbaz, S.; Faigenbloom, L.; Friedman, E.; Stein, R.; Kloog, Y. The Pre-GAP-Related Domain of Neurofibromin Regulates Cell Migration through the LIM Kinase/Cofilin Pathway. *Mol. Cell. Neurosci.* **2009**, *42* (4), 278–287. https://doi.org/10.1016/j.mcn.2009.07.014.
(142) Vallée, B.; Doudeau, M.; Godin, F.; Gombault, A.; Tchalikian, A.; De Tauzia, M.-L.; Bénédetti, H. Nf1 RasGAP Inhibition of LIMK2 Mediates a New Cross-Talk between Ras and Rho Pathways. *PLoS ONE* **2012**, *7* (10), e47283. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047283.
(143) Gross, A. M.; Dombi, E.; Widemann, B. C. Current Status of MEK Inhibitors in the Treatment of Plexiform Neurofibromas. *Childs Nerv. Syst.* **2020**, *36* (10), 2443–2452. https://doi.org/10.1007/s00381-020-04731-2.
(144) Rak, R.; Kloog, Y. Targeting LIM Kinase in Cancer and Neurofibromatosis. *Cell Cycle* **2014**, *13* (9), 1360–1361. https://doi.org/10.4161/cc.28748.
(145) Manetti, F. LIM Kinases Are Attractive Targets with Many Macromolecular Partners and Only a Few Small Molecule Regulators. *Med. Res. Rev.* **2012**, *32* (5), 968–998. https://doi.org/10.1002/med.20230.
(146) Manetti, F. Recent Advances in the Rational Design and Development of LIM Kinase Inhibitors Are Not Enough to Enter Clinical Trials. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *155* (2018), 445–458. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.06.016.
(147) Berabez, R.; Routier, S.; Bénédetti, H.; Plé, K.; Vallée, B. LIM Kinases , Promising but Reluctant Therapeutic Targets : Chemistry and Preclinical Validation In Vivo. *Cells* **2022**, *11* (13), 2090. https://doi.org/10.3390/cells11132090.
(148) Wrobelski S.T.; Lin, S.; Leftheris, K.; He, L.; Seitz, S. P.; Lin, T.-A.; Vaccaro, W. Phenyl-substituted pyrimidine compounds useful as kinase inhibitors. WO2006084017, **2006**.
(149) Ross-Macdonald, P.; de Silva, H.; Guo, Q.; Xiao, H.; Hung, C.-Y.; Penhallow, B.; Markwalder, J.; He, L.; Attar, R. M.; Lin, T.; Seitz, S.; Tilford, C.; Wardwell-Swanson, J.; Jackson, D. Identification of a Nonkinase Target Mediating Cytotoxicity of Novel Kinase Inhibitors. *Mol. Cancer Ther.* **2008**, *7* (11), 3490–3498. https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0826.
(150) He, L.; Seitz, S. P.; Trainor, G. L.; Tortolani, D.; Vaccaro, W.; Poss, M.; Tarby, C. M.; Tokarski, J. S.; Penhallow, B.; Hung, C.-Y.; Attar, R.; Lin, T.-A. Modulation of Cofilin Phosphorylation by Inhibition of the Lim Family Kinases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22* (18), 5995–5998. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.07.002.
(151) Rivalle, C.; Wendling, F.; Tambourin, P.; Lhoste, J.-M.; Bisagni, E.; Chermann, J.-C. Antitumor Amino-Substituted Pyrido[3',4':4,5]Pyrrolo[2,3-g]Isoquinolines and Pyrido[4,3-b]Carbazole Derivatives: Synthesis and Evaluation of Compounds Resulting from New Side Chain and Heterocycle Modifications. *J. Med. Chem.* **1983**, *26* (2), 181–185. https://doi.org/10.1021/jm00356a012.
(152) Prudent, R.; Vassal-Stermann, E.; Nguyen, C.-H.; Pillet, C.; Martinez, A.; Prunier, C.; Barette, C.; Soleilhac, E.; Filhol, O.; Beghin, A.; Valdameri, G.; Honoré, S.; Aci-Sèche, S.; Grierson, D.; Antonipillai, J.; Li, R.; Di Pietro, A.; Dumontet, C.; Braguer, D.; Florent, J.-C.; Knapp, S.; Bernard, O.; Lafanechère, L. Pharmacological Inhibition of LIM Kinase Stabilizes Microtubules and Inhibits Neoplastic Growth. *Cancer Res.* **2012**, *72* (17), 4429–4439. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3342.
(153) Gory-Fauré, S.; Powell, R.; Jonckheere, J.; Lanté, F.; Denarier, E.; Peris, L.; Nguyen, C. H.; Buisson, A.; Lafanechère, L.; Andrieux, A. Pyr1-Mediated Pharmacological Inhibition of LIM Kinase Restores Synaptic Plasticity and Normal Behavior in a Mouse Model of Schizophrenia. *Front. Pharmacol.* **2021**, *12*, 1–11. https://doi.org/10.3389/fphar.2021.627995.
(154) Harrison, B. A.; Whitlock, N. A.; Voronkov, M. V.; Almstead, Z. Y.; Gu, K.; Mabon, R.; Gardyan, M.; Hamman, B. D.; Allen, J.; Gopinathan, S.; McKnight, B.; Crist, M.; Zhang, Y.; Liu, Y.; Courtney, L. F.; Key, B.; Zhou, J.; Patel, N.; Yates, P. W.; Liu, Q.; Wilson, A. G. E.; Kimball, S. D.; Crosson, C. E.; Rice, D. S.;

Rawlins, D. B. Novel Class of LIM-Kinase 2 Inhibitors for the Treatment of Ocular Hypertension and Associated Glaucoma. *J. Med. Chem.* **2009**, *52* (21), 6515–6518. https://doi.org/10.1021/jm901226j.

(155) Harrison, B. A.; Almstead, Z. Y.; Burgoon, H.; Gardyan, M.; Goodwin, N. C.; Healy, J.; Liu, Y.; Mabon, R.; Marinelli, B.; Samala, L.; Zhang, Y.; Stouch, T. R.; Whitlock, N. A.; Gopinathan, S.; McKnight, B.; Wang, S.; Patel, N.; Wilson, A. G. E.; Hamman, B. D.; Rice, D. S.; Rawlins, D. B. Discovery and Development of LX7101, a Dual LIM-Kinase and ROCK Inhibitor for the Treatment of Glaucoma. *ACS Med. Chem. Lett.* **2015**, *6* (1), 84–88. https://doi.org/10.1021/ml500367g.

(156) Boland, S.; Bourin, A.; Alen, J.; Geraets, J.; Schroeders, P.; Castermans, K.; Kindt, N.; Boumans, N.; Panitti, L.; Vanormelingen, J.; Fransen, S.; Van de Velde, S.; Defert, O. Design, Synthesis and Biological Characterization of Selective LIMK Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25* (18), 4005–4010. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.07.009.

(157) Alen, J.; Bourin, A.; Boland, S.; Geraets, J.; Schroeders, P.; Defert, O. Tetrahydro-Pyrimido-Indoles as Selective LIMK Inhibitors: Synthesis, Selectivity Profiling and Structure-Activity Studies. *MedChemComm* **2016**, *7* (3), 478–483. https://doi.org/10.1039/c5md00473j.

(158) Champiré, A. Conception Rationnelle, Synthèse et Évaluation Biologique d'inhibiteurs de La Voie de Signalisation LIMK/ROCK, Université d'Orléans, 2018.

(159) Routier, S., Benedetti, H., Vallee-Meheust, B., Bonnet, P., Ple, K., Aci-Seche, S., Ruchaud, S., Braka, A., Champire, A., Andres, C., Vourc'h, P. Preparation of 4-(7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-3,6-dihydropyridine-1-(2*H*)-carboxamide derivatives as LIMK and ROCK kinases inhibitors for use in the treatment of cancer. WO2021239727, **2021**.

(160) Maiti, D.; Buchwald, S. L. Orthogonal Cu- and Pd-Based Catalyst Systems for the O- and N-Arylation of Aminophenols. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (47), 17423–17429. https://doi.org/10.1021/ja9081815.

(161) Lang, H.; Gahman, T. C.; Wash, P. L.; Zhao, C.; Davis, R. L. Novel Substituted Pyrimidinyloxy Amides Useful as Inhibitors of Protein Kinases. US2007/0155746.

