



**HAL**  
open science

# Synthèse de nouveaux ligands pour l'imagerie de la neuroinflammation par tomographie par émission de positons

Fanny Cacheux

► **To cite this version:**

Fanny Cacheux. Synthèse de nouveaux ligands pour l'imagerie de la neuroinflammation par tomographie par émission de positons. Chimie organique. Université Paris-Saclay, 2016. Français. NNT : 2016SACLS342 . tel-01619994

**HAL Id: tel-01619994**

**<https://theses.hal.science/tel-01619994>**

Submitted on 20 Oct 2017

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

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

NNT : 2016SACLS342

THESE DE DOCTORAT  
DE L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY

PREPAREE A  
L'UNIVERSITE PARIS-SUD

ECOLE DOCTORALE N° 571  
2MIB | Sciences chimiques : molécules,  
matériaux, instrumentation et biosystèmes

Spécialité CHIMIE

Par

Madame **Fanny Cacheux**

Synthèse de nouveaux ligands  
pour l'imagerie de la neuroinflammation par  
Tomographie par Emission de Positons

Thèse présentée et soutenue à Orsay, le 18 octobre 2016  
(CEA / I<sup>2</sup>BM, Service Hospitalier Frédéric Joliot)

**Composition du Jury :**

M. David Aitken (Professeur, Université Paris-Sud) – Président  
M. Xavier Pannecoucke (Professeur, INSA de Rouen) – Rapporteur  
M. Didier Lebars (Maître de conférences, Praticien hospitalier, Université de Lyon) – Rapporteur  
M. Jean-Michel Chezal (Professeur, Université d'Auvergne) – Examinateur  
M. Frédéric Dollé (Ingénieur-chercheur, CEA) – Directeur de thèse  
M<sup>me</sup> Annelaure Damont (Ingénieur-chercheur, CEA) – Examinatrice



*« Le savant n'est pas l'homme qui fournit les vraies réponses, c'est celui qui pose les vraies questions. »*

Claude Lévi-Strauss (1908-2009)





# Remerciements.

---

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés au sein du groupe « Sondes Moléculaires » (Unité de recherche mixte CEA-INSERM-UPSud, IMIV), au Service Hospitalier Frédéric Joliot (SHFJ) à Orsay, du 7 octobre 2013 au 6 octobre 2016. Partie intégrante du Commissariat à l’Energie Atomique et aux Energies Alternatives, ce groupe conduit ses activités de recherches dans le cadre de l’école doctorale Matériaux, Molécules, Instrumentation et Biosystèmes (2MIB) de l’Université Paris-Saclay.

Avant d’exposer mes travaux qui ont conduit à ce mémoire, je tiens à remercier toutes celles et ceux qui y ont contribué. Tout d’abord, je remercie sincèrement mon directeur de thèse, Frédéric Dollé, pour m’avoir permis de rejoindre son équipe de recherche et de m’avoir proposé un sujet passionnant et à l’interface de plusieurs disciplines : chimie, radiochimie, biologie et imagerie. Merci à lui pour le temps qu’il a consacré à l’avancement de mes travaux et surtout pour son investissement dans la préparation de mon manuscrit de thèse. Je voudrais également le remercier de m’avoir permis de pouvoir participer à plusieurs congrès internationaux.

Je voudrais remercier tout particulièrement Annelaure Damont qui m’a encadrée tout au long de ces trois années et qui même à distance s’est beaucoup impliquée dans les corrections et relectures de ce manuscrit. Ce fût un plaisir de travailler à ses côtés et partager sa bonne humeur quotidienne.

Un grand merci à Bertrand Kuhnast pour son investissement dans mes travaux, son aide et ses conseils toujours avisés.

Je tiens à remercier chaleureusement nos radiochimistes Fabien Caillé, Stéphane Le Helleix et Stéphane Demphel pour leur entrain et surtout pour le temps qu’ils ont consacré au radiomarquage de mes composés.

Merci à tous les membres de l’équipe, Vincent Médran-Navarrete avec qui j’ai partagé le laboratoire lors de la première année de ma thèse, Marie-Anne Peyronneau, Simon Specklin pour ses conseils en chimie et bien sûr Mélanie Roche pour les nombreuses heures que nous avons partagées au laboratoire et lui souhaite plein de réussite et d’encouragements pour la fin de sa thèse !

Merci aussi aux biologistes Emilie Jaumain, Benoit Jego, Géraldine Pottier, Alexandra Winkeler et sans oublier Raphaël Boisgard, sans qui l’évaluation *in vivo* des composés n’aurait pas pu être effectuée.

Je remercie les partenaires industriels des laboratoires Sanofi : Frank Marguet et Frédéric Puech, et des laboratoires Roche : Uwe Grether.

Enfin je remercie également Messieurs Didier Lebars et Xavier Pannecoucke, pour avoir accepté d’être rapporteurs de ce manuscrit et d’avoir consacré leur temps à la lecture et à la critique des travaux décrits. Merci également à Jean-Michel Chezal et David Aitken pour leur participation à ce jury de thèse.



# Abréviations et symboles.

---

Ac	acétyle
AcOH	acide acétique
Anh.	anhydre
Aq.	aqueux / aqueuse
BHE	barrière hématoencéphalique
Boc	<i>tert</i> -butoxycarbonyle
BOP	(benzotriazol-1-yloxy)tris(diméthylamino)phosphonium hexafluorophosphate
cat.	quantité catalytique
CB <sub>2</sub> R	récepteurs cannabinoïdes de type 2
CCM	chromatographie sur couche mince
CE	capture électronique
DAST	diéthylaminosulfurtrifluorure (trifluorure de diéthylaminosulfure)
dc	decay corrected (corrigé de la décroissance)
DCM	dichlorométhane
DIAD	diisopropyle azodicarboxylate
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropyléthylamine
DDQ	2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone
DMF	<i>N,N</i> -diméthylformamide
DMSO	diméthylsulfoxyde
EC <sub>50</sub>	concentration efficace médiane
Et	éthyle
Et <sub>3</sub> N	triéthylamine
eq.	équivalent
ESI	electrospray ionization (ionisation par électrospray)
GP	groupement partant
FDG	2-fluoro-2-désoxy-D-glucose
HPLC	high performance liquid chromatography (chromatographie liquide haute performance)
HRMS	high resolution mass spectrometry (spectrométrie de masse haute résolution)
IC <sub>50</sub>	concentration inhibitrice médiane
IRM	imagerie par résonance magnétique
J	constante de couplage (Hz)
K <sub>222</sub>	4,7,13,16,21,24-héxa-1,10-diazabicyclo[8.8.8]hexacosane
LC-MS	chromatographie en phase liquide-spectroscopie de masse
Me	méthyle
MS	mass spectrometry (spectrométrie de masse)
Ms	mésyle (méthylsulfonyle)
Ns	nosyle (4-nitrobenzènesulfonyle)
Nu	nucléophile
NMR	nuclear magnetic resonance (résonance magnétique nucléaire)
P2Y <sub>12</sub> R	récepteurs purinergiques de type P2Y <sub>12</sub>
P2Y <sub>14</sub> R	récepteurs purinergiques de type P2Y <sub>14</sub>

Pd/C	palladium sur charbon
Ph	phényle
Py	pyridine
ppm	partie par million
quant.	quantitatif
RAS	radioactivité spécifique (specific activity)
RCY	radiochemical yield (rendement radiochimique)
$R_f$	rapport frontal
SMOPS	3-méthoxy-3-oxopropane-1-sulfinate
$S_N1$	substitution nucléophile d'ordre 1
$S_N2$	substitution nucléophile d'ordre 2
$t_{1/2}$	période radioactive d'un radioélément / radioisotope
t.a.	température ambiante
TBAF	fluorure de tétrabutylammonium
TBDMS	<i>tert</i> -butyldiméthylsilyle
TBDPS	<i>tert</i> -tributyldiphénylsilyle
TBME	méthyle <i>tert</i> -butyl éther
TBTU	<i>O</i> -(benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tétramethyluronium tétrafluoroborate
tBu	<i>tert</i> -butyle
TEMP	tomographie par émission mono-photonique
TEP	tomographie par émission de positons
Tf	triflate (trifluorométhanesulfonyle)
THF	tétrahydrofurane
TFA	acide trifluoroacétique
TMS	triméthylsilyle
$t_R$	temps de rétention
Ts	tosyle (4-méthylbenzènesulfonyle)
TSPO	protéine de translocation 18 kDa

# Table des matières.

---

Remerciements.....	i
Abréviations et symboles.....	iii
Table des matières.....	v
Avant-propos.....	xiii
Première partie.....	1
Chapitre I : La médecine nucléaire et la Tomographie par Emission de Positons. ....	3
1. Rappel sur la radioactivité. ....	3
1.1. Historique. ....	3
1.2. Les différents modes de désintégrations.....	4
1.3. Grandeurs et unités. ....	6
1.3.1. Activité et unités de mesure. ....	6
1.3.2. Temps de demi-vie.....	6
1.3.3. Radioactivité spécifique.....	7
2. La médecine nucléaire. ....	7
3. La Tomographie par Emission de Positons. ....	8
3.1. Intérêts et champs d'application. ....	8
3.2. Principe physique. ....	8
3.3. Le cyclotron – outil indispensable pour la production des émetteurs de positons. ....	9
Chapitre II : La chimie du fluor-18.....	11
1. Production du fluor-18.....	11
1.1. Production du $[^{18}\text{F}]_2$ moléculaire.....	11
1.2. Production de fluor-18 de type ions fluorures. ....	12
2. La radiochimie du fluor-18.....	12
2.1. Réactions de fluoration à partir des ions fluorures $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ . ....	12
2.1.1. Réactions de substitution nucléophile en série aliphatique.....	13
2.1.1.a. Réactivité des halogénures d'alkyle.....	13
2.1.1.b. Réactivité des sulfonates.....	13
2.1.2. Réactions de substitution nucléophile en série aromatique.....	15
2.1.2.a. Réactivité des halogénures d'aryle.....	15
2.1.2.b. Réactivité des nitro aryles. ....	16
2.1.2.c. Réactivité des sels d'ammonium quaternaires. ....	16

2.1.2.d. Réactivité des iodoniums.....	17
2.1.2.e. Réactivité des phénols activés.....	17
2.1.2.f. Fluorations aromatiques par catalyse métallique.....	18
2.2. Réactions de fluoration par utilisation de fluor moléculaire [ <sup>18</sup> F]F <sub>2</sub> .....	20
2.2.1. Réactions de fluorodémétallation.....	20
2.2.2. Formations de précurseurs secondaires à partir de [ <sup>18</sup> F]F <sub>2</sub> .....	20
Chapitre III : La Chimie du carbone-11.....	23
1. Production du carbone-11 et réactifs marqués au carbone-11.....	23
1.1. Production des précurseurs primaires.....	23
1.2. Diversité des précurseurs secondaires.....	23
2. La radiochimie du carbone-11.....	24
2.1. Réactions de [ <sup>11</sup> C]méthylation.....	24
2.1.1. Préparation de [ <sup>11</sup> C]CH <sub>3</sub> I et de [ <sup>11</sup> C]CH <sub>3</sub> OTf.....	25
2.1.1.a. Préparation de l'iodure de [ <sup>11</sup> C]méthyle.....	25
2.1.1.b. Préparation du triflate de [ <sup>11</sup> C]méthyle.....	26
2.1.2. Exemples de réactions de méthylation.....	26
2.1.2.a. Réactions de N-méthylation.....	26
2.1.2.b. Réactions de O-méthylation.....	26
2.1.2.c. Réactions de S-méthylation.....	27
2.1.2.d. Réactions de C-méthylation.....	27
2.2. Réactions de [ <sup>11</sup> C]carbonylation.....	27
2.2.1. Fixation du [ <sup>11</sup> C]CO <sub>2</sub> : formation de [ <sup>11</sup> C]carbammates et d' [ <sup>11</sup> C]urées.....	28
2.2.2. Utilisation du monoxyde de [ <sup>11</sup> C]carbone ([ <sup>11</sup> C]CO).....	29
2.2.2.a. Préparation du [ <sup>11</sup> C]CO.....	29
2.2.2.b. Exemples d'utilisation.....	29
2.2.3. Utilisation du [ <sup>11</sup> C]phosgène ([ <sup>11</sup> C]COCl <sub>2</sub> ).....	29
2.2.3.a. Préparation du [ <sup>11</sup> C]COCl <sub>2</sub> .....	30
2.2.3.b. Exemples d'utilisation.....	30
2.3. Réactions de [ <sup>11</sup> C]cyanation – utilisation de H[ <sup>11</sup> C]CN.....	30
2.3.1. Préparation de H[ <sup>11</sup> C]CN.....	30
2.3.2. Exemples d'utilisation.....	31
2.4. Réactions de [ <sup>11</sup> C]carboxylation.....	31
Chapitre IV : La neuroinflammation et les cibles moléculaires retenues.....	33

1.	La protéine de translocation 18 kDa (TSPO).....	34
1.1.	Structure et intérêt de la protéine.....	34
1.2.	Les radioligands de la TSPO. ....	34
1.2.1.	Les phénoxyaryles acétamides. ....	35
1.2.2.	Les imidazo[1,2- <i>a</i> ]pyridine acétamides. ....	36
1.2.3.	Les pyrazolo[1,2- <i>a</i> ]pyrimidine acétamides.....	36
1.2.4.	Les pyridazino[4,5- <i>b</i> ]indole acétamides. ....	37
1.3.	Séries de dérivés choisies dans le cadre de mon travail de thèse. ....	38
2.	Les récepteurs cannabinoïdes de type 2 (CB <sub>2</sub> R).....	38
2.1.	Cible biologique et intérêt en imagerie médicale. ....	38
2.2.	Les radioligands des CB <sub>2</sub> R.....	40
2.2.1.	Les pyrazoles.....	40
2.2.2.	Les indoles.....	40
2.2.3.	Les oxoquinoléines.....	41
2.2.4.	Les oxadiazoles. ....	42
2.2.5.	Les ylidènes.....	42
2.3.	Série de dérivés choisie dans le cadre de mon travail de thèse. ....	43
3.	Les récepteurs purinergiques de type P2Y <sub>12</sub> (P2Y <sub>12</sub> R).....	43
3.1.	La cible biologique. ....	43
3.2.	Les ligands des P2Y <sub>12</sub> R. ....	44
3.2.1.	Les molécules et médicaments disponibles sur le marché. ....	44
3.2.2.	Les pipérazines.....	45
3.2.3.	Les pipéridines et azétidines. ....	46
3.3.	Série de dérivés choisie dans le cadre de mon travail de thèse. ....	47
4.	Les récepteurs purinergiques de type P2Y <sub>14</sub> (P2Y <sub>14</sub> R).....	47
4.1.	La cible biologique. ....	47
4.2.	Les ligands des P2Y <sub>14</sub> R. ....	48
4.2.1.	Les dérivés de nucléotides.....	48
4.2.2.	Les dérivés d'acides naphtoïques. ....	49
4.2.3.	Les pyrimidines. ....	49
4.3.	Série de dérivés choisie dans le cadre de mon travail de thèse. ....	50
Chapitre V : Le projet de thèse. ....		51
1.	Enjeux de la thèse. ....	51



2. Le projet de thèse dans son ensemble.....	51
3. Structure du projet de recherche en chimie.....	52
Deuxième partie.....	61
Chapitre I : Les ligands de la TSPO.....	63
1. Dérivés pyrazolo[1,5- <i>a</i> ]pyrimidine acétamides.....	63
1.1. Analogues de CfO-DPA-714 modifiés au niveau de l'amide (Projet A).....	63
1.1.1. Synthèse.....	63
1.1.2. Evaluations physico-chimique et pharmacologique <i>in vitro</i> .....	67
1.1.3. Stabilité microsomale.....	69
1.2. Analogues fluoropyridines de F-DPA (Projet B).....	69
1.2.1. Synthèse.....	70
1.2.2. Evaluations physico-chimique et pharmacologique <i>in vitro</i> .....	73
1.2.3. Stabilité microsomale.....	74
1.2.4. Synthèse des précurseurs de marquage.....	74
1.3. Analogues de DPA-713 modifiés au niveau de l'amide (Projet C).....	76
1.3.1. Synthèse.....	76
1.3.1.a. Synthèse des dérivés fluoroéthyle et fluoropropyle.....	77
1.3.1.b. Synthèse du dérivé « fluoropyridine ».....	79
1.3.2. Evaluations physico-chimique et pharmacologique <i>in vitro</i> .....	80
1.3.3. Stabilité microsomale.....	80
1.3.4. Synthèse des précurseurs de marquage.....	81
1.3.5. Radiomarquage au fluor-18 de 47.....	82
2. Dérivés pyridazino[4,5- <i>b</i> ]indole acétamides (Projet D).....	83
2.1. Analogues « fluoropyridines » de SSR180575.....	84
2.1.1. Synthèse.....	84
2.1.1.a. Synthèse du dérivé FPy-SSR180575 (59).....	84
2.1.1.b. Synthèse du dérivé FPy-OP-SSR180575 (60).....	85
2.1.2. Evaluations physico-chimique et pharmacologique <i>in vitro</i> .....	86
2.1.3. Stabilité microsomale.....	86
2.1.4. Synthèse des précurseurs de marquage.....	87
2.1.4.a. Synthèse du précurseur de marquage de [ <sup>18</sup> F]-59.....	87
2.1.4.b. Synthèse du précurseur de marquage de [ <sup>18</sup> F]-60.....	88
2.1.5. Radiomarquage au fluor-18.....	89

2.1.5.a. Radiomarquage de [ <sup>18</sup> F]-59.....	89
2.1.5.b. Radiomarquage de [ <sup>18</sup> F]-60.....	90
2.1.6. Evaluation <i>in vivo</i> de [ <sup>18</sup> F]-60 par imagerie TEP.....	91
2.2. Analogues fluoroéthyle et fluoropropyle de SSR180575.....	91
2.2.1. Synthèse.....	91
2.2.2. Evaluations physico-chimique et pharmacologique <i>in vitro</i> .....	93
2.2.3. Stabilité microsomale.....	94
2.2.4. Synthèse du précurseur de marquage [ <sup>18</sup> F]-67.....	95
2.2.5. Radiomarquage au fluor-18.....	96
Chapitre II : Les ligands des récepteurs cannabinoïdes de type 2.....	97
1. Dérivés fluorés de A-836339 (Projet F).....	97
1.1. Analyse rétrosynthétique.....	97
1.2. Synthèse des dérivés fluorés.....	97
1.3. Evaluations physico-chimique et pharmacologique <i>in vitro</i> .....	100
1.4. Stabilité microsomale.....	101
2. Synthèse des précurseurs de marquage au fluor-18.....	102
2.1. Analyse rétrosynthétique.....	102
2.2. Synthèse des précurseurs de marquage.....	102
3. Radiomarquage au fluor-18 de [ <sup>18</sup> F]-79.....	105
4. Evaluation <i>in vitro</i> par autoradiographie et <i>in vivo</i> par biodistribution de [ <sup>18</sup> F]-79.....	105
4.1. Autoradiographie <i>in vitro</i> de [ <sup>18</sup> F]-79.....	105
4.2. Biodistribution <i>in vivo</i> de [ <sup>18</sup> F]-79.....	106
Chapitre III : Les ligands des récepteurs purinergiques de type P2Y <sub>12</sub> .....	109
1. Synthèse.....	109
1.1. Série pipéridine.....	109
1.1.1. Analyse rétrosynthétique.....	109
1.1.2. Résultats obtenus pour la synthèse des ligands en série pipéridine.....	110
1.1.2.a. Synthèse du dérivé para-méthoxy (Projet G).....	110
1.1.1.b. Synthèse des dérivés para-fluoroéthoxy et -fluoropropoxy (Projet H).....	114
1.1.1.c. Synthèse du dérivé para-fluoropropyle.....	116
1.1.1.d. Synthèse du dérivé para-fluoroéthyle.....	117
1.2. Série azétidine.....	119
1.2.1. Analyse rétrosynthétique.....	119

1.2.2. Résultats obtenus pour la synthèse de ligands en série azétidine. ....	120
1.2.2.a. Synthèse du dérivé para-méthoxy (Projet I).....	120
1.2.2.b. Synthèse du dérivé para-fluoropropoxy (Projet J).....	120
2. Synthèse du précurseur de marquage de [ <sup>11</sup> C]-96.....	121
2.1. Analyse rétrosynthétique. ....	121
2.2 Résultats obtenus pour la synthèse du précurseur. ....	121
2.2.1. Tentative de synthèse du précurseur à partir de 96. ....	121
2.2.2. Tentative alternative de synthèse du précurseur. ....	122
3. Radiomarquage au carbone-11. ....	123
Chapitre IV : Les ligands des récepteurs purinergiques de type P2Y <sub>14</sub> .....	125
1. Synthèse. ....	125
1.1. Série phényle urée. ....	125
1.1.1. Analyse rétrosynthétique.....	125
1.1.2. Résultats obtenus pour la synthèse des ligands en série phényle urée (Projet K et L).126	
1.1.2.a. Synthèse de l'intermédiaire clé tetrahydropyrido[4,3-d]pyrimidine.....	126
1.1.2.b. Synthèse des anilines. ....	127
1.1.2.c. Couplage entre l'intermédiaire clé 121 et les anilines. ....	129
1.2. Série pyridine.....	130
1.2.1. Analyse rétrosynthétique.....	130
1.2.2. Résultats obtenus pour la synthèse des ligands en série pyridine (Projet M). ....	130
2. Synthèse du précurseur de marquage de [ <sup>11</sup> C]-133.....	132
2.1. Analyse rétrosynthétique. ....	132
2.2. Résultats obtenus pour la synthèse du précurseur de marquage [ <sup>11</sup> C]-133. ....	133
3. Radiomarquage au carbone-11 de 133.....	134
Troisième partie .....	135
Conclusion et perspectives.....	137
1. Conclusion et perspectives sur les ligands de la TSPO. ....	137
1.1. Analogues de CfO-DPA-714, modifiés au niveau de l'amide. ....	137
1.2. Analogues fluoropyridines de F-DPA. ....	137
1.3. Analogues fluorés de DPA-713, modifiés au niveau de l'amide. ....	138
1.4. Analogues fluorés de SSR180575, modifiés au niveau de l'amide.....	139
2. Conclusion et perspectives sur les ligands CB <sub>2</sub> R. ....	140
3. Conclusion et perspectives sur les ligands P2Y <sub>12</sub> R. ....	140

3.1. Série pipéridine : Dérivé méthoxy et son précurseur de marquage au carbone-11. ....	141
3.2. Pipéridine : Dérivés fluoro-alkoxy et fluoro-alcanes. ....	141
3.3. Série azétidine : Dérivé méthoxy.....	141
3.4. Série azétidine : Dérivés fluoro-alkoxy et fluoro-alcanes. ....	142
4. Conclusion et perspectives sur les ligands P2Y <sub>14</sub> R. ....	142
4.1 Dérivés méthoxy et thiométhoxy.....	142
4.2. Dérivés fluoro-alkoxy et fluoro-alcanes. ....	143
4.3. Dérivés fluoropyridines. ....	143
Quatrième partie.....	145
Chapter I: Organic synthesis.....	147
1.General information.....	147
1.1. Chemicals. ....	147
1.2 TLC analysis, HPLC conditions and flash chromatography. ....	147
1.2. Spectroscopic analyses. ....	147
2. Experimental procedures. ....	148
Chapter II: Radiochemistry.....	213
1.1. General procedure for fluorine-18-labelling.....	213
1.1.1. Radiosynthesizer descriptions and configurations.....	213
1.1.1.a. The TRACERLab FX N Pro. ....	213
1.1.1.b. The TRACERLab FX FN. ....	214
1.1.1.c. Preparation of both synthesizers. ....	214
1.1.2. Radioisotope production. ....	215
1.1.3. K[ <sup>18</sup> F]F / K <sub>222</sub> preparation.....	215
1.1.4. Fluorine-18 incorporation and pre-purification. ....	215
1.1.5. Semi-preparative HPLC purification and formulation. ....	216
1.1.6. Quality controls.....	216
1.1.7. Specific activity determination. ....	216
1.2. Fluorine-18 labelling of [ <sup>18</sup> F]-60 and [ <sup>18</sup> F]-79. ....	216
1.2.1. <sup>18</sup> F-radiolabelling of [ <sup>18</sup> F]-60.....	216
2.2.2. <sup>18</sup> F-radiolabelling of [ <sup>18</sup> F]-79.....	216
2. Carbon-11-labelling.....	217
2.1. General procedure carbon-11-labelling. ....	217
2.1.1. Radiosynthesizer description and configuration.....	217

2.1.1.a. The TRACERLab FX C Pro. ....	217
2.1.1.b. Radiosynthetizer preparation. ....	217
2.1.2.a. Radioisotope production. ....	218
2.1.2.b. [ <sup>11</sup> C]MeOTf radiosynthesis. ....	218
2.1.2.c. General procedure for [ <sup>11</sup> C]methylation. ....	218
2.1.2.d. Semi-preparative HPLC and formulation. ....	219
2.1.2.e. Quality control. ....	219
2.2. Carbon-11-labelling of [ <sup>11</sup> C]-96 and [ <sup>11</sup> C]-133. ....	219
2.2.1. <sup>11</sup> C-radiolabelling of [ <sup>11</sup> C]-96. ....	219
2.2.2. <sup>11</sup> C-radiolabelling of [ <sup>11</sup> C]-133. ....	219
Chapter III: <i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> characterization. ....	221
1.1. TSPO ligands. ....	221
1.1.1. Binding and selectivity. ....	221
1.1.2. LogD <sub>7.4</sub> determination. ....	221
1.1.3. Microsomal metabolic stability evaluation. ....	221
1.1.3.a. Intrinsic clearance. ....	221
1.1.3.b. Biotransformation. ....	222
1.2. CB <sub>2</sub> R ligands. ....	222
1.2.1. binding, efficacy and selectivity. ....	222
1.2.2. Intrinsic clearance. ....	223
2. <i>In vitro</i> autoradiography and <i>in vivo</i> studies. ....	223
2.1. TSPO. ....	223
2.1.1. Description of the neuroinflammatory animal model used. ....	223
2.1.2. <i>In vivo</i> μTEP imaging (general procedure). ....	223
2.2. CB <sub>2</sub> R. ....	224
2.2.1 <i>In vitro</i> autoradiography. ....	224
2.2.2. Biodistribution. ....	224
Références. ....	225
Annexes. ....	235
Annexe N°1: Publication J. Med. Chem. ....	237
Annexe N°2: Publication Eur. J. Med. Chem. ....	253

# Avant-propos

---

- A propos de la thèse.

Cette thèse a été réalisée du 7 Octobre 2013 au 6 Octobre 2016, au Service Hospitalier Frédéric Joliot (SHFJ) à Orsay. Le SHFJ fait partie de l'Institut d'imagerie biomédicale (I<sup>2</sup>BM) lui-même rattaché à la Direction de la recherche fondamentale (DRF) du CEA. Ce service est un centre d'imagerie moléculaire dédié à la recherche pré-clinique et clinique dans les domaines de l'oncologie et la neurologie principalement.

Dans son principe, l'imagerie moléculaire vise à observer le fonctionnement des organes et à mettre en évidence des processus moléculaires pour établir un diagnostic ou effectuer un suivi thérapeutique. Actuellement, les techniques les plus représentatives sont l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) et la Tomographie par Emission de Positons (TEP). La TEP présente un intérêt particulier pour l'étude des pathologies du système nerveux central, telles que les maladies d'Alzheimer et de Parkinson, où des techniques de diagnostic atraumatiques sont requises. Dans ce contexte, mes travaux de thèse ont consisté au développement de nouvelles sondes moléculaires pour l'imagerie *in vivo* par TEP de la neuroinflammation. Il s'agit en effet, d'un phénomène clé impliqué dans de nombreuses maladies neurodégénératives, qui se caractérise par l'activation de la microglie et la surexpression de biomarqueurs tels que la protéine de translocation 18 kDa (TSPO), mais aussi les récepteurs aux cannabinoïdes de type 2 (CB<sub>2</sub>R) et les récepteurs purinergiques P2Y<sub>12</sub> et P2Y<sub>14</sub>.

- A propos du manuscrit.

Ce manuscrit est composé de quatre parties. La première partie est consacrée au contexte du sujet et introduit les notions utiles à la compréhension de ce travail de thèse telles que la radioactivité et l'imagerie TEP, la radiochimie du fluor-18 et du carbone-11 ainsi que les quatre cibles pharmacologiques étudiées. La deuxième partie du manuscrit est dédiée aux résultats de recherche obtenus, et rapporte la description et la discussion des synthèses organiques des nouveaux ligands, leur évaluation biologique *in vitro*, le radiomarquage au fluor-18 ou au carbone-11 ainsi que l'évaluation *in vitro* par autoradiographie ou *in vivo* par imagerie TEP des meilleurs composés. La troisième partie conclut le projet de thèse dans son ensemble et introduit les perspectives envisagées. Enfin, la quatrième partie décrit les protocoles expérimentaux de synthèse organique, de radiochimie, des évaluations pharmacologiques, d'autoradiographie et d'imagerie TEP qui ont été menées au cours de ce projet. Cette dernière partie a volontairement été rédigée en anglais afin de faciliter son inclusion dans des publications. Une section dédiée aux références, suivie de deux annexes (avec mes deux premières publications) finalisent le manuscrit.

- A propos de la caractérisation des produits synthétisés.

Chaque nouveau composé a été systématiquement caractérisé par son spectre de résonance magnétique nucléaire du proton (RMN  $^1\text{H}$ ) et du carbone (RMN  $^{13}\text{C}$ ) ainsi que par son rapport frontal ( $R_f$ ). Les points de fusion ont été systématiquement mesurés pour les composés obtenus sous forme de solide. Des analyses de spectroscopie de masse à haute résolution (HRMS) ont aussi été effectuées pour les produits finaux et intermédiaires avancés figurant dans les publications ou projets de publications.

- A propos des publications et communications.

Les travaux relatifs à la synthèse organique et à la radiochimie ont permis la publication d'un article dans le « Journal of Medicinal Chemistry ». Un autre article a également été accepté dans l'« European Journal of Medicinal Chemistry » et un troisième est en cours d'écriture et devrait être soumis prochainement (« European Journal of Medicinal Chemistry » également *a priori*). Les recherches effectuées ont également donné lieu à plusieurs actes de congrès de la spécialité, dont l'International Symposium on Radiopharmaceutical Sciences (ISRS'15, Columbia, Mo, Etats-Unis), et à une communication orale lors d'un congrès jeune chercheur (3<sup>rd</sup> EFMC Young Medicinal Chemist Symposium) qui se tiendra du 1<sup>er</sup> au 2 Septembre 2016 à Manchester.

#### Publications :

- A. Damont, V. Médran-Navarrete, **F. Cacheux**, B. Kuhnast, G. Pottier, N. Bernards, F. Marguet, F. Puech, R. Boisgard and F. Dollé. Novel pyrazolo[1,5-a]pyrimidines as TSPO ligands: Synthesis, *in vitro* biological evaluation, [ $^{18}\text{F}$ ]labelling and first *in vivo* neuroinflammation PET images. *J. Med. Chem.* **2015**, 58, 7449–7464.
- F. Cacheux**, V. Médran-Navarrete, F. Dollé, F. Marguet, F. Puech, and A. Damont. Synthesis and *in vitro* characterization of novel fluorinated derivatives of the TSPO 18 kDa ligand CfO-DPA-714. *Eur. J. Med. Chem* **2017**, 125, 346-359.

#### Actes de congrès suite à des posters présentés lors de l'« International Symposium of Radiopharmaceuticals Sciences » (ISRS'15, du 26 au 31 mai, Columbia, Missouri, Etats-Unis) :

- F. Cacheux**, F. Caillé, B. Kuhnast, F. Marguet, F. Puech, G. Pottier, R. Boisgard, F. Dollé, A. Damont. Synthesis and [ $^{18}\text{F}$ ]labeling of a fluoropyridinyl analogue of the TSPO ligand SSR180575, modified at the *N,N*-dimethylacetamide position. *J. Label. Compounds Radiopharm.* **2015**, 58 (Suppl. 1), S223.
- A. Damont, G. Pottier, V. Medran-Navarrete, **F. Cacheux**, B. Kuhnast, F. Marguet, F. Puech, R. Boisgard, F. Dollé. Novel fluorine-18-labeled analogues of the TSPO ligand DPA-714 for *in vivo* PET imaging of neuroinflammation. *J. Label. Compounds Radiopharm.* 2015, 58 (Suppl. 1), S46.
- T. Keller, A. Krzyczmonik, S. Forsback, A. Kirjavainen, F. Lopez-Picon, **F. Cacheux**, A. Damont, F. Dollé, M. Haaparanta-Solin, O. Solin. Electrophilic fluorination and preclinical evaluation of a novel [ $^{18}\text{F}$ ]DPA-714 analogue, [ $^{18}\text{F}$ ]F-DPA. *J. Label. Compounds Radiopharm.* **2015**, 58 (Suppl. 1), S153.

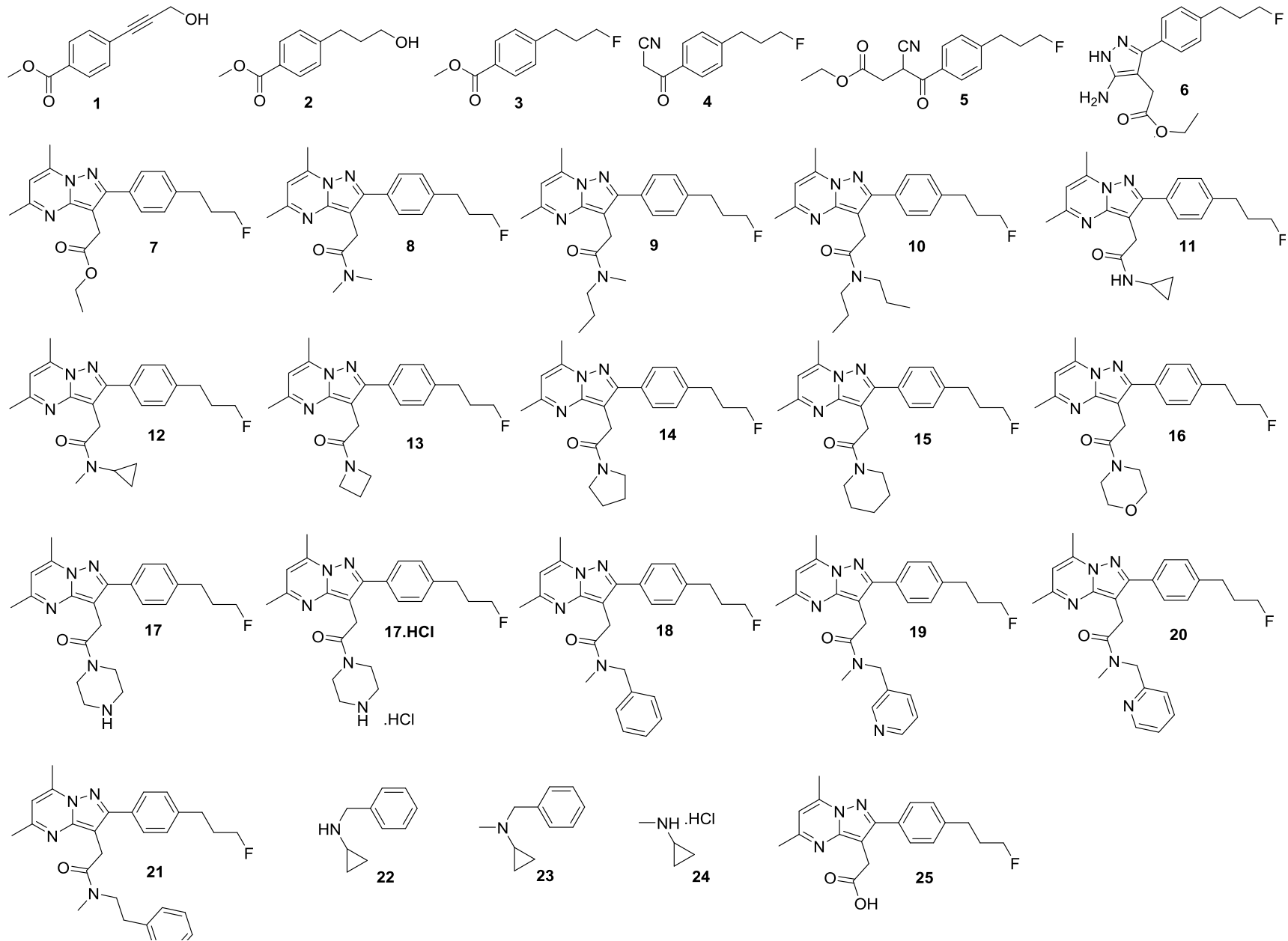
- A. Damont, **F. Cacheux**, B. Kuhnast, F. Marguet, F. Puech, G. Pottier, R. Boisgard, F. Dollé. Nucleophilic radiofluorination at the alpha-carbon of an acetamide motif: Preparation of a novel fluorine-18-labeled analogue of SSR180575. *J. Label. Compounds Radiopharm.* **2015**, 58 (Suppl. 1), S176.
- A. Damont, F. Caillé, V. Medran-Navarrete, **F. Cacheux**, B. Kuhnast, F. Dollé. The pyrazolo[1,5-a]pyrimidine F-DPA: Synthesis, *in vitro* characterization and radiolabeling with fluorine-18 using a nucleophilic approach. *J. Label. Compounds Radiopharm.* **2015**, 58 (Suppl. 1), S180.
- M. Haaparanta-Solin, F. Lopez-Picon, R. Almajidi, J. Takkinen, T. Keller, A. Krzyczmonik, S. Forsback, A. Kirjavainen, **F. Cacheux**, A. Damont, J. Rinne, F. Dollé, O. Solin. PET imaging and *ex vivo* brain autoradiography in a mouse model of Alzheimers disease using the TSPO tracers [<sup>18</sup>F]DPA-714 and [<sup>18</sup>F]F-DPA. *J. Label. Compounds Radiopharm.* **2015**, 58 (Suppl. 1), S272.