(162) Badea, I. A.; Axinte, L.; Vladescu, L. Monitoring of Aminophenol Isomers in Surface Water Samples Using a New HPLC Method. *Environ. Monit. Assess.* **2013**, *185* (3), 2367–2375. https://doi.org/10.1007/s10661-012-2717-7.

(163) Tables de pKa d'Evans. http://www.mch.estranky.sk/file/40/evans_pka_table.pdf.

(164) Kutz, S.; Schmidt, A.; Knölker, H.-J. Palladium-Catalyzed Synthesis of Pyrayaquinones, Murraya-quinones, and Murrayafoline-B. *Synthesis* **2016**, *49* (2), 275–292. https://doi.org/10.1055/s-0036-1588322.

(165) Han, Y.; Zhang, H.; Wang, S.; Li, B.; Xing, K.; Shi, Y.; Cao, H.; Zhang, J.; Tong, T.; Zang, J.; Guan, L.; Gao, X.; Wang, Y.; Liu, D.; Huang, M.; Jing, Y.; Zhao, L. Optimization of 4,6-Disubstituted Pyrido[3,2-d]Pyrimidines as Dual MNK/PIM Inhibitors to Inhibit Leukemia Cell Growth. *J. Med. Chem.* **2021**, *64* (18), 13719–13735. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c01084.

(166) Linstad, E. J.; Vāvere, A. L.; Hu, B.; Kempinger, J. J.; Snyder, S. E.; DiMagno, S. G. Thermolysis and Radiofluorination of Diaryliodonium Salts Derived from Anilines. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15* (10), 2246–2252. https://doi.org/10.1039/C7OB00253J.

(167) Ladziata, V.; Glunz, P. W.; Hu, Z.; Wang, Y. Spirocycloheptanes as inhibitors of ROCK. WO2016010950, **2016**.

(168) *LanthaScreen Eu Kinase Binding Assay Validation & Reagent Selection Table - FR*. https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/industrial/pharma-biopharma/drug-discovery-development/target-and-lead-identification-and-validation/kinasebiology/kinase-activity-assays/lanthascreentm-eu-kinase-binding-assay/lanthascreen-eu-kinase-binding-assay-validation-table.html (accessed 2023-09-04).

(169) Spriet, C.; Kasprowicz, A.; Trinel, D.; Bodart, J.-F. FRET-Based Enzyme Activity Reporter: Practical Hints for Kinases as Indicators of Virulence. In *Biosensing Technologies for the Detection of Pathogens - A Prospective Way for Rapid Analysis*; Rinken, T., Kivirand, K., Eds.; InTech, 2018. https://doi.org/10.5772/intechopen.72388.

(170) Georgiades, S. N.; Clardy, J. Preparation of a Psammaplysene-Based Library. *Org. Lett.* **2006**, *8* (19), 4251–4254. https://doi.org/10.1021/ol061599w.

(171) Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1997**, *23* (1), 3–25. https://doi.org/10.1016/S0169-409X(96)00423-1.

(172) Wildman, S. A.; Crippen, G. M. Prediction of Physicochemical Parameters by Atomic Contributions. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1999**, *39* (5), 868–873. https://doi.org/10.1021/ci990307l.

(173) Morpurgo, M.; Bayer, E. A.; Wilchek, M. N-Hydroxysuccinimide Carbonates and Carbamates Are Useful Reactive Reagents for Coupling Ligands to Lysines on Proteins. *J. Biochem. Biophys. Methods* **1999**, *38* (1), 17–28. https://doi.org/10.1016/S0165-022X(98)00027-X.

(174) Kawamoto, M.; Shiga, N.; Takaishi, K.; Yamashita, T. Non-Destructive Erasable Molecular Switches and Memory Using Light-Driven Twisting Motions. *Chem. Commun.* **2010**, *46* (44), 8344. https://doi.org/10.1039/c0cc02685a.

(175) Marzaro, G.; Guiotto, A.; Pastorini, G.; Chilin, A. A Novel Approach to Quinazolin-4(3H)-One via Quinazoline Oxidation: An Improved Synthesis of 4-Anilinoquinazolines. *Tetrahedron* **2010**, *66* (4), 962–968. https://doi.org/10.1016/j.tet.2009.11.091.

(176) Lan, J. S.; Pan, L. F.; Xie, S. S.; Wang, X. B.; Kong, L. Y. Synthesis and Evaluation of 6-Methylcoumarin Derivatives as Potent and Selective Monoamine Oxidase B Inhibitors. *MedChemComm* **2015**, *6* (4), 592–600. https://doi.org/10.1039/c4md00437j.

(177) Huang, X.; Anderson, K. W.; Zim, D.; Jiang, L.; Klapars, A.; Buchwald, S. L. Expanding Pd-Catalyzed C–N Bond-Forming Processes: The First Amidation of Aryl Sulfonates, Aqueous Amination, and Complementarity with Cu-Catalyzed Reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (22), 6653–6655. https://doi.org/10.1021/ja035483w.

(178) Phukan, K.; Ganguly, M.; Devi, N. Mild and Useful Method for N-Acylation of Amines. *Synth. Commun.* **2009**, *39* (15), 2694–2701. https://doi.org/10.1080/00397910802663428.

(179) Biswas, A.; Shogren, R. L.; Willett, J. L. Solvent-Free Process to Esterify Polysaccharides. *Biomacromolecules* **2005**, *6* (4), 1843–1845. https://doi.org/10.1021/bm0501757.

(180) Breugst, M.; von der Heiden, D. Mechanisms in Iodine Catalysis. *Chem. - Eur. J.* **2018**, *24* (37), 9187–9199. https://doi.org/10.1002/chem.201706136.

(181) Moffett, R. B. Tetracyclic Heterocycles as CNS Agents. *J. Heterocycl. Chem.* **1980**, *17* (2), 341–350. https://doi.org/10.1002/jhet.5570170226.

(182) Avenoza, A.; Cativiela, C.; Fernández-Recio, M. A.; Peregrina, J. M. Synthesis of 1-Amino-4-Hydroxycyclohexane-1-Carboxylic Acids. *J. Chem. Soc. Perkin 1* **1999**, No. 22, 3375–3379. https://doi.org/10.1039/a904132j.

(183) Danishefsky, S.; Kitahara, T. Useful Diene for the Diels-Alder Reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96* (25), 7807–7808. https://doi.org/10.1021/ja00832a031.

(184) Danishefsky, S.; Kitahara, T.; Yan, C. F.; Morris, J. Diels-Alder Reactions of Trans-1-Methoxy-3-Trimethylsilyloxy-1,3-Butadiene. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101* (23), 6996–7000. https://doi.org/10.1021/ja00517a036.

(185) Avenoza, A.; Cativiela, C.; Busto, J. H.; Fernández-Recio, M. A.; Peregrina, J. M.; Rodríguez, F. New Synthesis of 7-Azabicyclo[2.2.1]Heptane-1-Carboxylic Acid. *Tetrahedron* **2001**, *57* (3), 545–548. https://doi.org/10.1016/S0040-4020(00)01023-1.

(186) Oba, M.; Ishikawa, N.; Demizu, Y.; Kurihara, M.; Suemune, H.; Tanaka, M. Helical Oligomers with a Changeable Chiral Acetal Moiety: Helical Oligomers with a Changeable Chiral Acetal Moiety. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, *2013* (34), 7679–7682. https://doi.org/10.1002/ejoc.201301450.

(187) Konnert, L.; Lamaty, F.; Martinez, J.; Colacino, E. Recent Advances in the Synthesis of Hydantoins: The State of the Art of a Valuable Scaffold. *Chem. Rev.* **2017**, *117* (23), 13757–13809. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00067.

(188) Goodman, M. M.; Yu, W. STEREOSELECTIVE SYNTHESIS OF AMINO ACID ANALOGS FOR TUMOR IMAGING. US20060292073, 2006.

(189) Pettersson, M.; Quant, M.; Min, J.; Iconaru, L.; Kriwacki, R. W.; Waddell, M. B.; Guy, R. K.; Luthman, K.; Grøtli, M. Design, Synthesis and Evaluation of 2,5-Diketopiperazines as Inhibitors of the MDM2-P53 Interaction. *PLOS ONE* **2015**, *10* (10), e0137867. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137867.

(190) Hashimoto, N.; Aoyama, T.; Shioiri, T. New Methods and Reagents in Organic Synthesis. 14. A Simple Efficient Preparation of Methyl Esters with Trimethylsilyldiazomethane (TMSCHN₂) and Its Application to Gas Chromatographic Analysis of Fatty Acids. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1981**, *29* (5), 1475–1478. https://doi.org/10.1248/cpb.29.1475.

(191) Kühnel, E.; Laffan, D. D. P.; Lloyd-Jones, G. C.; Martínez del Campo, T.; Shepperson, I. R.; Slaughter, J. L. Mechanism of Methyl Esterification of Carboxylic Acids by Trimethylsilyldiazomethane. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46* (37), 7075–7078. https://doi.org/10.1002/anie.200702131.

(192) Galemmo, JR. R.; Holland, R.; Hum, G.; Pajouhesh, H.; Chahal, N.; Seid-Bagherzadeh, M.; Girard, A. CYCLYLAMINE DERIVATIVES AS CALCIUM CHANNEL BLOCKERS. US2009270394A1.

(193) Kesteleyn, B. R. R.; Berke, J. M.; Coesemans, E.; Grosse, S. C.; Jacoby, E.; Jonckers, T. H. M.; Last, S. J.; Verschueren, W. G.; Obringer, M.; Doebelin, C. C. C. Amide Derivatives Useful in the Treatment of HBV Infection or HBV-Induces Diseases. WO2020225230A1, **2020**.

(194) Routier, S.; Buron, F.; Suzenet, F.; Rodrigues, N.; Chalon, S.; Vercouillie, J.; Guilloteau, D.; Emond, P.; Marzag, H. Radiolabelled Compounds for Diagnosing Cholinergic Neurodegenerative Diseases. WO2022106714, **2022**.

(195) Rottländer, M.; Knochel, P. Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions with Aryl Nonaflates: A Practical Alternative to Aryl Triflates. *J. Org. Chem.* **1998**, *63* (1), 203–208. https://doi.org/10.1021/jo971636k.

(196) Eastwood, P. R. A Versatile Synthesis of 4-Aryl Tetrahydropyridines via Palladium Mediated Suzuki Cross-Coupling with Cyclic Vinyl Boronates. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41* (19), 3705–3708. https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)00447-0.

(197) Dubois, N.; Glynn, D.; McInally, T.; Rhodes, B.; Woodward, S.; Irvine, D. J.; Dodds, C. On DABAL-Me3 Promoted Formation of Amides. *Tetrahedron* **2013**, *69* (46), 9890–9897. https://doi.org/10.1016/j.tet.2013.08.062.

(198) Biswas, K.; Prieto, O.; Goldsmith, P. J.; Woodward, S. Remarkably Stable (Me3Al)2?DABCO and Stereoselective Nickel-Catalyzed AlR3 (R=Me, Et) Additions to Aldehydes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44* (15), 2232–2234. https://doi.org/10.1002/anie.200462569.

(199) Novak, A.; Humphreys, L. D.; Walker, M. D.; Woodward, S. Amide Bond Formation Using an Air-Stable Source of AlMe3. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47* (32), 5767–5769. https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2006.06.004.

(200) Ghosh, A. K.; Brindisi, M. Urea Derivatives in Modern Drug Discovery and Medicinal Chemistry. *J. Med. Chem.* **2020**, *63* (6), 2751–2788. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01541.

(201) Ge, J.; Zhang, C.-W.; Ng, X. W.; Peng, B.; Pan, S.; Du, S.; Wang, D.; Li, L.; Lim, K.-L.; Wohland, T.; Yao, S. Q. Puromycin Analogues Capable of Multiplexed Imaging and Profiling of Protein Synthesis and Dynamics in Live Cells and Neurons. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55* (16), 4933–4937. https://doi.org/10.1002/anie.201511030.

(202) Fleming, F. F.; Yao, L.; Ravikumar, P. C.; Funk, L.; Shook, B. C. Nitrile-Containing Pharmaceuticals: Efficacious Roles of the Nitrile Pharmacophore. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (22), 7902–7917. https://doi.org/10.1021/jm100762r.

(203) Wu, Y.; Cheng, W.; Zhang, X.; Li, Z.; Liu, Y.; Bai, W. Neurofibromatosis Type I-Associated Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors: A Case Report and Literature Review. *Arch. Med. Sci.* **2020**, *16* (6), 1476–1482. https://doi.org/10.5114/aoms.2020.100309.

(204) Mitchell, I.; Spencer, K. L.; Stengel, P.; Han, Y.; Kallan, N. C.; Munson, M.; Vigers, G. P. A.; Blake, J.; Josey, J.; Miller, S.; Xiao, D.; Xu, R.; Rao; Wang, B.; Bernacki, A. L. WO2005051304, **2005**.

(205) Blake, J.; Gunawardana, I. W.; Le Huerou, Y.; Mohr, P. J.; Wallace, E. M.; Wang, B. WO2009089352, **2009**.

(206) Patel, M.; Taskar, K. S.; Zamek-Gliszczynski, M. J. Importance of Hepatic Transporters in Clinical Disposition of Drugs and Their Metabolites. *J. Clin. Pharmacol.* **2016**, *56*, S23–S39. https://doi.org/10.1002/jcph.671.

(207) La physiologie de l'absorption. https://www.digischool.fr/cours/la-physiologie-de-l-absorption (accessed 2023-07-17).

(208) Al Shoyaib, A.; Archie, S. R.; Karamyan, V. T. Intraperitoneal Route of Drug Administration: Should It Be Used in Experimental Animal Studies? *Pharm. Res.* **2020**, *37* (1), 12. https://doi.org/10.1007/s11095-019-2745-x.
(209) Zhang, F.; Xue, J.; Shao, J.; Jia, L. Compilation of 222 Drugs' Plasma Protein Binding Data and Guidance for Study Designs. *Drug Discov. Today* **2012**, *17* (9–10), 475–485. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2011.12.018.
(210) Mathis, A. Le Rôle Des Cytochromes P450 Dans Les Interactions Médicamenteuses et Environnementales Rencontrées à l'officine, 2012.
(211) Guengerich, F. P. Mechanisms of Cytochrome P450-Catalyzed Oxidations. *ACS Catal.* **2018**, *8* (12), 10964–10976. https://doi.org/10.1021/acscatal.8b03401.
(212) Baker, M.; Parton, T. Kinetic Determinants of Hepatic Clearance: Plasma Protein Binding and Hepatic Uptake. *Xenobiotica* **2007**, *37* (10–11), 1110–1134. https://doi.org/10.1080/00498250701658296.
(213) *Pharmacocinétique*. https://pharmacomedicale.org/pharmacologie/pharmacocinetique/38-parametres-pharmacocinetiques (accessed 2023-07-19).
(214) Guiraud, M.; Bouroubi, A.; Beauchamp, R.; Bocquet, A.; Grégoire, J.-M.; Rauly-Lestienne, I.; Blanco, I.; Wolkenstein, P.; Schmitt, A.-M. Cutaneous Neurofibromas: Patients' Medical Burden, Current Management and Therapeutic Expectations: Results from an Online European Patient Community Survey. *Orphanet J. Rare Dis.* **2019**, *14* (1), 286. https://doi.org/10.1186/s13023-019-1265-4.
(215) Maguiness, S.; Berman, Y.; Rubin, N.; Dodds, M.; Plotkin, S. R.; Wong, C.; Moertel, C. Measuring the Effect of Cutaneous Neurofibromas on Quality of Life in Neurofibromatosis Type 1. *Neurology* **2021**, *97*, S25–S31. https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000012427.
(216) Ozarslan, B.; Russo, T.; Argenziano, G.; Santoro, C.; Piccolo, V. Cutaneous Findings in Neurofibromatosis Type 1. *Cancers* **2021**, *13* (3), 463. https://doi.org/10.3390/cancers13030463.
(217) Oguievetskaia, K.; Cifuentes-Diaz, C.; Girault, J.-A.; Goutebroze, L. Contacts Cellulaires Des Fibres Myélinisées Du Système Nerveux Périphérique. *médecine/sciences* **2005**, *21* (2), 162–169. https://doi.org/10.1051/medsci/2005212162.
(218) Ortonne, N.; Wolkenstein, P.; Blakeley, J. O.; Korf, B.; Plotkin, S. R.; Riccardi, V. M.; Miller, D. C.; Huson, S.; Peltonen, J.; Rosenberg, A.; Carroll, S. L.; Verma, S. K.; Mautner, V.; Upadhyaya, M.; Stemmer-Rachamimov, A. Cutaneous Neurofibromas: Current Clinical and Pathologic Issues. *Neurology* **2018**, *91*, S5–S13. https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000005792.
(219) Blakeley, J. O.; Le, L. Q.; Lee, S. Y.; Ly, I.; Rhodes, S. D.; Romo, C. G.; Sarin, K. Y.; Staedtke, V.; Steensma, M. R.; Wolkenstein, P.; Largaespada, D.; Serra, E.; Haniffa, M.; Bakker, A.; McCormick, F.; Cagan, R. L.; Ju, W.; Stemmer-Rachamimov, A.; Grimes, K.; Topilko, P.; Kornacki, D.; Kelly, K. M.; Gottesman, S.; York, Z.; Epps, R. A Call for Discovery and Therapeutic Development for Cutaneous Neurofibromas. *J. Invest. Dermatol.* **2023**, *143* (8), 1351–1357. https://doi.org/10.1016/j.jid.2022.11.027.
(220) Radomska, K. J.; Coulpier, F.; Gresset, A.; Schmitt, A.; Debbiche, A.; Lemoine, S.; Wolkenstein, P.; Vallat, J.-M.; Charnay, P.; Topilko, P. Cellular Origin, Tumor Progression, and Pathogenic Mechanisms of Cutaneous Neurofibromas Revealed by Mice with Nf1 Knockout in Boundary Cap Cells. *Cancer Discov.* **2019**, *9* (1), 130–147. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-0156.
(221) Molina, J. R.; Adjei, A. A. The Ras/Raf/MAPK Pathway. *J. Thorac. Oncol.* **2006**, *1* (1), 7–9. https://doi.org/10.1016/S1556-0864(15)31506-9.
(222) Scheiner, S. Understanding Noncovalent Bonds and Their Controlling Forces. *J. Chem. Phys.* **2020**, *153* (14), 140901. https://doi.org/10.1063/5.0026168.
(223) Covalent Bond Energies. https://gchem.cm.utexas.edu/data/section2.php?target=bond-energies-table4.php (accessed 2023-08-02).
(224) Boike, L.; Henning, N. J.; Nomura, D. K. Advances in Covalent Drug Discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2022**, *21* (12), 881–898. https://doi.org/10.1038/s41573-022-00542-z.
(225) Miner, J.; Hoffhines, A. The Discovery of Aspirin's Antithrombotic Effects. *Tex. Heart Inst. J.* **2007**, *34* (2), 179–186.
(226) *Listes modèles des médicaments essentiels de l'OMS*. https://syntheticdrugs.unodc.org/syntheticdrugs/fr/access/pharmaceutical/selection--model-list-of-essential-medicines.html (accessed 2023-08-02).