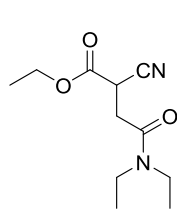
#### Posters:

- Présenté lors de l'Atelier « France Life Imaging » Agents d'imagerie (FLI-WP1 2015, du 19 au 20 avril, Dijon, France) :
- F. Cacheux**, V. Médran-Navarrete, F. Dollé, F. Marguet, F. Puech, A. Damont. Novel TSPO ligands, related to DPA-714, as Positron Emission Tomography probes for glioma imaging.
- Présentés lors des Rencontres Internationale de Chimie Thérapeutique (RICT 2016, du 6 au 9 Juillet, Caen, France) :
- F. Cacheux**, A. Damont F. Marguet, F. Puech, B. Kuhnast, F. Dollé. Novel fluoropyridine analogs derived from the TSPO ligand F-DPA: Synthesis and *in vitro* characterization.
- F. Cacheux**, V. Médran-Navarrete, F. Dollé, F. Marguet, F. Puech, A. Damont. Novel derivatives of the TSPO 18 kDa ligand CfO-DPA-714: Synthesis and *in vitro* characterization.
- F. Cacheux**, A. Damont, F. Caillé, C. Ullmer, U. Grether, B. Kuhnast, F. Dollé. Synthesis of novel fluorinated radioligands, related to A-836339, as Positron Emission Tomography probes for imaging the Cannabinoid type 2 Receptors.

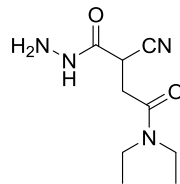




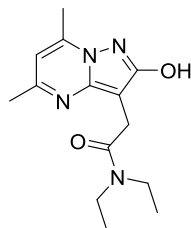




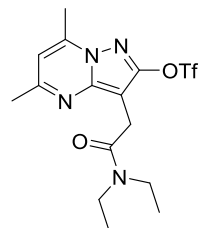
26



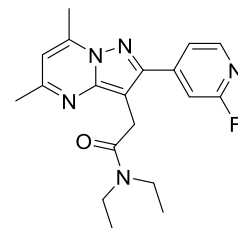
27



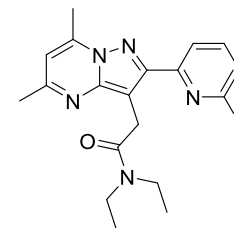
28



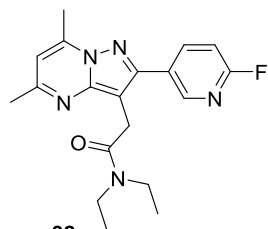
29



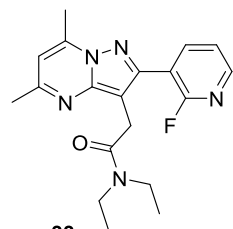
30



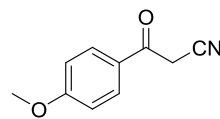
31



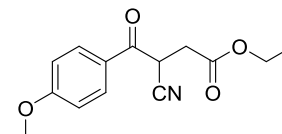
32



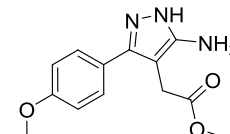
33



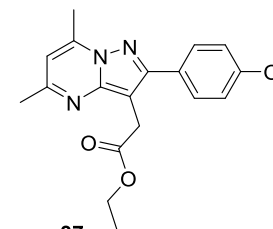
34



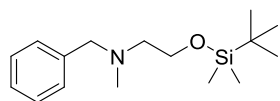
35



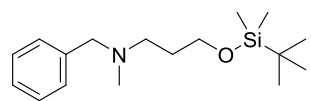
36



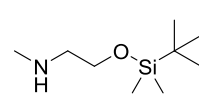
37



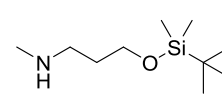
38



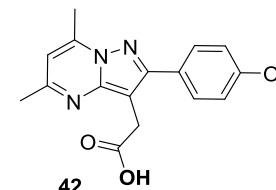
39



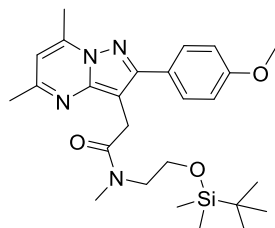
40



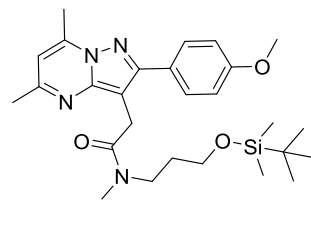
41



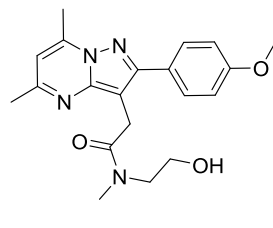
42



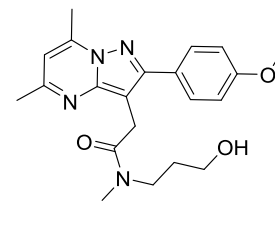
43



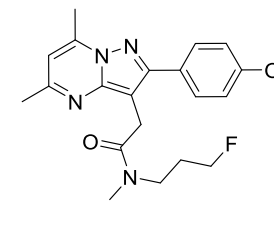
44



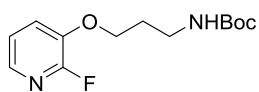
45



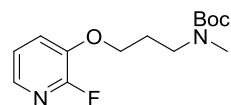
46



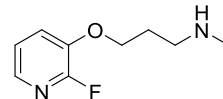
47



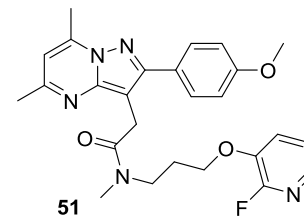
48



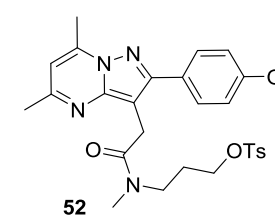
49



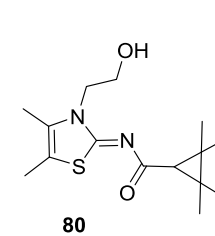
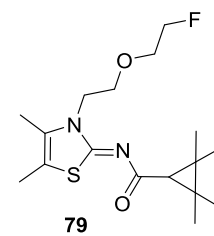
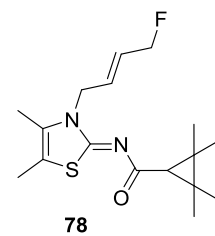
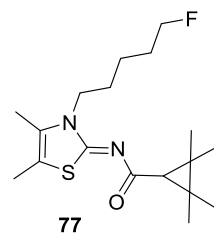
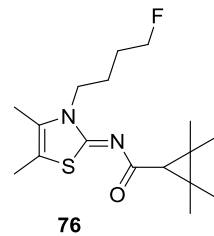
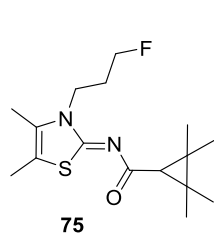
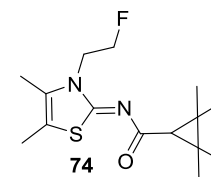
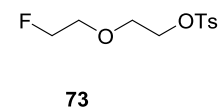
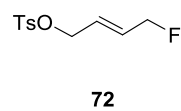
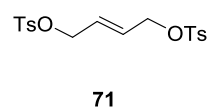
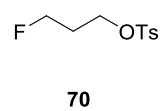
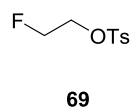
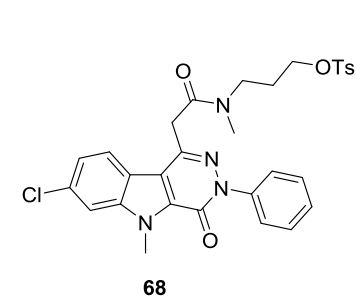
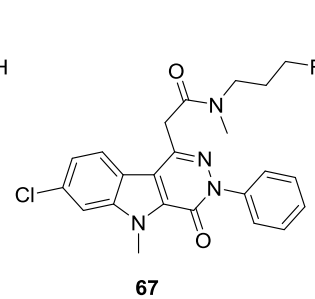
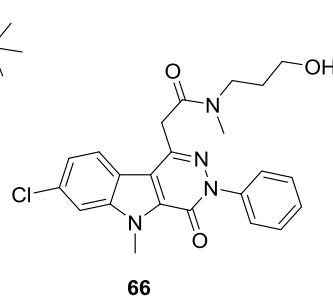
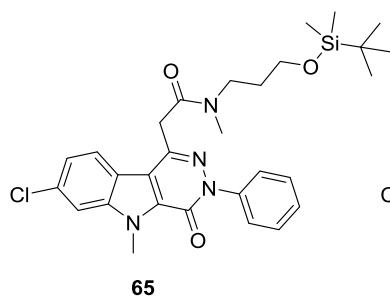
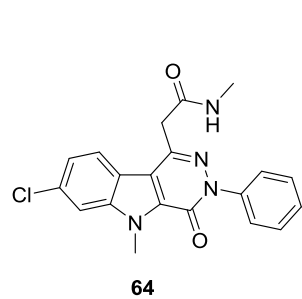
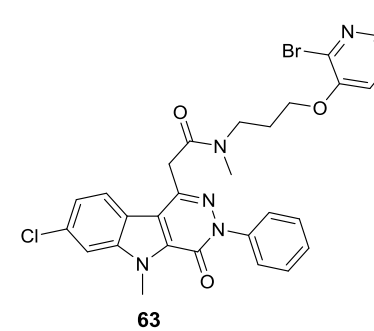
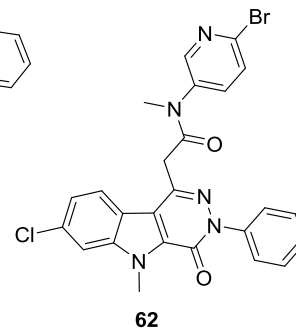
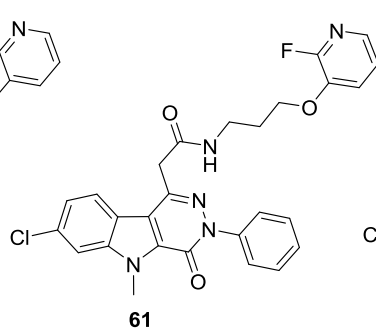
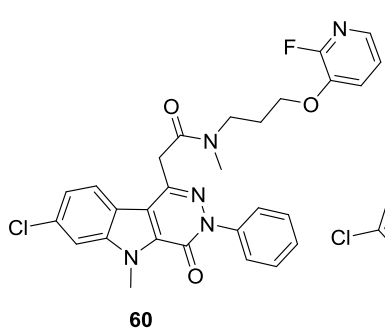
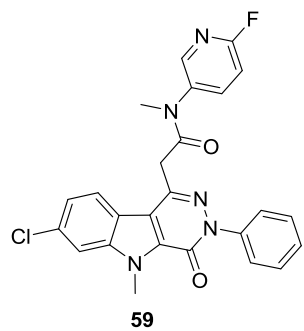
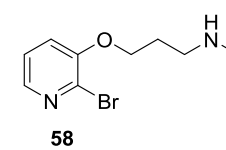
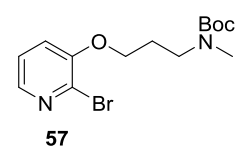
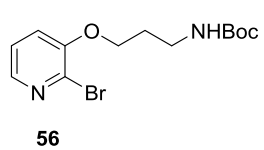
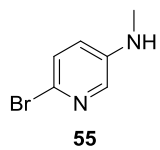
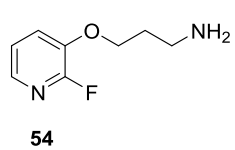
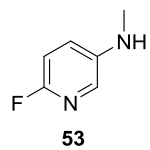
50

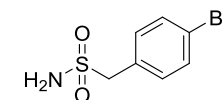
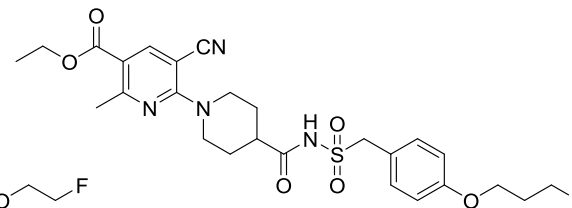
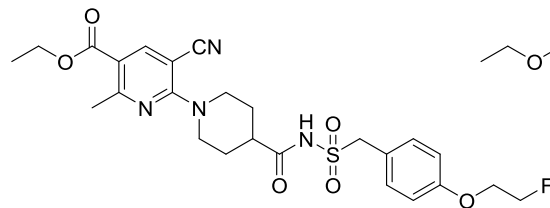
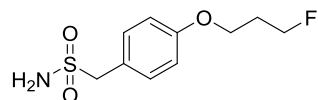
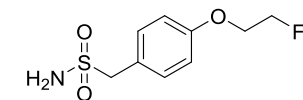
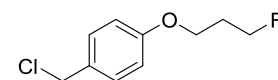
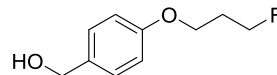
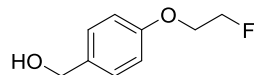
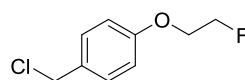
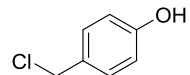
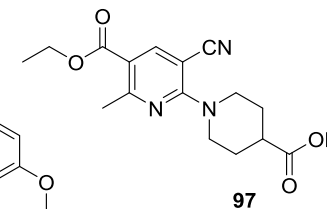
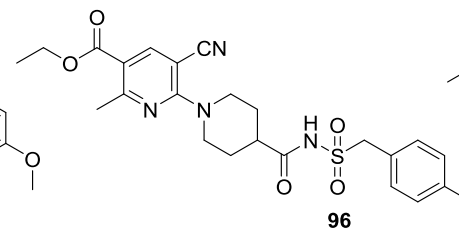
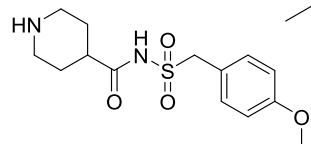
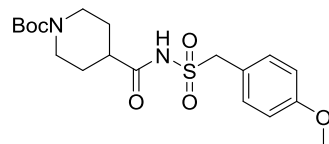
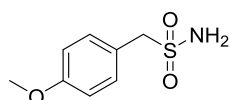
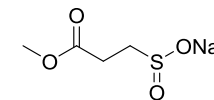
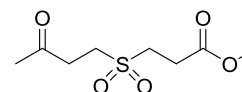
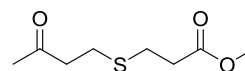
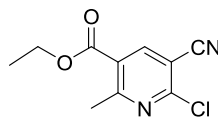
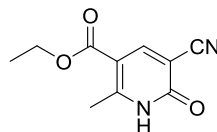
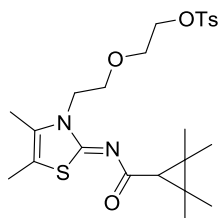
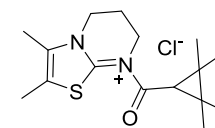
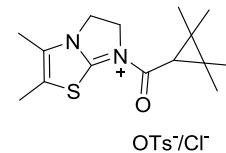
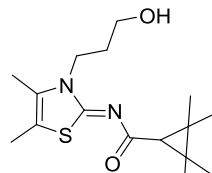
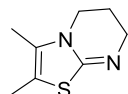
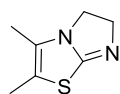
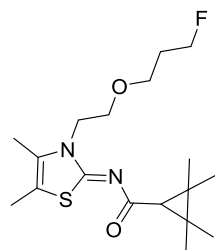


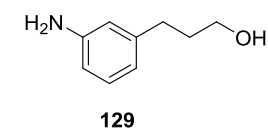
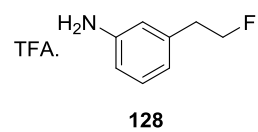
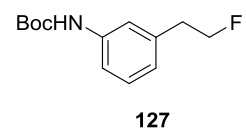
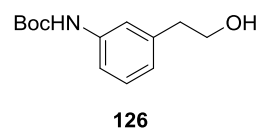
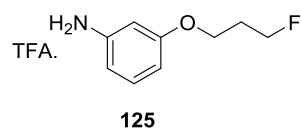
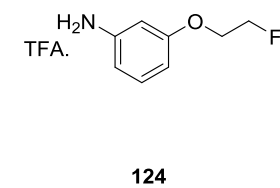
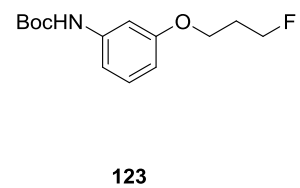
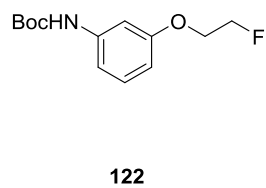
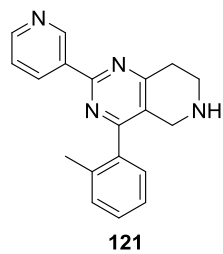
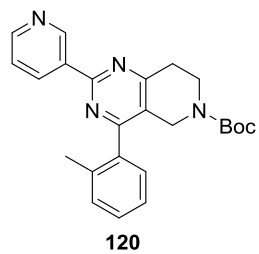
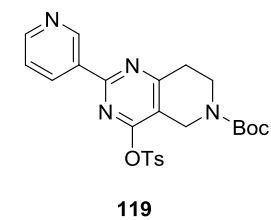
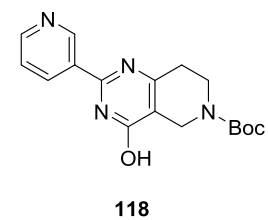
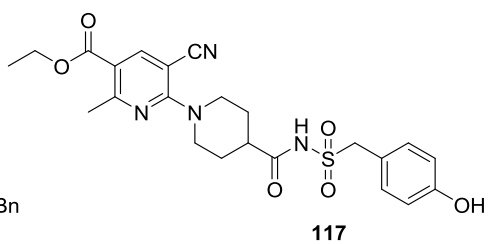
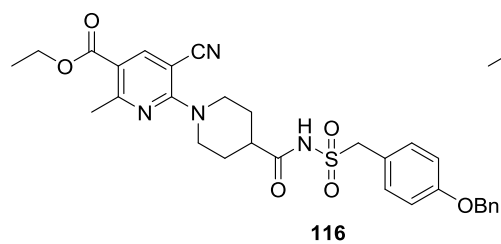
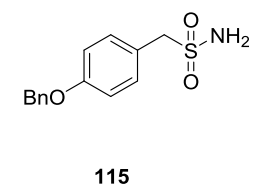
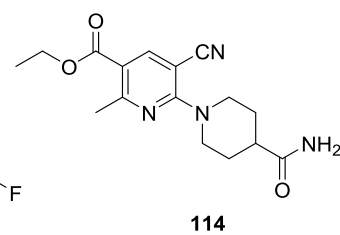
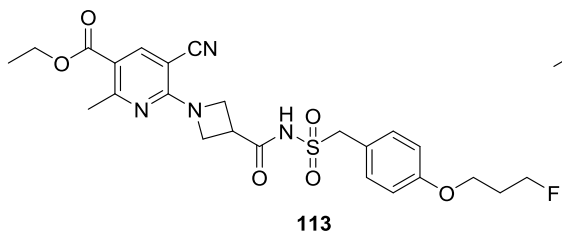
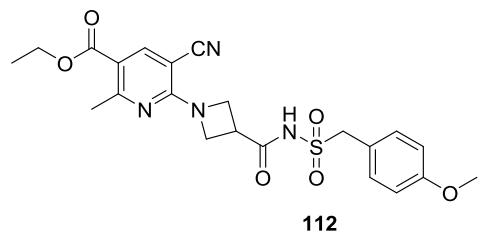
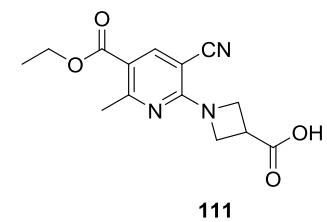
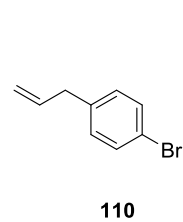
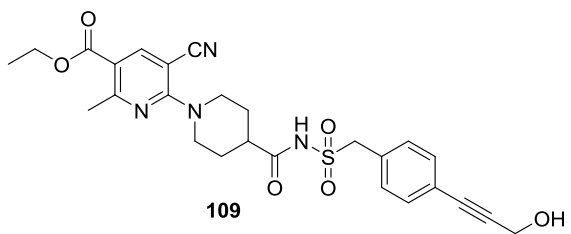
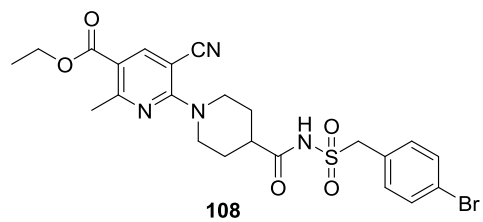
51

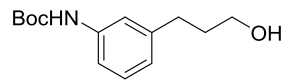


52

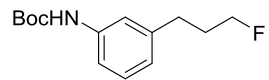




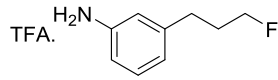




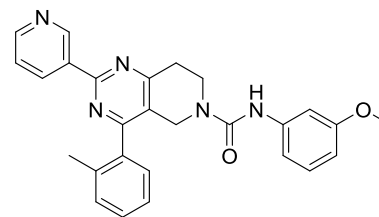
130



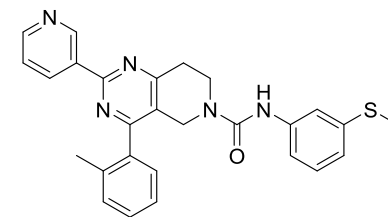
131



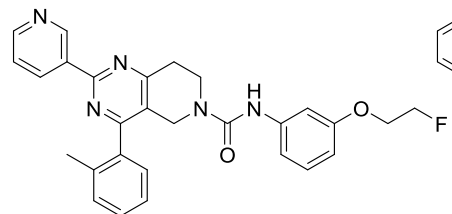
132



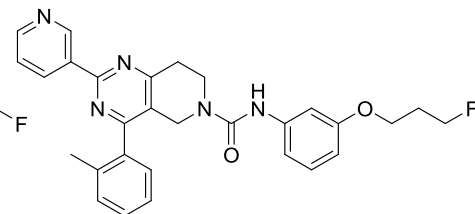
133



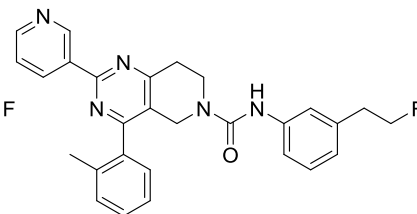
134



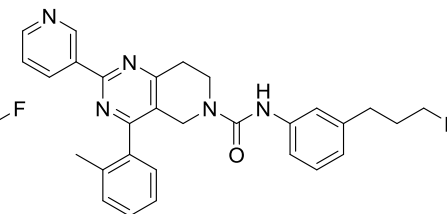
135



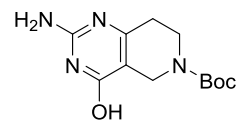
136



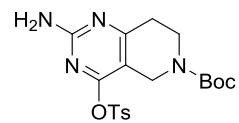
137



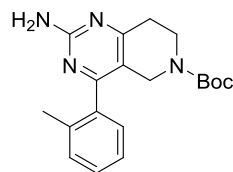
138



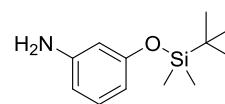
139



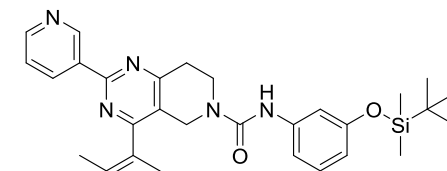
140



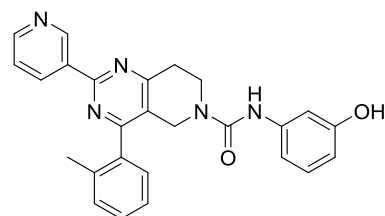
141



142



143



144

# Première partie

Introduction et généralités





# Chapitre I : La médecine nucléaire et la Tomographie par Emission de Positons.

---

Depuis l'obtention du premier radionucléide artificiel en 1934 par Irène et Frédéric Joliot-Curie, l'utilisation de la radioactivité dans les sciences biologiques et médicales n'a cessé de progresser. Elle est présente aujourd'hui dans de nombreuses techniques relevant de la biochimie et de biologie moléculaire, ainsi qu'en médecine nucléaire, pour lesquelles la notion de traceur, inventée par George de Hevesy en 1913, est le concept fondateur. En découvrant le moyen de produire des isotopes radioactifs artificiels, Irène et Frédéric Joliot-Curie offraient à la recherche en biologie des outils nucléaires d'une efficacité sans équivalent.

La médecine nucléaire versant diagnostic et l'imagerie au sens large sont aujourd'hui des techniques susceptibles d'apporter des informations extrêmement précises sur les organismes vivants, de manière non traumatique. Parmi ces techniques, citons la Tomographie par Emission de Positons (TEP) qui connaît aujourd'hui un véritable essor et trouve des applications quotidiennes en oncologie, mais aussi neurologie et maladies métaboliques. En parallèle d'autres techniques, comme par exemple l'Imagerie par Résonance Magnétique nucléaire (IRM), la TEP est également un accélérateur dans le cadre du développement de médicaments innovants.

## 1. Rappel sur la radioactivité.

### 1.1. Historique.

La radioactivité fut découverte par Henri Becquerel en 1896 lors de ses travaux sur le rayonnement X découvert par Wilhelm Roentgen quelques années auparavant. Henri Becquerel découvrit par hasard que certaines substances, telles que les sels d'uranium, pouvaient noircir une plaque photographique en l'absence de lumière. Après diverses expériences, il supposa qu'il s'agissait d'une propriété atomique spécifique de l'uranium. Il admit que l'uranium émettait des rayonnements particuliers qu'il appela « rayons uraniques ». Suite à cette découverte, plusieurs scientifiques décidèrent d'étudier ce rayonnement. En 1898, Marie Curie entreprit des mesures quantitatives en se référant à l'ionisation que produisent ces rayonnements dans l'air et démontra que le thorium émet aussi ce type de rayonnements. Aidée de son mari Pierre Curie, ils isolèrent deux nouveaux éléments : le radium et le polonium et introduisirent pour la première fois le terme de radioactivité. En 1899, Ernest Rutherford met en évidence l'existence de plusieurs types de rayonnements  $\alpha$  et  $\beta$  ; le premier s'arrête après avoir traversé quelques millimètres de papier aluminium et le second plus pénétrant. En 1900, Paul Villard découvre le rayonnement  $\gamma$  dans l'émission du radium. De 1901 à 1903, Ernest Rutherford et Frédéric Soddy montrent que la radioactivité est en fait une transmutation spontanée d'un élément à un autre et élaborent ainsi la théorie de la filiation radioactive. En 1913, Niels Bohr montre que le noyau atomique est le siège de la radioactivité alors que le cortège électronique est responsable des propriétés chimiques de l'élément. En 1924, Lacassagne et Lattes utilisent pour la première fois des traces de polonium pour des recherches en biologie. En 1929, le

premier cyclotron est construit par Livingston et Lawrence et cinq ans plus tard Irène et Frédéric Joliot-Curie découvrent la radioactivité artificielle<sup>1</sup>.

## 1.2. Les différents modes de désintégrations.

Chaque élément est représenté par le symbole  ${}^A_ZX$ , avec

X : symbole de l'élément chimique

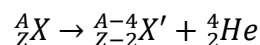
A : nombre de masse ou nombre de nucléons (protons + neutrons)

Z : nombre de charge ou numéro atomique (nombre de protons)

A un même élément peuvent correspondre des noyaux différents qui possèdent le même nombre de protons mais un nombre de neutrons différents : on parle alors d'isotopes. Ces isotopes peuvent être stables ou radioactifs. Par exemple, le carbone possède plusieurs isotopes, dont deux stables, carbone-12 et carbone-13 ( ${}^{12}\text{C}$  et  ${}^{13}\text{C}$ ). Parmi les isotopes radioactifs, citons le carbone-11 ( ${}^{11}\text{C}$ , de période radioactive 20,4 min), élément artificiel et le carbone-14 ( ${}^{14}\text{C}$ , de période radioactive 5730 ans), qui est naturel. Les noyaux radioactifs évoluent dans le temps vers un état plus stable ; ils se désintègrent en donnant un autre noyau et en émettant un rayonnement. On distingue alors trois types de rayonnements différents :

- Le rayonnement  $\alpha$ .

Ce type de rayonnement correspond à la production spontanée d'une particule lourde constituée d'un noyau atomique formé de deux protons et de deux neutrons, ce qui correspond à un noyau d'hélium (**Equation 1**).



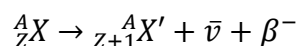
**Equation 1**

La particule  $\alpha$ , étant 7000 fois plus lourde qu'un électron, peut être arrêtée par une faible quantité de matière. Quelques centimètres d'air et une simple feuille de papier suffisent à se protéger des rayonnements d'un émetteur  $\alpha$ .

- Le rayonnement  $\beta$ .

Il existe deux types de rayonnements  $\beta$  : les  $\beta^-$  et  $\beta^+$ .

On parle de rayonnement  $\beta^-$  s'il y a émission d'un électron ; un neutron du noyau se désintègre en proton, en électron et en anti-neutrino ( $\bar{\nu}$ ) (**Equation 2**).



**Equation 2**

Les électrons éjectés peuvent traverser quelques dizaines de centimètres de matière voire quelques mètres dans l'air, mais d'une façon générale ils sont assez rapidement absorbés par la matière où ils donnent éventuellement naissance à des rayons X et leur excédant d'énergie est transformé en chaleur. Ils génèrent également des radicaux libres conduisant à des réarrangements moléculaires, et

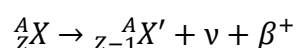
présentent donc un potentiel destructeur assez important. Certains isotopes (**Tableau 1**), sélectionnés pour leur énergie et leur temps de demi-vie, sont utilisés à des fins thérapeutiques, en particulier en oncologie pour la désagrégation localisés de cellules tumorales, tel que le lutécium-177 (Luthatera<sup>®</sup>) utilisé pour le traitement des tumeurs neuroendocrines.

Radionucléide	Période	E <sub>max</sub> (MeV)	Emission
Strontium-89	50,0 jours	1,49	β <sup>-</sup>
Yttrium-90	64,1 heures	2,28	β <sup>-</sup>
Iode-131	8,0 jours	0,61	β <sup>-</sup> , CE*, γ
Holmium-166	26,8 heures	1,85	β <sup>-</sup>
Lutécium-177	6,7 jours	0,50	β <sup>-</sup> , γ

\*CE : capture électronique

**Tableau 1 :** Propriétés de quelques émetteurs β<sup>-</sup> utilisés en médecine nucléaire.

On parle de rayonnement β<sup>+</sup> s'il y a émission d'un positon. Le positon résulte de la transformation d'un proton en neutron, neutrino (ν) et positon, ce dernier étant un anti-électron (**Equation 3**).



**Equation 3**

Les positons, ou électrons positifs émis par le radio-isotope vont rencontrer dans leur trajectoire d'éjection un électron et leur collision conduira à une annihilation de la matière, accompagnée d'une émission d'énergie sous la forme de deux photons de 511 keV émis de matière antiparallèle. La détection dite en coïncidence de ces deux photons constitue le principe de la TEP.

Le **Tableau 2** résume les principaux radionucléides émetteurs de positions les plus couramment utilisés en médecine nucléaire.

Radionucléide	Période	E <sub>max</sub> (MeV)	Emission
Carbone-11	20,4 minutes	0,96	β <sup>+</sup>
Azote-13	9,96 minutes	1,20	β <sup>+</sup>
Oxygène-15	2,04 minutes	1,73	β <sup>+</sup>
Fluor-18	109,8 minutes	0,63	β <sup>+</sup>
Cuivre-64	12,7 minutes	1,35	β <sup>+</sup> , β <sup>-</sup> , CE
Gallium-68	1,13 heure	1,89	β <sup>+</sup> , γ
Iode-124	4,18 jours	0,65	β <sup>+</sup>

**Tableau 2 :** Propriétés de quelques émetteurs β<sup>+</sup> utilisés en médecine nucléaire.

- Le rayonnement  $\gamma$ .

Ce rayonnement correspond à l'émission de photons de courte longueur d'onde et d'énergie très variable. Il traduit la perte d'énergie au niveau du noyau et le retour vers une entité plus stable. Ces rayons sont très pénétrants et peuvent traverser de fortes épaisseurs de matière. Des matériaux denses tels que le plomb, le tungstène ou de grandes épaisseurs de bétons sont nécessaires pour les atténuer fortement. L'énergie du rayonnement émis par chaque isotope est différente et permet de bien caractériser l'isotope d'origine. Dans la pratique, le technétium-99m et l'iode-123 sont les radionucléides les plus utilisés en médecine nucléaire (**Tableau 3**).

Radionucléide	Période	$E_{\max}$ (MeV)	Emission
Technétium-99m	6,02 heures	0,14 MeV	$\gamma$
Indium-111	67,3 heures	0,25 MeV	$\gamma$ , CE
Iode-123	13,2 heures	0,16 MeV	$\gamma$ , CE

**Tableau 3 :** Propriétés de quelques émetteurs  $\gamma$  utilisés en médecine nucléaire.

### 1.3. Grandeurs et unités.

#### 1.3.1. Activité et unités de mesure.

L'activité, notée  $A(t)$ , d'une source radioactive à un instant  $t$  est donnée par la loi de décroissance radioactive qui est une fonction exponentielle décroissante<sup>2</sup> (**Equation 4**).

$$A(t) = A_0 e^{-\lambda t}$$

**Equation 4**

Avec :  $A(t)$  : activité à l'instant  $t$  (Bq ou Ci)

$A_0$  : activité initiale (Bq ou Ci)

$\lambda$  : constante radioactive ( $s^{-1}$ )

$t$  : temps (s)

Dans le système international, l'unité de mesure de radioactivité est le Becquerel (Bq). Il correspond à une désintégration par seconde. Cependant, l'unité historique, encore très utilisée aujourd'hui en radiochimie, est le Curie (Ci). Il est défini comme le nombre de désintégrations d'un gramme de radium, soit 37 milliards de désintégrations par seconde. Un Curie équivaut donc à  $3,7 \cdot 10^{10}$  Bq ou 37 GBq.

#### 1.3.2. Temps de demi-vie.

Le temps de demi-vie ou période d'un isotope radioactif est l'intervalle de temps au bout duquel l'activité de cet isotope est divisée par deux. Ce temps est lié à la constante de désintégration  $\lambda$  (**Equation 5**).

$$A(t_{1/2}) = \frac{A_0}{2} = A_0 e^{-\lambda t_{1/2}}$$

$$\Rightarrow t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{\lambda}$$

Equation 5

La période est une constante pour un radio-isotope donné, pouvant s'étaler entre une fraction de seconde à plusieurs milliards d'années.

### 1.3.3. Radioactivité spécifique.

La radioactivité spécifique (RAS) est l'activité d'un radionucléide par unité de poids, de volume ou de quantité de matière. La RAS maximale théorique est atteinte lorsque le radionucléide est pur, et est généralement évaluée pour une mole. La RAS est inversement proportionnelle à la période du radionucléide, ce qui implique que la quantité de molécule marquée par un radioélément, nécessaire pour obtenir une activité donnée, est d'autant plus faible que la période de ce radioélément est courte (Equation 6).

$$RAS_{max}(Bq/mol) = \frac{\ln(2) \times N_A}{t_{1/2}}$$

Equation 5

A titre d'exemple, la RAS théorique du fluor-18 est de  $6,33 \cdot 10^4$  GBq/ $\mu$ mol et celle du carbone-11 est de  $34,13 \cdot 10^4$  GBq/ $\mu$ mol.

## 2. La médecine nucléaire.

La médecine nucléaire est une spécialité médicale regroupant l'ensemble des techniques utilisant des radioéléments chez l'être humain, que ce soit à des fins de diagnostic ou de thérapie. Dans les deux cas, une substance contenant un isotope radioactif, appelée « radiopharmaceutique », est administrée au patient puis va se fixer sélectivement sur une cible qui peut être un organe ou un tissu biologique. Les rayonnements émis par le radioélément peuvent être soit absorbés à très courte distance, dans le cas de la thérapie pour aller détruire des cellules tumorales par exemple – on parle alors de thérapie vectorisée ou métabolique – soit captés à l'extérieur du corps humain par un dispositif de détection afin de localiser le radiopharmaceutique dans l'organisme et de visualiser sa biodistribution.

Les principaux avantages de l'imagerie nucléaire sont de fournir une imagerie fonctionnelle, c'est-à-dire relative au fonctionnement de l'organe étudié. De plus, il s'agit d'une méthode non invasive puisque le plus souvent le produit radioactif est administré par une simple injection intraveineuse et généralement à l'état de traces, la molécule n'induisant alors pas d'effet pharmacologique. Actuellement, l'utilisation de radio-isotopes est très répandue notamment dans les domaines de la neurologie et de l'oncologie, que ce soit à des fins de diagnostics ou pour un traitement thérapeutique. A titre d'exemple, depuis plus de cinquante ans, le cancer de la thyroïde est traité dans 90 % des cas par de l'iode-131 ( $^{131}\text{I}$ )iodure de sodium) qui apporte une guérison totale et définitive<sup>3</sup>.