(227) Roth, G. J.; Siok, C. J. Acetylation of the NH2-Terminal Serine of Prostaglandin Synthetase by Aspirin. *J. Biol. Chem.* **1978**, *253* (11), 3782–3784. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)34756-7.
(228) Lei, J.; Zhou, Y.; Xie, D.; Zhang, Y. Mechanistic Insights into a Classic Wonder Drug—Aspirin. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (1), 70–73. https://doi.org/10.1021/ja5112964.
(229) Sutanto, F.; Konstantinidou, M.; Dömling, A. Covalent Inhibitors: A Rational Approach to Drug Discovery. *RSC Med. Chem.* **2020**, *11* (8), 876–884. https://doi.org/10.1039/D0MD00154F.
(230) Ghosh, A. K.; Samanta, I.; Mondal, A.; Liu, W. R. Covalent Inhibition in Drug Discovery. *ChemMedChem* **2019**, *14* (9), 889–906. https://doi.org/10.1002/cmdc.201900107.
(231) Singh, J.; Petter, R. C.; Baillie, T. A.; Whitty, A. The Resurgence of Covalent Drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2011**, *10* (4), 307–317. https://doi.org/10.1038/nrd3410.
(232) Olbe, L.; Carlsson, E.; Lindberg, P. A Proton-Pump Inhibitor Expedition: The Case Histories of Omeprazole and Esomeprazole. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2* (2), 132–139. https://doi.org/10.1038/nrd1010.
(233) Burger, J. A.; Buggy, J. J. Bruton Tyrosine Kinase Inhibitor Ibrutinib (PCI-32765). *Leuk. Lymphoma* **2013**, *54* (11), 2385–2391. https://doi.org/10.3109/10428194.2013.777837.
(234) Barf, T.; Covey, T.; Izumi, R.; Van De Kar, B.; Gulrajani, M.; Van Lith, B.; Van Hoek, M.; De Zwart, E.; Mittag, D.; Demont, D.; Verkaik, S.; Krantz, F.; Pearson, P. G.; Ulrich, R.; Kaptein, A. Acalabrutinib (ACP-196): A Covalent Bruton Tyrosine Kinase Inhibitor with a Differentiated Selectivity and In Vivo Potency Profile. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2017**, *363* (2), 240–252. https://doi.org/10.1124/jpet.117.242909.
(235) Yin, G.; Huang, J.; Petela, J.; Jiang, H.; Zhang, Y.; Gong, S.; Wu, J.; Liu, B.; Shi, J.; Gao, Y. Targeting Small GTPases: Emerging Grasps on Previously Untamable Targets, Pioneered by KRAS. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2023**, *8* (1), 212. https://doi.org/10.1038/s41392-023-01441-4.
(236) Huang, L.; Guo, Z.; Wang, F.; Fu, L. KRAS Mutation: From Undruggable to Druggable in Cancer. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2021**, *6* (1), 386. https://doi.org/10.1038/s41392-021-00780-4.
(237) Ostrem, J. M.; Peters, U.; Sos, M. L.; Wells, J. A.; Shokat, K. M. K-Ras(G12C) Inhibitors Allosterically Control GTP Affinity and Effector Interactions. *Nature* **2013**, *503* (7477), 548–551. https://doi.org/10.1038/nature12796.
(238) Ray, S.; Murkin, A. S. New Electrophiles and Strategies for Mechanism-Based and Targeted Covalent Inhibitor Design. *Biochemistry* **2019**, *58* (52), 5234–5244. https://doi.org/10.1021/acs.biochem.9b00293.
(239) Cheng, S.-S.; Yang, G.-J.; Wang, W.; Leung, C.-H.; Ma, D.-L. The Design and Development of Covalent Protein-Protein Interaction Inhibitors for Cancer Treatment. *J Hematol Oncol* **2020**, *13* (1), 26. https://doi.org/10.1186/s13045-020-00850-0.
(240) Singh, J. The Ascension of Targeted Covalent Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2022**, *65* (8), 5886–5901. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c02134.
(241) Bandyopadhyay, A.; Gao, J. Targeting Biomolecules with Reversible Covalent Chemistry. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2016**, *34*, 110–116. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.08.011.
(242) Bradshaw, J. M.; McFarland, J. M.; Paavilainen, V. O.; Bisconte, A.; Tam, D.; Phan, V. T.; Romanov, S.; Finkle, D.; Shu, J.; Patel, V.; Ton, T.; Li, X.; Loughhead, D. G.; Nunn, P. A.; Karr, D. E.; Gerritsen, M. E.; Funk, J. O.; Owens, T. D.; Verner, E.; Brameld, K. A.; Hill, R. J.; Goldstein, D. M.; Taunton, J. Prolonged and Tunable Residence Time Using Reversible Covalent Kinase Inhibitors. *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11* (7), 525–531. https://doi.org/10.1038/nchembio.1817.
(243) Lu, X.; Smaill, J. B.; Patterson, A. V.; Ding, K. Discovery of Cysteine-Targeting Covalent Protein Kinase Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2022**, *65* (1), 58–83. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c01719.
(244) Gambini, L.; Baggio, C.; Udompholkul, P.; Jossart, J.; Salem, A. F.; Perry, J. J. P.; Pellecchia, M. Covalent Inhibitors of Protein–Protein Interactions Targeting Lysine, Tyrosine, or Histidine Residues. *J. Med. Chem.* **2019**, *62* (11), 5616–5627. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b00561.
(245) Jackson, P. A.; Widen, J. C.; Harki, D. A.; Brummond, K. M. Covalent Modifiers: A Chemical Perspective on the Reactivity of α,β-Unsaturated Carbonyls with Thiols via Hetero-Michael Addition Reactions. *J. Med. Chem.* **2017**, *60* (3), 839–885. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00788.
(246) Zhao, Z.; Bourne, P. E. Progress with Covalent Small-Molecule Kinase Inhibitors. *Drug Discov. Today* **2018**, *23* (3), 727–735. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.01.035.

(247) Grabrijan, K.; Hrast, M.; Proj, M.; Dolšak, A.; Zdovc, I.; Imre, T.; Petri, L.; Ábrányi-Balogh, P.; Keserű, G. M.; Gobec, S. Covalent Inhibitors of Bacterial Peptidoglycan Biosynthesis Enzyme MurA with Chloroacetamide Warhead. *Eur. J. Med. Chem.* **2022**, *243*, 114752. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114752.

(248) Huang, F.; Han, X.; Xiao, X.; Zhou, J. Covalent Warheads Targeting Cysteine Residue: The Promising Approach in Drug Development. *Molecules* **2022**, *27* (22), 7728. https://doi.org/10.3390/molecules27227728.

(249) Kim, H.; Hwang, Y. S.; Kim, M.; Park, S. B. Recent Advances in the Development of Covalent Inhibitors. *RSC Med. Chem.* **2021**, *12* (7), 1037–1045. https://doi.org/10.1039/D1MD00068C.

(250) Mortenson, D. E.; Brighty, G. J.; Plate, L.; Bare, G.; Chen, W.; Li, S.; Wang, H.; Cravatt, B. F.; Forli, S.; Powers, E. T.; Sharpless, K. B.; Wilson, I. A.; Kelly, J. W. "Inverse Drug Discovery" Strategy To Identify Proteins That Are Targeted by Latent Electrophiles As Exemplified by Aryl Fluorosulfates. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140* (1), 200–210. https://doi.org/10.1021/jacs.7b08366.

(251) Serafimova, I. M.; Pufall, M. A.; Krishnan, S.; Duda, K.; Cohen, M. S.; Maglathlin, R. L.; McFarland, J. M.; Miller, R. M.; Frödin, M.; Taunton, J. Reversible Targeting of Noncatalytic Cysteines with Chemically Tuned Electrophiles. *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8* (5), 471–476. https://doi.org/10.1038/nchembio.925.

(252) Krishnan, S.; Miller, R. M.; Tian, B.; Mullins, R. D.; Jacobson, M. P.; Taunton, J. Design of Reversible, Cysteine-Targeted Michael Acceptors Guided by Kinetic and Computational Analysis. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (36), 12624–12630. https://doi.org/10.1021/ja505194w.

(253) De Cesco, S.; Kurian, J.; Dufresne, C.; Mittermaier, A. K.; Moitessier, N. Covalent Inhibitors Design and Discovery. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *138*, 96–114. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.06.019.

(254) Faridoon; Ng, R.; Zhang, G.; Li, J. J. An Update on the Discovery and Development of Reversible Covalent Inhibitors. *Med. Chem. Res.* **2023**, *32* (6), 1039–1062. https://doi.org/10.1007/s00044-023-03065-3.

(255) Song, S.; Gao, P.; Sun, L.; Kang, D.; Kongsted, J.; Poongavanam, V.; Zhan, P.; Liu, X. Recent Developments in the Medicinal Chemistry of Single Boron Atom-Containing Compounds. *Acta Pharm. Sin. B* **2021**, *11* (10), 3035–3059. https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.01.010.

(256) Shindo, N.; Fuchida, H.; Sato, M.; Watari, K.; Shibata, T.; Kuwata, K.; Miura, C.; Okamoto, K.; Hatsuyama, Y.; Tokunaga, K.; Sakamoto, S.; Morimoto, S.; Abe, Y.; Shiroishi, M.; Caaveiro, J. M. M.; Ueda, T.; Tamura, T.; Matsunaga, N.; Nakao, T.; Koyanagi, S.; Ohdo, S.; Yamaguchi, Y.; Hamachi, I.; Ono, M.; Ojida, A. Selective and Reversible Modification of Kinase Cysteines with Chlorofluoroacetamides. *Nat. Chem. Biol.* **2019**, *15* (3), 250–258. https://doi.org/10.1038/s41589-018-0204-3.

(257) Ciechanover, A.; Schwartz, A. L. The Ubiquitin-Proteasome Pathway: The Complexity and Myriad Functions of Proteins Death. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1998**, *95* (6), 2727–2730. https://doi.org/10.1073/pnas.95.6.2727.

(258) Yang, Q.; Zhao, J.; Chen, D.; Wang, Y. E3 Ubiquitin Ligases: Styles, Structures and Functions. *Mol. Biomed.* **2021**, *2* (1), 23. https://doi.org/10.1186/s43556-021-00043-2.

(259) Benaroudj, N. Le Protéasome, Une Machinerie Cellulaire Qui Dégrade Les Protéines. *médecine/sciences* **2005**, *21* (2), 115–116. https://doi.org/10.1051/medsci/2005212115.

(260) Liu, Z.; Hu, M.; Yang, Y.; Du, C.; Zhou, H.; Liu, C.; Chen, Y.; Fan, L.; Ma, H.; Gong, Y.; Xie, Y. An Overview of PROTACs: A Promising Drug Discovery Paradigm. *Mol. Biomed.* **2022**, *3* (1), 46. https://doi.org/10.1186/s43556-022-00112-0.

(261) Rodríguez, A. *Novel PROTAC has a two-front improvement*. Baylor College of Medicine Blog Network. https://blogs.bcm.edu/2020/09/03/from-the-labs-novel-protac-has-a-two-front-improvement/ (accessed 2023-06-28).

(262) Sakamoto, K. M.; Kim, K. B.; Kumagai, A.; Mercurio, F.; Crews, C. M.; Deshaies, R. J. Protacs: Chimeric Molecules That Target Proteins to the Skp1–Cullin–F Box Complex for Ubiquitination and Degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, *98* (15), 8554–8559. https://doi.org/10.1073/pnas.141230798.

(263) Griffith, E. C.; Su, Z.; Turk, B. E.; Chen, S.; Chang, Y.-H.; Wu, Z.; Biemann, K.; Liu, J. O. Methionine Aminopeptidase (Type 2) Is the Common Target for Angiogenesis Inhibitors AGM-1470 and Ovalicin. *Chem. Biol.* **1997**, *4* (6), 461–471. https://doi.org/10.1016/S1074-5521(97)90198-8.

(264) Yaron, A.; Hatzubai, A.; Davis, M.; Lavon, I.; Amit, S.; Manning, A. M.; Andersen, J. S.; Mann, M.; Mercurio, F.; Ben-Neriah, Y. Identification of the Receptor Component of the IκBα–Ubiquitin Ligase. *Nature* **1998**, *396* (6711), 590–594. https://doi.org/10.1038/25159.

(265) Schneekloth, A. R.; Pucheault, M.; Tae, H. S.; Crews, C. M. Targeted Intracellular Protein Degradation Induced by a Small Molecule: En Route to Chemical Proteomics. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18* (22), 5904–5908. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.07.114.

(266) Vassilev, L. T.; Vu, B. T.; Graves, B.; Carvajal, D.; Podlaski, F.; Filipovic, Z.; Kong, N.; Kammlott, U.; Lukacs, C.; Klein, C.; Fotouhi, N.; Liu, E. A. In Vivo Activation of the P53 Pathway by Small-Molecule Antagonists of MDM2. *Science* **2004**, *303* (5659), 844–848. https://doi.org/10.1126/science.1092472.

(267) Itoh, Y.; Ishikawa, M.; Naito, M.; Hashimoto, Y. Protein Knockdown Using Methyl Bestatin−Ligand Hybrid Molecules: Design and Synthesis of Inducers of Ubiquitination-Mediated Degradation of Cellular Retinoic Acid-Binding Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (16), 5820–5826. https://doi.org/10.1021/ja100691p.

(268) Ito, T.; Ando, H.; Suzuki, T.; Ogura, T.; Hotta, K.; Imamura, Y.; Yamaguchi, Y.; Handa, H. Identification of a Primary Target of Thalidomide Teratogenicity. *Science* **2010**, *327* (5971), 1345–1350. https://doi.org/10.1126/science.1177319.

(269) Lu, G.; Middleton, R. E.; Sun, H.; Naniong, M.; Ott, C. J.; Mitsiades, C. S.; Wong, K.-K.; Bradner, J. E.; Kaelin, W. G. The Myeloma Drug Lenalidomide Promotes the Cereblon-Dependent Destruction of Ikaros Proteins. *Science* **2014**, *343* (6168), 305–309. https://doi.org/10.1126/science.1244917.