## 3. La Tomographie par Emission de Positons.

### 3.1. Intérêts et champs d'application.

La Tomographie d'Emission Mono-Photonique (TEMP) comme la Tomographie d'Emission de Positons (TEP), sont des techniques d'imagerie non-invasives qui permettent de suivre *in vivo* le devenir d'une molécule injectée et préalablement marquée avec un radio-isotope émetteur de photons ou de positons. Utilisant des radionucléides émetteurs de positons à vie courte (comme le carbone-11 de période 20,4 minutes et le fluor-18 de période 109,8 minutes), la TEP fournit des informations non seulement qualitatives mais aussi quantitatives. Elle permet d'obtenir des images tomographiques d'un organe et de cartographier des concentrations locales de la molécule radioactive injectée. Des paramètres physiologiques tels que le débit sanguin, le volume sanguin, le pH intracellulaire ou la consommation tissulaire en oxygène ou en glucose peuvent ainsi être mesurés. La TEP permet également l'observation de la cinétique de distribution et la mesure de la concentration d'une molécule marquée en tout point d'un organe sain ou malade. Enfin, l'injection de doses traceuses de molécules marquées permet l'étude fonctionnelle de récepteurs ou d'enzymes. La précision des résultats dépend à la fois des performances du tomographe, de la technique de reconstruction d'images et des phénomènes physiques relatifs à l'émission de positons et à la détection des photons d'annihilation.

### 3.2. Principe physique.

Le positon  $\beta^+$  est une particule de même masse et de même spin que l'électron mais de charge opposée. Il est émis par un atome radioactif dont le nombre de protons est supérieur à celui de ces neutrons. La réaction nucléaire de désintégration revient à la transformation du proton en neutron, en neutrino et en positon (**Equation 3**). Le positon ainsi créé parcourt alors dans la matière un chemin qui est fonction de son énergie cinétique initiale et qui est appelé parcours moyen. Lorsqu'il a perdu toute son énergie cinétique, et que sa quantité de mouvement est quasi nulle, l'ultime choc avec un électron produit une réaction d'annihilation où les deux particules en présence (positon et électron) disparaissent pour donner naissance à deux photons  $\gamma$  d'énergie égale à 511 keV. La conservation de la quantité de mouvement implique que les deux photons soient émis à  $180^\circ$  l'un de l'autre : on parle alors de photons émis en coïncidence (**Figure 1**).

Le principe physique de l'imagerie TEP repose sur la détection en coïncidence des deux photons émis par un système de collimateur électronique. En effet, sur les tomographes actuels, les éléments de détections sont disposés en vis-à-vis sur une couronne et chaque paire de détecteur est couplée électroniquement. Lorsque que les tubes d'une paire produisent simultanément une impulsion électrique, on dit que l'on a enregistré une coïncidence. Le traitement de l'ensemble des signaux permettra de distinguer parmi ces coïncidences, celles qui correspondent à de vrais événements de celles qui sont générées fortuitement par deux photons provenant de deux annihilations différentes. Sur la plupart des systèmes, une fenêtre de coïncidence de 10 à 20 nanosecondes permet aux calculateurs de distinguer les photons issus d'une annihilation ou d'une autre. Si les détecteurs opposés sont déclenchés dans cette fourchette temporelle, on estime que les deux photons proviennent du même positon. En revanche, les couples de photons détectés en dehors de cette

fenêtre seront rejetés. Si une annihilation se produit au centre du champ d'examen, les deux photons atteindront les détecteurs exactement au même moment. Par contre, s'il existe un décalage par rapport au centre, les deux détecteurs seront déclenchés en coïncidence avec un léger retard pour l'un d'eux. La mesure de ce retard permet de déterminer la localisation de l'annihilation sur la ligne de coïncidence et donc la position de la substance marquée injectée (technique appelée « temps de vol »). L'acquisition et le traitement de ces données va permettre la reconstruction d'images tridimensionnelles.

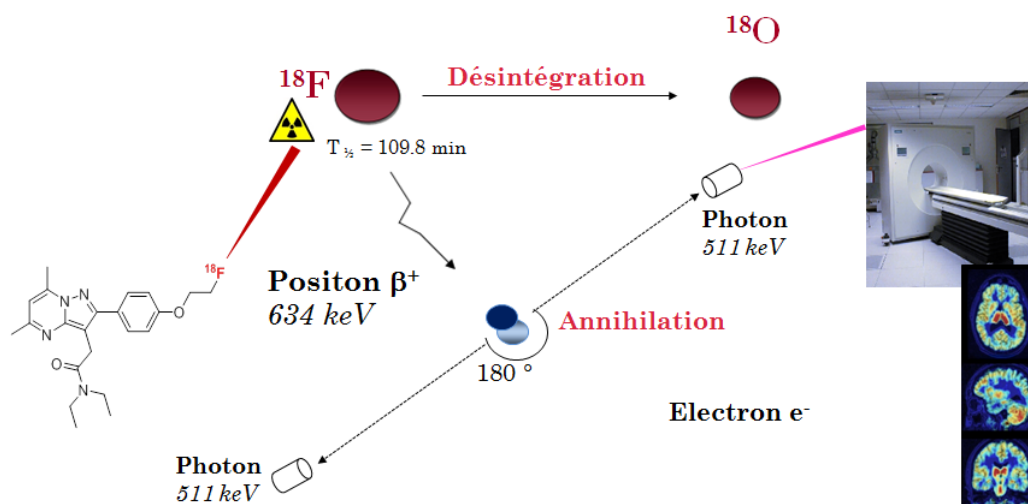


Figure 1 : Principe physique de la TEP.

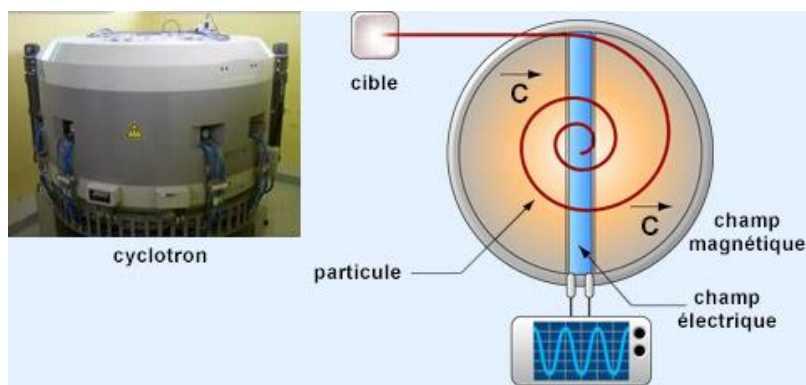
Comme expliqué précédemment, le positon parcourt une distance de quelques millimètres dans les tissus avant de s'annihiler. L'image finale obtenue donne donc la distribution statistique de ces points d'annihilation et non celle des émetteurs de positons (donc du radiotraceur). C'est la raison pour laquelle la résolution spatiale des caméras TEP ne peut pas descendre en dessous de quelques millimètres. Cette distance correspond au parcours moyen du positon avant son annihilation et varie en fonction de l'énergie initiale de la particule. Plus l'énergie est basse, plus le parcours moyen du positon est court et donc meilleure est la résolution de l'image. Une autre limite intrinsèque en termes de résolution spatiale provient de la non-colinéarité des deux photons résultant de l'annihilation d'un positon qui n'a pas perdu totalement son énergie cinétique. Ce défaut de colinéarité peut être de l'ordre de  $0,5^\circ$ . La combinaison de ses deux phénomènes limite donc la résolution spatiale, propre à la détection en coïncidence, de 2 à 4 mm en pratique.

### 3.3. Le cyclotron – outil indispensable pour la production des émetteurs de positons.

Les radio-isotopes émetteurs de positons sont tous des isotopes artificiels. Pour les produire, il est nécessaire d'utiliser des réactions nucléaires et donc des accélérateurs de particules. L'accélérateur le plus souvent utilisé aujourd'hui est le cyclotron biomédical. Le cyclotron est un accélérateur électromagnétique de haute fréquence, dont les premiers modèles ont été mis au point en 1929 par Ernest Orlando Lawrence aux Etats-Unis. Dans son principe, le cyclotron utilise l'action combinée

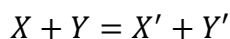


d'un champ magnétique et d'un champ électrique pour délivrer un faisceau de particules accélérées. Ces particules électriquement chargées (proton, deutons, voire helium-3 ou helium-4), sont ensuite introduites au centre d'une enceinte où règne un vide très poussé. Elles décrivent une trajectoire en spirale depuis le centre du cyclotron jusqu'au bord tandis que leur vitesse s'accroît. Elles parcourent plusieurs tours avant d'être extraites de l'accélérateur pour être projetées sur une cible pouvant quant à elle, être située à quelques mètres de la machine à proprement dite (**Figure 2**).



**Figure 2** : Schéma de principe d'un cyclotron.

Les particules accélérées possèdent une énergie suffisante pour pouvoir générer des radio-isotopes, par bombardement des éléments stables qui constituent la cible. La cible peut être constituée par un liquide, un gaz ou un solide. La réaction de transmutation peut s'écrire selon l'**Equation 6** :



**Equation 6**

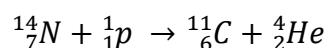
Avec X : élément stable constituant la cible

Y : particule incidente

X' : radioélément généré

Y' : particule créée après réaction de transmutation nucléaire

Le carbone-11 peut ainsi être créé par bombardement de protons sur de l'azote-14 (**Equation 7**) :



**Equation 7**

Par convention, on écrit cette réaction de transmutation nucléaire  ${}^{14}\text{N}(\text{p},\alpha){}^{11}\text{C}$ . Le rendement de cette réaction est fonction de différents paramètres comme l'intensité du faisceau, l'épaisseur du matériau de la cible ou l'extraction du radioélément généré.

# Chapitre II : La chimie du fluor-18.

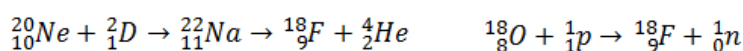
Le fluor-18, du fait de ses caractéristiques nucléaires uniques, est un émetteur de positons de choix pour l'imagerie TEP. Il possède une période radioactive de 109,8 minutes, un pourcentage d'émission en positon très élevé (97 %) et une énergie maximale du positon émis de seulement 634 keV, permettant ainsi une résolution quasi-optimale en imagerie. Sa période radioactive est assez longue pour permettre en outre de distribuer des radiotraceurs en dehors de leur site de production. De ce fait, de nombreux radiopharmaceutiques marqués au fluor-18, disposant aujourd'hui d'une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM), sont utilisés en oncologie, neurologie ainsi que pour les maladies cardiovasculaires et inflammatoires. Citons le 2-[<sup>18</sup>F]fluoro-2-désoxy-D-glucose ou [<sup>18</sup>F]FDG, qui est le plus largement utilisé et tout particulièrement en oncologie mais aussi la [<sup>18</sup>F]fluoro-L-DOPA (oncologie, neurologie) ou encore la [<sup>18</sup>F]fluorocholine (oncologie). Il existe également des radiotraceurs disposant d'une AMM et dédiés à la détection des plaques amyloïdes pour le diagnostic de la maladie d'Alzheimer, tels que le [<sup>18</sup>F]flutemetamol (Vizamyl<sup>TM</sup>), le [<sup>18</sup>F]florbetapir (Amyvid<sup>TM</sup>) et le [<sup>18</sup>F]florbetapen (NeuraCeq<sup>TM</sup>).

## 1. Production du fluor-18.

Le fluor-18 est produit grâce à un cyclotron sous deux formes physico-chimiques distinctes : du fluor moléculaire [<sup>18</sup>F]F<sub>2</sub>, sous forme gazeuse donc, et des ions fluorures [<sup>18</sup>F]F<sup>-</sup> (en solution).

### 1.1. Production du [<sup>18</sup>F]<sub>2</sub> moléculaire.

Le fluor moléculaire [<sup>18</sup>F]F<sub>2</sub> peut être obtenu de deux manières ; soit par accélération et bombardement de deutons sur une cible de néon gazeux (**Figure 3, Equation 1**)<sup>4</sup>, soit par accélération et bombardement de protons sur du dioxygène gazeux fortement enrichi en oxygène-18 ([<sup>18</sup>O]O<sub>2</sub>, > 97%) (**Figure 3, Equation 2**)<sup>5</sup>.



Equation 1

Equation 2

**Figure 3 :** Production du [<sup>18</sup>F]F<sub>2</sub> moléculaire.

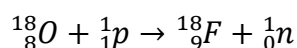
Avec la première méthode, au cours de l'irradiation, le fluor moléculaire généré a tendance à s'absorber sur la cible, ce qui rend son extraction difficile. Pour remédier à ce problème, une petite quantité (de l'ordre de 0,2 à 0,5 % en volume par rapport au néon) de fluor gazeux non radioactif (F<sub>2</sub>, fluor-19) doit être introduit dans la cible afin d'entraîner quantitativement les molécules de [<sup>18</sup>F]F<sub>2</sub>. Dans ces conditions, et en utilisant par exemple du néon contenant 0,4 % de fluor à une pression de 11 bars, il est possible de récupérer environ 75 % de l'activité produite, essentiellement sous forme de fluor moléculaire [<sup>18</sup>F]F<sub>2</sub>. La dilution isotopique engendrée par l'ajout de fluor-19 se traduit néanmoins par une faible radioactivité spécifique, comprise entre 0,05 et 0,35 GBq/μmol.

En utilisant le dioxygène gazeux enrichi en oxygène-18, le fluor-18 est également absorbé sur les parois de la cible à la fin de l'irradiation. La fraction d'oxygène qui n'a pas réagi est recyclée par

liquéfaction cryogénique et une seconde irradiation est réalisée en présence d'un gaz inerte et de fluor moléculaire (F<sub>2</sub>, fluor-19). Là encore, les radioactivités spécifiques sont faibles, dû à la dilution isotopique.

## 1.2. Production de fluor-18 de type ions fluorures.

Les ions fluorures marqués au fluor-18 ([<sup>18</sup>F]F<sup>-</sup>) peuvent être obtenus par accélération et bombardement de protons sur de l'eau enrichie en oxygène-18 ([<sup>18</sup>O]H<sub>2</sub>O, > 97 %) (**Equation 2**)<sup>6</sup> :



**Equation 2**

Cette réaction est très largement employée et présente l'avantage de produire de grandes quantités de fluor-18 sous forme d'ions fluorures à haute radioactivité spécifique (de 111 à 370 GBq/μmol). L'irradiation est généralement effectuée sous pression de gaz inerte (azote ou hélium, de 2 à 5 bars), afin de réduire le point d'ébullition de l'eau et de permettre une irradiation avec une intensité de particules plus importante, tout en diminuant le phénomène de radiolyse de l'eau de cible (en H<sub>2</sub> et O<sub>2</sub>).

Il existe une autre méthode de production des ions fluorures [<sup>18</sup>F]F<sup>-</sup>, dont la réaction de transmutation nucléaire est <sup>16</sup>O(<sup>3</sup>He,p)<sup>18</sup>F. Cette technique présente l'avantage de ne pas nécessiter l'utilisation d'eau enrichie (dont le coût varie de quelques dizaines d'euros à 100 € le millilitre !) mais requiert un cyclotron suffisamment puissant pour pouvoir accélérer des noyaux d'hélium-3.

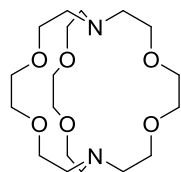
## 2. La radiochimie du fluor-18.

Comme décrit précédemment le fluor-18 peut être produit soit sous la forme de fluor moléculaire [<sup>18</sup>F]F<sub>2</sub>, généralement à basse activité spécifique, soit sous forme d'ions fluorures [<sup>18</sup>F]F<sup>-</sup> de très haute activité spécifique. Le fluor moléculaire est exclusivement associé à des réactions de type électrophile alors que les ions fluorures conduiront généralement à des réactions de type nucléophile. Les diverses réactions présentées constituent dans la grande majorité des cas la dernière étape de synthèse du radiotraceur.

### 2.1. Réactions de fluoration à partir des ions fluorures [<sup>18</sup>F]F<sup>-</sup>.

Les réactions de substitutions nucléophiles font intervenir le fluor-18 sous sa forme [<sup>18</sup>F]F<sup>-</sup>. La densité électronique de l'ion fluorure étant très élevée, en milieu aqueux, il est solvaté par plusieurs sphères de coordination qui diminuent fortement sa nucléophilie. La première étape de toute réaction de fluoration nucléophile est donc d'obtenir des ions fluorures anhydres et de ce fait « activés ». Pour cela, les ions fluorures sont piégés sur une résine échangeuse d'anions afin de recycler l'eau enrichie en oxygène-18. Les ions [<sup>18</sup>F]F<sup>-</sup> sont ensuite élués de la résine par une solution aqueuse de carbonate alcalin (potassium, césium par exemple) ou de tétrabutylammonium. La solution contenant les ions fluorures est alors concentrée par chauffage modéré et sous courant d'hélium. Une distillation azéotropique de l'eau avec de l'acétonitrile est souvent également utilisée. Le résidu est ensuite mis en solution dans un solvant aprotique tel que l'acétonitrile ou le diméthylsulfoxyde, avant de réagir

avec un précurseur de marquage (molécule acceptrice de fluor-18). Afin d'augmenter la nucléophilie des ions fluorures, un cryptant est souvent utilisé, permettant de chélater le contre-ion présent. Le plus couramment utilisé est le Kryptofix<sup>®</sup> K<sub>222</sub> (**Figure 4**), qui est sélectif des ions potassium.



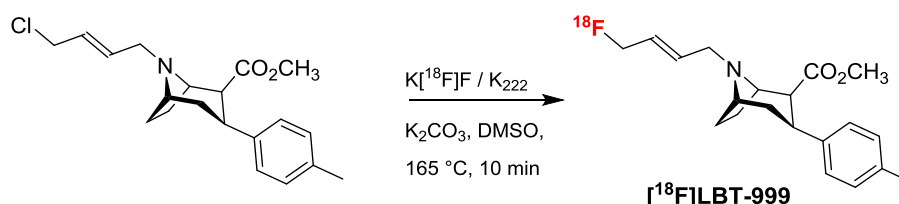
**Figure 4** : Structure du cryptant Kryptofix<sup>®</sup> K<sub>222</sub>.

### 2.1.1. Réactions de substitution nucléophile en série aliphatique.

Lors des réactions de substitution nucléophile aliphatique, il y a substitution d'un groupement partant par l'ion fluorure [<sup>18</sup>F]F<sup>-</sup>. Différents groupements partants peuvent être utilisés, et les plus courants sont les halogènes (chlore, brome, iode) et les sulfonates (tosylate, mésylates, nosylates, triflates).

#### 2.1.1.a. Réactivité des halogénures d'alkyle.

La substitution nucléophile par un échange d'halogènes est une méthode d'incorporation du fluor-18 de type S<sub>N</sub>2. L'ordre de réactivité admis des halogènes en série aliphatique est le suivant : I > Br > Cl > F. Un échange fluor-19 / fluor-18 est donc possible, mais rarement utilisé aussi pour préserver les radioactivités spécifiques les plus élevées possibles. Par exemple, la radiosynthèse du [<sup>18</sup>F]LBT-999, un radioligand des transporteurs dopaminergiques dérivé de la cocaïne, utilisé pour le diagnostic de la maladie de Parkinson et développé au laboratoire en 2007, fait intervenir la substitution nucléophile d'un atome de chlore par des fluorures [<sup>18</sup>F]F<sup>-</sup> en présence de Kryptofix<sup>®</sup> K<sub>222</sub> dans le diméthylsulfoxyde à 165 °C pendant 10 minutes (**Schéma 1**)<sup>7</sup>.



**Schéma 1** : Radiosynthèse du [<sup>18</sup>F]LBT-999 par S<sub>N</sub>2 sur un précurseur chloré.

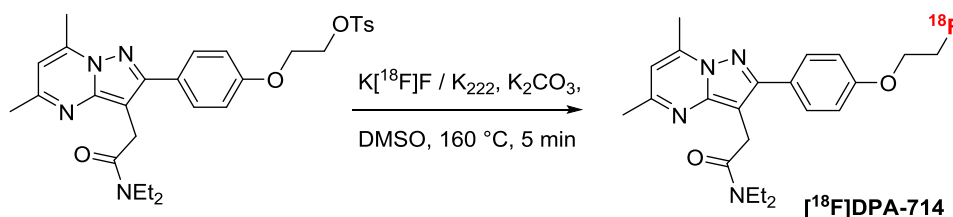
Le radiotracer peut ainsi être obtenu en 85 à 90 minutes avec un rendement radiochimique (non corrigé de la décroissance, et calculé à partir de la quantité initiale d'ions [<sup>18</sup>F]fluorures) de 10 à 16 %. La RAS de ce traceur obtenu au laboratoire est comprise entre 37 et 111 GBq/μmol.

#### 2.1.1.b. Réactivité des sulfonates.

##### ▪ Les tosylates.

Les tosylates (R-SO<sub>2</sub>PhCH<sub>3</sub>) sont les sulfonates les plus largement employés en radiochimie du fluor-18 en série aliphatique. Ce sont de très bons groupes partants et les précurseurs de marquage peuvent être facilement préparés à partir des alcools correspondants. Par ailleurs, leur lipophilie leur

permet d'être aisément séparés du radioligand fluoré par chromatographie liquide à haute performance (HPLC). La radiosynthèse de [ $^{18}\text{F}$ ]DPA-714, ligand de la TSPO, dédié à l'imagerie de la neuroinflammation et développée au sein de notre laboratoire en 2008, fait intervenir un précurseur présentant un groupe tosylate. Dans cet exemple, le précurseur de marquage possède un  $\text{clogP}$  de 4,34 contre un  $\text{clogP}$  de 3,33 pour la molécule marquée au fluor-18. [ $^{18}\text{F}$ ]DPA-714 a pu être obtenu en faisant réagir le précurseur tosylé avec le complexe  $\text{K}[^{18}\text{F}]\text{F} / \text{K}_{222}$  et du carbonate de potassium dans le diméthylsulfoxyde à 160 °C pendant 5 minutes. Sur la base des lots produits au laboratoire, ce traceur est régulièrement formé en 85 à 90 minutes avec des rendements (non corrigés de la décroissance, et calculé à partir de la quantité initiale d'ions [ $^{18}\text{F}$ ]fluorures) de 15 à 20 % et une RAS moyenne de 148 GBq/ $\mu\text{mol}$  (**Schéma 2**)<sup>8</sup>.

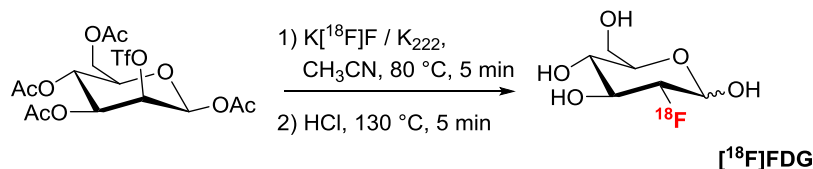


**Schéma 2** : Radiosynthèse du [ $^{18}\text{F}$ ]DPA-714 par  $\text{S}_{\text{N}}2$  sur un précurseur tosylate.

#### ▪ Les triflates.

Le groupement triflate ( $\text{R}-\text{SO}_3\text{CF}_3$ ) est l'un des plus réactifs de la série des sulfonates. C'est ce groupe partant qui est intégré au précurseur du 2- $[^{18}\text{F}]$ fluoro-2-désoxy-D-glucose ( $[^{18}\text{F}]$ FDG), qui est le radiopharmaceutique le plus couramment employé en imagerie TEP. Le [ $^{18}\text{F}$ ]FDG est notamment utilisé en oncologie pour la détection et le diagnostic de certaines tumeurs. Pour faire simple, les cellules cancéreuses ont tendance à consommer plus de glucose que les cellules saines. Elles vont donc consommer le [ $^{18}\text{F}$ ]FDG qui est un dérivé du glucose, et ce dernier va s'accumuler à l'intérieur des cellules cancéreuses, puisque qu'il ne pourra pas être métabolisé suivant le cycle de Krebs du fait du remplacement de l'hydroxyle en position 2 par un fluor.

La méthode de radiofluoration actuelle a été développée initialement par Hamacher *et al.*<sup>9</sup>, et consiste à faire réagir un précurseur mannose-triflate en présence de Kryptofix<sup>®</sup>  $\text{K}_{222}$ , dans l'acétonitrile à 80 °C pendant 5 minutes puis à déprotéger les groupements hydroxyles en présence d'acide chlorhydrique. La réaction de substitution nucléophile  $\text{S}_{\text{N}}2$  entraîne une inversion de configuration, ce qui permet de former le dérivé glucose correspondant (**Schéma 3**).



**Schéma 3** : Radiosynthèse du [ $^{18}\text{F}$ ]FDG par  $\text{S}_{\text{N}}2$  sur un précurseur triflate.

Les automates de synthèse les plus performants permettent aujourd'hui d'obtenir le [ $^{18}\text{F}$ ]FDG avec des rendements (non corrigés de la décroissance) très largement supérieurs à 70 % et des temps de radiosynthèse extrêmement courts (25 minutes). La RAS de ce traceur n'est que rarement

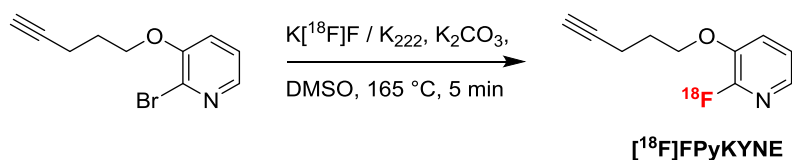
déterminée, mais est cependant très élevée du fait du procédé de synthèse utilisé d'une part, et de la quantité d'ions [ $^{18}\text{F}$ ]fluorures mis en jeu (très régulièrement  $> 370$  GBq) d'autre part.

### 2.1.2. Réactions de substitution nucléophile en série aromatique.

Les substitutions nucléophiles en série aromatique ( $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$ ) nécessitent l'appauvrissement du noyau aromatique en électrons par la présence d'un (ou plusieurs) substituant(s) électroattracteur(s), idéalement positionné(s) en position *para* et / ou *ortho* du groupement partant, lorsque l'aromatique considéré est un noyau phényle. Les groupes électroattracteurs les plus utilisés sont les groupes carbonylés (CN, CO, CHO,  $\text{CO}_2\text{R}$  ...). Les groupes partants les plus employés sont les fonctions nitro ( $\text{NO}_2$ ), halogènes (Br principalement) et ammonium quaternaires ( $-\text{NR}_3^+$ , R = alkyl). La substitution peut également se faire par échange isotopique avec le fluor-19, mais dans ce cas, les RAS sont très faibles. Il existe aussi des familles de composés développées plus récemment telles que les iodoniums, les ylides d'iodoniums (ou de sélénium), les sulfoniums et les aryles boroniques, qui permettent de marquer au fluor-18 des cycles aromatiques peu ou pas activés. Lorsque le noyau aromatique est naturellement appauvri en électron – cas des pyridines par exemple – un groupement électroattracteur n'est pas nécessaire.

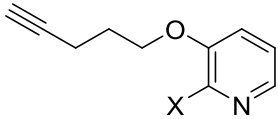
#### 2.1.2.a. Réactivité des halogénures d'aryle.

L'ordre de réactivité admis des halogènes en série aromatique est le suivant :  $\text{F} > \text{Cl} > \text{Br} > \text{I}$ . Le fluor est donc l'halogène le plus propice à une substitution. Cependant, son utilisation n'est pas adaptée lorsqu'il est nécessaire d'obtenir de hautes radioactivités spécifiques. En effet, le précurseur qui contient du fluor-19 est toujours en large excès par rapport aux ions fluorures [ $^{18}\text{F}$ ]F $^-$ , ce qui provoque une importante dilution isotopique dans la mesure où l'on recueillera un mélange radiotraceur / précurseur qu'aucune méthode de purification ne permettra de séparer. C'est pourquoi l'utilisation d'autres halogènes tels que le brome est plus courante. Le radiomarquage du groupement prosthétique [ $^{18}\text{F}$ ]FPyKYNE (réactif fonctionnel permettant le radiomarquage de macromolécules par réaction de chimie clic (click-chemistry)) peut s'effectuer à partir du précurseur bromé en présence de  $\text{K}[^{18}\text{F}]\text{F} / \text{K}_{222}, \text{K}_2\text{CO}_3$ , dans le diméthylsulfoxyde à  $165\text{ }^\circ\text{C}$  pendant 5 minutes (**Schéma 4**)<sup>10</sup>.



**Schéma 4** : Radiosynthèse de [ $^{18}\text{F}$ ]FPyKYNE.

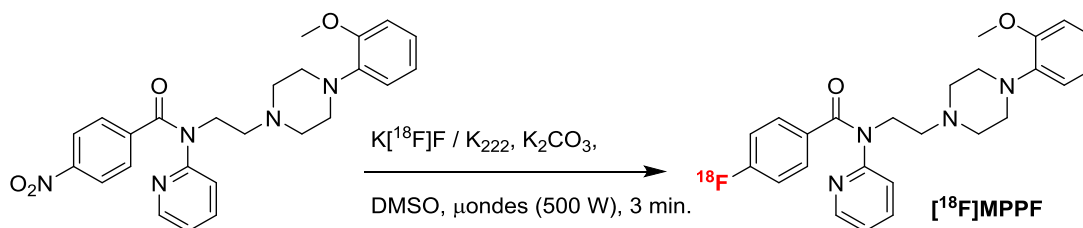
Il a cependant été montré que les halogènes ne sont pas les meilleurs groupes substituables, et le même composé peut être obtenu avec de bien meilleurs rendements ( $> 90\%$ ) et après seulement 3 minutes de chauffage à  $165\text{ }^\circ\text{C}$  (toute chose égale par ailleurs), en utilisant le précurseur nitro correspondant (**Tableau 4**)<sup>10</sup>.

Précurseur utilisé		Temps de réaction (min)				
Structure	X	1 (%)	2 (%)	3 (%)	4 (%)	5 (%)
	Br	5	4	5	6	16
	NO <sub>2</sub>	22	49	> 90	> 90	> 90

**Tableau 4 :** Comparaison de la réactivité des précurseurs bromé et nitro sur un exemple choisi : [<sup>18</sup>F]FPyKYNE.

### 2.1.2.b. Réactivité des nitro aryles.

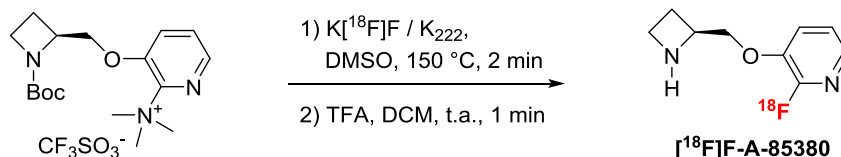
Comme illustré ci-dessus, les groupements nitros sont également de bons groupements utilisables dans le cas d'une substitution nucléophile aromatique. Le radiotracer [<sup>18</sup>F]MPPF, permettant l'exploration des récepteurs sérotoninergiques 5HT<sub>1A</sub> du système nerveux central a été initialement développé au CERMEP à Lyon, à partir du précurseur nitro<sup>11</sup>. A noter que cette molécule contient « naturellement » un groupement électroattracteur en *para* (groupement carbonyle) (**Schéma 5**). Des méthodes de radiomarquage par utilisation de  $\mu$ -ondes<sup>12</sup> permettent aujourd'hui d'obtenir ce radiotracer avec un rendement non corrigé de la décroissance de 25 % après 70 minutes de synthèse et une RAS de 37 à 185 GBq/ $\mu$ mol.



**Schéma 5 :** Radiosynthèse du [<sup>18</sup>F]MPPF par substitution nucléophile aromatique.

### 2.1.2.c. Réactivité des sels d'ammonium quaternaires.

Les sels d'ammoniums quaternaires permettent le radiomarquage au fluor-18 de certaines molécules. La radiosynthèse de [<sup>18</sup>F]F-A-85380 par exemple, un radioligand dédié à l'imagerie des récepteurs nicotiques fait intervenir un groupement triméthylammonium trifluorométhanesulfonate pour introduire le fluor-18 en  $\alpha$  de la pyridine (**Schéma 6**)<sup>13</sup>. Le solvant utilisé est toujours le diméthylsulfoxyde avec un temps de chauffage très court (2 minutes) et une température modérée (150 °C).



**Schéma 6 :** Radiosynthèse en deux étapes du [<sup>18</sup>F]F-A-85380 à partir d'un ammonium quaternaire.

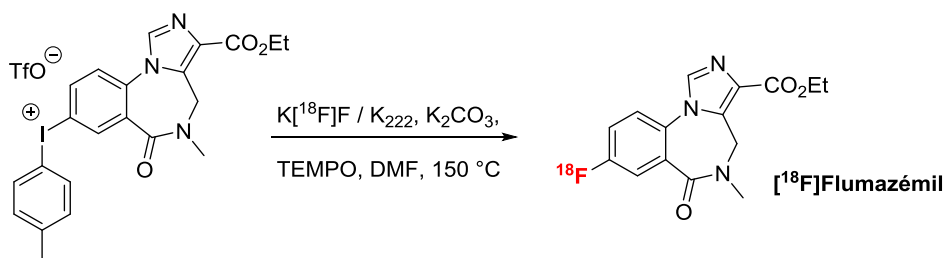
Ce radiotracer a été synthétisé au sein de notre laboratoire en deux étapes (fluoruration / déprotection) et a été obtenu avec un rendement de 49 à 52 % (non corrigé de la décroissance, sur la base du fluor-18 initialement mis en jeu) et une RAS régulièrement comprise entre 148 et 259 GBq/ $\mu$ mol, pour un temps total de synthèse de 50 à 55 minutes.



### 2.1.2.d. Réactivité des iodoniums.

Les sels d'iodonium font partie de la famille des réactifs de l'iode hypervalent. Ils connaissent un intérêt croissant en radiochimie car ils permettent notamment le marquage au fluor-18 de cycles aromatiques qui ne sont pas activés, c'est-à-dire non appauvris en électrons par la présence d'un groupe électro-attracteur comme dans la plupart des exemples précédents. Les sels d'iodonium sont des composés ioniques de l'atome d'iode, chargés positivement, et liés de façon covalente à deux groupements carbonés. Le contre-ion est le plus souvent un halogénure, un tosylate ou un triflate. On notera par ailleurs que la nature du contre-ion peut influencer sur la solubilité et sur la réactivité du sel. Les halogénures sont en général moins solubles et moins réactifs que les triflates.

Moon *et al.*<sup>14</sup> sont parvenus à marquer le [<sup>18</sup>F]Flumazénil, utilisé pour l'imagerie de l'épilepsie et de la perte neuronale, avec un rendement radiochimique de 36 % (non corrigé de la décroissance) après une synthèse de 60 minutes (**Schéma 7**). Ce composé a également été radiomarké au fluor-18 à partir d'un précurseur nitro, et dans ce cas, il a été obtenu avec seulement 30 % de rendement (non corrigé de la décroissance) et 75 minutes de radiosynthèse<sup>15</sup>. On notera la présence de TEMPO dans le milieu réactionnel, un capteur de radicaux libres souvent utilisé dans le cas de réactions avec des précurseurs iodoniums. Les iodes hypervalents sont des composés connus pour induire de nombreuses réactions secondaires dues principalement à la fission homolytique de la liaison iode-aryle, générant ainsi des radicaux qui peuvent entraîner des réactions indésirables<sup>16</sup>.



**Schéma 7** : Radiosynthèse du [<sup>18</sup>F]Flumazénil par substitution d'un iodonium.

### 2.1.2.e. Réactivité des phénols activés.

Récemment, le groupe de Ritter a mis au point une méthode de fluoration nucléophile aromatique par réaction de désoxyfluoruration de phénols contenant des substrats riches ou pauvres en électrons<sup>17</sup>. Cette réaction passe par l'activation du phénol (molécule A, **Schéma 8**) par réaction avec un réactif imidazolium. Le fluor-18 est ensuite additionné sur le motif imidazole conduisant à un intermédiaire (molécule B, **Schéma 8**), qui par attaque nucléophile intramoléculaire et concertée du fluor-18 puis élimination simultanée du groupe imidazole, permet d'obtenir le produit radiomarké. Cette méthode permet par exemple de radiomarker des cycles aromatiques peu appauvris en électrons ou de radiomarker des positions habituellement considérées défavorables. On note cependant que lorsque le groupement R présente un caractère fortement électro-attracteur, les rendements d'incorporation du fluor-18 sont nettement meilleurs, allant jusqu'à 99 % pour un nitrile ou un aldéhyde en *para* du fluor-18. En revanche, les rendements d'incorporation sont plus faibles pour des positions « défavorables » (75 % pour la 3-[<sup>18</sup>F]fluoro-5-chloropyridine) ou des groupements R peu électro-attracteurs (39 % pour un amide par exemple)<sup>17</sup>.



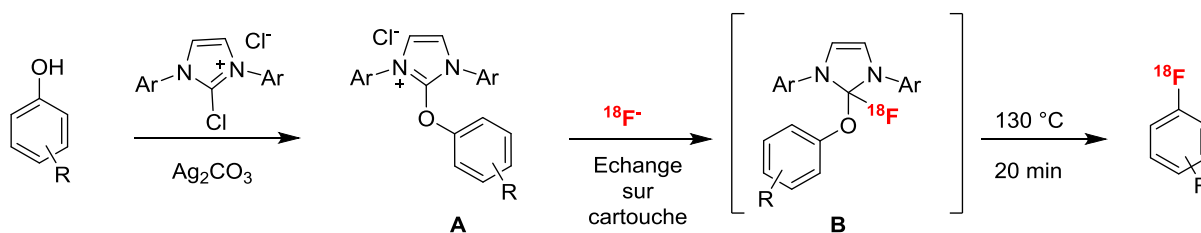


Schéma 8 : Principe de fluoration par utilisation des phénols activés.

### 2.1.2.f. Fluorations aromatiques par catalyse métallique.

Plus récemment, des techniques basées sur de la catalyse métallique ont été développées pour le marquage au fluor-18 de positions dites défavorables, c'est à dire sur des cycles peu activés et pour faire face aux faiblesses des autres méthodes précédemment citées.

- Catalyse au cuivre.