(270) Gandhi, A. K.; Kang, J.; Havens, C. G.; Conklin, T.; Ning, Y.; Wu, L.; Ito, T.; Ando, H.; Waldman, M. F.; Thakurta, A.; Klippel, A.; Handa, H.; Daniel, T. O.; Schafer, P. H.; Chopra, R. Immunomodulatory Agents Lenalidomide and Pomalidomide Co-stimulate T Cells by Inducing Degradation of T Cell Repressors I Karos and A Iolos via Modulation of the E 3 Ubiquitin Ligase Complex CRL 4 ^{CRBN}. *Br. J. Haematol.* **2014**, *164* (6), 811–821. https://doi.org/10.1111/bjh.12708.

(271) Fischer, E. S.; Böhm, K.; Lydeard, J. R.; Yang, H.; Stadler, M. B.; Cavadini, S.; Nagel, J.; Serluca, F.; Acker, V.; Lingaraju, G. M.; Tichkule, R. B.; Schebesta, M.; Forrester, W. C.; Schirle, M.; Hassiepen, U.; Ottl, J.; Hild, M.; Beckwith, R. E. J.; Harper, J. W.; Jenkins, J. L.; Thomä, N. H. Structure of the DDB1–CRBN E3 Ubiquitin Ligase in Complex with Thalidomide. *Nature* **2014**, *512* (7512), 49–53. https://doi.org/10.1038/nature13527.

(272) Buckley, D. L.; Van Molle, I.; Gareiss, P. C.; Tae, H. S.; Michel, J.; Noblin, D. J.; Jorgensen, W. L.; Ciulli, A.; Crews, C. M. Targeting the von Hippel–Lindau E3 Ubiquitin Ligase Using Small Molecules To Disrupt the VHL/HIF-1α Interaction. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (10), 4465–4468. https://doi.org/10.1021/ja209924v.

(273) Schneekloth, J. S.; Fonseca, F. N.; Koldobskiy, M.; Mandal, A.; Deshaies, R.; Sakamoto, K.; Crews, C. M. Chemical Genetic Control of Protein Levels: Selective in Vivo Targeted Degradation. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (12), 3748–3754. https://doi.org/10.1021/ja039025z.

(274) Galdeano, C.; Gadd, M. S.; Soares, P.; Scaffidi, S.; Van Molle, I.; Birced, I.; Hewitt, S.; Dias, D. M.; Ciulli, A. Structure-Guided Design and Optimization of Small Molecules Targeting the Protein–Protein Interaction between the von Hippel–Lindau (VHL) E3 Ubiquitin Ligase and the Hypoxia Inducible Factor (HIF) Alpha Subunit with in Vitro Nanomolar Affinities. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (20), 8657–8663. https://doi.org/10.1021/jm5011258.

(275) Bondeson, D. P.; Mares, A.; Smith, I. E. D.; Ko, E.; Campos, S.; Miah, A. H.; Mulholland, K. E.; Routly, N.; Buckley, D. L.; Gustafson, J. L.; Zinn, N.; Grandi, P.; Shimamura, S.; Bergamini, G.; Faelth-Savitski, M.; Bantscheff, M.; Cox, C.; Gordon, D. A.; Willard, R. R.; Flanagan, J. J.; Casillas, L. N.; Votta, B. J.; Den Besten, W.; Famm, K.; Kruidenier, L.; Carter, P. S.; Harling, J. D.; Churcher, I.; Crews, C. M. Catalytic in Vivo Protein Knockdown by Small-Molecule PROTACs. *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11* (8), 611–617. https://doi.org/10.1038/nchembio.1858.

(276) Adlanmerini, M.; Fabre, A.; Boudou, F.; Riant, É.; Fontaine, C.; Laurell, H.; Gourdy, P.; Lenfant, F.; Arnal, J.-F. Effets Membranaires Du Récepteur Alpha Des Œstrogènes: Une Question de Spécificité Tissulaire. *médecine/sciences* **2015**, *31* (12), 1083–1091. https://doi.org/10.1051/medsci/20153112011.

(277) Pham, A.-T.; Ghilardi, A. F.; Sun, L. Recent Advances in the Development of RIPK2 Modulators for the Treatment of Inflammatory Diseases. *Front. Pharmacol.* **2023**, *14*, 1127722. https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1127722.
(278) Winter, G. E.; Buckley, D. L.; Paulk, J.; Roberts, J. M.; Souza, A.; Dhe-Paganon, S.; Bradner, J. E. Phthalimide Conjugation as a Strategy for in Vivo Target Protein Degradation. *Science* **2015**, *348* (6241), 1376–1381. https://doi.org/10.1126/science.aab1433.
(279) Donati, B.; Lorenzini, E.; Ciarrocchi, A. BRD4 and Cancer: Going beyond Transcriptional Regulation. *Mol. Cancer* **2018**, *17* (1), 164. https://doi.org/10.1186/s12943-018-0915-9.
(280) Samarasinghe, K. T. G.; Crews, C. M. Targeted Protein Degradation: A Promise for Undruggable Proteins. *Cell Chem. Biol.* **2021**, *28* (7), 934–951. https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2021.04.011.
(281) Békés, M.; Langley, D. R.; Crews, C. M. PROTAC Targeted Protein Degraders: The Past Is Prologue. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2022**, *21* (3), 181–200. https://doi.org/10.1038/s41573-021-00371-6.
(282) Chirnomas, D.; Hornberger, K. R.; Crews, C. M. Protein Degraders Enter the Clinic — a New Approach to Cancer Therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2023**, *20* (4), 265–278. https://doi.org/10.1038/s41571-023-00736-3.
(283) Troup, R. I.; Fallan, C.; Baud, M. G. J. Current Strategies for the Design of PROTAC Linkers: A Critical Review. *Explor. Target. Anti-Tumor Ther.* **2020**, *1* (5), 273–312. https://doi.org/10.37349/etat.2020.00018.
(284) Belcher, B. P.; Ward, C. C.; Nomura, D. K. Ligandability of E3 Ligases for Targeted Protein Degradation Applications. *Biochemistry* **2023**, *62* (3), 588–600. https://doi.org/10.1021/acs.biochem.1c00464.
(285) Cao, C.; He, M.; Wang, L.; He, Y.; Rao, Y. Chemistries of Bifunctional PROTAC Degraders. *Chem. Soc. Rev.* **2022**, *51* (16), 7066–7114. https://doi.org/10.1039/D2CS00220E.
(286) Kannt, A.; Đikić, I. Expanding the Arsenal of E3 Ubiquitin Ligases for Proximity-Induced Protein Degradation. *Cell Chem. Biol.* **2021**, *28* (7), 1014–1031. https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2021.04.007.
(287) Maple, H. J.; Clayden, N.; Baron, A.; Stacey, C.; Felix, R. Developing Degraders: Principles and Perspectives on Design and Chemical Space. *MedChemComm* **2019**, *10* (10), 1755–1764. https://doi.org/10.1039/C9MD00272C.
(288) P. Wurz, R.; Dellamaggiore, K.; Dou, H.; Javier, N.; Lo, M.-C.; D. McCarter, J.; Mohl, D.; Sastri, C.; Russell Lipford, J.; J. Cee, V. A "Click Chemistry Platform" for the Rapid Synthesis of Bispecific Molecules for Inducing Protein Degradation. *J. Med. Chem.* **2017**, *61* (2), 453–461. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01781.
(289) Xia, L.-W.; Ba, M.-Y.; Liu, W.; Cheng, W.; Hu, C.-P.; Zhao, Q.; Yao, Y.-F.; Sun, M.-R.; Duan, Y.-T. Triazol: A Privileged Scaffold for Proteolysis Targeting Chimeras. *Future Med. Chem.* **2019**, *11* (22), 2919–2973. https://doi.org/10.4155/fmc-2019-0159.
(290) Zagidullin, A.; Milyukov, V.; Rizvanov, A.; Bulatov, E. Novel Approaches for the Rational Design of PROTAC Linkers. *Explor. Target. Anti-Tumor Ther.* **2020**, *1* (5), 381–390. https://doi.org/10.37349/etat.2020.00023.
(291) Liu, X.; Zhang, X.; Lv, D.; Yuan, Y.; Zheng, G.; Zhou, D. Assays and Technologies for Developing Proteolysis Targeting Chimera Degraders. *Future Med. Chem.* **2020**, *12* (12), 1155–1179. https://doi.org/10.4155/fmc-2020-0073.
(292) Rodbard, D.; Feldman, Y.; Jaffe, M. L.; Miles, L. E. M. Kinetics of Two-Site Immunoradiometric ('Sandwich') Assays—II. *Immunochemistry* **1978**, *15* (2), 77–82. https://doi.org/10.1016/0161-5890(78)90046-9.
(293) Douglass, E. F.; Miller, C. J.; Sparer, G.; Shapiro, H.; Spiegel, D. A. A Comprehensive Mathematical Model for Three-Body Binding Equilibria. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (16), 6092–6099. https://doi.org/10.1021/ja311795d.
(294) Cecchini, C.; Pannilunghi, S.; Tardy, S.; Scapozza, L. From Conception to Development: Investigating PROTACs Features for Improved Cell Permeability and Successful Protein Degradation. *Front. Chem.* **2021**, *9*, 672267. https://doi.org/10.3389/fchem.2021.672267.
(295) Li, X.; Pu, W.; Zheng, Q.; Ai, M.; Chen, S.; Peng, Y. Proteolysis-Targeting Chimeras (PROTACs) in Cancer Therapy. *Mol. Cancer* **2022**, *21* (1), 1–30. https://doi.org/10.1186/s12943-021-01434-3.