De la catalyse au cuivre a été développée par le groupe de Gouverneur<sup>18</sup> pour marquer au fluor-18 des positions aromatiques à partir d'aryles boroniques grâce à un couplage de Chan-Lam en présence d'un complexe de cuivre II commercial ( $[\text{Cu}(\text{OTf})_2(\text{Py})_4]$ ) et soluble (**Figure 5**).

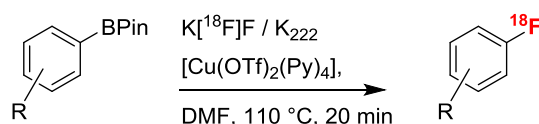
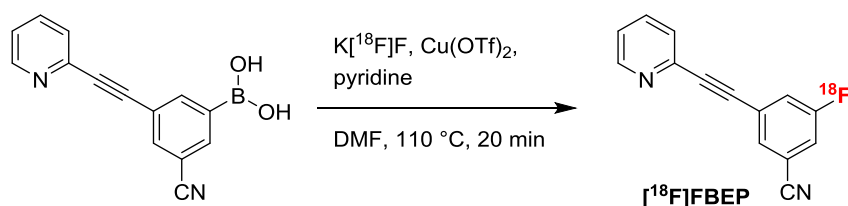


Figure 5 : Conditions de marquage au fluor-18 par catalyse au cuivre et un couplage de Chan-Lam.

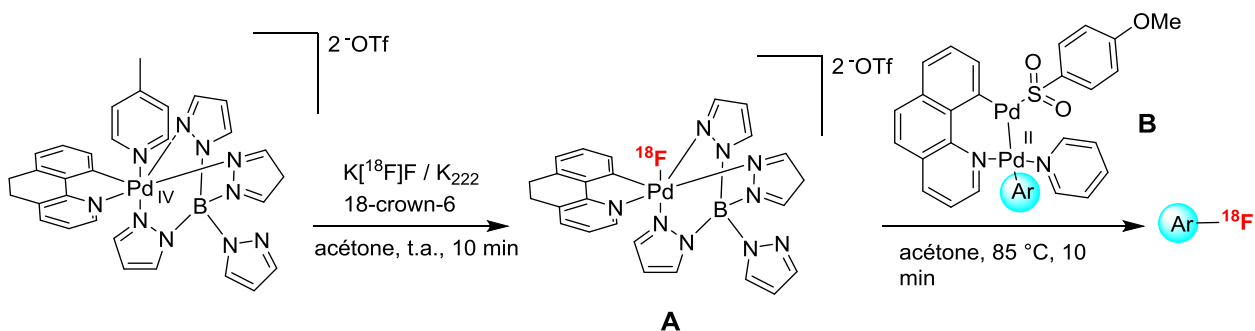
En appliquant cette méthode, Mossine *et al.*<sup>19</sup> ont marqué le  $[\text{F}^{18}]$ FBEP, un ligand permettant l'imagerie des récepteurs glutamatergiques mGluR5 impliqués dans les désordres neuropsychiatriques (**Schéma 9**). Les auteurs ont obtenu jusqu'à 8 % d'incorporation du fluor-18. Le rendement radiochimique en radiotracer n'est pas indiqué dans la publication, mais ce dernier devrait être supérieur à celui initialement reporté par Wong *et al.*<sup>20</sup> – 1,7 % – obtenu par une substitution chlore /  $[\text{F}^{18}]$ fluor.

Schéma 9 : Radiosynthèse du  $[\text{F}^{18}]$ FBEP par catalyse au cuivre.

- Catalyse au palladium et au nickel.

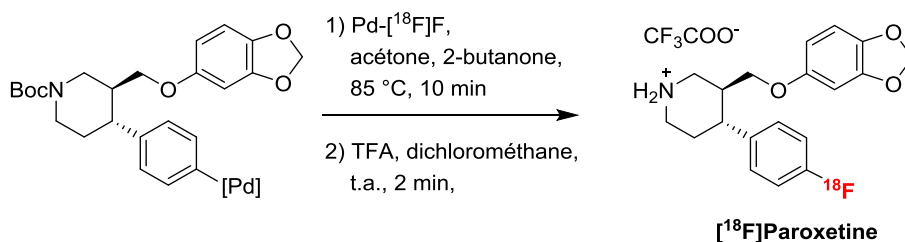
Les couplages pallado-catalysés sont largement utilisés pour créer des liaisons carbone-carbone et carbone-hétéroatome. Cette chimie a été adaptée au fluor-18 pour générer des liaisons C- $^{18}\text{F}$  à partir d'intermédiaires de palladium hypervalent. Le groupe de Ritter a, en particulier, développé une

méthode transformant les ions fluorures  $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$  en une espèce électrophile en utilisant un complexe hypervalent  $\text{Pd}-[^{18}\text{F}]\text{F}$  comme réactif pour la synthèse de radiotraceurs. Cette méthode nécessite cependant la préparation de deux complexes au palladium : un premier sur lequel le fluor-18 est incorporé (espèce A, **Schéma 10**) et un second servant de précurseur de marquage à proprement dit<sup>21</sup> (espèce B, **Schéma 10**).



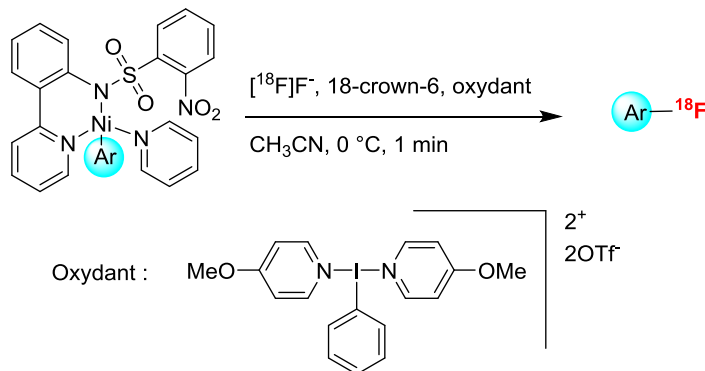
**Schéma 10** : Méthode de radiomarquage au fluor-18 par utilisation de complexe palladié.

Cette méthode a été utilisée pour marquer la  $[^{18}\text{F}]\text{Paroxetine}$  (un anti-dépresseur), qui a pu être obtenue en quantité juste suffisante pour permettre de faire de l'imagerie TEP du primate non-humain<sup>22</sup> (**Schéma 11**). En effet seulement 0,37 GBq de traceur ont été isolé soit 1 % de rendement non corrigé de la décroissance d'après les auteurs. La RAS n'a pas été communiquée par ailleurs.



**Schéma 11** : Radiomarquage de la  $[^{18}\text{F}]\text{Paroxetine}$ .

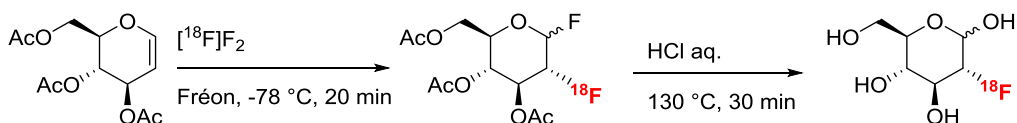
Ritter et ses collaborateurs ont également rapportés une méthode analogue dans laquelle les précurseurs de marquage sont des complexes de nickel<sup>23</sup>. Ces complexes permettent une fluoration en une seule étape ne nécessitant pas la préparation préalable d'un agent électrophile et fournissent des rendements plus élevés que les complexes au palladium (**Schéma 12**).



**Schéma 12** : Méthode de radiomarquage au fluor-18 par utilisation de complexe au nickel.

## 2.2. Réactions de fluoration par utilisation de fluor moléculaire $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ .

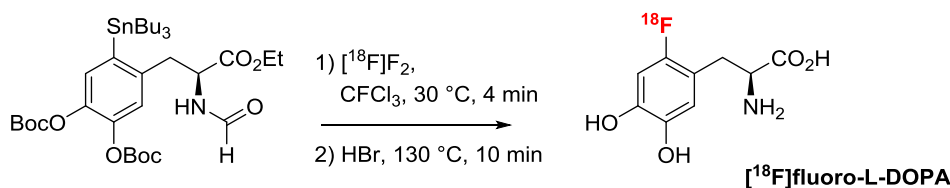
A la différence des substitutions nucléophiles, les fluorations électrophiles font généralement intervenir des composés gazeux entraînés par un gaz vecteur tel que le néon et contenant du fluor-19, ce qui diminue très fortement la RAS des traceurs ainsi formés, comme précédemment écrit. Le radiotracer le plus emblématique, le  $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ , a été marqué pour la première fois en 1978<sup>24</sup> par fluoration d'un glycol triacétylé (**Schéma 13**). Ces réactions d'addition sur double-liaison, ne permettent pas une stéréosélectivité ni une régiosélectivité contrôlées, et le développement concomitant de méthodes de fluoration par substitution nucléophile – conduisant aussi à de meilleurs RAS – a relégué au second plan cette méthodologie.



**Schéma 13** : Synthèse « historique » du  $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$  par addition électrophile.

### 2.2.1. Réactions de fluorodémétallation.

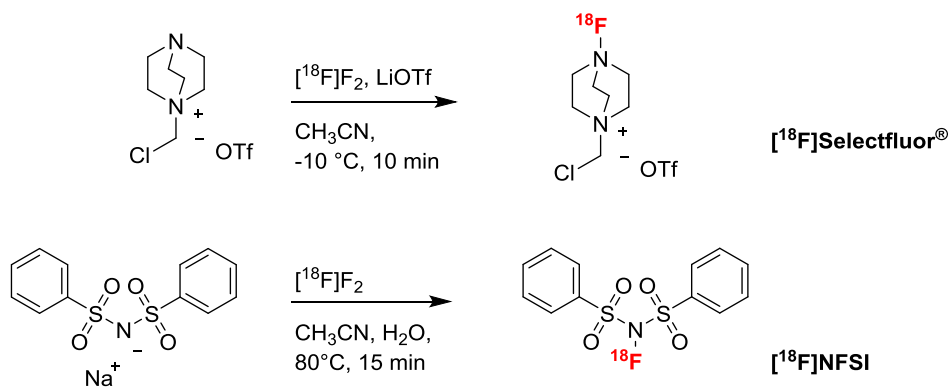
Par la suite, des précurseurs organométalliques à base de métaux de transition ont été développés afin notamment de contrôler la régiosélectivité de la réaction. Grâce à leur caractère inductif donneur, les métaux augmentent la densité électronique portée par le carbone à fluorer, ce qui se traduit par une fixation régiosélective du fluor-18. Par exemple, une méthode de radiomarquage de la  $[^{18}\text{F}]\text{fluoro-L-DOPA}$  développée au sein de notre laboratoire en 1998<sup>25</sup> fait intervenir la fluoration électrophile à température ambiante d'un précurseur stannylé protégé par des groupements Boc (**Schéma 14**). Cette synthèse a ensuite été automatisée par De Vries *et al.*<sup>26</sup> et a permis d'obtenir le radiotracer après 45 minutes de radiosynthèse avec un rendement de 24,8 % (non corrigé de la décroissance) et une RAS moyenne de 10,6 GBq/ $\mu\text{mol}$ .



**Schéma 14** : Radiosynthèse de la  $[^{18}\text{F}]\text{fluoro-L-DOPA}$  par fluorodestannylation.

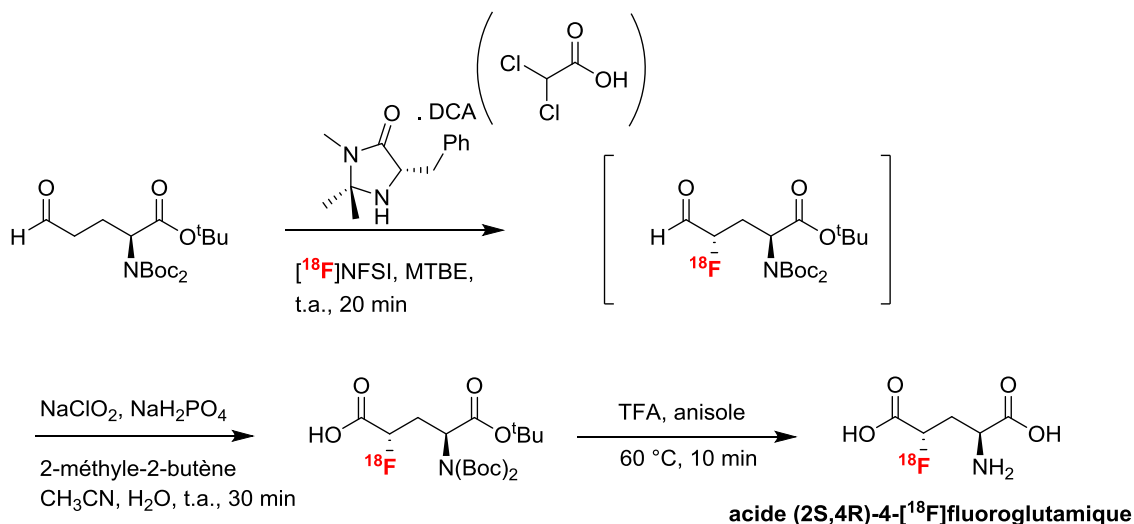
### 2.2.2. Formations de précurseurs secondaires à partir de $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ .

Le fluor gazeux électrophile peut également être utilisé pour la préparation de précurseurs secondaires tels que le  $[^{18}\text{F}]\text{Selectfluor}^{\text{®}}$  ou le  $[^{18}\text{F}]\text{NFSI}$  (**Schéma 15**), permettant d'élargir les possibilités de fluorations électrophiles.



**Schéma 15 :** Préparation de  $[\text{F}^{18}\text{F}]$ Selectfluor $^\circledast$  et de  $[\text{F}^{18}\text{F}]$ NFSI.

Le  $[\text{F}^{18}\text{F}]$ NFSI a par exemple été utilisé par Buckingham *et al.*<sup>27</sup> pour la préparation de l'acide (2S,4R)-4- $[\text{F}^{18}\text{F}]$ fluoroglutamique, traceur employé pour la détection des tumeurs pulmonaires et du colon (**Schéma 16**). Les auteurs ont pu obtenir jusqu'à 65 % d'incorporation du fluor-18 (à partir du  $[\text{F}^{18}\text{F}]$ NFSI).



**Schéma 16 :** Radiosynthèse de l'acide (2S,4R)-4- $[\text{F}^{18}\text{F}]$ fluoroglutamique



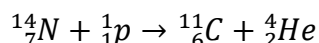
# Chapitre III : La Chimie du carbone-11.

Le carbone-11, avec un temps de demi-vie de 20,4 minutes, est un émetteur de positons à vie brève également très utilisé en imagerie TEP. Contrairement au fluor-18, il offre une plus grande variété de réactions chimiques pour l'introduire au sein d'une molécule organique, et possède donc un fort potentiel pour le radiomarquage isotopique de molécules « drug-like » ou d'entités biologiques. Marquage au carbone-11 rime très souvent avec réactions de méthylation (alcools, amines ou thiols) et repose majoritairement sur l'utilisation de triflate de [<sup>11</sup>C]méthyle ([<sup>11</sup>C]CH<sub>3</sub>OTf) ou d'iodure de [<sup>11</sup>C]méthyle ([<sup>11</sup>C]CH<sub>3</sub>I). Cependant, la diversité des précurseurs secondaires qui peuvent être formés à partir du [<sup>11</sup>C]dioxyde de carbone ([<sup>11</sup>C]CO<sub>2</sub>) et du [<sup>11</sup>C]méthane [<sup>11</sup>C]CH<sub>4</sub>) – entités primaires marquées au carbone-11 et générées en ciblerie – permettent également l'introduction de cet isotope *via* d'autres réactions, telles que des carbonylations ou des carboxylations, notamment *via* l'utilisation du monoxyde de [<sup>11</sup>C]carbone ([<sup>11</sup>C]CO).

## 1. Production du carbone-11 et réactifs marqués au carbone-11

### 1.1. Production des précurseurs primaires.

Le carbone-11 peut être produit par irradiation d'azote pur par un faisceau de protons (**Equation 8**) :



**Equation 8**

Le <sup>11</sup>C « atomique » se stabilise sous sa forme moléculaire appelée « précurseur primaire », dont la nature dépend du gaz cible employé. Si l'irradiation a lieu en présence d'un gaz cible contenant des traces d'oxygène (0,2 % par exemple), le carbone-11 sera produit sous forme de dioxyde de [<sup>11</sup>C]carbone ([<sup>11</sup>C]CO<sub>2</sub>). Si l'irradiation a lieu en présence d'un gaz cible contenant 5 % d'hydrogène, le carbone-11 sera produit sous forme de [<sup>11</sup>C]méthane ([<sup>11</sup>C]CH<sub>4</sub>).

### 1.2. Diversité des précurseurs secondaires.

A partir des précurseurs primaires cités précédemment (à savoir [<sup>11</sup>C]CO<sub>2</sub> et [<sup>11</sup>C]CH<sub>4</sub>) un nombre considérable de synthons marqués au carbone-11, appelés « précurseurs secondaires », peuvent être préparés. Ces synthons organiques, monocarbonés, sont en fait des réactifs pour la plupart et sont à l'origine de la diversité des marquages de molécules au carbone-11. Parmi ces précurseurs secondaires, on retrouve [<sup>11</sup>C]CH<sub>3</sub>I et [<sup>11</sup>C]CH<sub>3</sub>OTf, deux réactifs qui dominent largement encore la chimie du carbone-11, et utilisés notamment pour des réactions de *N*-, *O*- et *S*- méthylation.

La **Figure 6** ci-dessous décrit la préparation des principaux précurseurs secondaires marqués au carbone-11, à partir de [<sup>11</sup>C]CO<sub>2</sub> ou [<sup>11</sup>C]CH<sub>4</sub><sup>28</sup>.



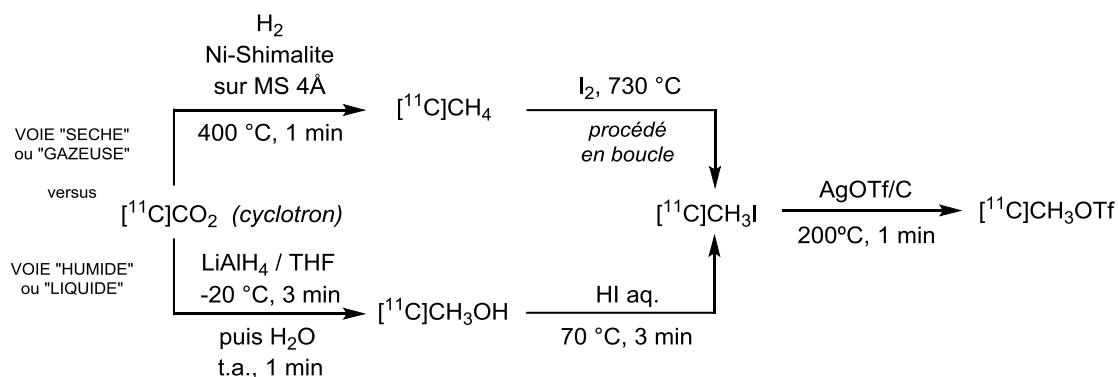
## 2.1.1. Préparation de $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ et de $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$ .

### 2.1.1.a. Préparation de l'iodure de $[^{11}\text{C}]\text{méthyle}$ .

$[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$  peut être obtenu de deux manières différentes (**Figure 7**) : par voie dite « liquide » à partir de  $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$  ou par voie dite « sèche » (ou « gazeuse ») à partir du  $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$ , ce dernier pouvant soit être obtenu en ciblerie (cf ci-dessus paragraphe 1.1), soit par réduction quantitative du  $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ . En pratique, de nos jours,  $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$  est régulièrement formé par voie sèche à partir du  $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ .

- Iodure de  $[^{11}\text{C}]\text{méthyle}$  ( $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ ) par voie liquide.

La première étape de fabrication du  $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$  par voie liquide correspond à la réduction du  $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$  en  $[^{11}\text{C}]\text{méthanol}$  ( $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OH}$ ) par  $\text{LiAlH}_4$  en solution dans le tétrahydrofurane ou le diéthyle éther. Après hydrolyse, le  $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OH}$  est distillé puis recondensé dans une solution d'acide iodhydrique.  $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$  ainsi formé est ensuite distillé à haute température sous courant d'azote ou d'hélium à travers un piège de  $\text{NaOH} / \text{P}_2\text{O}_5$ . Cette méthode a été développée en 1976 par Langström et Lundqvist<sup>30</sup>.



- Iodure de  $[^{11}\text{C}]\text{méthyle}$  ( $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ ) par voie gazeuse.

Une méthode alternative à la production de  $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$  par voie liquide a été développée dans les années 1990. Cette méthode exploite la conversion du méthane  $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$  en  $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$  par réaction en phase gazeuse avec de l'iode moléculaire ( $\text{I}_2$ ) à des températures comprises entre 700 et 750 °C. Le  $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$  est en pratique bien souvent obtenu au préalable par réduction du  $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$  par du dihydrogène haute température impliquant un catalyseur au nickel. Afin d'obtenir des rendements finaux suffisants en  $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ , un procédé de recirculation du  $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$  (n'ayant pas encore été converti) via une boucle et une pompe a été développé. Au cours de chaque cycle, l'iodure de  $[^{11}\text{C}]\text{méthyle}$  est « simplement » extrait du milieu réactionnel par piégeage sur une résine de type Porapak maintenue à température ambiante alors que le  $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$  restant est remis en contact avec de l'iode moléculaire.

Un procédé optimisé (environ 50 % de rendement non corrigé de la décroissance) est par ailleurs en place sur un automate disponible commercialement (TRACERLab FX C Pro, GEMS), basé sur 16 cycles (4 cycles / min pendant 4 min) de recirculation du  $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$ . En fin de procédé,  $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$  est ensuite relargué par chauffage de la résine Porapak<sup>31,32</sup>.



### 2.1.1.b. Préparation du triflate de [<sup>11</sup>C]méthyle.

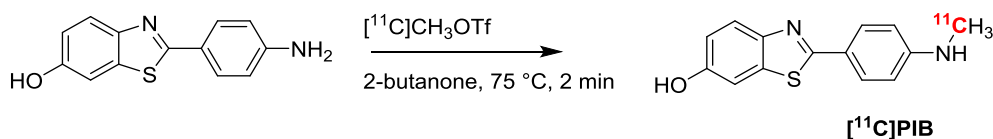
[<sup>11</sup>C]CH<sub>3</sub>OTf est un agent de méthylation plus réactif comparé à [<sup>11</sup>C]CH<sub>3</sub>I, nécessitant des temps de synthèse plus courts et acceptant des températures plus basses<sup>33</sup>. Il est également moins volatile que [<sup>11</sup>C]CH<sub>3</sub>I et peut être piégé dans des plus petits volumes de solvants. La combinaison de ces propriétés fait que les méthylations d'hétéroatomes utilisant [<sup>11</sup>C]CH<sub>3</sub>OTf donnent de meilleurs rendements radiochimiques que celles utilisant [<sup>11</sup>C]CH<sub>3</sub>I.

La synthèse de [<sup>11</sup>C]CH<sub>3</sub>OTf est réalisée de manière quantitative par passage de [<sup>11</sup>C]CH<sub>3</sub>I à travers une colonne contenant du triflate d'argent adsorbé sur charbon sous courant d'hélium et à 200 °C<sup>34</sup>.

## 2.1.2. Exemples de réactions de méthylation.

### 2.1.2.a. Réactions de N-méthylation.

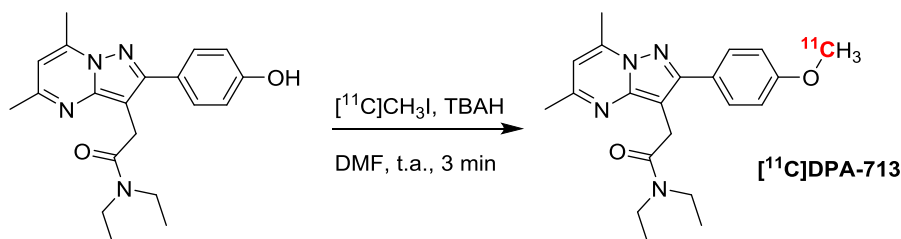
Un traceur très utilisé en recherche clinique pour le diagnostic de la maladie d'Alzheimer, est le [<sup>11</sup>C]PIB (Pittsburgh compound B), une molécule se fixant préférentiellement sur les plaques amyloïdes. Ce traceur est marqué au carbone-11 sur une aniline par action du [<sup>11</sup>C]CH<sub>3</sub>OTf à 75 °C pendant 2 minutes<sup>35,36</sup> (**Schéma 17**). Par cette méthode Phillippe *et al.*<sup>36</sup> par exemple, ont obtenu le [<sup>11</sup>C]PIB avec un rendement (non corrigé de la décroissance et basé sur la quantité initiale de [<sup>11</sup>C]CO<sub>2</sub>) de 24 % et une RAS moyenne de 183 GBq/μmol.



**Schéma 17** : Radiosynthèse du [<sup>11</sup>C]PIB, un exemple choisi de N-[<sup>11</sup>C]méthylation.

### 2.1.2.b. Réactions de O-méthylation.

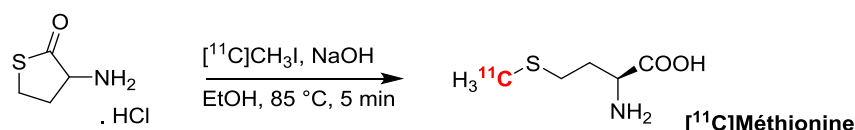
[<sup>11</sup>C]CH<sub>3</sub>OTf est aussi utilisé pour des réactions de O-méthylation. De nombreux traceurs sont marqués au carbone-11 par introduction d'un [<sup>11</sup>C]méthyle sur un hydroxyle. A titre d'exemple, parmi les ligands dédiés à l'imagerie de la TSPO, on peut citer [<sup>11</sup>C]PBR28<sup>37</sup>, [<sup>11</sup>C]DAA1106<sup>38</sup> et [<sup>11</sup>C]DPA-713<sup>39</sup>, dont la radiosynthèse est décrite dans le **Schéma 18**. Kassiou *et al.*<sup>39</sup> ont pu obtenir [<sup>11</sup>C]DPA-713 en seulement 13 minutes de radiosynthèse, un rendement de 9 % (non corrigé de la décroissance et basé sur la quantité initiale de [<sup>11</sup>C]CH<sub>3</sub>I) et une RAS moyenne de 37 GBq/μmol.



**Schéma 18** : Radiosynthèse du [<sup>11</sup>C]DPA-713, un exemple choisi de O-[<sup>11</sup>C]méthylation.

### 2.1.2.c. Réactions de S-méthylation.

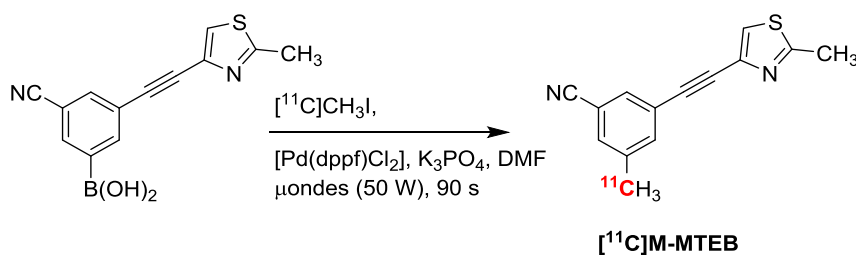
L'un des principaux traceurs radiomarqué par une réaction de S-alkylation est la L-[<sup>11</sup>C]Méthionine, un acide aminé utilisé pour le diagnostic des tumeurs cérébrales. Elle peut être préparée à partir du chlorhydrate de la L-homocystéine thiolactone en présence de [<sup>11</sup>C]CH<sub>3</sub>I, et d'hydroxyde de sodium dans l'éthanol à 85 °C pendant 5 minutes<sup>33</sup>. La [<sup>11</sup>C]méthionine est ainsi obtenue avec un rendement radiochimique de 21,3 % (non corrigé de la décroissance et calculé à partir de la quantité initiale de [<sup>11</sup>C]CH<sub>3</sub>I) et une pureté énantiomérique supérieure à 98 % (**Schéma 19**). Elle peut être aussi obtenue avec des rendements équivalents voire supérieurs par [<sup>11</sup>C]méthylation sur phase solide (cartouche)<sup>40</sup>.



**Schéma 19** : Radiosynthèse de la [<sup>11</sup>C]Méthionine, un exemple choisi de S-[<sup>11</sup>C]méthylation.

### 2.1.2.d. Réactions de C-méthylation.

[<sup>11</sup>C]CH<sub>3</sub>I est également régulièrement utilisé pour la formation de liaison carbone-[<sup>11</sup>C]carbone *via* des réactions de [<sup>11</sup>C]méthylation pallado-catalysées, donnant notamment accès au marquage de fonctions toyles. Parmi ces réactions, les couplages de Stille et de Suzuki sont assez répandus et permettent l'incorporation de groupements [<sup>11</sup>C]méthyle à partir d'organostannanes ou d'acides boroniques<sup>41</sup>. Un analogue du ligand des récepteurs glutamatergiques mGluR5 [<sup>18</sup>F]FBEP (présenté dans le chapitre précédent) a par exemple été radiomarqué au carbone-11. Hamill *et al.*<sup>42</sup> ont obtenu le [<sup>11</sup>C]M-MTEB après un temps total de synthèse de 20 minutes, avec un rendement radiochimique de 28 % (non corrigé de la décroissance et calculé à partir de la quantité initiale de [<sup>11</sup>C]CH<sub>3</sub>I produite) et une RAS moyenne de 70,3 GBq/μmol (**Schéma 20**).



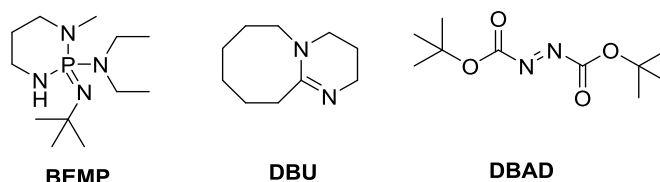
**Schéma 20** : Radiosynthèse du [<sup>11</sup>C]M-MTEB, un exemple choisi de formation de liaison C-[<sup>11</sup>C]méthyle.

## 2.2. Réactions de [<sup>11</sup>C]carbonylation.

Les réactions de carbonylations sont des procédés complémentaires aux réactions de méthylation, qui en permettant notamment la formation d'urées, de carbonates et de carbamates, offrent des possibilités de radiosynthèse et de développement de nouveaux radiotraceurs. Les principaux synthons utilisés pour ces réactions sont le dioxyde de [<sup>11</sup>C]carbone ([<sup>11</sup>C]CO<sub>2</sub>) et surtout le monoxyde [<sup>11</sup>C]carbone ([<sup>11</sup>C]CO), mais aussi historiquement, le [<sup>11</sup>C]phosgène ([<sup>11</sup>C]COCl<sub>2</sub>). Une revue récente fait le point sur leur utilisation, et des exemples choisis et représentatifs de ces méthodologies sont donnés ci-dessous<sup>43</sup>.

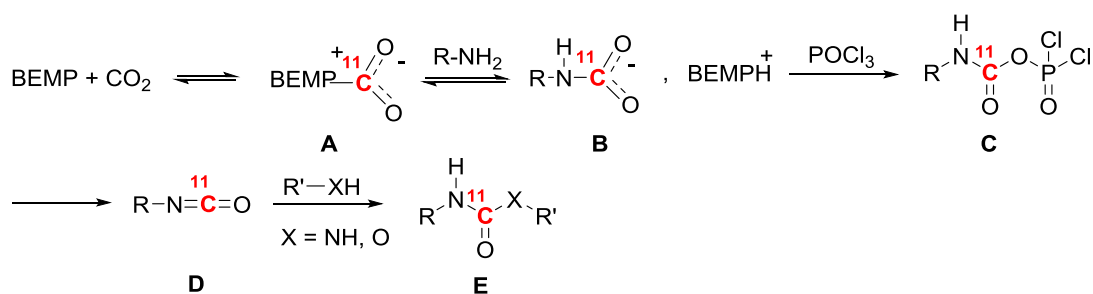
### 2.2.1. Fixation du $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ : formation de $[^{11}\text{C}]$ carbamates et d' $[^{11}\text{C}]$ urées.

Le dioxyde de  $[^{11}\text{C}]$ carbone est un réactif simple d'utilisation car il est généré directement en ciblerie lors de l'irradiation et production du carbone-11 (cf section précédente). En utilisant des bases azotées fortes comme agents de fixation, telles que le BEMP ou le DBU (dont les structures sont présentées dans la **Figure 8**), le  $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$  va être piégé efficacement à température ambiante et sous faibles pressions et permettre dans un deuxième temps la formation d'urées dissymétriques, par exemple.



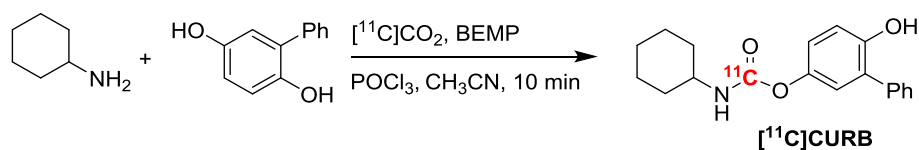
**Figure 8** : Structures des bases BEMP, DBU et DBAD.

Le  $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$  va réagir dans un premier temps avec le BEMP ou le DBU pour former le composé A (**Schéma 21**) puis un équilibre va se créer avec un premier nucléophile (composé B). Après l'addition de  $\text{POCl}_3$  (composé C) et « déshydratation », l'isocyanate D se forme, qui peut ensuite réagir avec un second nucléophile pour former l'urée E souhaitée<sup>44</sup>.



**Schéma 21** : Mécanisme réactionnel de la formation de  $[^{11}\text{C}]$ urées dissymétriques par fixation du  $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ .

Cette méthode peut être employée pour la formation d'urées, de carbonyles ou d'isocyanates marqués au carbone-11 (s'il n'y a qu'un seul nucléophile dans le milieu). Elle a notamment permis le développement de nouveaux radiotraceurs ciblant la FAAH, une enzyme catalysant l'hydrolyse des amides d'acides gras et impliquée dans le métabolisme de certains neurotransmetteurs. En particulier, le traceur  $[^{11}\text{C}]\text{CURB}$ , imaginé à partir d'un inhibiteur sélectif et irréversible de cet hydrolase (le URB597), a été marqué au carbone-11 à partir de la cyclohexylamine et du [1,1'-biphényl]-2,5-diol, en présence de  $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$  (**Schéma 22**).



**Schéma 22** : Radiosynthèse de  $[^{11}\text{C}]\text{CURB}$  par fixation du  $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ .

Wilson *et al.*<sup>44</sup> ont obtenu [<sup>11</sup>C]CURB avec un rendement de 8 % (non corrigé de la décroissance et calculé à partir de la quantité initiale de [<sup>11</sup>C]CO<sub>2</sub>) et une RAS moyenne de 92,5 GBq/μmol.

### 2.2.2. Utilisation du monoxyde de [<sup>11</sup>C]carbone ([<sup>11</sup>C]CO).

Le monoxyde de [<sup>11</sup>C]carbone peut également être utilisé pour des réactions de carbonylation et permettre le marquage de fonctions variées telles que des cétones, amides, acides carboxyliques, esters, et urées. La réactivité versatile de ce réactif est permise notamment par la catalyse avec des métaux de transition tels que le palladium ou le rhodium qui permettent de se coordonner facilement au [<sup>11</sup>C]CO et de faciliter ainsi la formation de liaison [<sup>11</sup>C]C-O<sup>45</sup>.

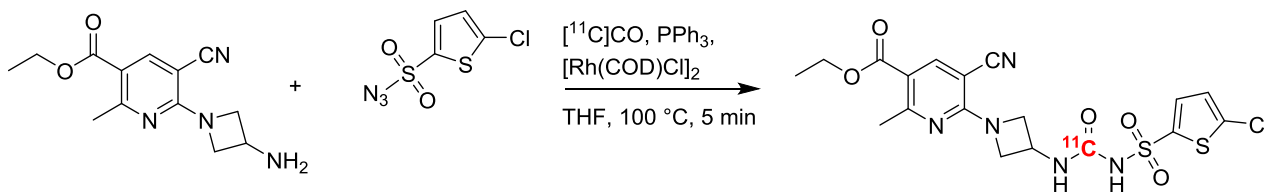
#### 2.2.2.a. Préparation du [<sup>11</sup>C]CO.

Le [<sup>11</sup>C]CO peut être préparé avec de bons rendements à partir de [<sup>11</sup>C]CO<sub>2</sub> (produit en ciblerie par cyclotron), par passage au travers d'un tube de quartz contenant du zinc (400 °C) ou du molybdène (850 °C) sous courant d'azote ou d'hélium<sup>45</sup>.

#### 2.2.2.b. Exemples d'utilisation.

Les réactions de carbonylation mettant en œuvre du [<sup>11</sup>C]CO sont le plus souvent pallado-catalysées, faisant intervenir notamment le Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>. Le cycle catalytique comportent trois étapes : une addition oxydante de l'halogénure d'aryle pour générer *in situ* un complexe de palladium (0), une insertion du [<sup>11</sup>C]CO au complexe du palladium puis une élimination réductrice permet de former le produit [<sup>11</sup>C]carbonylé attendu<sup>46</sup>.

Plus récemment, des catalyseurs au rhodium ont été développés pour la synthèse de petites molécules et la formation d'urées par réaction d'aminocarbonylation en présence d'aryle ou des azotures de sulfones. Cette méthode a été employée tout récemment par Windhorst *et al.*<sup>47</sup> pour le radiomarquage d'un ligand des P2Y<sub>12</sub>R, à partir d'une amine et d'un azoture de thiophène sulfonyle (**Schéma 23**). En présence de triphénylphosphine et de [Rh(COD)Cl]<sub>2</sub> dans le tétrahydrofur à 100 °C pendant 5 minutes, le composé désiré est formé avec un rendement de 8,5 % (non corrigé de la décroissance), et une RAS supérieure à 100 GBq/μmol.