(296) Yu, F.; Cai, M.; Shao, L.; Zhang, J. Targeting Protein Kinases Degradation by PROTACs. *Front. Chem.* **2021**, *9*, 679120. https://doi.org/10.3389/fchem.2021.679120.
(297) Donovan, K. A.; Ferguson, F. M.; Bushman, J. W.; Eleuteri, N. A.; Bhunia, D.; Ryu, S.; Tan, L.; Shi, K.; Yue, H.; Liu, X.; Dobrovolsky, D.; Jiang, B.; Wang, J.; Hao, M.; You, I.; Teng, M.; Liang, Y.; Hatcher, J.; Li, Z.; Manz, T. D.; Groendyke, B.; Hu, W.; Nam, Y.; Sengupta, S.; Cho, H.; Shin, I.; Agius, M. P.; Ghobrial, I. M.; Ma, M. W.; Che, J.; Buhrlage, S. J.; Sim, T.; Gray, N. S.; Fischer, E. S. Mapping the Degradable Kinome Provides a Resource for Expedited Degrader Development. *Cell* **2020**, *183* (6), 1714–1731. https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.10.038.
(298) Malvi, P.; Reddy, D. S.; Kumar, R.; Chava, S.; Burela, S.; Parajuli, K.; Zhang, X.; Wajapeyee, N. LIMK2 Promotes Melanoma Tumor Growth and Metastasis through G3BP1-ESM1 Pathway-Mediated Apoptosis Inhibition. *Oncogene* **2023**, *42* (18), 1478–1491. https://doi.org/10.1038/s41388-023-02658-x.
(299) Wissner, A.; Mansour, T. S. The Development of HKI-272 and Related Compounds for the Treatment of Cancer. *Arch. Pharm. (Weinheim)* **2008**, *341* (8), 465–477. https://doi.org/10.1002/ardp.200800009.
(300) Itaya, T.; Kanai, T. New Reactions of Phosgene with Tertiary Amines. *Heterocycles* **1997**, *46* (1), 101–104. https://doi.org/10.3987/COM-97-S37.
(301) Lemoucheux, L.; Rouden, J.; Ibazizene, M.; Sobrio, F.; Lasne, M.-C. Debenzylation of Tertiary Amines Using Phosgene or Triphosgene: An Efficient and Rapid Procedure for the Preparation of Carbamoyl Chlorides and Unsymmetrical Ureas. Application in Carbon-11 Chemistry. *J. Org. Chem.* **2003**, *68* (19), 7289–7297. https://doi.org/10.1021/jo0346297.
(302) Flanagan, M. E.; Abramite, J. A.; Anderson, D. P.; Aulabaugh, A.; Dahal, U. P.; Gilbert, A. M.; Li, C.; Montgomery, J.; Oppenheimer, S. R.; Ryder, T.; Schuff, B. P.; Uccello, D. P.; Walker, G. S.; Wu, Y.; Brown, M. F.; Chen, J. M.; Hayward, M. M.; Noe, M. C.; Obach, R. S.; Philippe, L.; Shanmugasundaram, V.; Shapiro, M. J.; Starr, J.; Stroh, J.; Che, Y. Chemical and Computational Methods for the Characterization of Covalent Reactive Groups for the Prospective Design of Irreversible Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (23), 10072–10079. https://doi.org/10.1021/jm501412a.
(303) Rondestvedt, C. S. Unsaturated Sulfonic Acids. IV. Preparation and Properties of α-Bromoalkenesulfonyl Chlorides. *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76* (7), 1926–1929. https://doi.org/10.1021/ja01636a056.
(304) Magnani, J. L.; Peterson, J. M.; Sarkar, A. K.; Vohra, Y. U.; Baek M.-G. Dérivés de galactopyranosyle-cyclohexyle utilisés en tant qu'antagonistes d'e-sélectine WO2018169853A1, **2018**.
(305) Lucescu, L.; Bîcu, E.; Belei, D.; Shova, S.; Rigo, B.; Gautret, P.; Dubois, J.; Ghinet, A. Synthesis and Biological Evaluation of a New Class of Triazin–Triazoles as Potential Inhibitors of Human Farnesyltransferase. *Res. Chem. Intermed.* **2016**, *42* (3), 1999–2021. https://doi.org/10.1007/s11164-015-2131-1.
(306) Jang, D. O.; Park, D. J.; Joonggon, K. A Mild and Efficient Procedure for the Preparation of Acid Chlorides from Carboxylic Acids. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40* (29), 5323–5326. https://doi.org/10.1016/S0040-4039(99)00967-3.
(307) Kijrungphaiboon, W.; Chantarasriwong, O.; Chavasiri, W. Cl3CCN/PPh3 and CBr4/PPh3: Two Efficient Reagent Systems for the Preparation of N-Heteroaromatic Halides. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53* (6), 674–677. https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2011.11.123.
(308) Due-Hansen, M. E.; Pandey, S. K.; Christiansen, E.; Andersen, R.; Hansen, S. V. F.; Ulven, T. A Protocol for Amide Bond Formation with Electron Deficient Amines and Sterically Hindered Substrates. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14* (2), 430–433. https://doi.org/10.1039/C5OB02129D.
(309) Deng, W.; Chen, X.; Jiang, K.; Song, X.; Huang, M.; Tu, Z.-C.; Zhang, Z.; Lin, X.; Ortega, R.; Patterson, A. V.; Smaill, J. B.; Ding, K.; Chen, S.; Chen, Y.; Lu, X. Investigation of Covalent Warheads in the Design of 2-Aminopyrimidine-Based FGFR4 Inhibitors. *ACS Med. Chem. Lett.* **2021**, *12* (4), 647–652. https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.1c00052.
(310) Jang, M.; Lim, T.; Park, B. Y.; Han, M. S. Metal-Free, Rapid, and Highly Chemoselective Reduction of Aromatic Nitro Compounds at Room Temperature. *J. Org. Chem.* **2022**, *87* (2), 910–919. https://doi.org/10.1021/acs.joc.1c01431.

(311) Fletcher, J. T.; Walz, S. E.; Keeney, M. E. Monosubstituted 1,2,3-Triazoles from Two-Step One-Pot Deprotection/Click Additions of Trimethylsilylacetylene. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49* (49), 7030–7032. https://doi.org/10.1016/J.TETLET.2008.09.136.

(312) Wu, H.; Yang, K.; Zhang, Z.; Leisten, E. D.; Li, Z.; Xie, H.; Liu, J.; Smith, K. A.; Novakova, Z.; Barinka, C.; Tang, W. Development of Multifunctional Histone Deacetylase 6 Degraders with Potent Antimyeloma Activity. *J. Med. Chem.* **2019**, *62* (15), 7042–7057. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b00516.

(313) Coulson, D. R.; Satek, L. C.; Grim, S. O. Tetrakis(Triphenylphosphine)Palladium(0). In *Inorganic Syntheses*; Cotton, F. A., Ed.; Wiley, 1972; Vol. 13, pp 121–124. https://doi.org/10.1002/9780470132449.ch23.

Contributions scientifiques

Publication :

- Berabez, R.; Routier, S.; Bénédetti, H.; Plé, K.; Vallée, B. LIM Kinases, Promising but Reluctant Therapeutic Targets : Chemistry and Preclinical Validation In Vivo. *Cells* **2022**, *11* (13), 2090.