**Schéma 23** : Exemple de carbonylation utilisant le [<sup>11</sup>C]CO.

### 2.2.3. Utilisation du [<sup>11</sup>C]phosgène ([<sup>11</sup>C]COCl<sub>2</sub>).

Le [<sup>11</sup>C]phosgène joue curieusement un rôle modeste mais continu dans l'histoire de la radiochimie du carbone-11<sup>48</sup>. Dans les années 1970, le [<sup>11</sup>C]COCl<sub>2</sub> avait été proposé comme réactif complémentaire aux précurseurs secondaires existants, en particulier [<sup>11</sup>C]CH<sub>3</sub>I, et [<sup>11</sup>C]CH<sub>3</sub>OTf.

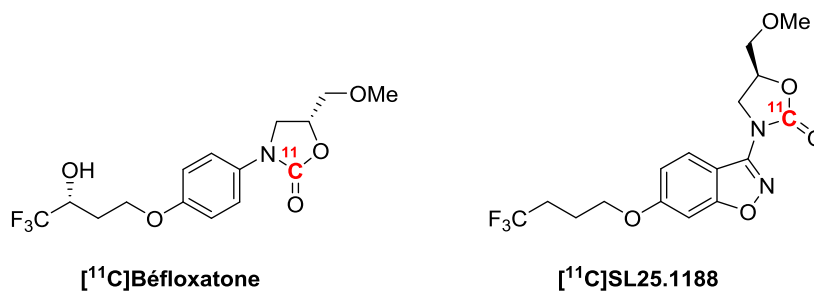
Alors que ces derniers permettaient principalement de faire des réactions méthylation, le  $[^{11}\text{C}]$ phosgène avait pour avantage de pouvoir introduire un carbonyle marqué entre deux hétéroatomes, et donnait donc accès à des radiotraceurs clés contenant notamment des motifs  $[^{11}\text{C}]$ imidazolone ou  $[^{11}\text{C}]$ oxazolidinones<sup>43</sup>. A ce moment, la préparation de  $[^{11}\text{C}]$ CO n'avait pas été développée, et les réactions pallado-catalysée nécessaires à son incorporation restaient peu (pas) connues.

### 2.2.3.a. Préparation du $[^{11}\text{C}]$ COCl<sub>2</sub>.

Le phosgène est généralement préparé à partir du  $[^{11}\text{C}]$ CH<sub>4</sub> et en deux étapes consécutives « en ligne ». La première étape consiste en une chloration du  $[^{11}\text{C}]$ CH<sub>4</sub> par utilisation de dichlore pour former le tétrachlorure de  $[^{11}\text{C}]$ carbone ( $[^{11}\text{C}]$ CCl<sub>4</sub>).  $[^{11}\text{C}]$ CCl<sub>4</sub> est ensuite transformé en  $[^{11}\text{C}]$ COCl<sub>2</sub> après passage dans un tube de quartz (vide) chauffé à 510 °C<sup>49</sup>.

### 2.2.3.b. Exemples d'utilisation.

Parmi les exemples de radiotraceurs marqués au carbone-11 par utilisation du  $[^{11}\text{C}]$ COCl<sub>2</sub>, on peut citer les deux inhibiteurs de monoamine oxydase (MAO)  $[^{11}\text{C}]$ Béfloxatone (MAO-A) et  $[^{11}\text{C}]$ SL25.1188 (MAO-B). Ces deux composés ont été marqués au niveau de leur cycle oxazolidinone, à partir des précurseurs amino-alcool correspondants<sup>50-52</sup> (**Schéma 24**). A noter que  $[^{11}\text{C}]$ SL25.1188 a aussi été marqué plus récemment par fixation du  $[^{11}\text{C}]$ CO<sub>2</sub><sup>53</sup>.



**Schéma 24** : Structures de la  $[^{11}\text{C}]$ Béfloxatone et du  $[^{11}\text{C}]$ SL25.1188, deux exemples choisis de molécules marquées via le  $[^{11}\text{C}]$ COCl<sub>2</sub>.

## 2.3. Réactions de $[^{11}\text{C}]$ cyanation – utilisation de H $[^{11}\text{C}]$ CN.

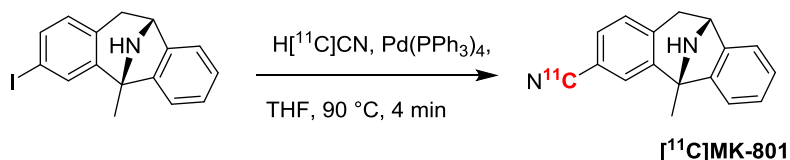
Moins utilisées que les deux précédentes, les réaction de  $[^{11}\text{C}]$ cyanation permettent, comme leur nom l'indique, d'introduire une fonction nitrile sur des structures généralement aromatiques, mais permettent également de former des  $[^{11}\text{C}]$ carbonyles après hydrolyse. Le réactif utilisé pour ces réactions est le  $[^{11}\text{C}]$ cyanure d'hydrogène (H $[^{11}\text{C}]$ CN).

### 2.3.1. Préparation de H $[^{11}\text{C}]$ CN.

H $[^{11}\text{C}]$ CN est généralement préparé à partir du  $[^{11}\text{C}]$ CH<sub>4</sub> par réaction avec de l'ammoniac sur un catalyseur au platine chauffé à 900 °C<sup>43</sup>.

### 2.3.2. Exemples d'utilisation.

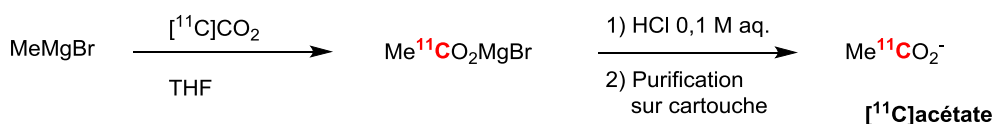
L'insertion d'une fonction nitrile sur un noyau aromatique en présence de palladium (0) a notamment été exemplifié par Andersson *et al.*<sup>54</sup> grâce au marquage du [<sup>11</sup>C]3-cyano-MK-801, un antagoniste des récepteurs NMDA (*N*-méthyle-D-aspartate) impliqués dans les dommages neuronaux (**Schéma 25**). Les auteurs ont obtenu ce radiotracer avec 38 % de rendement (non corrigé de la décroissance et calculé à partir de la quantité initiale de H[<sup>11</sup>C]CN) et une RAS moyenne de 407 GBq/μmol.



**Schéma 25** : Radiosynthèse du [<sup>11</sup>C]MK-801, un exemple choisi d'utilisation de H[<sup>11</sup>C]CN.

### 2.4. Réactions de [<sup>11</sup>C]carboxylation.

Les réactions de [<sup>11</sup>C]carboxylation restent rares en radiochimie du carbone-11, mais méritent d'être ici citées car elles sont associées à la préparation de l'acétate marqué au carbone-11 (CH<sub>3</sub>[<sup>11</sup>C]CO<sub>2</sub><sup>-</sup>), une molécule fréquemment employée en recherche clinique en cardiologie pour l'étude du métabolisme oxydatif dans le myocarde<sup>55</sup>. Ce radiotracer peut être préparé par « simple » piégeage du [<sup>11</sup>C]CO<sub>2</sub> dans une solution de bromure de méthylmagnésium (MeMgBr) dans le tétrahydrofurane à température ambiante. Après hydrolyse et purification sur cartouche, l'acétate est obtenu avec un rendement extrêmement reproductible de 40 % (non corrigé de la décroissance et calculé à partir de la quantité initiale de [<sup>11</sup>C]CO<sub>2</sub>). La RAS n'est en général pas mesurée pour ce radiotracer (**Schéma 26**)<sup>56</sup>.



**Schéma 26** : Radiosynthèse de l'acétate marqué au carbone-11, un exemple choisi de [<sup>11</sup>C]carboxylation.

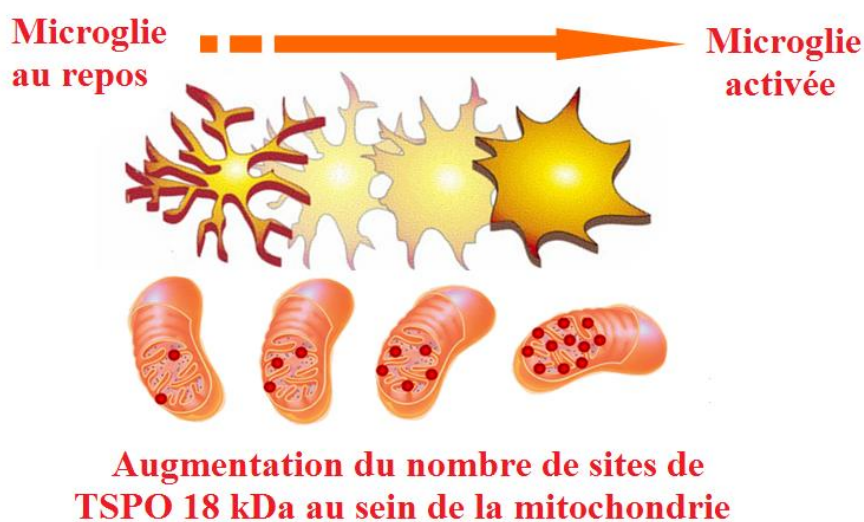


## Chapitre IV : La neuroinflammation et les cibles moléculaires retenues.

La neuroinflammation, ou inflammation des tissus nerveux, reflète un ensemble de phénomènes biologiques multiples et complexes au sein du système nerveux central (SNC). Elle est impliquée dans certaines maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson, Huntington, mais aussi la sclérose en plaques), soit en tant que conséquence, soit en tant que facteur causatif de la maladie.

La neuroinflammation se caractérise par l'implication du système immunitaire de l'hôte, et notamment l'activation au niveau du SNC de la microglie<sup>57</sup> (ou cellules microgliales, communément appelées les macrophages résidants du SNC), avec pour conséquence la prise en charge et l'élimination de substances toxiques et de débris cellulaires présents dans le cerveau ou le liquide céphalorachidien. Originellement neuroprotective, une activation prolongée ou chronique de la microglie s'avère délétère (neurotoxique), contribuant à la dégénérescence neuronale et au dysfonctionnement cérébral associé chez l'homme aux maladies neurodégénératives<sup>58</sup>.

L'activation des cellules microgliales s'accompagne d'une augmentation de l'expression de certaines protéines, en particulier de récepteurs, et notamment la protéine de translocation 18 kDa (TSPO), les récepteurs aux cannabinoïdes de type 2 (CB<sub>2</sub>R), et, comme démontré plus récemment, les récepteurs purinergiques de type P2Y<sub>12</sub> et P2Y<sub>14</sub> (**Figure 9**).



**Figure 9 :** Activation de la microglie, et surexpression de la TSPO.



# 1. La protéine de translocation 18 kDa (TSPO).

## 1.1. Structure et intérêt de la protéine.

La protéine de translocation 18 kDa (TSPO), anciennement connue sous le nom de récepteurs périphériques aux benzodiazépines (PBR pour « Peripheral Benzodiazepine Receptor »), est une protéine riche en tryptophanes et hautement lipophile constituée de 169 acides aminés répartis en cinq hélices  $\alpha$  transmembranaires<sup>59</sup>. Elle est localisée dans la membrane mitochondriale externe des cellules gliales où elle forme un complexe trimérique avec un canal anionique voltage dépendant (VDAC) de 32 kDa et un transporteur de nucléotide adénine (ANT) de 30 kDa<sup>60</sup> (**Figure 10**).



**Figure 10** : Structure de la mitochondrie et organisation spatiale du complexe trimérique.

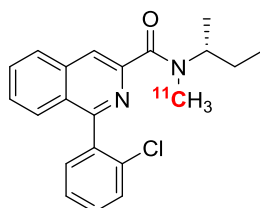
La TSPO joue un rôle primordial dans certains phénomènes de transport, et est notamment impliquée dans la translocation du cholestérol, du cytosol vers la membrane interne de la mitochondrie. Une fois oxydé par les cytochromes P450, le cholestérol est transformé en prégnénone, un intermédiaire clé de la synthèse stéroïdienne<sup>61</sup>. La TSPO est également impliquée dans d'autres processus biochimiques tels que la croissance et la différenciation des cellules ou l'apoptose.

Alors que sa concentration est faible dans le système nerveux central sain, elle augmente considérablement dans des conditions inflammatoires. Cette surexpression, qui est associée à l'activation des cellules microgliales, est particulièrement importante dans le cas des maladies neurodégénératives<sup>58</sup>. Ainsi, la TSPO est considérée aujourd'hui comme un biomarqueur de ces maladies inflammatoires<sup>57,62</sup>, et l'imagerie de cette protéine pourrait être un moyen d'évaluer l'efficacité des traitements et connaître l'évolution de la pathologie au cours du temps<sup>63,64</sup>. Pour y parvenir, il est nécessaire de disposer de radioligands hautement spécifiques et c'est pourquoi, au cours des deux dernières décennies, une grande variété de ligands de plus en plus performants a été développée.

## 1.2. Les radioligands de la TSPO.

Plusieurs classes de ligands de la TSPO ont été répertoriées à ce jour menant à une liste impressionnante de composés, avec parmi eux le ligand historique PK11195 appartenant à la famille

des isoquinoléines carboxamides. Ce composé est l'un des premiers ligands de la TSPO à avoir été développé, et ceci par les laboratoires Pharmuka (ex-Rhône-Poulenc, aujourd'hui Sanofi). Marqué au tritium, le PK11195 est aujourd'hui toujours le radioligand de référence pour les déterminations d'affinité et les études auto-radiographiques. Grâce à son marquage au carbone-11 en 1984 par Camsonne *et al.*<sup>65</sup> (**Figure 11**), il a depuis fait l'objet de nombreuses études par imagerie par TEP, aussi bien en pré-clinique, sur une grande variété de modèles animaux qu'en évaluation clinique. Cette molécule reste un radioligand TEP de référence, mais présente malgré tout certaines limitations, telles qu'un contraste des images peu élevé et une fixation non spécifique avec les protéines plasmatiques<sup>66</sup>.

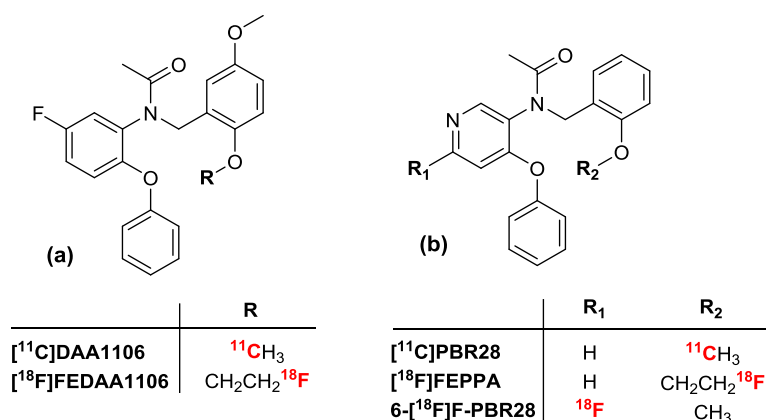


**Figure 11** : Structure de l'isoquinoléine carboxamide PK11195, ici marquée au carbone-11.

Il y a donc eu un besoin de traceurs plus performants qui s'est traduit par l'émergence de nouvelles classes de ligands. Une liste non-exhaustive inclue les phénoxyaryles acétamides – classe issue de l'ouverture du cycle benzodiazépine original – et les imidazo[1,2-*a*]pyridines acétamides et analogues structuraux (pyrazolo[1,2-*a*]pyrimidine et pyridazino[4,5-*b*]indole acétamides).

### 1.2.1. Les phénoxyaryles acétamides.

Les structures des principaux ligands de cette famille sont résumées dans la **Figure 12**.



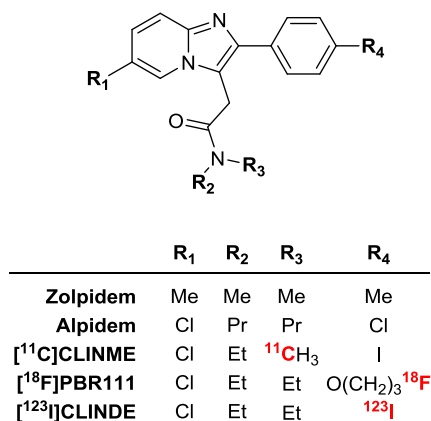
**Figure 12** : Structures et positions de marquage de quelques phénoxyaryles acétamides sélectionnés. (a) phénoxyphényl acétamides (à gauche), (b) phénoxy-pyridinyl acétamides (à droite).

Le premier représentant de la classe des phénoxyaryles acétamides à avoir vu le jour en 1999 est le [<sup>11</sup>C]DAA1106, présentant une affinité subnanomolaire pour la TSPO et une excellente spécificité. Ce radioligand a par ailleurs été utilisé lors d'études préclinique pour l'imagerie cérébrale *in vivo* chez la souris et sur un modèle d'inflammation chez le rat<sup>38,67</sup>. Très rapidement un analogue fluoré de ce ligand a été synthétisé : le [<sup>18</sup>F]FEDAA1106, pour permettre des protocoles d'imagerie plus long<sup>68-70</sup>. En 2008, Briard *et al.* ont développé et radiomarké un autre ligand légèrement différent de

cette famille, le [ $^{11}\text{C}$ ]PBR28, où un motif pyridine a été introduit à la structure, et a montré sa spécificité envers la TSPO chez le singe<sup>71</sup>. Un analogue fluoré (6- $^{18}\text{F}$ ]F-PBR28) a été développé et radiomarqué au fluor-18 au laboratoire en 2011<sup>72</sup>. Un autre analogue fluoré ( $^{18}\text{F}$ ]FEPPA), reprenant le motif pyridine en place dans PBR28, a également été développé en 2008, dans lequel la fonction méthoxy de ce dernier a été remplacée par un chaîne fluoroéthyle pour permettre l'incorporation du fluor-18 par substitution nucléophile aliphatique<sup>73</sup>. Ce dérivé est aujourd'hui un concurrent de [ $^{18}\text{F}$ ]DPA-714 (section 1.2.3) dans cette série.

### 1.2.2. Les imidazo[1,2-*a*]pyridine acétamides.

Les imidazo[1,2-*a*]pyridine acétamides sont une autre classe particulièrement intéressante de ligands de la TSPO puisque qu'elle inclut deux médicaments qui sont aujourd'hui sur le marché : le Zolpidem (Stilnox<sup>®</sup>) développé par Sanofi pour le traitement des insomnies et l'Alpidem (Ananxyl<sup>®</sup>) un anxiolytique synthétisé chez Synthélabo. Ce dernier, s'il présente une très forte affinité pour la TSPO, est aussi très affin des récepteurs centraux aux benzodiazépines (CBR), ce qui limite son intérêt pour l'imagerie de la neuroinflammation<sup>74,75</sup>. D'autres imidazo[1,2-*a*]pyridines acétamides ont alors été développés comme traceurs TEP tels que [ $^{11}\text{C}$ ]CLINME<sup>76,77</sup> et [ $^{18}\text{F}$ ]PBR111<sup>78,79</sup> mais également [ $^{123}\text{I}$ ]CLINDE pour l'imagerie TEMP (**Figure 13**).



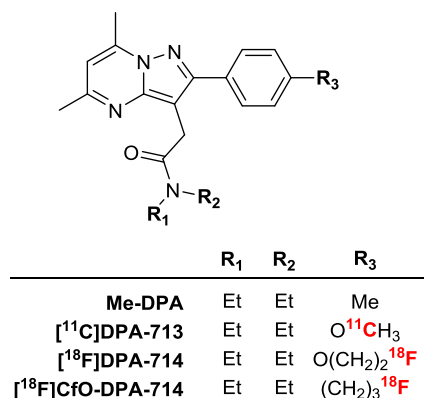
**Figure 13** : Structures et positions de marquage (quand pertinentes) de quelques imidazo[1,2-*a*]pyridines acétamides sélectionnés.

### 1.2.3. Les pyrazolo[1,2-*a*]pyrimidine acétamides.

Afin d'améliorer encore la sélectivité des ligands envers la protéine TSPO par rapport aux CBR, des études de relation structure-activité du noyau imidazo[1,2-*a*]pyridine ont été menées, et ont favorisées le développement d'une classe de molécules bioisostères : la famille des pyrazolo[1,2-*a*]pyrimidines. Et notamment, en 2001, des équipes au sein des universités de Firenze et de Pise en Italie ont publié un important travail sur le criblage d'une vingtaine de composés, conduisant notamment à Me-DPA (**Figure 14**). Il a été démontré que l'emplacement de la fonction acétamide ne pouvait pas être modifié sous peine d'une perte d'affinité envers la TSPO. Ils ont ensuite mis en évidence que l'introduction des deux méthyles en position 5 et 7 du cycle pyrazolo[1,2-*a*]pyrimidine augmentait grandement la spécificité et la sélectivité des ligands pour la TSPO<sup>80</sup>. Suite à ce travail,

deux composés particulièrement intéressants ont vu le jour, DPA-713 et DPA-714. Radiomarqués respectivement au carbone-11 pour DPA-713<sup>39</sup> et au fluor-18 pour DPA-714<sup>8</sup>, les deux dérivés ont montré de bonnes propriétés en imagerie TEP dans des modèles de neuroinflammation chez le rongeur<sup>81</sup>.

Les structures des principaux ligands de la famille des pyrazolo[1,2-*a*]pyrimidine acétamides sont présentées dans la **Figure 14**.



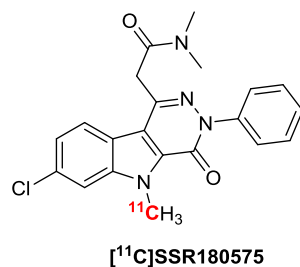
**Figure 14** : Structures et positions de marquage (quand pertinente) de quelques pyrazolo[1,2-*a*]pyrimidine acétamides.

[<sup>18</sup>F]DPA-714 est par ailleurs utilisé aujourd'hui dans plusieurs essais cliniques chez l'homme<sup>82,83</sup> et commence à sérieusement concurrencer le ligand de référence [<sup>11</sup>C]PK11195. Cependant, de récentes études de métabolisme menées au sein de notre laboratoire ont mis en évidence que [<sup>18</sup>F]DPA-714 était rapidement et fortement métabolisé. Un des sites de métabolisation est la chaîne fluoroéthoxy, rompue au niveau de l'oxygène, et conduisant à des radiométabolites de petits poids moléculaires, tels que le [<sup>18</sup>F]fluoroacétaldéhyde et le [<sup>18</sup>F]fluoroacétate.

Ces composés ne présentent pas d'affinité pour la TSPO, mais peuvent pénétrer dans le cerveau et de ce fait induire une diminution de la qualité des images TEP<sup>84</sup>. Pour surmonter cette limitation, une série de composés métaboliquement plus stables a été synthétisée dans lesquels l'atome d'oxygène reliant le groupement phényle à la chaîne fluorée a été remplacé par un ou plusieurs atome(s) de carbone. Parmi ces nouveaux dérivés, l'un d'eux a été sélectionné et radiomarqué au fluor-18 : [<sup>18</sup>F]CfO-DPA-714<sup>85</sup>.

#### 1.2.4. Les pyridazino[4,5-*b*]indole acétamides.

Une autre famille de composés ciblant la TSPO sont les pyridazino[4,5-*b*]indole acétamides, avec notamment le SSR180575 développé par les laboratoires Sanofi<sup>86</sup> (**Figure 15**). Ce ligand, qui a été marqué au carbone-11<sup>87</sup> sur le méthyle de l'indole, possède une forte affinité pour la TSPO aussi bien chez le rat que chez l'homme et présente des effets neuroprotecteurs<sup>88</sup>. Une série de dérivés fluorés de ce composé a par ailleurs été synthétisée au sein de notre laboratoire dans lesquels des chaînes fluorées de différentes longueurs, saturées ou non ont été introduites au niveau de l'azote de l'indole et en position 4 du cycle phényle<sup>89</sup>. D'autres analogues de ce dérivé sont également étudiés et devraient faire l'objet d'un deuxième dépôt de brevet avec Sanofi.



**Figure 15** : Structure du SSR180575, marqué ici au carbone-11.

### 1.3. Séries de dérivés choisies dans le cadre de mon travail de thèse.

Le laboratoire travaille depuis plusieurs années simultanément sur le développement de ligands appartenant aux familles pyrazolo[1,2-*a*]pyrimidines et pyridazino[4,5-*b*]indoles. Il a donc été choisi de continuer le travail de dérivatisation et d'optimisation de ces deux familles afin de préparer des composés fluorés à la fois plus affins de la TSPO et si possible plus stables vis-à-vis du métabolisme que les analogues déjà existants.

## 2. Les récepteurs cannabinoïdes de type 2 (CB<sub>2</sub>R).

### 2.1. Cible biologique et intérêt en imagerie médicale.

Le système endocannabinoïde est représenté par un groupe de lipides neuromodulateurs dont les récepteurs sont impliqués dans diverses propriétés physiologiques et pathologiques. Deux types de récepteurs couplés aux protéines G ont été découverts et nommés récepteurs cannabinoïdes centraux (CB<sub>1</sub>R) et récepteurs cannabinoïdes périphériques (CB<sub>2</sub>R)<sup>90</sup>. Les CB<sub>1</sub>R majoritairement exprimés dans le système nerveux central, aussi bien dans les cellules nerveuses que dans les cellules gliales. On trouve également les CB<sub>1</sub>R dans les organes périphériques tels que le système immunitaire, les intestins, la vessie et les cellules endothéliales mais toutefois en quantité beaucoup plus faible que dans le cerveau. Ces récepteurs sont associés à la sensation de douleur, à la cognition, aux réponses émotionnelles et au comportement. Les CB<sub>2</sub>R en revanche sont exprimés essentiellement dans le système immunitaire et notamment dans la rate, la moelle osseuse et le réseau lymphatique.

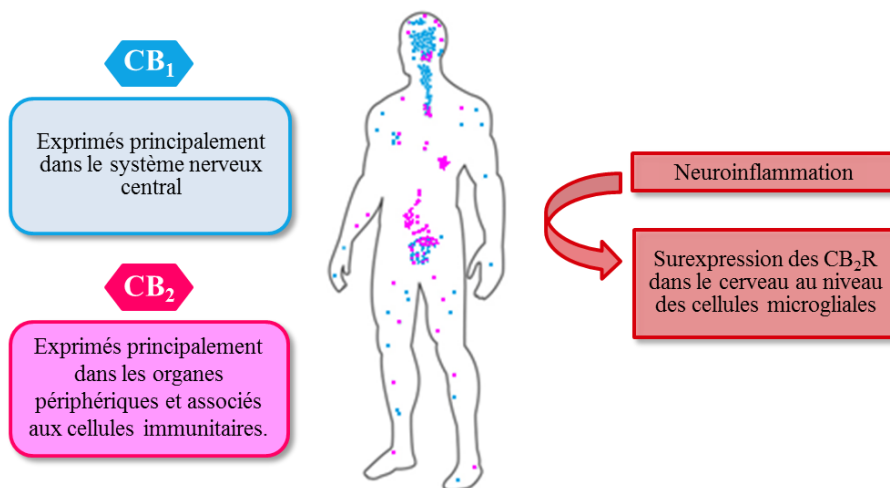
Cependant, il a été reporté plus récemment que ces récepteurs étaient également localisés dans le système nerveux central. Ils y joueraient un rôle significatif dans la protection des cellules microgliales du cerveau en cas de neurotoxicité associée à une surexpression de la microglie activée, en relarguant des cytokines anti ou pro-inflammatoires (**Figure 16**)<sup>91,92</sup>.

Les ligands cannabinoïdes peuvent être classés en trois familles :

- Les ligands endogènes : composés de structure lipidique, qui ont une demi-vie très courte et qui sont catabolisés par l'enzyme FAAH (Fatty Acid AminoHydrolase). Ces ligands, dont les deux principaux qui ont été caractérisés sont l'anandamine (AEA) et le 2-arachidonoylglycérol (2-AG), sont produits massivement à la suite d'une augmentation de

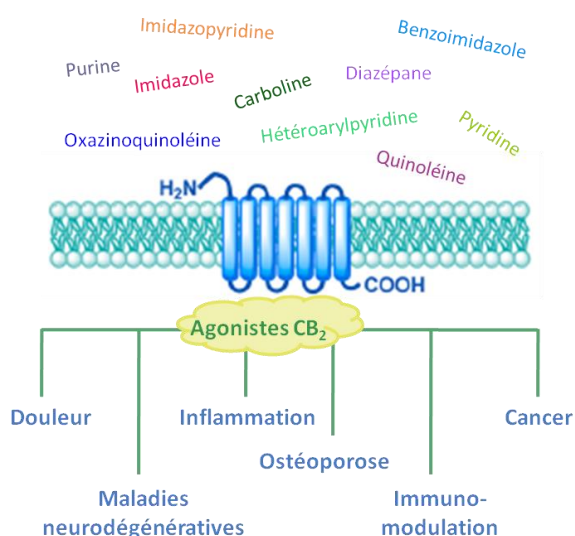
calcium intracellulaire dans différents tissus, en particulier dans le système nerveux central, où ils vont moduler la libération de neurotransmetteurs.

- Les ligands exogènes naturels : il s'agit de tous les composés produits par la plante *Cannabis sativa*. On en compte plus d'une soixantaine dont le plus abondant et le plus actif est le  $\Delta^9$ -transstétrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC).
- Les ligands synthétiques qui peuvent être des agonistes inverses ou des antagonistes.



**Figure 16 :** Répartition des récepteurs CB<sub>1</sub> et CB<sub>2</sub> dans l'organisme humain.

Au cours des dernières décennies, la recherche liée au développement de nouveaux antagonistes des CB<sub>2</sub>R s'est accrue et de nombreux ligands de différentes familles chimiques ont été synthétisés et testés. En effet, les laboratoires pharmaceutiques ont ciblés des molécules de haute affinité et de haute sélectivité envers les récepteurs CB<sub>2</sub> par rapport aux récepteurs CB<sub>1</sub> dans le but d'un potentiel traitement de pathologies telles que les maladies neurodégénératives, la perception de la douleur, l'inflammation sévère, le cancer et l'ostéoporose<sup>93,94</sup> (**Figure 17**).



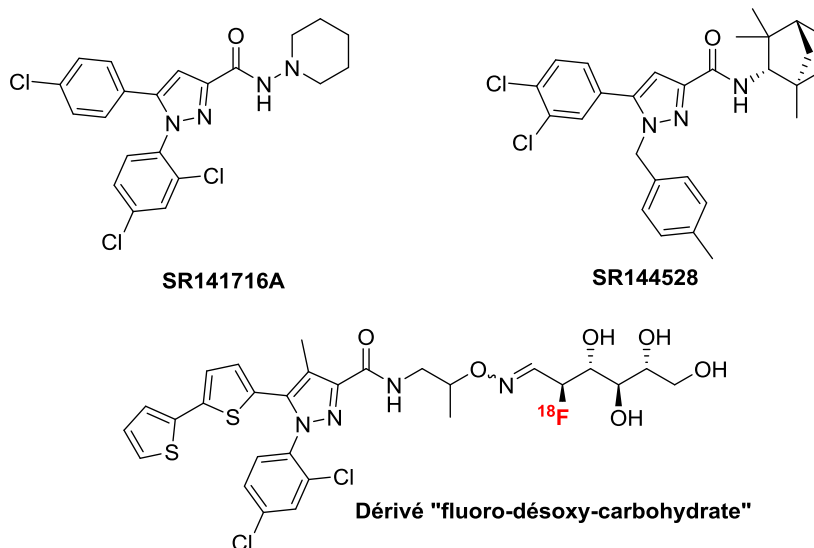
**Figure 17 :** Rôle des récepteurs CB<sub>2</sub><sup>90</sup>.

## 2.2. Les radioligands des CB<sub>2</sub>R.

Au cours des dernières années, un nombre important de radioligands des CB<sub>2</sub>R dédiés à l'imagerie TEP *in vivo*, a été synthétisé et caractérisé, incluant différentes familles chimiques : des pyrazoles et pyrazolines, des sulfones, des pyridines, des indoles et des oxoquinoléines<sup>95</sup>.

### 2.2.1. Les pyrazoles.

Beaucoup de radiotraceurs TEP ciblant les CB<sub>2</sub>R sont basés sur la structure du 1,5-diaryl-3-carboxypyrazole du SR141716A, un antagoniste inverse des récepteurs CB<sub>1</sub>, plus connu sous le nom de Rimonabant<sup>®</sup>, médicament développé en 1994 par Sanofi dans le cadre de la lutte contre l'obésité<sup>96</sup>. Quelques années plus tard, Rinaldi *et al.*<sup>97</sup> synthétisent le premier ligand antagoniste hautement sélectif et affiné des CB<sub>2</sub>R : SR144528, basé sur la structure de son prédécesseur SR141716A. Cette famille de composés possède cependant une lipophilie élevée qui limite son utilisation en TEP. C'est pourquoi en 2013, le groupe de Zanda développe un ligand conjugué à un groupement prosthétique hydrophile et opportuniste (le [<sup>18</sup>F]FDG) et permettant d'une part d'abaisser la lipophilie et d'autre part un marquage au fluor-18<sup>98</sup> (**Figure 18**).

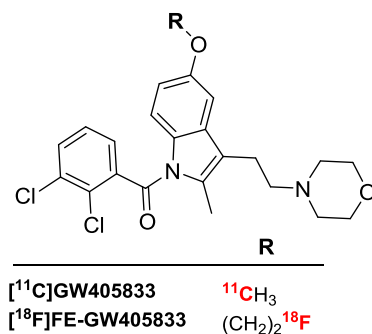


**Figure 18** : Structures des ligands CB<sub>2</sub>R de la famille des pyrazoles.

### 2.2.2. Les indoles.

Parmi la famille des indoles, un ligand est bien connu : le GW405833, développé par le groupe de Labelle en 1996<sup>99</sup>. Ce dérivé, présentant une forte affinité pour les CB<sub>2</sub>R ainsi qu'une très bonne sélectivité, a été radiomarqué en 2007 au carbone-11 par Evens *et al.*<sup>100</sup>. Rapidement un dérivé fluoré a été synthétisé puis radiomarqué au fluor-18 ([<sup>18</sup>F]FE- GW405833) par le même groupe<sup>101</sup> (**Figure 19**). Les expériences *ex vivo* et *in vivo* menées par autoradiographies et par imagerie  $\mu$ TEP ont pu démontrer un plus fort contraste dans les régions du cerveau lésées que dans les zones contrôles<sup>102</sup>.

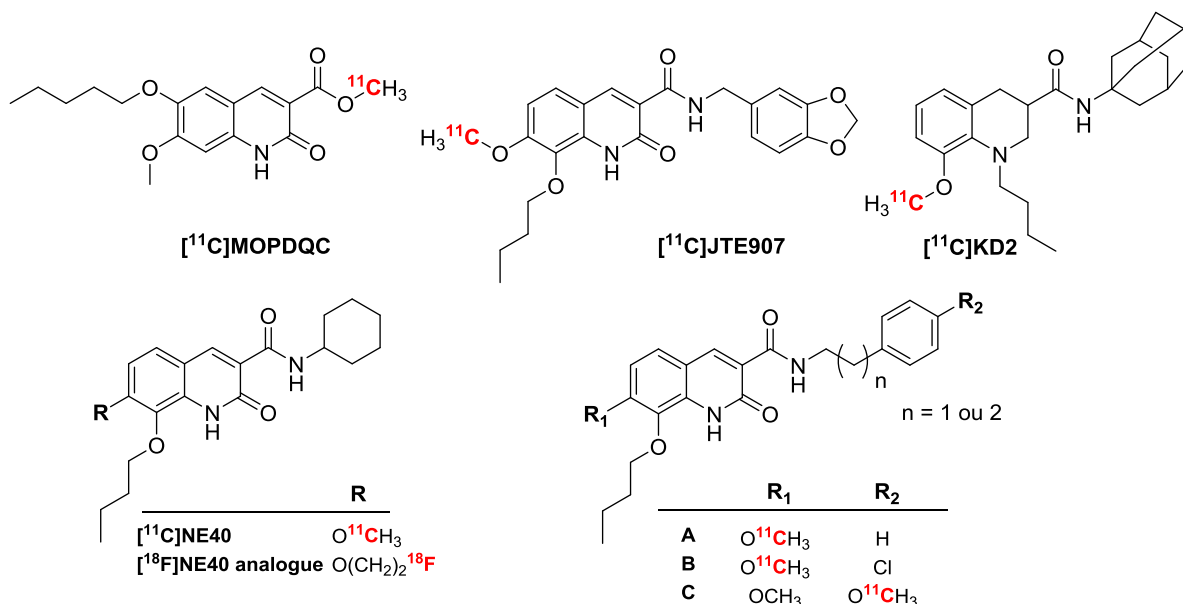




**Figure 19** : Structure du GW405833 marqué au carbone-11 et de son dérivé marqué au fluor-18 (indoles).

### 2.2.3. Les oxoquinoléines.

La famille des oxoquinoléines a été largement étudiée en tant que ligands des  $\text{CB}_2\text{R}$ . Les premières 2-oxoquinoléines ont été introduites en 2000 par les laboratoires Japan Tobacco avec plusieurs structures présentant un fort potentiel pour cette cible. Un premier traceur a été sélectionné : l'ester de méthyle de l'acide 7-méthoxy-2-oxo-6-pentyloxy-1,2-dihydroquinoléine-3-carboxylique (**Figure 20**, MOPDQC)<sup>103</sup>.



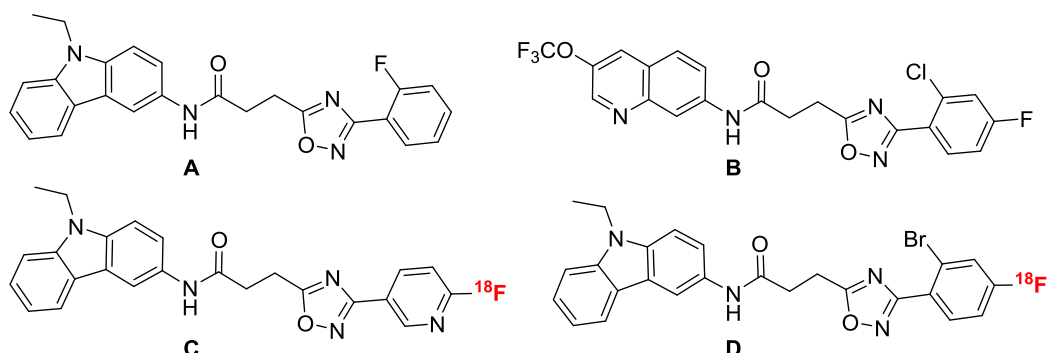
**Figure 20** : Structures des ligands  $\text{CB}_2\text{R}$  de la famille des oxoquinoléines.

Le radiomarquage peut s'effectuer aisément à partir du « précurseur » acide carboxylique correspondant en présence de triflate de  $[^{11}\text{C}]\text{méthyle}$ . Cependant ce composé est métabolisé rapidement *in vivo* et aucune rétention n'a été observée dans la rate, laissant présager que ce radiotracer n'est pas adapté pour l'imagerie TEP des  $\text{CB}_2\text{R}$ . Un autre ligand a été développé et marqué au carbone-11 par le même laboratoire l'année suivante : le  $[^{11}\text{C}]\text{JTE907}$  (**Figure 20**). Basés sur la structure de ce dernier, d'autres ligands ont vu le jour tels que le  $[^{11}\text{C}]\text{NE40}$ <sup>104</sup> et son analogue fluoré<sup>105</sup> ainsi que des dérivés présentant un noyau aromatique substitué par une ou deux fonctions méthoxy (dérivés A, B et C de la **Figure 20**) développés en 2010 par Gao *et al.*<sup>106</sup>. Plus récemment, en 2013, un autre ligand appartenant à cette famille a également été synthétisé et radiomarqué au carbone-11, comportant quant à lui un motif 4-oxoquinoléine : le  $[^{11}\text{C}]\text{KD2}$ , démontrant des caractéristiques en imagerie prometteuses<sup>107</sup>.



### 2.2.4. Les oxadiazoles.

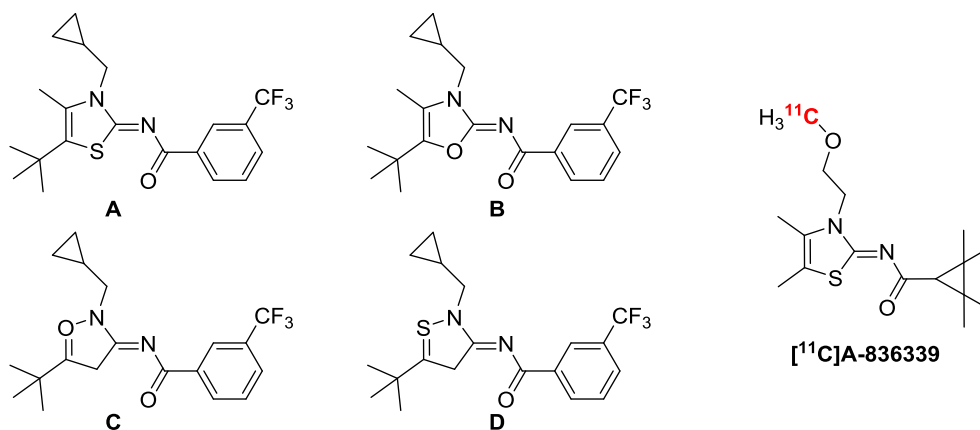
Les dérivés constitués d'un cycle oxadiazole constituent une autre classe d'agonistes puissants et sélectifs des CB<sub>2</sub>R qui a pu être identifiée suite à des screening de composés<sup>108</sup>. Les relations structures-activité ont démontrées que dans ce groupe de composés, le corps oxadiazole était primordial et que les substituants en position 2 et 4 sur le cycle phényle porté par l'oxadiazole, jouaient un rôle important sur l'activité de ces dérivés. Parmi la série de composés développée par le groupe d'Hitchcock, les composés A et B de la **Figure 21** présentent à la fois une bonne affinité et une bonne sélectivité pour les CB<sub>2</sub>R<sup>108</sup>. Enfin, en 2012, Rühl *et al.*<sup>109</sup>, après une étude structure-activité basée sur les dérivés précédents, a radiomarqué au fluor-18 les composés C et D de la **Figure 21**.



**Figure 21** : Structures des ligands CB<sub>2</sub>R de la famille des oxadiazoles.

### 2.2.5. Les ylidènes.

En 2007, Taisho Pharmaceuticals divulgue une autre série d'agonistes des CB<sub>2</sub>R avec un corps constitué d'un hétérocycle à cinq chaînons<sup>110</sup>. La synthèse et l'étude des relations structure-activité des dérivés thiazoles montrent que l'introduction de groupes fonctionnels sur les positions 3 et 5 du cycle thiazole influence nettement l'affinité et la sélectivité pour les CB<sub>2</sub>R<sup>110</sup>. Les thiazolylidènes présentent de bonnes affinités et de bonnes sélectivités (**Figure 22**, composé A). Souhaitant améliorer l'affinité des composés pour les CB<sub>2</sub>R, les auteurs ont modifié l'hétérocycle et ont ainsi préparé des oxazolylidènes (composés B), des isoxazolylidènes (composés C), et des isothiazolylidènes (composés D).



**Figure 22** : Structures des dérivés ylidènes hétérocycliques.

Sur la base de la structure des thiazolylidènes, les laboratoires Abbott ont également développé un ligand très affiné et sélectif des récepteurs CB<sub>2</sub> par rapport aux CB<sub>1</sub>: le A-836339 dont la structure est présentée dans la **Figure 22**<sup>111</sup>. Ce ligand a par ailleurs été radiomarqué au carbone-11 par l'équipe d'Horti en 2010<sup>112</sup>.

On notera par ailleurs que lors de la plupart des études de biodistribution et d'évaluation *in vivo* de ces nouveaux traceurs pour les CB<sub>2</sub>R ont utilisés la rate comme organe contrôle, étant donné que ces récepteurs sont naturellement présents dans cet organe périphérique.

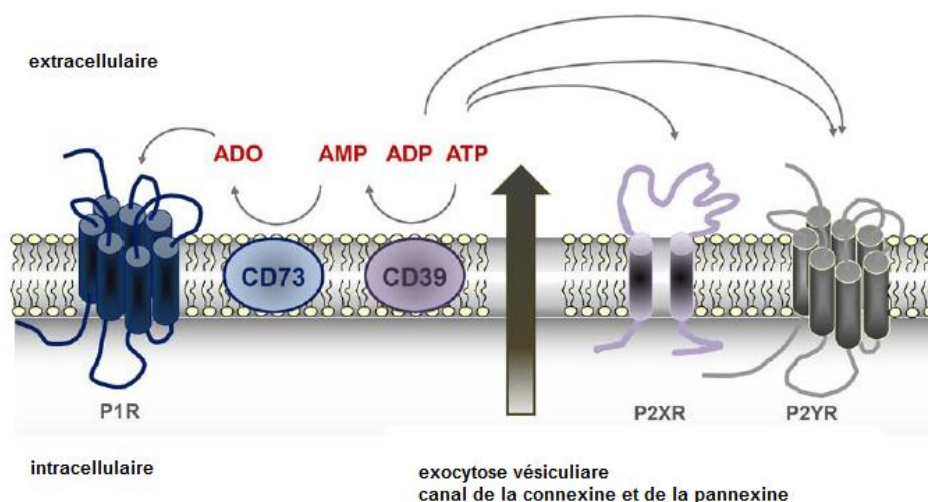
### 2.3. Série de dérivés choisie dans le cadre de mon travail de thèse.

Au démarrage du projet de thèse en 2013, aucun dérivé de la famille des ylidènes n'avait été radiomarqué au fluor-18. Il a donc été envisagé de préparer une nouvelle série de ligands marquables au fluor-18 sur la base de [<sup>11</sup>C]A-836339, composé présentant des propriétés en imagerie intéressantes.

## 3. Les récepteurs purinergiques de type P2Y<sub>12</sub> (P2Y<sub>12</sub>R).

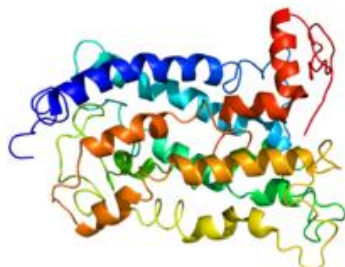
### 3.1. La cible biologique.

Les récepteurs purinergiques de type P2Y sont des protéines transmembranaires appartenant à la famille des récepteurs couplés aux protéines G. Ces récepteurs sont divisés en deux groupes, les récepteurs à l'adénosine (groupe P1) d'une part, et les récepteurs aux nucléotides (groupe P2) d'autre part. Ce second groupe étant lui-même subdivisé en deux sous-familles, les récepteurs métabotropiques P2Y et ionotropiques P2X<sup>113</sup> (**Figure 23**).



**Figure 23** : Vue schématique des récepteurs P1Y, P2Y et P2X.

Parmi les récepteurs P2Y, le sous-type P2Y<sub>12</sub> est une protéine constituée de 342 acides aminés répartis en sept hélices transmembranaires (**Figure 24**). Ces récepteurs sont l'un des principaux acteurs de l'agrégation plaquettaire pouvant conduire à la thrombose et sont donc une cible moléculaire attractive pour le développement d'agents anti-thrombotiques<sup>114,115</sup>. Le clopidogrel (Plavix®), par exemple, est un médicament anti agrégeant plaquettaire agissant directement sur ces récepteurs.



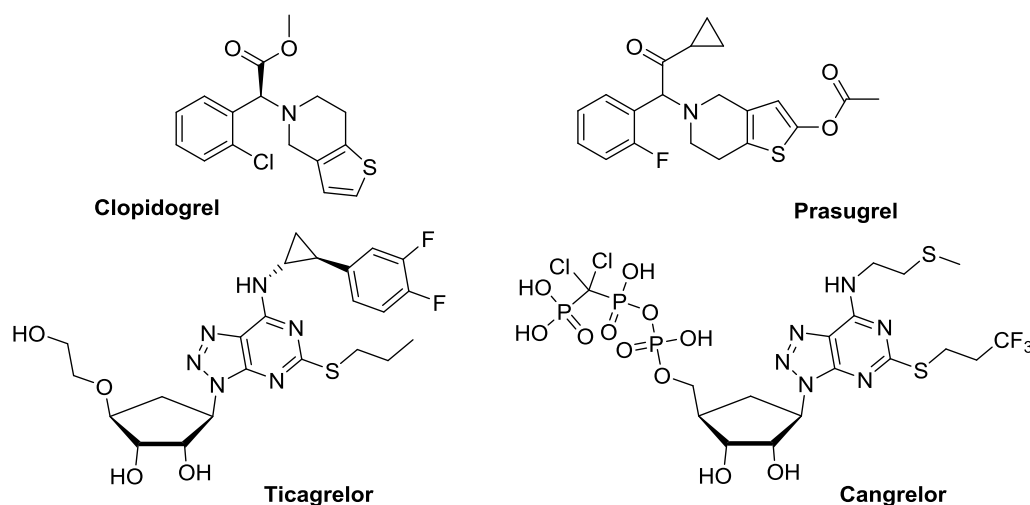
**Figure 24** : Structure tridimensionnelle des récepteurs P2Y<sub>12</sub>.

Au-delà de leur rôle dans l'agrégation plaquettaire, les récepteurs P2Y comme P2X, et leurs ligands, ont récemment été identifiés comme d'importants modulateurs de phénomènes inflammatoires et immunitaires<sup>113</sup>. Il a été mis en évidence tout récemment que les récepteurs purinergiques et principalement le sous-type P2Y<sub>12</sub> étaient ainsi exprimés dans les microglies du système nerveux central<sup>116,117</sup>. Ce récepteur apparaît donc dès lors comme une cible potentielle en imagerie et thérapie pour les processus physiopathologiques inflammatoires et immunitaires siégeant au niveau du tissu cérébral.

## 3.2. Les ligands des P2Y<sub>12</sub>R.

### 3.2.1. Les molécules et médicaments disponibles sur le marché.

Un certain nombre de médicaments antagonistes des récepteurs P2Y<sub>12</sub> sont déjà commercialisés comme agents antiplaquettaires pour le traitement des thromboses tels que le Clopidogrel (Plavix®, Sanofi), le Prasugrel (Efient®, Eli Lilly) de la famille des thiénopyridines, le Ticagrelor (Brilinta®, AstraZeneca) et la prodrogue Cangrelor (Kengreal®, The Medicines Company), deux ligands de la famille des triazolopyrimidines (**Figure 25**).

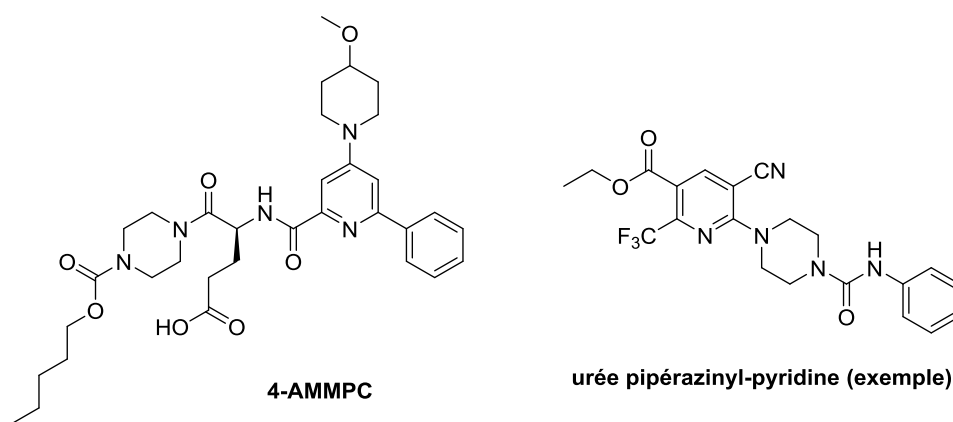


**Figure 25** : Structure du Clopidogrel, du Prasugrel, du Ticagrelor et du Cangrelor.

Sur la base des structures de ces ligands, d'autres séries ont été développées par différents groupes. Le succès du Clopidogrel a par exemple incité l'équipe de TenBrink<sup>118</sup> à synthétiser en 2009 de nouveaux inhibiteurs des P2Y<sub>12</sub> de corps thienopyrimidines. Pour comparaison avec le Ticagrelor, Tu *et al.*<sup>119</sup> ont synthétisé et évalué biologiquement une nouvelle série de cyclopentyl-triazolopyrimidines antagonistes des P2Y<sub>12</sub>. A ce jour, aucune de ces structures n'a été marquée par le carbone-11 ou le fluor-18.

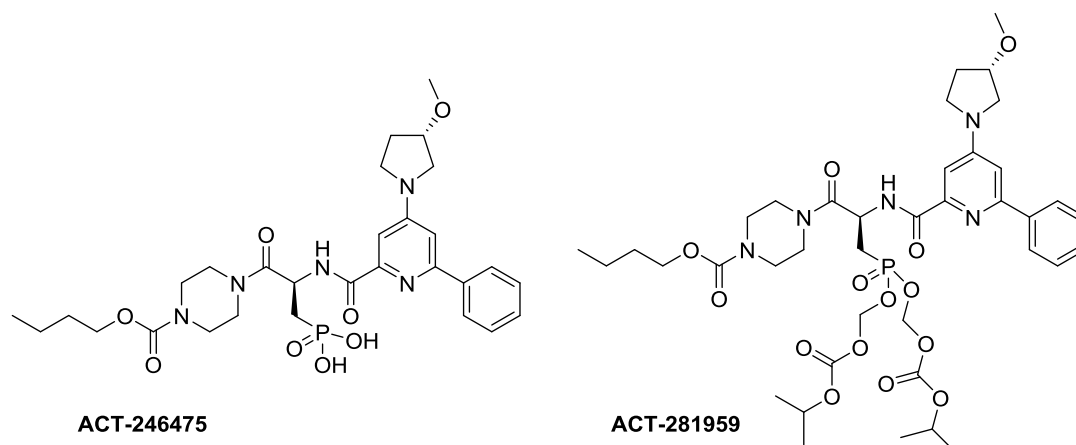
### 3.2.2. Les pipérazines.

Les groupes de Ennis<sup>120</sup> et de Zetterberg<sup>121</sup> ont développés de nouvelles séries de composés de la famille des pipérazines. L'étude des relations structure-activité a mené chaque groupe à la sélection d'un composé pour l'évaluation clinique. En faisant varier notamment la position 4 de la pyridine, le groupe de Ennis est parvenu à obtenir un composé hautement sélectif des P2Y<sub>12</sub> avec une affinité de 15 nM (**Figure 26**, composé de gauche, 4-AMMPC). Ce composé présente également de bonnes propriétés pharmacocinétique permettant une délivrance orale et à ce stade, aucune toxicité particulière n'a été détectée chez le rat et chez le chien, faisant de ce composé un bon candidat pour l'évaluation clinique chez l'homme. En 2011, Bach *et al.*<sup>121</sup> ont identifié une nouvelle série d'urées pipérazinyl-pyridines dont plusieurs dérivés montrent des affinités sub-nanomolaires pour les récepteurs P2Y<sub>12</sub>. Leur étude a mis en évidence que le 3-éthoxycarbonyl sur le cycle pyridine et le motif urée comme « linker » entre la pipérazine et le cycle aromatique contribuent significativement à l'efficacité des ligands (**Figure 26**, composé de droite).



**Figure 26 :** Structure des ligands de corps pipérazine.

Récemment, en 2015, l'équipe de Riederer du laboratoire Actelion Pharmaceuticals<sup>122</sup> a développé un nouvel antagoniste basé sur la structure du ligand de Parlow *et al.*<sup>120</sup>. L'optimisation du motif 2-phénylpyrimidine-4-carboxamide, l'introduction d'un substituant (S)-3-méthoxy pyrrolidine en position 6 du cycle pyrimidine et le remplacement de la fonction acide carboxylique par un bio-isostère (groupement acide phosphonique) a abouti à l'obtention d'un composé très affiné et sélectif des récepteurs P2Y<sub>12</sub> (ACT-246475) ainsi que de sa prodrogue (ACT-281959)<sup>122,123</sup> (**Figure 27**). Aucun dérivé n'a été radiomarqué au carbone-11 ou au fluor-18 dans cette série à ce jour.

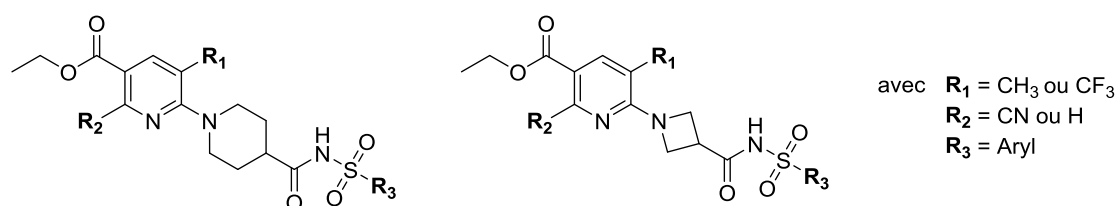


**Figure 27** : Structure du ligand ACT-246475 et de sa prodrogue, ACT-281959.

La série la plus récente, développée par l'équipe de Rieder ne retiendra pas notre attention pour un futur radiomarquage, car les composés possèdent un motif phosphonate très hydrophile et ne sont donc à priori pas adaptés pour passer la BHE (critère essentiel pour le développement de ligands dédiés à la neuroinflammation). En effet, les molécules ont toutes été optimisées pour une cible circulante et doivent donc justement éviter ce passage de la BHE.

### 3.2.3. Les pipéridines et azétidines.

Le groupe de Zetterberg s'est beaucoup investi dans le développement d'antagonistes pour les récepteurs P2Y<sub>12</sub>, et a notamment optimisé la série pipérazine évoquée dans le paragraphe précédent, en remplaçant d'une part le motif urée par des sulfonyles, et d'autre part le motif pipérazine par une azétidine ou une pipéridine<sup>124</sup> (**Figure 28**). Le motif sulfonyle a été introduit pour pallier aux problèmes de faible solubilité et de faible stabilité métabolique, rencontrés avec les urées



**Figure 28** : Structures des ligands sulfonyles : pipérazines (gauche) et azétidines (droite).

L'équipe de Zetterberg s'est ensuite intéressée à remplacer le « linker » sulfonyle par une sulfonamide d'acyle afin d'améliorer encore les propriétés pharmacocinétiques de ces dérivés<sup>125</sup>. Le travail a été effectué à la fois sur la série de composés comportant un corps pipéridine et azétidine. Un ligand de chaque série a été retenu pour une évaluation de son effet anti-thrombotique et les risques possibles d'hémorragies qui en découlent (**Figure 29**). Si les deux composés présentent des effets anti-thrombotiques intéressants, c'est le composé pipéridine qui a été retenu comme candidat pour des essais cliniques chez l'homme et qui a de ce fait été synthétisé en grande quantité<sup>126</sup>.

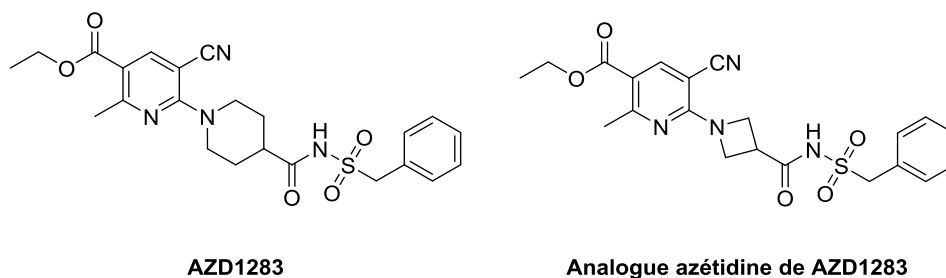


Figure 29 : Structure des sulfonamides d'acyle.

### 3.3. Série de dérivés choisie dans le cadre de mon travail de thèse.

Si pour les deux cibles présentées précédemment (la TSPO et les CB<sub>2</sub>R), un nombre important de radioligands marqués au carbone-11 ou au fluor-18 existaient, aucun ligand des P2Y<sub>12</sub>R n'avait été radiomarqué au démarrage de la thèse.

Le choix d'un candidat pour pouvoir faire de l'imagerie TEP s'est donc effectué à partir des études structure-activité récentes et disponibles dans la littérature et en concertation (travail partagé) avec le « work package 3 - chimie » INMiND dans lequel mon projet de thèse s'inscrit. Un ligand présentant une haute affinité et une bonne sélectivité pour les récepteurs P2Y<sub>12</sub> était nécessaire. De plus, il était envisagé de pouvoir, dans un premier temps, réaliser un marquage isotopique au carbone-11 ou au fluor-18 d'une molécule de la littérature dont on connaissait son affinité pour la cible visée, avant d'entreprendre la synthèse de dérivés nouveaux et leur caractérisation *in vitro*.

Les études bibliographiques nous ont menées aux dérivés sulfonamides d'acyle éthyle 6-aminonicotinate développés par Bach *et al.*<sup>125</sup>, d'une part parce qu'un dérivé de cette série était marquable isotopiquement au carbone-11, et d'autre part parce que des dérivés fluorés étaient facilement envisageables. De plus, le composé AZD1283 ayant été synthétisé à grande échelle, les motifs éthyle 6-aminonicotinate et sulfonamine étaient donc accessibles en peu d'étapes et avec des rendements raisonnables.

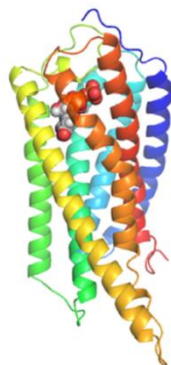
## 4. Les récepteurs purinergiques de type P2Y<sub>14</sub> (P2Y<sub>14</sub>R).

### 4.1. La cible biologique.

Les récepteurs purinergiques de type P2Y<sub>14</sub> sont un sous-type des récepteurs purinergiques P2Y décrits au paragraphe précédent. Ils appartiennent également à la famille des récepteurs couplés aux protéines G. Ces récepteurs sont activés par des nucléotides uraciles uridines diphosphate (UDP) et l'UDP-glucose (qui est un précurseur du glycogène intervenant dans la glycogénèse)<sup>127</sup>. Les récepteurs P2Y<sub>14</sub> sont spécifiquement impliqués dans la dégranulation des mastocytes (cellules présentes dans les tissus conjonctif, la moelle osseuse, la rate et les ganglions lymphatiques), ce qui suggère qu'ils pourraient être une cible thérapeutique potentielle pour l'asthme<sup>128</sup>. Les P2Y<sub>14</sub>R sont aussi impliqués dans la régulation des fonctions neuro-immunes, et sont présents dans les cellules

immunitaires telles que les leukocytes, les monocytes et les macrophages, suggérant qu'ils jouent un rôle dans les phénomènes inflammatoires<sup>129,130</sup>.

La structure cristallographique de la protéine P2Y<sub>14</sub> n'a pas encore été résolue par cristallographie des rayons-X, mais une équipe l'a récemment modélisée à partir de la structure cristalline de P2Y<sub>12</sub> (**Figure 30**)<sup>127</sup>, ce qui permet de pouvoir mieux cibler les ligands adéquats pour cette cible biologique.



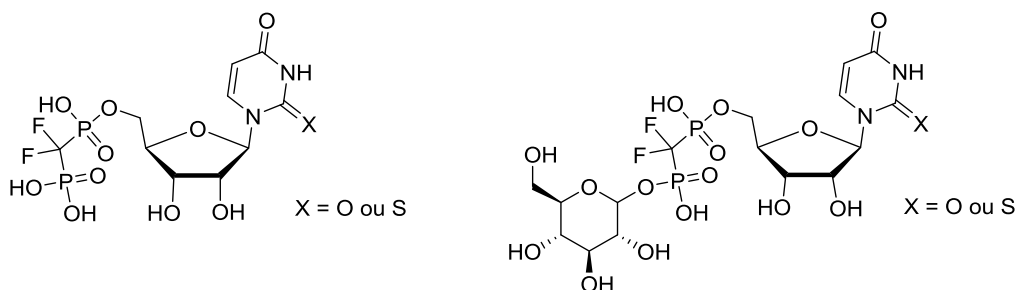
**Figure 30** : Structure modélisée des récepteurs P2Y<sub>14</sub>.

## 4.2. Les ligands des P2Y<sub>14</sub>R.

Il existe un nombre beaucoup plus restreint d'antagonistes sélectifs et stables qui ont été développés pour les récepteurs P2Y<sub>14</sub>, faisant de ces récepteurs une cible pharmacologique difficile à étudier. On peut cependant classer les antagonistes existants en trois grandes classes : les analogues de nucléotides, les acides naphthoïques et les pyrimidines.

### 4.2.1. Les dérivés de nucléotides.

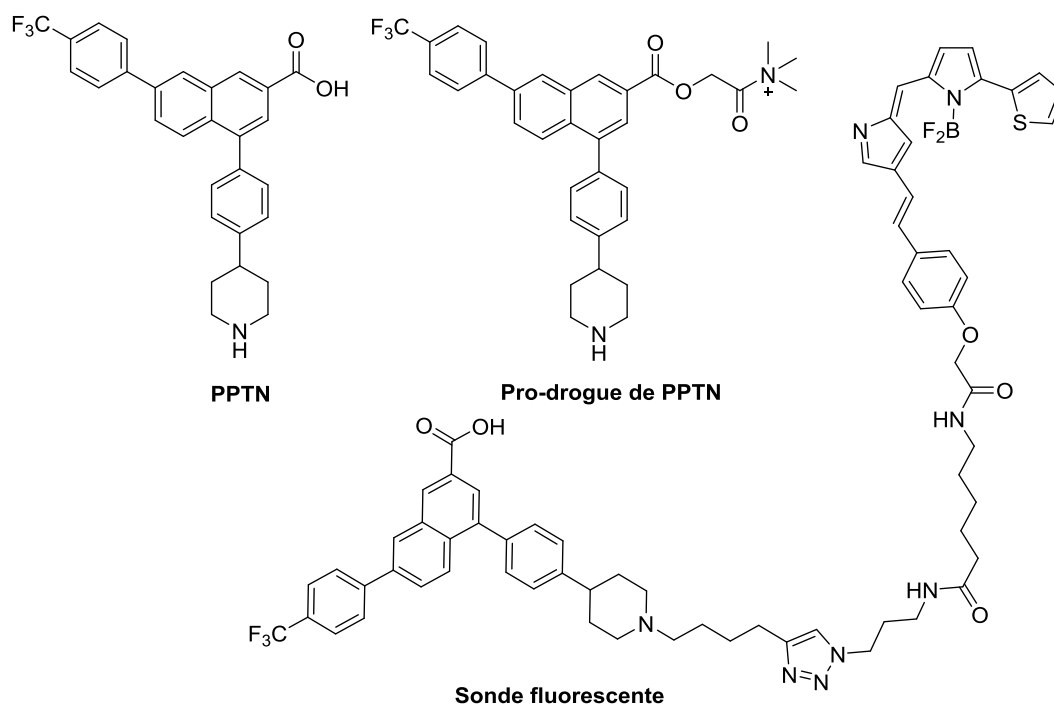
La première classe de ligands de P2Y<sub>14</sub> a été développée par l'équipe de Jacobson en 2007<sup>131</sup>. Ces ligands sont des dérivés de l'UDP-glucose dans lesquelles le cycle ribose a été modifié notamment par un remplacement des groupements hydroxyles par différents groupes fonctionnels. L'étude a permis de mettre en évidence que l'analogue 2-thio-UDP-glucose avait une efficacité comparable à l'UDP-glucose, ligand naturel des P2Y<sub>14</sub> (**Figure 31**). Le glucose peut également être remplacé par d'autre sucre comme le ribose ou le fructose sans perte significative de l'affinité<sup>132</sup>.



**Figure 31** : Structure des agonistes dérivés de l'UDP-glucose.

### 4.2.2. Les dérivés d'acides naphtoïques.

Une seconde classe de ligands est représentée par la famille des acides naphtoïques avec comme principal ligand hautement affiné et sélectif des P2Y<sub>14</sub>, l'acide 4-(4-(pipéridin-4-yl)-phényl)-7-(4-(trifluorométhyl)-phényl)-2-naphtoïque (PPTN) (**Figure 32**) et sa prodrogue développée par Barrett *et al.*<sup>133</sup> en 2013. La même équipe a exploré plus en détails cette famille de ligands et a développé une sonde fluorescente<sup>134</sup>, basée sur la structure du PPTN et sur l'étude récente de la structure du complexe récepteur P2Y<sub>12</sub> humain / antagoniste déterminée par haute résolution cristallographique 3D<sup>135</sup>.

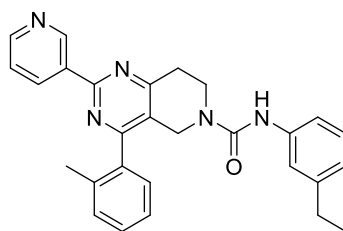


**Figure 32** : Structures des principaux ligands dérivés de l'acide naphtoïque.

### 4.2.3. Les pyrimidines.

Enfin, la troisième famille de ligands est basée sur un motif pyrimidine qui a été développée par Guay *et al.* dès 2008<sup>136,137</sup>. Ces auteurs ont exploré les relations structure-activité de cette famille à partir d'un corps tétrahydropyrimidine flexible en étudiant l'influence du remplacement du groupement 3-pyridyle et du motif phénylurée par d'autres aromatiques. Enfin les troisièmes modifications réalisées sur cette structure ont consistées à étudier l'influence du groupement aromatique en position 2 de la pyrimidine. Ces modifications ont abouti à la sélection d'un composé présentant de bonnes caractéristiques au sein d'une série de plus de cinquante composés (IC<sub>50</sub> = 81 nM). Ces valeurs de concentration inhibitrice médiane sont les seules données disponibles à ce jour dans cette série (**Figure 33**).





**Figure 33** : Structure du composé « tête de série » tétrahydropyrimidine issu du screening<sup>136</sup>.

### 4.3. Série de dérivés choisie dans le cadre de mon travail de thèse.

Comme pour les récepteurs P2Y<sub>12</sub>, un certain nombre de ligands ont été développés pour les récepteurs P2Y<sub>14</sub>, mais il n'en existait aucun ayant été radiomarqué au démarrage de la thèse

De manière analogue au choix effectué pour les P2Y<sub>12</sub>R, le choix d'un candidat à radiomarquer pour pouvoir faire de l'imagerie TEP s'est donc fait à partir des études bibliographiques récentes et dans le cadre du « work package 3-chimie » d'INMiND. De manière analogue à ce qui est décrit dans le chapitre précédent, un ligand présentant une haute affinité et une bonne sélectivité pour les récepteurs P2Y<sub>14</sub> était nécessaire. De plus, il était envisagé de pouvoir, dans un premier temps, réaliser un marquage isotopique au carbone-11 ou au fluor-18 d'une molécule de la littérature dont on connaît son affinité pour la cible visée, avant d'entreprendre la synthèse de nouveaux dérivés.

Les études bibliographiques nous ont menées aux ligands de la famille de pyrimidines développés par Guay *et al.*<sup>136</sup>, d'une part parce que deux dérivés *para* méthoxyphényle et *para* thiométhyle phényle étaient « radiomarquables » isotopiquement au carbone-11 (méthylation de la fonction méthoxy par un réactif de type triflate de [<sup>11</sup>C]méthyle), d'autre part, parce que des dérivés fluorés étaient chimiquement envisageables. En effet, les études structure-activité disponibles suggéraient que des modifications telles que l'introduction d'un atome de fluor ou un motif le contenant pouvaient être effectuées à diverses positions, offrant une diversité quant aux dérivés fluorés potentiels à synthétiser.

# Chapitre V : Le projet de thèse.

## 1. Enjeux de la thèse.

Comme expliqué au chapitre précédent, la neuroinflammation joue un rôle important dans de nombreuses maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer, de Parkinson, d'Huntington, mais aussi la sclérose en plaques. Elle est caractérisée par l'activation de la microglie, phénomène qui s'accompagne d'une augmentation de l'expression de certaines protéines, en particulier de récepteurs, et notamment la protéine de translocation 18 kDa (TSPO), les récepteurs aux cannabinoïdes de type 2 (CB<sub>2</sub>R), et, comme démontré plus récemment, les récepteurs purinergiques de type P2Y<sub>12</sub> et P2Y<sub>14</sub>. Ces quatre cibles biologiques peuvent donc être considérées comme des biomarqueurs des maladies neurodégénératives, et l'enjeu de cette thèse consiste au développement de nouveaux radioligands spécifiques de ces cibles pour l'imagerie par Tomographie par Emission de Positons (TEP). Disposer de telles sondes moléculaires, permettra outre de quantifier de manière non invasive les phénomènes neuroinflammatoires chez l'homme, de suivre l'évolution au cours du temps des pathologies précitées voire d'évaluer l'efficacité thérapeutique d'un traitement pour ces maladies. Si les deux premières cibles biologiques étaient décrites au démarrage de mon projet de thèse, les deux dernières résultent de recherches récentes menées au sein du consortium européen INMiND (Imaging of Neuroinflammation in Neurodegenerative Diseases), dans lequel s'inscrit ce travail de thèse.

## 2. Le projet de thèse dans son ensemble.

Le projet de thèse peut se diviser en quatre domaines d'activité :

- La synthèse organique de nouvelles molécules en tant que ligands des quatre cibles pharmacologiques précitées. Ces développements s'effectueront autour d'une structure dite « lead » ou tête de série, provenant soit de l'analyse de la littérature, soit de précédents travaux de recherche du laboratoire. Cette activité constitue la majeure partie du travail présentée dans ce mémoire.
- Une fois synthétisées et caractérisées physico-chimiquement, ces nouvelles molécules sont évaluées *in vitro* vis-à-vis de leur cible biologique (affinité et sélectivité par exemple). Cette activité a toujours été externalisée au travers de collaborations académiques (INMiND) ou industrielles (Sanofi, Roche) et se finalise par la sélection d'une ou plusieurs structures pour un marquage radioactif par le fluor-18 ou le carbone-11.
- Marquer isotopiquement un ligand implique au préalable la préparation de précurseurs de marquage, c'est-à-dire de nouvelles molécules à partir desquelles, l'isotope radioactif (le fluor-18) ou une brique le contenant (dans le cas de l'utilisation d'iodure de méthyle marqué au carbone-11 par exemple) sera introduit. Cette activité constitue une autre partie importante du travail présenté dans ce mémoire.

- Enfin, le marquage radioactif proprement dit, suivi de l'évaluation des caractéristiques en tant qu'agent d'imagerie du radioligand synthétisé, soit *in vivo*, par imagerie TEP chez le petit animal, soit *in vitro*, par autoradiographies sur coupes de tissus, sont les finalités de mon travail de thèse.

### 3. Structure du projet de recherche en chimie.

Le projet de thèse se divise en quatre parties principales, chacune dédiée à l'une des cibles pharmacologiques choisies, à savoir : la TSPO, les CB<sub>2</sub>R, les P2Y<sub>12</sub>R et les P2Y<sub>14</sub>R.

- La première partie de la recherche en chimie est consacrée au développement des ligands ciblant la protéine TSPO.