Communication orale :

- Berabez, R. ; Champiré, A. ; Sainjon, M. ; Braka, A. ; Aci-Sèche, S. ; Bonnet, P. ; Mathea, S. ; Knapp, S. ; Cosson, A. ; Corret, J. ; Girardin, C. ; Ruchaud, S. ; Vallée, B. ; Brion, R. ; Verrecchia, F. ; Plé, K. ; Bénédetti, H. ; Routier, S. *Synthesis and preclinical validation of LIMKs inhibitors: Promising drugs for osteosarcoma treatment?* 29th Young Research Fellow Meeting (SCT-YRFM). **Juillet 2022, Nantes**.

Flash posters (FP) et posters (P) :

- **(FP) + (P)** Berabez, R. ; Champiré, A. ; Sainjon, M. ; Braka, A. ; Aci-Sèche, S. ; Bonnet, P. ; Mathea, S. ; Knapp, S. ; Cosson, A. ; Corret, J. ; Girardin, C. ; Ruchaud, S. ; Vallée, B. ; Brion, R. ; Verrecchia, F. ; Plé, K. ; Bénédetti, H. ; Routier, S. *Synthesis and preclinical validation of LIMKs inhibitors: Promising drugs for osteosarcoma treatment?*
34ème colloque Biotechnocentre. **Octobre 2022**, **Nouan-le-Fuzelier**.

- **(FP) + (P)** Berabez, R. ; Champiré, A. ; Sainjon, M. ; Braka, A. ; Aci-Sèche, S. ; Bonnet, P. ; Mathea, S. ; Knapp, S. ; Cosson, A. ; Corret, J. ; Girardin, C. ; Ruchaud, S. ; Vallée, B. ; Brion, R. ; Verrecchia, F. ; Plé, K. ; Bénédetti, H. ; Routier, S. *Synthesis and preclinical validation of LIMKs inhibitors: Promising drugs for osteosarcoma treatment?*
XXVII EFMC International Symposium on Medicinal Chemistry (EFMC-ISMC 2022). **Septembre 2022**, **Nice**.

- **(FP) + (P)** Berabez, R. ; Champiré, A. ; Sainjon, M. ; Braka, A. ; Aci-Sèche, S. ; Bonnet, P. ; Mathea, S. ; Knapp, S. ; Cosson, A. ; Corret, J. ; Girardin, C. ; Ruchaud, S. ; Vallée, B. ; Brion, R. ; Verrecchia, F. ; Plé, K. ; Bénédetti, H. ; Routier, S. *Synthesis and preclinical validation of LIMKs inhibitors: Promising drugs for osteosarcoma treatment?*
9th EFMC Young Medicinal Chemists' Symposium (EFMC-YMCS 2022). **Septembre 2022**, **Nice**.

- **(P)** Berabez, R. ; Champiré, A. ; Sainjon, M. ; Braka, A. ; Aci-Sèche, S. ; Bonnet, P. ; Mathea, S. ; Knapp, S. ; Cosson, A. ; Corret, J. ; Girardin, C. ; Ruchaud, S. ; Vallée, B. ; Brion, R. ; Verrecchia, F. ; Plé, K. ; Bénédetti, H. ; Routier, S. *Synthesis and preclinical validation of LIMKs inhibitors: Promising drugs for osteosarcoma treatment?*
Journée scientifique de la Fédération de Recherche Physique et Chimie du Vivant. **Août 2022**, **Orléans**.

- **(P)** Berabez, R. ; Champiré, A. ; Vallée, B. ; Bénédetti, H. ; Plé, K. ; Routier, S. *Inhibiting LIM Kinase: A possible treatment for neurofibromatosis type 1?*
28th Young Research Fellow Meeting (SCT-YRFM). **Février 2021**, **Paris**.

Rayan BERABEZ

Conception et validation préclinique de nouveaux inhibiteurs de LIMK pour le traitement de la Neurofibromatose de type 1

La neurofibromatose de type 1 (NF1) est une maladie génétique qui se manifeste entre autre par l'apparition de tumeurs bénignes localisées au niveaux des terminaux nerveux appelés neurofibromes cutanés (NFc). Au cours de ces dernières années, de nouvelles cibles thérapeutiques sont apparues telles que les LIM kinases (LIMKs), enzymes responsables du dynamisme du cytosquelette et dont la suractivation est liée à différentes pathologies comme la NF1, le glioblastome ou l'ostéosarcome. Un travail de chimie médicinale a été donc initié dans le but de concevoir de nouveaux inhibiteurs sélectifs des LIMKs.

Dans un premier temps, des études de relations structure-activité (RSA) ont été réalisées sur les 3 principaux sites de pharmacomodulations du composé de type pyrrolopyrimidine préalablement développé par notre équipe. Le développement de différentes stratégies de synthèse a été entrepris permettant un accès efficace à un grand nombre de produits finaux (84). L'optimisation de la partie aniline des composés a mené à la synthèse de 49 inhibiteurs des LIMKs, avec des constantes d'inhibition inférieures à 5 nM pour certains d'entre eux.

Par la suite, l'élaboration d'une voie de synthèse optimisée en 15 étapes a permis de remplacer le cycle central 3,6-dihydropyridine jusqu'alors inchangé, par un dérivé de l'acide 1-aminocyclohex-3-ène-1-carboxylique.

Enfin, une nouvelle série d'inhibiteurs a été préparée en remplaçant la base hétérocyclique pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidine par des dérivés 7-azaindoliques. Nous avons observé une meilleure sélectivité pour les LIMKs vis-à-vis des ROCKs pour les 23 produits obtenus.

Des évaluations *in vitro* approfondies de nos meilleurs inhibiteurs sur plusieurs lignées cellulaires ont mené à la sélection de deux composés pour être utilisés lors d'essais *in vivo* sur un modèle de souris original de NF1. En parallèle, de nouveaux modes d'inhibition des LIMKs ont été développés avec la synthèse d'un inhibiteur irréversible ciblant LIMK1, ainsi que 4 PROTACs qui ont provoqué la dégradation des LIMKs par la voie protéasome-ubiquitine sur plusieurs lignées cellulaires.

Mots clés : neurofibromatose de type 1, glioblastome, kinase, inhibiteur, LIMK, ROCK, pyrrolopyrimidine, inhibiteur irréversible, PROTAC.

Conception and preclinical validation of new LIMK inhibitors for the treatment of Neurofibromatosis type 1

Neurofibromatosis type 1 (NF1) is a genetic disease characterized by the development of cutaneous neurofibromas (cNF) (benign tumors) located at nerve endings. LIM kinases (LIMKs), enzymes responsible for cytoskeleton dynamics, have emerged in recent years as valid therapeutic targets for this disease. These enzymes are overactivated in several pathologies including NF1, glioblastoma or osteosarcoma. A medicinal chemistry project was therefore initiated with the aim of designing new selective inhibitors of LIMKs.

Initially, structure-activity relationship (SAR) studies were conducted on the 3 main pharmacomodulation sites of the pyrrolopyrimidine-type compounds previously developed by our team. The development of various synthetic strategies was undertaken, allowing efficient access to a large number of final products (84). Optimization of the aniline portion of the compounds led to the synthesis of 49 LIMKs inhibitors, with inhibition constants lower than 5 nM for several derivatives.

Subsequently, an optimized 15 steps synthetic route was developed to replace the previously unchanged central ring 3,6-dihydropyridine with a derivative of 1-aminocyclohex-3-ene-1-carboxylic acid.

Finally, a new series of inhibitors was developed by replacing the heterocyclic pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidine base by 7-azaindole derivatives. Improved LIMK vs. ROCK selectivity was observed among the 23 obtained products.

Following extensive *in vitro* evaluation of our best inhibitors on several cell lines, two compounds were selected for *in vivo* trials on an original mouse model of NF1. In parallel, new modes of LIMKs inhibition were developed with the synthesis of an irreversible inhibitor targeting LIMK1, as well as 4 PROTACs that induced LIMKs degradation through the ubiquitin-proteasome system in several cell lines.

Keywords: neurofibromatosis type 1, glioblastoma, kinase, inhibitor, LIMK, ROCK, pyrrolopyrimidine, irreversible inhibitor, PROTAC.

Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA), Université d'Orléans, UFR Science Rue de Chartres, BP 6759, 45067 Orléans cedex 2