Le laboratoire s'investit depuis plusieurs années dans le développement de ligands spécifiques de cette protéine et s'intéresse notamment à des analogues synthétiques appartenant à la famille des pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidines. Le lead de cette famille est le composé **DPA-713**, avec une affinité pour la TSPO exprimée par un Ki de 4,7 nM. Ce composé fut marqué au carbone-11 au début des années 2000 et présente des propriétés en imagerie intéressantes<sup>138</sup>. Du fait de la demi-vie courte du carbone-11, un dérivé fluoré, facilement marquable au fluor-18, a rapidement été développé : le **DPA-714** (Ki = 0,91 nM). Ce composé fut radiomarké au sein de notre laboratoire en 2008<sup>8</sup>. [<sup>18</sup>F]**DPA-714**, bien qu'utilisé aujourd'hui dans plusieurs protocoles cliniques, présente cependant des facteurs limitants pour l'imagerie. En effet, il a été montré qu'il était facilement métabolisé *in vivo*, et que l'une des voies de métabolisation observée chez le rat et le babouin fait intervenir la perte de la chaîne [<sup>18</sup>F]fluoroéthyle<sup>84</sup>. Or le métabolite radioactif issu de cette *O*-déalkylation est le [<sup>18</sup>F]fluoroacétate, qui ne possède pas d'affinité pour la TSPO mais qui est cependant capable de traverser la barrière hémato-encéphalique. Ce phénomène augmente ainsi le « bruit de fond » des images TEP au niveau du cerveau et diminue de fait le contraste, ce qui engendre une diminution de la qualité de ces images pour la visualisation de la surexpression de TSPO dans le cerveau. Pour pallier à ces problèmes de métabolisme, plusieurs séries de composés ont été synthétisées lors d'un travail de thèse précédent (Vincent Médran-Navarrete, thèse soutenue le 11 juin 2014).

De ce travail, un premier dérivé est ressorti, **CfO-DPA-714** (Ki = 0,37 nM), qui a par ailleurs été marqué au fluor-18 en 2011<sup>139</sup>. Un premier projet (**Projet A, Figure 34**) découle de ce dérivé : l'objectif étant de moduler la partie amide de **CfO-DPA-714** en introduisant des amides tertiaires comportant différents substituants.

Un second composé est également ressorti du travail de thèse de Vincent Médran-Navarrete, l'analogue **F-DPA** (Ki = 1,7 nM), dont l'atome de fluor est directement attaché au cycle phényle en position *para*. Ce composé a pu être marqué au fluor-18 par voie électrophile en utilisant du Selectfluor<sup>®</sup> au sein d'un laboratoire partenaire<sup>140</sup>, et présente des caractéristiques en imagerie prometteuses<sup>141</sup>. Devant les difficultés rencontrées pour faire un radiomarkage par voie nucléophile au sein de notre laboratoire<sup>142</sup>, il a été choisi d'insérer un motif fluoropyridine (**Projet B, Figure 34**), motif permettant d'incorporer relativement facilement le fluor-18 par cette

voie<sup>143,144</sup>. Quatre fluoropyridines ont donc été envisagées, en déplaçant l'atome d'azote sur le cycle et en gardant le fluor en position *ortho*.

Enfin, sur la base cette fois de la structure de **DPA-713**, quelques dérivés fluorés, compatibles de plus avec un marquage par le fluor-18 par voie nucléophile (aliphatique ou hétéroaromatique) ont été proposés (**Projet C, Figure 34**). Ce projet, dans lequel l'atome de fluor (ou le motif le contenant) est aussi introduit au niveau de la fonction amide, est une alternative au **projet A** (basé lui sur la structure de **DPA-714**) à la fois en termes d'introduction d'un isotope à vie plus longue que le carbone-11, et de positionnement de cet isotope en regard du métabolisme.

Le laboratoire est également impliqué dans des recherches sur une autre famille de ligands de la TSPO : la famille des pyridazino[4,5-*b*]indoles. La tête de série de cette famille est le **SSR180575**, composé qui a été marqué au carbone-11 en 2010 sur le méthyle porté par l'indole<sup>145</sup>. Comme pour la famille des pyrazolopyrimidines, l'objectif est de développer de nouveaux ligands fluorés de l'acétamide **SSR180575**. Les travaux précédents du laboratoire ont permis de modifier ce composé d'une part au niveau de la fonction *para* méthoxyphényle, et d'autre part au niveau de l'indole, en introduisant des chaînes fluorés alkyles, saturées ou non<sup>89</sup>. La seule autre position de ce dérivé qui peut encore être modifiée, sans perte de l'affinité pour la cible, est la fonction amide ; ce qui a donné lieu au **Projet D, Figure 35**. Une partie seulement des modifications effectuées à ce niveau sont présentées dans ce mémoire, les autres étant confidentielles et les structures chimiques associées potentiellement brevetables (**Projet E, Figure 35**).

NB : Il a volontairement été choisi de positionner l'atome de fluor toujours en position terminale sur les chaînes alkyles. En effet, à cette position le rendement d'incorporation du fluor-18 par substitution nucléophile aliphatique est en général le meilleur et d'autre part, cela permet également de s'affranchir d'induire une chiralité si le positionnement était différent.

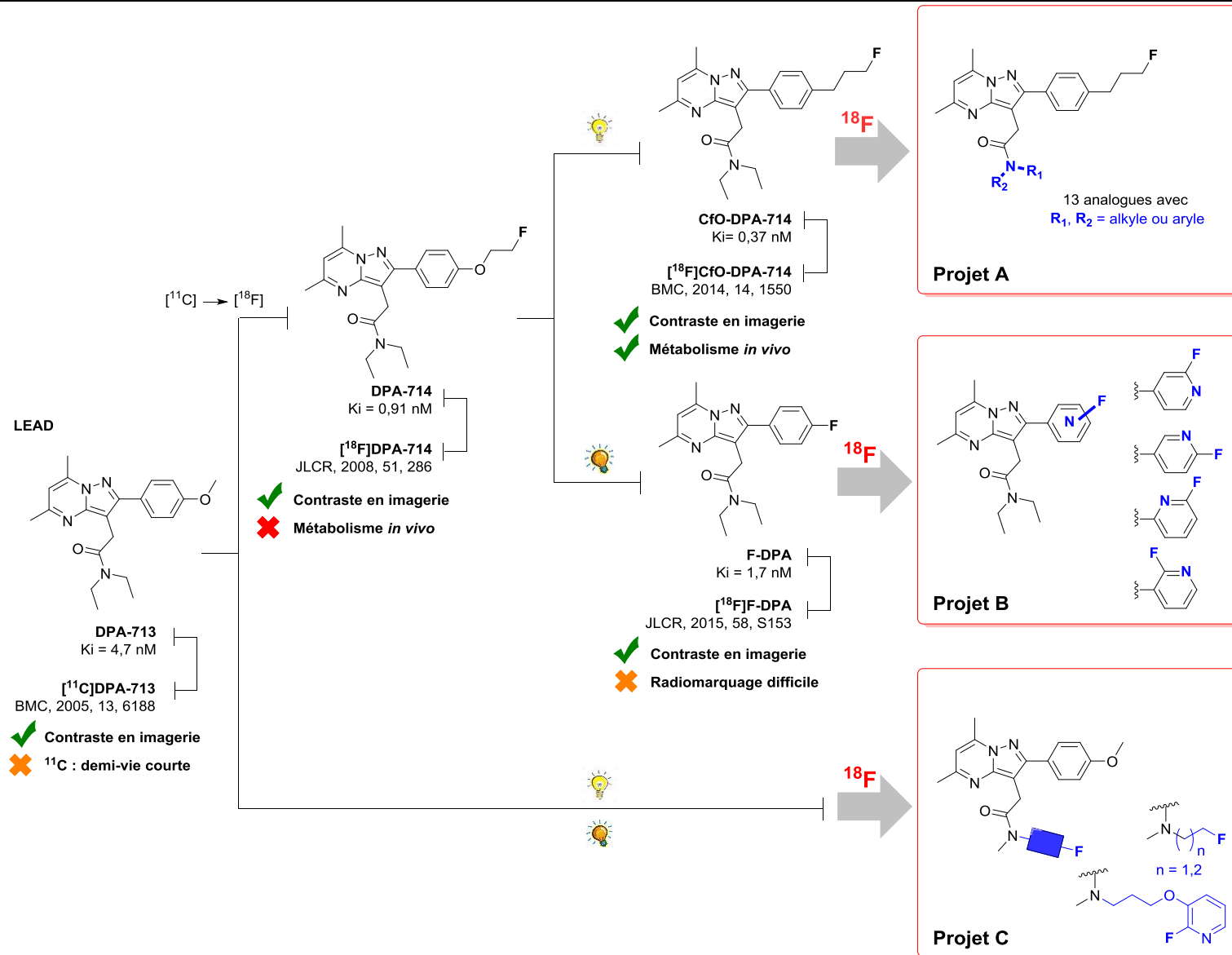


Figure 34 : Structures visées des ligands de la TSPO de type pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine.

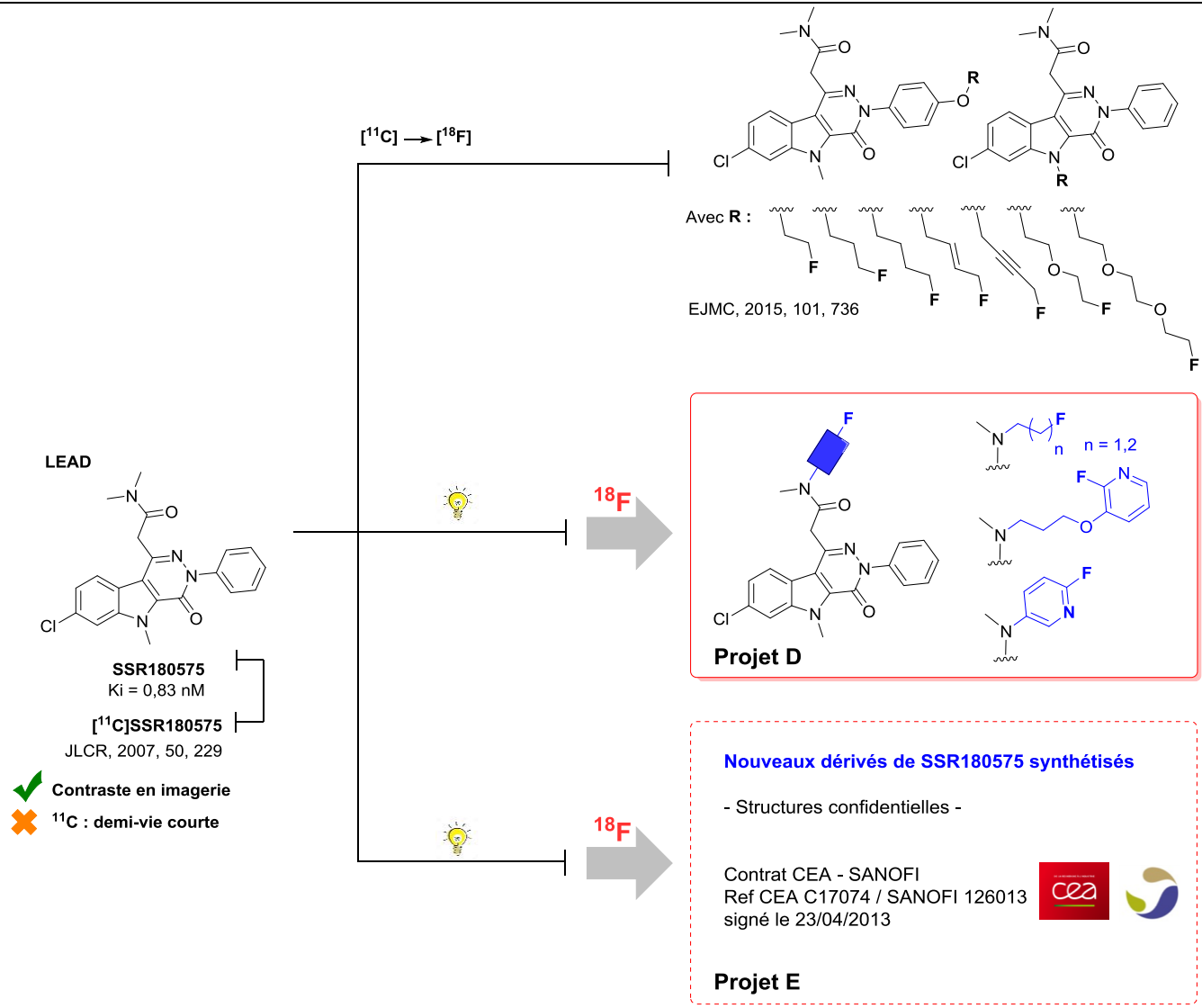
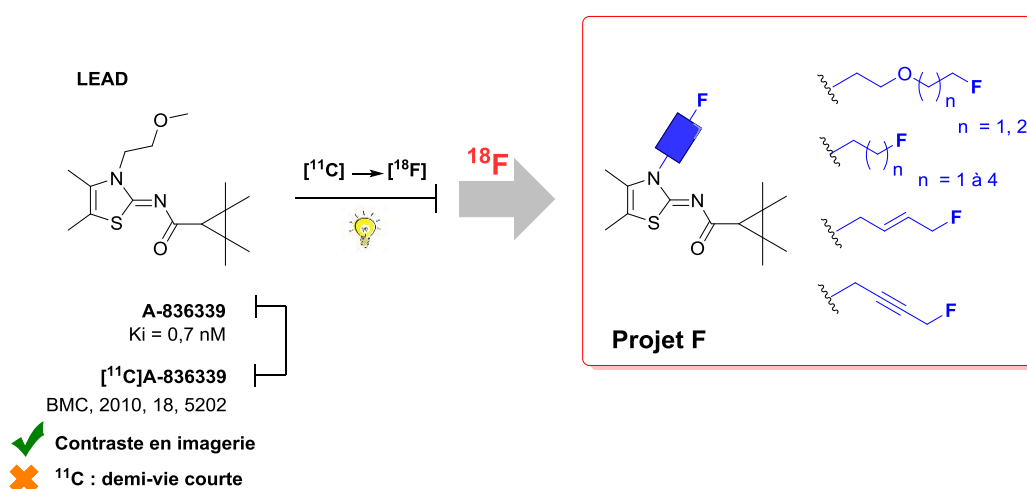


Figure 35 : Structures visées des ligands de la TSPO de type pyridazino[4,5-*b*]indole.

- La seconde partie du manuscrit est dédiée aux ligands des récepteurs cannabinoïdes de type 2 (CB<sub>2</sub>R) (**Projet F**).

Il existe déjà un certain nombre de ligands pour ces récepteurs, et nous nous sommes intéressés à un composé développé initialement par les laboratoires Abbott, le **A-836339** ( $K_i = 0,7 \text{ nM}$ )<sup>111</sup>. Ce composé a été marqué au carbone-11 par l'équipe d'Horti en 2010, et présente des caractéristiques *in vivo* intéressantes<sup>112</sup>. Pour pallier à certaines restrictions liées à la demi-vie courte de ce radio-isotope, le développement d'une série de dérivés marquables au fluor-18 a été envisagé. Les modifications ont toutes été effectuées au niveau de la fonction méthoxy-éthyle, qui a été remplacée par des chaînes alkyles, saturées ou non, comportant un atome de fluor en position terminale, pour les mêmes raisons que celles évoquées lors des projets dédiés à la TSPO (**Figure 36**).



**Figure 36** : Structures visées des ligands des CB<sub>2</sub>R, dérivés de A-836339.

- La troisième cible à laquelle nous nous sommes intéressés, sont les récepteurs purinergiques de type P2Y<sub>12</sub>.

Pour ces récepteurs, deux familles de composés provenant de la littérature ont été retenues, l'une présentant un motif pipéridine et l'autre, un motif azétidine<sup>125</sup>. La tête de série de la famille « pipéridine » comporte une fonction *para*-méthoxyphényle ( $IC_{50} = 30 \text{ nM}$ ), et est donc propice à un marquage isotopique au carbone-11 par réaction de méthylation. Le **Projet G** (**Figure 37**) consiste donc à resynthétiser ce dérivé, puis à préparer son précurseur de marquage, le dérivé phénol correspondant. Des dérivatisations de cette tête de série sont également envisagées dans le but d'un marquage au fluor-18 (**Projet H**, **Figure 37**), et ceci en remplaçant la fonction méthoxy par des chaînes alcane ou alkoxy portant un atome de fluor en position terminale. La seconde famille de dérivés (famille « azétidine ») présente aussi de bonnes affinités vis-à-vis de la cible ( $6 \text{ nM} < IC_{50} < 230 \text{ nM}$ ). De façon analogue à la première famille, un premier projet (**Projet I**, **Figure 37**) vise à obtenir le dérivé *para*-méthoxyphényle (en vue d'un marquage au carbone-11), puis à faire des analogues fluorés (en vue d'un marquage au fluor-18) (**Projet J**, **Figure 37**).

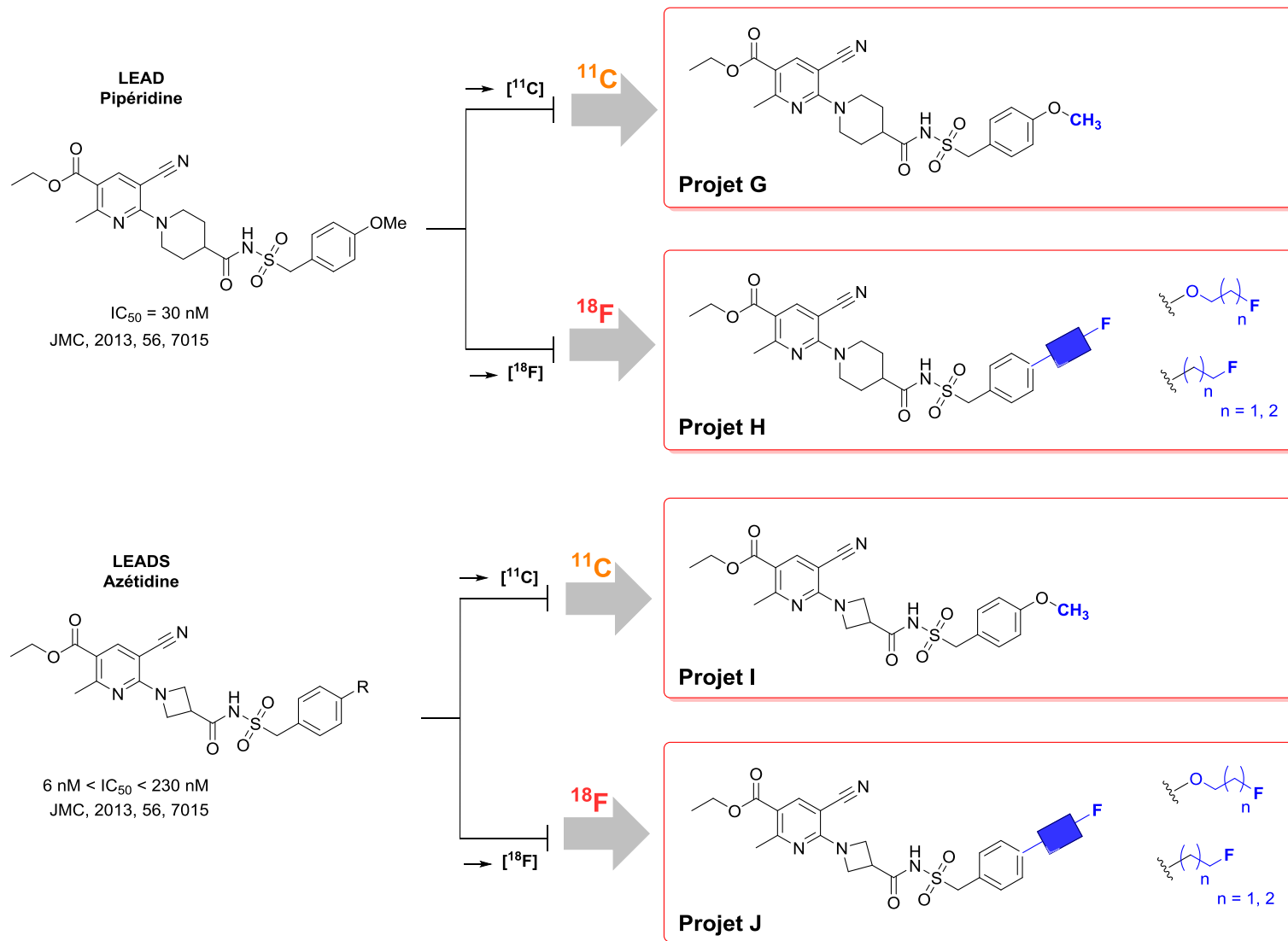


Figure 37 : Structures visées des ligands des P2Y<sub>12</sub>R.



- Enfin, la quatrième cible à laquelle nous nous sommes intéressés, sont les récepteurs purinergiques de type P2Y<sub>14</sub>.

Pour ces récepteurs, une première famille de phényle urées présentant un corps 5,6,7,8-tétrahydropyrido[4,3-*d*]pyrimidine<sup>136</sup> a été retenue sur la base d'une étude bibliographique exhaustive et conduite au nom du consortium INMiND. Le **Projet K (Figure 38)** consiste à resynthétiser dans un premier temps le dérivé *méta* méthoxyphényle (présentant un IC<sub>50</sub> de 5,1 μM) son analogue *meta* thiométhylphényle (IC<sub>50</sub> = 0,63 μM), et les deux dérivés « nor » correspondants. Les concentrations inhibitrices médianes (seules données disponibles à ce jour pour cette série) de ces deux composés sont modestes, mais leurs structures sont les seules reportées permettant un marquage isotopique relativement facile (méthylation) par le carbone-11. Comme précédemment, des dérivatisations au niveau de la fonction méthoxy sont également envisagées dans le but d'un marquage au fluor-18 (**Projet L, Figure 38**), en introduisant des chaînes alcane ou alkoxy avec un atome de fluor placé en position terminale.

Des modifications seront aussi proposées au niveau du noyau aromatique placé en position-2 de la pyrimidine. Il existe en effet une deuxième famille de phényle urées structurellement très proches de la précédente, dans laquelle la pyridine en position-2 a été remplacée par différents noyaux aromatiques, et pour laquelle une deuxième tête de série, présentant un atome de fluor en *para* d'un phényle (IC<sub>50</sub> = 25 nM)<sup>136</sup> a été identifiée. Le **Projet M (Figure 38)** vise donc à synthétiser quelques nouveaux dérivés à l'interface de ces deux familles, en introduisant un motif *ortho*-fluoropyridine à cette position-2 dans le but d'un marquage au fluor-18 par voie nucléophile.

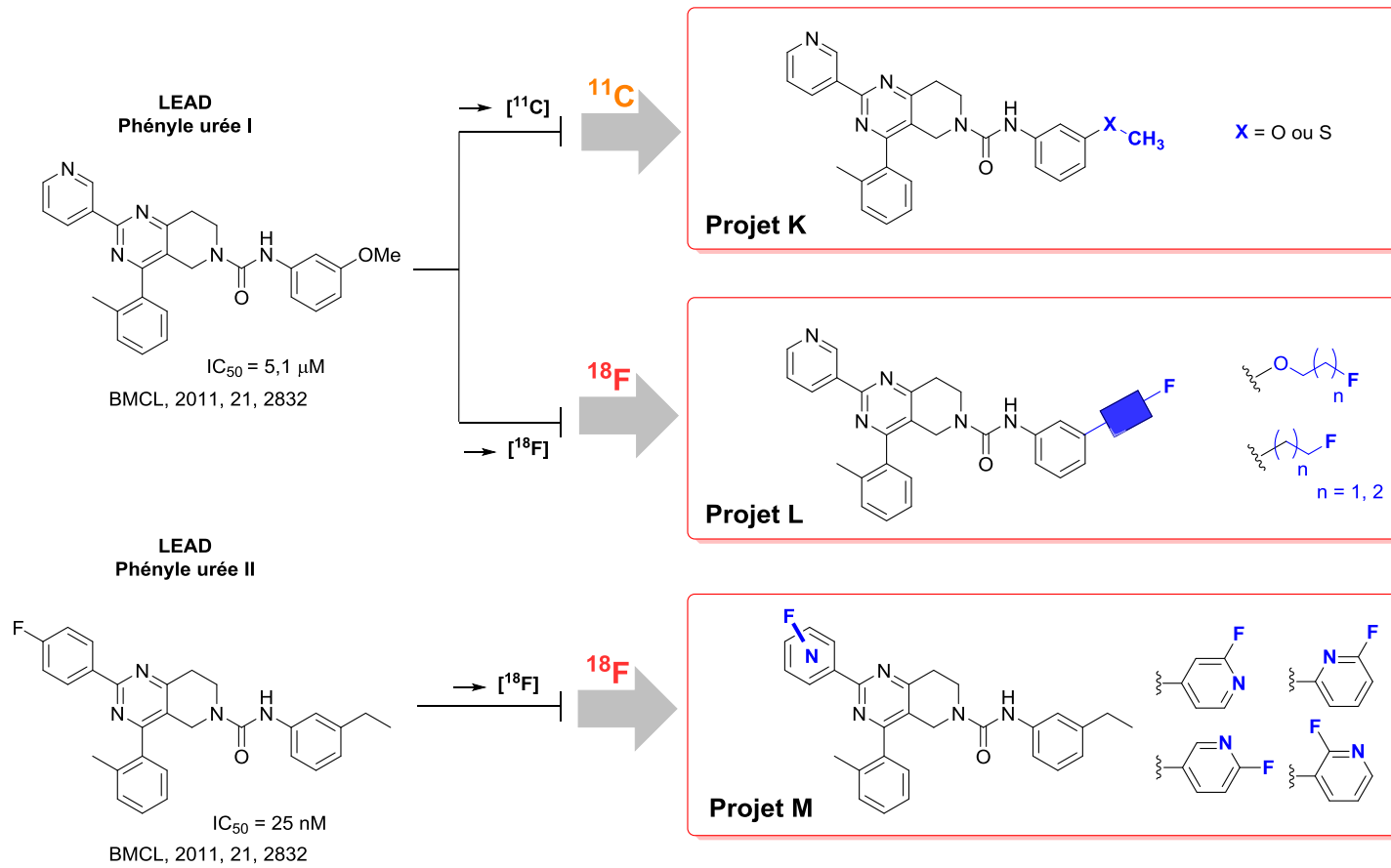


Figure 38 : Structures visées des ligands des P2Y<sub>14</sub>R



# Deuxième partie

## Résultats et discussions

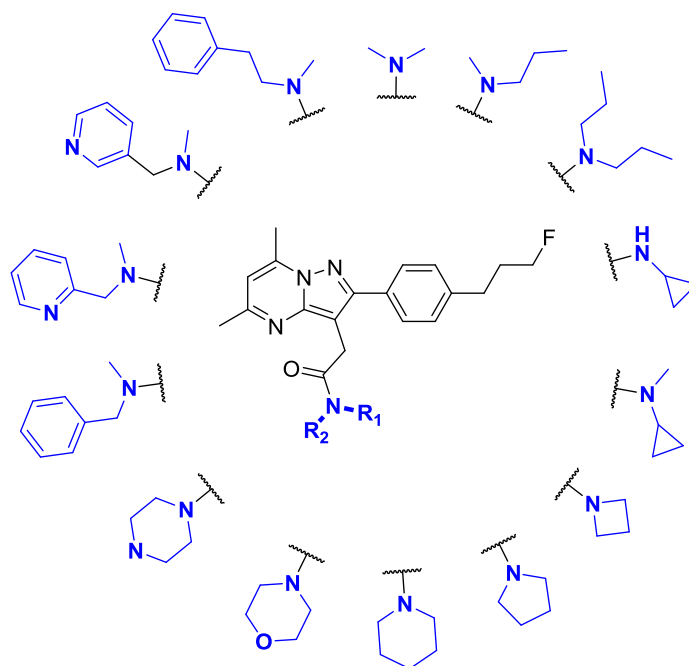


# Chapitre I : Les ligands de la TSPO.

## 1. Dérivés pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine acétamides.

### 1.1. Analogues de CfO-DPA-714 modifiés au niveau de l'amide (Projet A).

Pour rappel, l'objectif de ce premier projet est de moduler la partie amide de **CfO-DPA-714**, en introduisant des amides tertiaires comportant différents substituants. Les amides ciblés sont présentés dans la **Figure 39**.



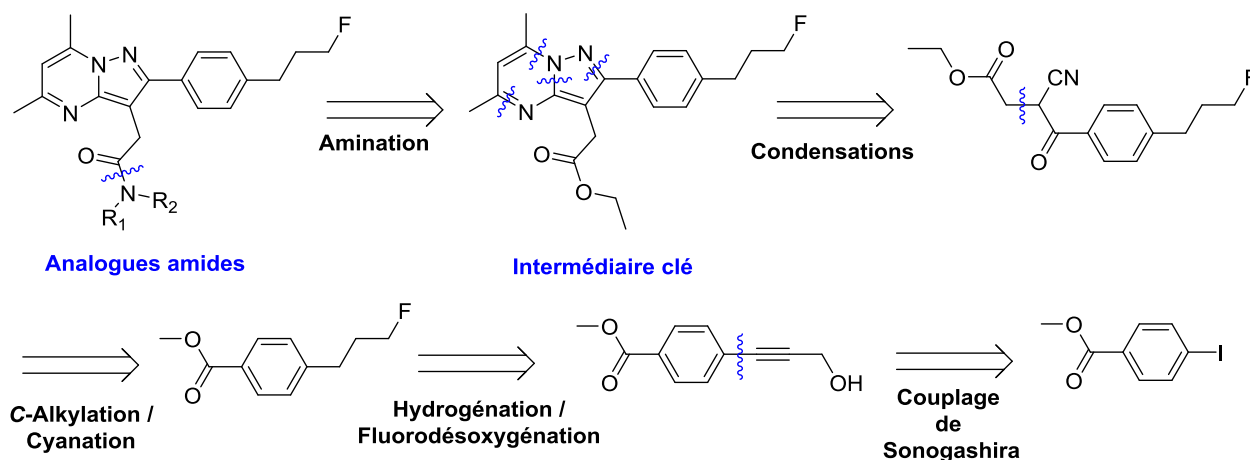
**Figure 39** : Structures des amides ciblés.

#### 1.1.1. Synthèse.

- Analyse rétrosynthétique.

L'analyse rétrosynthétique des analogues amides présentée dans le **Schéma 27** fait apparaître un intermédiaire clé, le dérivé ester éthylique, qui permettrait d'obtenir tous les dérivés de cette série en une étape, lors la dernière étape de la séquence réactionnelle, *via* une réaction de transamidation. Cet intermédiaire pourra quant à lui être obtenu après une séquence de six étapes, à partir du 4-iodobenzoate de méthyle. Dans un premier temps, il faut introduire la chaîne fluoropropyle sur le cycle benzylique. Pour cela, il faut créer une liaison carbone-carbone entre un aromatique et une chaîne alkyle. Un couplage de Sonogashira peut donc être envisagé. Il s'agit d'un couplage pallado-catalysé entre des alcynes vrais et des halogénures ou triflates vinyliques ou aromatiques conduisant à des alcynes aromatiques<sup>146</sup>. Ainsi, en couplant l'alcool propargylique au méthyl-4-iodobenzoate, en réduisant la triple liaison, puis en fluorant l'alcool, le synthon désiré peut-être obtenu. Après cyanation de l'ester puis substitution nucléophile, un  $\beta$ -

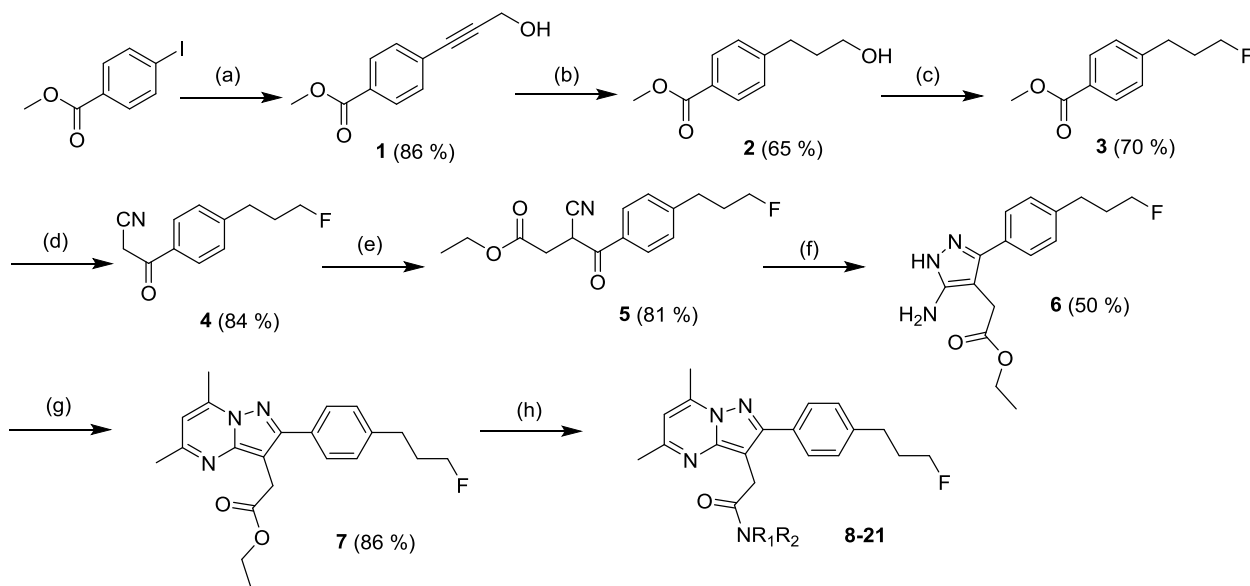
acétonitrile sera produit, qui après deux condensations successives, permettra de former le cycle pyrazolopyrimidine<sup>147</sup>.



**Schéma 27** : Rétrosynthèse des analogues CfO-DPA-amides.

- Résultats obtenus pour la synthèse des analogues amides **8-21**.

Une série de quatorze dérivés structurellement proches de **CfO-DPA-714** a été synthétisée en huit étapes décrites dans le **Schéma 28**.



**Réactifs et conditions** : (a) prop-2-yn-1-ol, CuI, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, Et<sub>3</sub>N, t.a., 1 nuit ; (b) H<sub>2</sub>, Pd/C 10 %, méthanol, t.a., 1 nuit ; (c) Deoxo-Fluor<sup>®</sup> 50 % dans le THF, DCM, 0 °C à t.a., 1 nuit ; (d) i) 2,5 M *n*-BuLi dans l'hexane, CH<sub>3</sub>CN, THF anh., -60 °C, 1 h, puis ii) **3**, THF anh., -50 °C à -30 °C, 2 h ; (e) NaOH, NaI, BrCH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>Et, éthanol, t.a., 24 h ; (f) NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O, AcOH, éthanol, reflux, 2 h ; (g) acétylacétone, éthanol, reflux, 5 h ; (h) i) amine appropriée, AlMe<sub>3</sub>, toluène anh., t.a., 1 h, puis ii) **7**, toluène anh., chauffage (70 à 110 °C), 30 min à 5 h.

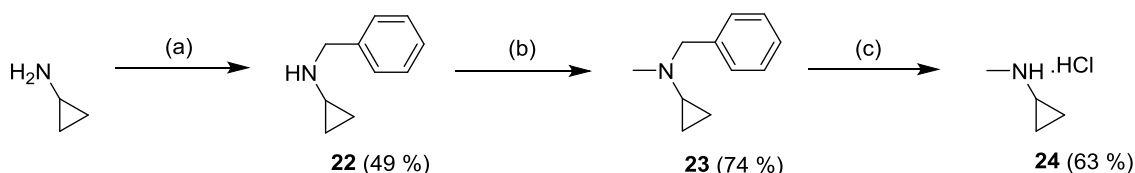
**Schéma 28** : Synthèse des analogues amides **8-21**.

Premièrement, un couplage de Sonogashira entre le méthyl-4-iodobenzoate et le prop-2-yn-1-ol en présence de Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, et de CuI dans la triéthylamine permet d'obtenir l'alcool propargylique **1** avec 86 % de rendement. La triple liaison de ce dernier est ensuite réduite par une hydrogénation catalytique à température ambiante dans le méthanol pour donner l'alcool **2**. Cet alcool est alors soumis à une fluorodésoxygénation en utilisant du Déoxo-Fluor<sup>®</sup> dans du dichlorométhane à température ambiante pour donner le dérivé **3** avec un rendement de 70 %. La fonction ester est ensuite convertie en β-cétonitrile par une addition nucléophile du carbanion de l'acétonitrile généré par une base forte (dans ce cas, le *n*-BuLi), à -78 °C. Ces conditions permettent de générer **4** avec 84 % de rendement. Une autre méthode a également été tentée, en utilisant comme base le méthanolate de sodium à reflux dans de l'acétonitrile. Cette méthode s'est avérée être moins reproductible, donnant **4** avec des rendements variant de 29 à 76 %. Une étape de C-alkylation a ensuite été réalisée sur **4**, en présence de 2-bromoacétate d'éthyle, d'iodure de sodium et de d'hydroxyde de sodium dans de l'éthanol à température ambiante, pour fournir l'ester **5** avec un bon rendement de 81 %. Cet ester a été ensuite soumis à deux condensations consécutives, la première avec du monohydrate d'hydrazine à reflux dans un mélange éthanol/acide acétique, pour donner l'intermédiaire aminopyrazole **6**, puis la seconde en présence d'acétylacétone dans l'éthanol à chaud pour donner la pyrazolopyrimidine **7** (notre intermédiaire clé), avec un rendement de 43 % sur les 2 étapes.

L'ester **7** a ensuite été traité avec différentes amines, toutes commerciales à l'exception de la *N*-méthyl-*N*-cyclopropylamine **24**. La réaction de transamidation<sup>148-150</sup> a été réalisée en présence de triméthylaluminium, dans du toluène à 110 °C, sauf pour les composés **10** et **16** (100 °C) et le dérivé **13** (70 °C). En effet, pour le composé **13** qui comporte une azétidine, cycle à quatre chaînons fortement contraint, un chauffage trop élevé risquerait de le dégrader rapidement. Tous les amides ont été obtenus avec des rendements allant de 23 à 81 % et des puretés chimiques supérieures à 95 %, à l'exception du dérivé **12**, qui n'a pas pu être isolé par cette méthode. Pour ce dérivé, le rendement n'a jamais dépassé 5 % et la pureté n'a jamais été supérieure à 70 %. Les résultats sont résumés dans le **Tableau 5** (page suivante).

- Cas particulier de l'analogue *N*-méthyl-*N*-cyclopropylamide **12**.

La *N*-méthyl-*N*-cyclopropylamine n'est pas une amine commerciale et a été resynthétisée, sous sa forme chlorhydrate, en trois étapes selon la procédure décrite par Yoshida *et al.*<sup>151</sup> (**Schéma 29**).


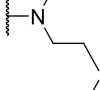
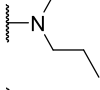




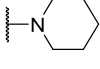
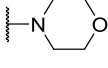
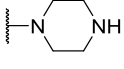
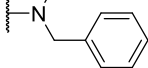
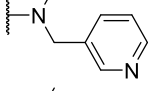
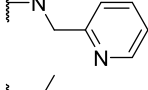
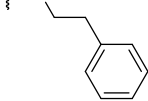


**Réactifs et conditions :** (a) BnBr, Et<sub>3</sub>N, THF, t.a., 1 nuit ; (b) 37 % massique CH<sub>2</sub>O, NaBH<sub>4</sub>, 0 °C, 30 min ; (c) i) H<sub>2</sub>, Pd/C 10 %, méthanol, t.a., 1 nuit, ii) 10 M HCl dans du méthanol.

**Schéma 29 :** Synthèse du chlorhydrate de *N*-méthyl-*N*-cyclopropylamine **24**.

Dans un premier temps, la cyclopropylamine a été protégée par un groupement benzyle en présence de bromure de benzyle et de triéthylamine dans du tétrahydrofurane à température ambiante pour donner la *N*-benzylamine **22** avec un rendement de 49 %.



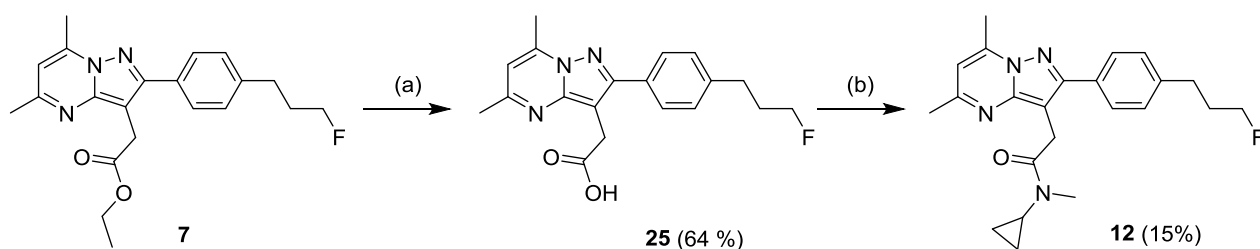
Composé	NR <sub>1</sub> R <sub>2</sub>	Réaction		
		T (°C)	t (min)	Rendement
8		110	30	66 %
9		110	240	53 %
10		100	60	61 %
11		110	45	81 %
12		110	60	< 5 % *
13		70	60	49 %
14		110	60	67 %
15		110	120	61 %
16		100	60	80 %
17		110	60	46 %
18		110	60	62 %
19		110	60	78 %
20		110	300	30 %
21		110	240	23 %

\* : Composé obtenu avec une pureté non suffisante (70 %)

**Tableau 5 :** Analogues amides de **Cfo-DPA-714** obtenus à partir de **7**.

La *N*-benzylamine **22** fut ensuite engagée dans une réaction de méthylation par amination réductrice en présence de paraformaldéhyde et de borohydrure de sodium à 0 °C. Le groupement benzyle du dérivé **23** a ensuite été retiré grâce à une hydrogénéolyse catalytique dans du méthanol à température ambiante (74%). Enfin, la *N*-méthyl-*N*-cyclopropylamine a été convertie en chlorhydrate par l'action d'un excès d'une solution méthanolique d'acide chlorhydrique 10 M. Le chlorure de *N*-méthyl-*N*-cyclopropylammmonium **24** a ainsi été obtenu avec un rendement de 63 %.

La préparation de l'amide **12** a été tentée selon deux méthodes différentes. Dans un premier temps, la méthylation directe de l'analogue **11** a été testée, en utilisant de l'hydrure de sodium dans du *N,N*-diméthylformamide à température ambiante. Cette méthode, de par sa faible sélectivité, a aboutie à la formation de nombreux sous-produits, et n'a pas permis d'isoler le produit désiré. C'est pourquoi une méthode alternative a été choisie, consistant en un couplage entre l'amine **24** et l'acide carboxylique **25**, ce dernier résultant de l'hydrolyse de l'ester **7** (Schéma 30).



Réactifs et conditions : (a) KOH, méthanol, 40 °C, 3 h ; (b) **24**, Et<sub>3</sub>N, TBTU, DCM, t.a., 12 h.

Schéma 30 : Synthèse du dérivé *N*-méthyl-*N*-cyclopropylamide **12**.

L'acide **25** a ainsi été obtenu avec 64 % de rendement après 3 heures de réaction avec de l'hydroxyde de potassium dans du méthanol à 40 °C. Il a ensuite été engagé dans une réaction de couplage avec l'amine **24**, en utilisant du TBTU comme agent de couplage et de la triéthylamine comme base. Dans ces conditions, l'analogue **12** a pu être obtenu avec un faible rendement de 15 %. Cependant, la pureté maximale obtenue pour ce composé étant seulement de 70 % (basée sur des analyses HPLC), il n'a pas été engagé dans les tests de mesure d'affinité pour la TSPO.

### 1.1.2. Evaluations physico-chimique et pharmacologique *in vitro*.

Les propriétés pharmacologiques (affinité pour la TSPO et sélectivité versus CBR) et physico-chimiques (LogD<sub>7,4</sub>) des treize analogues **8-11** et **13-21** ont été déterminées et comparées à celles de **DPA-714** et **CfO-DPA-714** (Tableau 6).

Les affinités *in vitro*, des analogues **8-11** et **13-21** pour la TSPO (K<sub>i</sub>) ont été mesurées par déplacement du [<sup>3</sup>H]PK11195 sur des homogénats de membranes de cœur de rat. A l'exception, de la pipérazinamide **17** (260 nM), tous les analogues synthétisés présentent des affinités nanomolaires voire subnanomolaires pour la TSPO, avec des valeurs de K<sub>i</sub> variant de 0,25 nM à 32 nM. Au sein de cette série, trois composés, les dérivés **19**, **20** et **21**, montrent des affinités comparables à celles de **DPA-714** (0,91 nM), avec des K<sub>i</sub> respectifs de 2,8, 1,2, et 1,1 nM. Les

dérivés *N*-méthyle-*N*-propyle **9** (0,25 nM), *N,N*-dipropyle **10** (0,26 nM) et *N*-méthyle-*N*-benzylamide **18** (0,30 nM), présentent quant à eux des valeurs de  $K_i$  légèrement inférieures à celle de **CfO-DPA-714** (0,37 nM).

Tous les analogues synthétisés présentent un pourcentage d'inhibition nul ou négligeable (2 % pour le dérivé **8**) pour les CBR en compétition avec du [<sup>3</sup>H]flunitrazepam à 1  $\mu$ M, attestant de l'excellente sélectivité pour la TSPO.

Ligand	TSPO <sup>a</sup> $K_i$ (nM)	CBR % inhib. <sup>b</sup> 1 $\mu$ M	LogD <sub>7,4</sub> <sup>c</sup>
<b>DPA-714</b>	0,91	0 %	2,89
<b>CfO-DPA-714</b>	0,37	0 %	3,51
<b>8</b>	15	2 %	2,68
<b>9</b>	0,25	0 %	3,65
<b>10</b>	0,26	0 %	4,39
<b>11</b>	17	0 %	2,69
<b>13</b>	32	0 %	2,73
<b>14</b>	26	0 %	3,04
<b>15</b>	2,2	0 %	3,56
<b>16</b>	27	0 %	2,56
<b>17</b>	260	0 %	0,87
<b>18</b>	0,30	0 %	3,98
<b>19</b>	2,8	0 %	2,61
<b>20</b>	1,2	0 %	3,16
<b>21</b>	1,1	0 %	4,08

<sup>a</sup> Valeur déterminée en utilisant des homogénats de membranes de cœur de rat en présence de [<sup>3</sup>H]PK11195 ( $K_d = 1,8$  nM,  $c = 0,2$  nM). <sup>b</sup> Valeur déterminée en utilisant des homogénats de cortex cérébral de rat et exprimée en % d'inhibition à 1  $\mu$ M contre du [<sup>3</sup>H]flunitrazepam ( $K_d = 2,1$  nM,  $C = 0,4$  nM). <sup>c</sup> Valeur déterminée en convertissant le temps de rétention des analogues testés en utilisant une méthode HPLC validée et standardisée.

**Tableau 6** : Détermination *in vitro* de l'affinité, de la sélectivité et de la lipophilie des analogues **8-11** et **13-21**, et des composés de référence **DPA-714** et **CfO-DPA-714**.

De manière générale, plus les substituants sont lipophiles, meilleure est l'affinité de la molécule correspondante. En effet, les composés ayant des valeurs de log  $D_{7,4}$  supérieure à 3,1 montrent les meilleures affinités (analogues **9**, **10**, **15**, **18**, **20** et **21**). De plus, l'introduction d'un hétéroatome sur le cycle benzyle, entraînant de ce fait une augmentation du caractère hydrophile de la structure, conduit à une diminution de l'affinité pour la TSPO (**19** et **20** à comparer à **18**). Enfin de manière intéressante, le remplacement du motif *N*-benzyle (**18**) par un motif *N*-phénytyle (**21**) conduit là encore à une diminution de l'affinité, probablement due à des interactions stériques défavorables au sein de la poche de liaison lipophile de la protéine.

Il est couramment suggéré que la valeur du log  $D_{7,4}$  de composés ciblant le système nerveux central (SNC) doit être comprise entre 3 et 4 pour une pénétration optimale de la barrière hématoencéphalique (BHE). Parmi les composés présentant une forte affinité pour la TSPO ( $K_i < 3,0$  nM), les dérivés **9** et **15** ont des valeurs de log  $D_{7,4}$  similaires à celle de **CfO-DPA-714**

(respectivement 3,65 et 3,56 contre 3,51). Les composés **19** et **20** ont quant à eux des valeurs proches de celle de **DPA-714** (2,61 et 3,16 contre 2,89), du fait de la présence d'un hétéroatome dans le substituant de l'amide.

### 1.1.3. Stabilité microsomale.

La stabilité métabolique microsomale *in vitro* des analogues présentant une forte affinité pour la TSPO ( $K_i < 3,0$  nM) a été évaluée en utilisant des microsomes hépatiques préparées à partir de trois espèces différentes : homme, rat et souris (**Tableau 7**). Les résultats, exprimés comme une clairance intrinsèque, reflètent le taux de biotransformation *in vitro* du composé. De ce fait, plus les valeurs sont élevées, plus les composés sont métabolisés rapidement. **DPA-714** et **CfO-DPA-714** ont aussi été testés en tant que références.

Composé	Clairance intrinsèque (InC, $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ protéine) <sup>a</sup>		
	Homme	Rat	Souris
<b>DPA-714</b>	68	> 1000	408
<b>CfO-DPA-714</b>	241	>1000	865
<b>9</b>	321	> 1000	781
<b>10</b>	> 1000	> 1000	> 1000
<b>15</b>	424	> 1000	931
<b>18</b>	> 1000	> 1000	> 1000
<b>19</b>	862	> 1000	> 1000
<b>20</b>	270	610	947
<b>21</b>	> 1000	> 1000	> 1000

<sup>a</sup> Clairance intrinsèque, exprimée en  $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$  protéine, reflète le taux de biotransformation du composé.

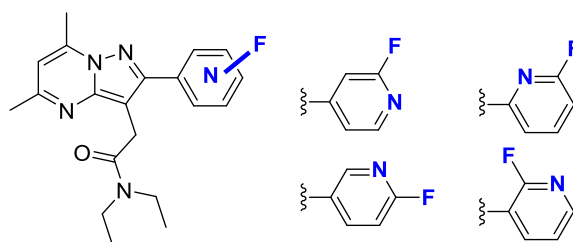
**Tableau 7** : Evaluation de la clairance intrinsèque des analogues **9**, **10**, **15** et **18-21**, ainsi que des composés de référence **DPA-714** et **CfO-DPA-714**.

D'après le **Tableau 7**, tous les composés sont rapidement métabolisés en présence de microsomes de rat, avec des valeurs (InC) supérieures à 1000, exceptée pour le composé **20** qui semble légèrement plus stable (610  $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$  protéine). Tous les dérivés sont également rapidement biotransformés en présence de microsomes de souris (InC > 750  $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$  protéine). En revanche, en présence de microsomes humains, les taux de biotransformations sont plus variables, fluctuant de 270, pour le composé **20**, à plus de 1000  $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$  protéine pour les composés **10**, **18** et **21**. Les dérivés **9** et **20** semblent être les moins métabolisés avec des valeurs comparables à celle de **CfO-DPA-714** (respectivement 321, 270 et 241  $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$  protéine). De manière surprenante, **DPA-714** reste le composé le plus stable aussi bien vis-à-vis des microsomes humains que de ceux de souris.

## 1.2. Analogues fluoropyridines de F-DPA (Projet B).

Pour rappel, l'objectif de ce deuxième projet est de synthétiser des analogues de **F-DPA**, pour lesquels un marquage par le fluor-18 à haute activité spécifique et par fluoration

hétéroaromatique serait possible. Les structures des quatre fluoropyridines envisagées sont présentées dans la **Figure 40**. Il a été choisi de faire varier la position de l'azote et du fluor sur le cycle tout en gardant le fluor en *ortho* de l'azote.

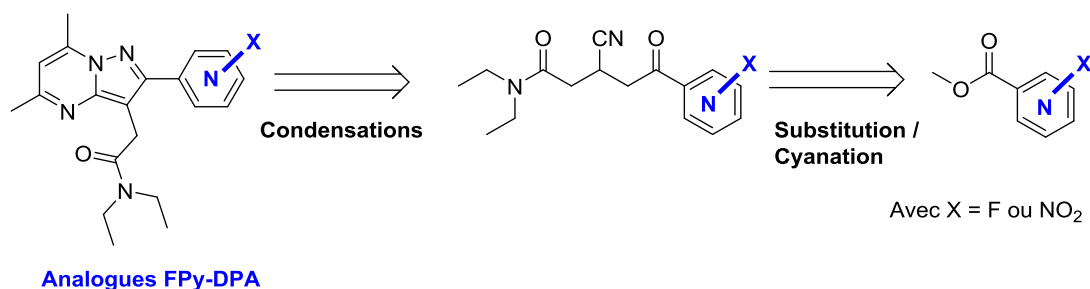


**Figure 40** : Structures des quatre fluoropyridines envisagées.

### 1.2.1. Synthèse.

- Analyse rétrosynthétique.

Une première approche peut être envisagée pour la synthèse des quatre dérivés fluoropyridines, basée sur la stratégie employée pour la synthèse des dérivés amides de **CfO-DPA-714** (projet A). Cette méthode consiste à construire le cycle pyrazolopyrimidine en partant d'un synthon pyridine selon les quatre étapes suivantes : une cyanation de l'ester de départ, une substitution nucléophile pour introduire la fonction *N,N*-diéthylacétamide, et deux condensations successives formant d'abord le pyrazole puis le cycle pyrazolopyrimidine (**Schéma 31**). Cette méthode présente deux inconvénients majeurs. Premièrement, en partant des fluoropyridines, certaines étapes risquent de poser problème, du fait de la position du fluor en  $\alpha$  de l'azote qui peut être très facilement substitué notamment « à chaud » ou en milieu basique. Ce problème pourrait néanmoins être contourné en partant d'une nitropyridine, et en introduisant le fluor par substitution lors d'une dernière étape de synthèse. Le deuxième inconvénient majeur de cette stratégie est que la synthèse doit être effectuée quatre fois en parallèle pour chaque fluoropyridine souhaitée.



**Schéma 31** : Schéma rétrosynthétique des analogues FPY-DPA.

Cette méthode ne sera donc pas retenue, et une voie alternative, convergente, a donc été envisagée (**Schéma 32**).

Afin de rendre la synthèse convergente, l'idée était d'obtenir un synthon à partir duquel on pourrait en une dernière étape, introduire les quatre motifs fluoropyridines (**Schéma 32**). Ce synthon, dans lequel la fonction *N,N*-diéthylacétamide et le cycle pyrazolopyrimidine sont déjà en place, doit contenir un halogène ou un triflate en position 3 du pyrazole. Ce dernier peut être obtenu à partir d'un hydroxyle. A partir de cet intermédiaire, il faut ensuite créer une liaison

aryle-aryle entre les fluoropyridines et le cycle pyrazolopyrimidine. Le type de couplage choisi permettant de former cette liaison est le couplage de Suzuki<sup>152</sup>.

Le couplage de Suzuki est un couplage pallado-catalysé entre des dérivés du bore et des halogénures ou triflates vinyliques ou aromatiques. L'un des grands avantages de cette réaction est la stabilité des dérivés du bore, leur facilité d'accès et leur faible toxicité<sup>152,153</sup>.

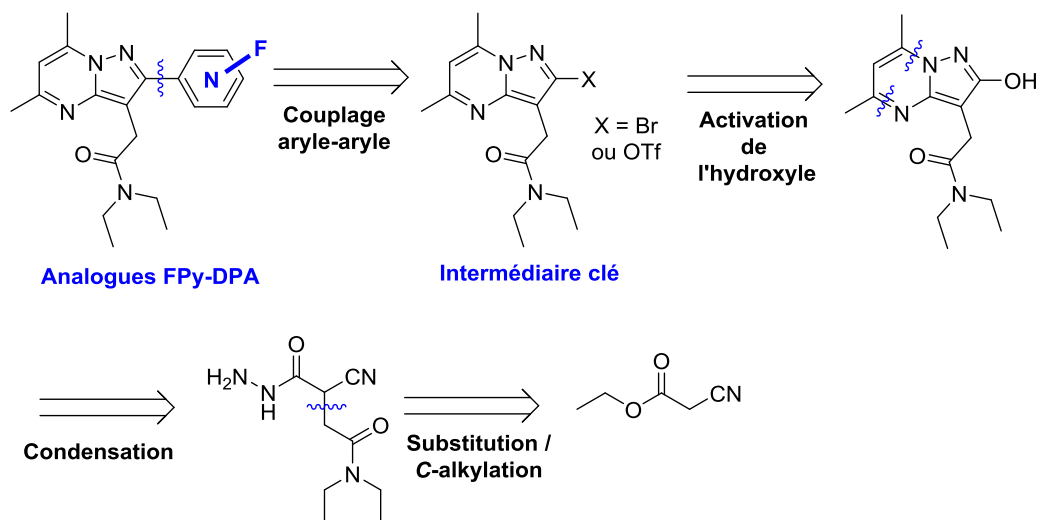


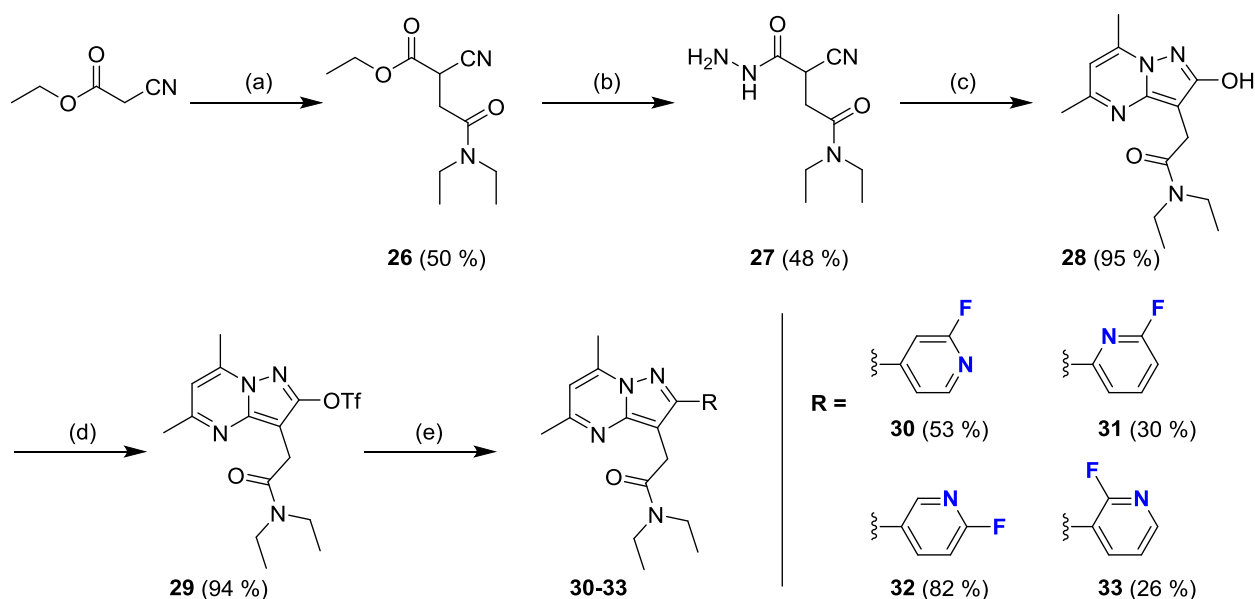
Schéma 32 : Rétrosynthèse alternative des analogues FPY-DPA.

- Résultats obtenus pour la synthèse des analogues amides **30-33**.

Les quatre fluoropyridines analogues de **F-DPA** ont été synthétisées en cinq étapes décrites dans le **Schéma 33** selon la seconde stratégie alternative rétrosynthétique proposée dans le **Schéma 32**.

La première étape de C-alkylation entre le 2-cyanoacétate et 2-chloro-*N,N*-diméthylacétamide en présence d'hydrure de sodium dans du tétrahydrofurane a permis d'obtenir le 1,3-cétonitrile acétamide **26**<sup>154</sup> avec un rendement de 50 %. La fonction ester de **26** a ensuite été substituée par du monohydrate d'hydrazine pour donner **27** avec 48 % de rendement<sup>155</sup>. Cet intermédiaire a été engagé dans une étape de condensation avec l'acétylacétone pour former l'alcool **28** quasi quantitativement (95 %)<sup>156</sup>.

A partir de ce composé hydroxylé, plusieurs stratégies ont été envisagées. Dans un premier temps, l'idée était de réaliser une halogénéation en vue d'un couplage de Suzuki avec les acides ou esters boroniques souhaités. Cependant, les diverses conditions de chloration en présence de POCl<sub>3</sub> ou SOCl<sub>2</sub>, ou de bromation par PBr<sub>3</sub> ou triphénylphosphine / Br<sub>2</sub>, n'ont conduit qu'à la dégradation de l'alcool initial. Une seconde stratégie a donc été employée, visant à activer l'hydroxyle de **28** en triflate. La formation du triflate a été réalisée en présence d'anhydride triflique et de triéthylamine dans du dichlorométhane à 0 °C. Il a été observé que la réaction doit se faire à 0 °C car une hausse de température conduit rapidement à une dégradation, probablement due à une réactivité particulière de l'hydroxyle directement accroché au cycle pyrazole. Dans ces conditions, le triflate **29** a finalement pu être obtenu avec un très bon rendement de 94 %.



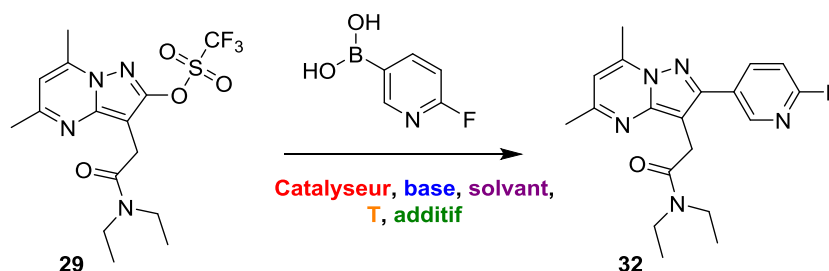
**Réactifs et conditions :** (a) i) NaH, THF, reflux, 1 h, puis ii) 2-chloro-*N,N*-diméthylacétamide, t.a., 3 h ; (b) monohydrate d'hydrazine, éthanol, t.a., 1 nuit ; (c) acétylacétone, acide acétique, 80 °C, 2 h ; (d) Tf<sub>2</sub>O, Et<sub>3</sub>N, DCM, 0 °C, 3 h ; (e) acide 2-fluoropyridine-4-boronique, acide 6-fluoropyridine-2-boronique, acide 6-fluoropyridine-3-boronique, ou acide 2-fluoropyridine-3-boronique respectivement, aq. 2 M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, toluène / éthanol (50:50, v:v), 70 °C, 5 h.

**Schéma 33 :** Synthèse des analogues FPy-DPA 30-33.

La dernière étape permettant d'obtenir les quatre dérivés fluoropyridines est un couplage de Suzuki. Diverses conditions ont dû être testées et sont regroupées dans le **Tableau 8**. Les conditions ont été mises au point avec l'un des acides boroniques : l'acide 6-fluoropyridine-3-boronique.

Les conditions classiques de couplage<sup>157</sup> (**Tableau 8**, essais 1, 2 et 4) ont conduit à la dégradation du produit de départ. Dans l'essai **5**, le catalyseur utilisé est le Pd(dba)<sub>2</sub>, auquel on rajoute dans le milieu réactionnel du dppf qui va s'échanger avec le dba et se chélater au palladium. Du TBAI est également ajouté au mélange bi-phasique afin d'améliorer le transfert de phase. Cependant, dans ces conditions et malgré le chauffage à 100 °C, aucune conversion n'a été observée. Lors de l'essai **3**, du KBr a été rajouté au mélange Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, dans le dioxane. Le KBr a pour intérêt de s'échanger avec l'halogénure ou dans ce cas le triflate lors de l'étape de transmétallation, et de favoriser l'étape d'élimination réductrice<sup>158</sup>. Cependant, ces conditions n'ont pas non plus permis d'observer une conversion du produit de départ.

Les meilleures conditions ont été obtenues pour l'essai **6** (**Tableau 8**), en utilisant le Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> comme catalyseur, et une solution à 2 M de carbonate de potassium comme base dans un mélange 1 / 1 toluène / éthanol avec un chauffage à 70 °C pendant 5 h. Les quatre fluoropyridines (**30-33**) ont ainsi pu être isolées, après purification par chromatographie et trituration dans un mélange de diéthyle éther / éthanol (pour enlever l'oxyde de triphénylphosphine formé au cours de la réaction et co-migrant avec les produits au cours de la chromatographie) et avec des rendements variant de 26 à 82 % et une pureté supérieure à 96 % (déterminée par HPLC).



Essai	Catalyseur	Base	Solvant	Température	Additifs	Résultats
1	PdCl <sub>2</sub> (PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	DMF	110 °C	/	Dégradation
2	Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub>	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Dioxane / Eau	90 °C	/	Dégradation
3	Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub>	K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Dioxane	90 °C	KBr	Pas de conversion
4	PdCl <sub>2</sub> (dppf) <sub>2</sub>	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	DMF / eau	90 °C	/	Dégradation
5	Pd(dba) <sub>2</sub>	Et <sub>3</sub> N	Dioxane / Eau	100 °C	TBAI, dppf	Pas de conversion
6	Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub>	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> aq 2 M	Toluène / Ethanol	70 °C	/	100 % de conversion

**Tableau 8 :** Conditions de couplage de Suzuki testées pour la préparation de **32**.

### 1.2.2. Evaluations physico-chimique et pharmacologique *in vitro*.

Les propriétés pharmacologiques (affinité pour la TSPO et sélectivité versus CBR) et physico-chimiques (LogD<sub>7,4</sub>) des quatre analogues fluoropyridines **30-33** ont été déterminées et comparées à celles de **F-DPA**.

Ligand	TSPO <sup>a</sup> K <sub>i</sub> (nM)	CBR % inhib. <sup>b</sup> 1 μM	LogD <sub>7,4</sub> <sup>c</sup>
<b>F-DPA</b>	1,7	0 %	3,07
<b>30</b>	2,6	0 %	2,37
<b>31</b>	1,2	0 %	2,89
<b>32</b>	30	0 %	2,18
<b>33</b>	58	0 %	1,69

<sup>a</sup> Valeur déterminée en utilisant des homogénats de membranes de cœur de rat en présence de [<sup>3</sup>H]PK11195 (K<sub>d</sub> = 1,8 nM, c = 0,2 nM). <sup>b</sup> Valeur déterminée en utilisant des homogénats de cortex cérébral de rat et exprimée en % d'inhibition à 1 μM contre du [<sup>3</sup>H]flunitrazepam (K<sub>d</sub> = 2,1 nM, c = 0,4 nM). <sup>c</sup> Valeur déterminée en convertissant le temps de rétention des analogues testés en utilisant une méthode HPLC validée et standardisée.

**Tableau 9 :** Détermination *in vitro* de l'affinité, de la sélectivité et de la lipophilie des analogues **30-33**, et du composé de référence **F-DPA**.

Les résultats présentés dans le **Tableau 9** indiquent que les valeurs d'affinités pour la TSPO (K<sub>i</sub>) des dérivés **30-33** sont comprises entre 1,2 et 58 nM. Deux dérivés, **30** et **31**, présentent des valeurs de K<sub>i</sub> de l'ordre du nanomolaire (respectivement 2,6 et 1,2 nM), comparables à celle obtenue pour **F-DPA** (1,7 nM) ; ce sont les dérivés comportant le fluor en position *mé*ta du cycle



pyridine. De façon surprenante, le composé **32**, le plus proche structurellement de **F-DPA** présente un  $K_i$  de 30 nM. La tendance générale, laisse à penser que la position du fluor sur le noyau phényle importe moins que la position de l'atome d'azote. Il semblerait en effet que l'azote en position *mé*ta induise une interaction stérique défavorable au sein de la poche de liaison de la protéine ( $K_i$  de **32** et **33** = 30 nM et 58 nM), ce qui ne semble pas être le cas lorsqu'il est en *ortho* ou en *para* (**31**, **30** respectivement)

Les valeurs de  $\log D_{7,4}$  des quatre nouveaux dérivés (**30-33**) sont comprises entre 2,89 et 1,69 et sont légèrement inférieures à celle de **F-DPA** (3,07) ; ce qui est cohérent avec le fait que l'on ait rajouté un hétéroatome sur la structure. Ces valeurs sont légèrement inférieures à celles préconisées ( $3 < \log D_{7,4} < 4$ ) pour une pénétration optimale de la barrière hématoencéphalique.

### 1.2.3. Stabilité microsomale.

La stabilité métabolique microsomale *in vitro* des deux analogues présentant une affinité pour la TSPO ( $K_i$ ) inférieure à 3,0 nM a été évaluée en utilisant des microsomes hépatiques issus de trois espèces différentes : homme, rat et souris (**Tableau 10**).

Composé	Clairance intrinsèque (InC, $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ protéine) <sup>a</sup>		
	Homme	Rat	Souris
<b>F-DPA</b>	178	>1000	726
<b>30</b>	68	584	205
<b>31</b>	137	237	540

<sup>a</sup> Clairance intrinsèque, exprimée en  $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$  protéine, reflète le taux de biotransformations du composé.

**Tableau 10** : Evaluation de la clairance intrinsèque des analogues **30** et **31**, et du composé de référence **F-DPA**.

Les deux composés testés (**30** et **31**) sont plus rapidement métabolisés en présence de microsomes de rongeurs qu'en présence de microsomes humains. Par ailleurs, en présence de microsomes humains, le composé **30** est légèrement plus stable que **31** (68  $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$  protéine contre 137). On constate également que les dérivés **30** et **31** sont plus stables que **F-DPA** chez les trois espèces.

### 1.2.4. Synthèse des précurseurs de marquage.

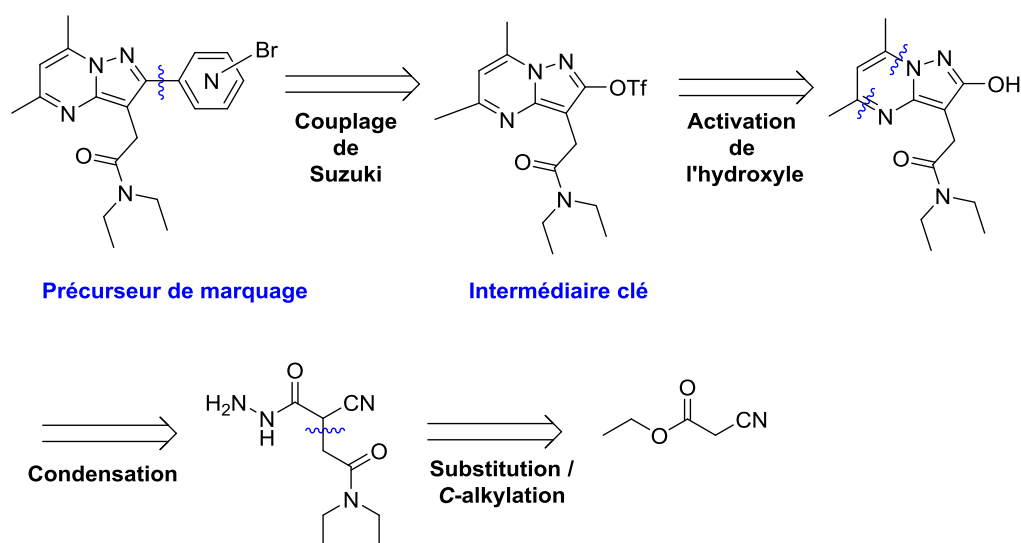
Les données physico-chimiques et pharmacologiques des analogues FPy-DPA montrent que **30** et **31** présentent une bonne affinité et sélectivité pour la TSPO. Il a donc été entrepris de synthétiser les précurseurs de marquage de chacun de ces deux dérivés.

Pour rappel, un précurseur de marquage au fluor-18 est une molécule capable d'incorporer un atome de fluor-18 dans sa structure de préférence en une seule étape de radiosynthèse. La molécule radiomarquée possède une structure identique à celle de la version non radioactive, communément désignée par l'appellation « référence froide », à la différence près que l'atome de

fluor est radioactif. On souhaite ici incorporer un atome de fluor-18 sur une pyridine. Il a donc été choisi de préparer un précurseur comportant un brome comme groupe partant.

- Analyse rétrosynthétique.

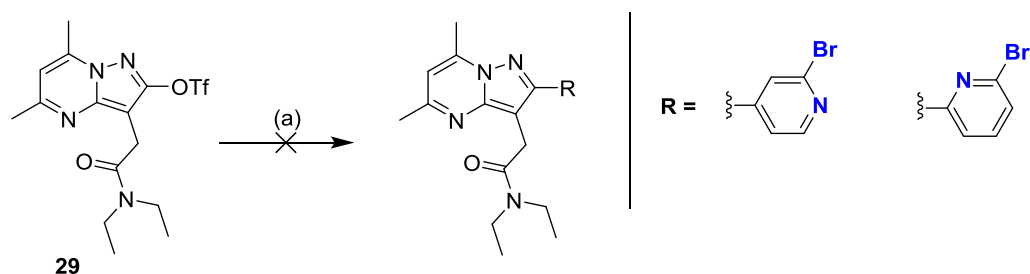
Sur la base des résultats positifs obtenus pour les dérivés fluorés, la même stratégie a été appliquée pour la synthèse des précurseurs de marquage de [ $^{18}\text{F}$ ]-**30** et [ $^{18}\text{F}$ ]-**31**, à l'exception de l'étape finale qui est dans ce cas l'introduction d'une bromopyridine et non d'une fluoropyridine (**Schéma 34**). Il aurait été préférable de choisir un précurseur comportant une fonction nitro ou un ammonium quaternaire comme groupe partant, cependant les acides boroniques correspondant n'étaient pas commerciaux, et pas forcément faciles d'accès d'un point de vue synthétique.



**Schéma 34** : Rétrosynthèse des précurseurs de marquage de [ $^{18}\text{F}$ ]**30** et [ $^{18}\text{F}$ ]**31**.

- Résultats obtenus pour la synthèse des deux dérivés bromés en tant que précurseurs de marquage.

Les quatre premières étapes permettant la préparation du triflate **29** ont déjà été détaillées dans le **Schéma 33**, et ne seront pas commentées à nouveau dans cette partie.



**Réactif et conditions** : (a) ester 2-bromopyridine-4-boronique pinacol ou acide 6-bromopyridine-2-boronique respectivement, aq. 2 M  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ , toluène / éthanol (50 : 50, v : v), 70 °C, 5 h à 24 h.

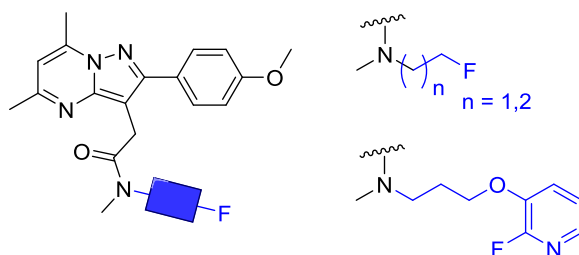
**Schéma 35** : Tentative de synthèse des précurseurs de marquage bromés.

A partir des conditions de couplage mises au point précédemment (**Tableau 8**, essai 6), un couplage de Suzuki a été réalisé entre le triflate **29**, l'ester 2-bromopyridine-4-boronique pinacol

ou l'acide 6-bromopyridine-2-boronique en présence de  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ , d'une solution aqueuse à 2 M de carbonate de potassium dans un mélange 1/1 éthanol/toluène à 70 °C (**Schéma 35**). Cependant, avec les pyridines bromées, aucune conversion du triflate n'a été observée. Une explication possible peut être que l'acide 6-bromopyridine-2-boronique ou l'ester 2-bromopyridine-4-boronique pinacol réagissent sur eux-mêmes du fait de la présence du brome et de la fonction acide ou ester boronique sur la même structure. Par manque de temps, d'autres conditions de couplage n'ont pas pu être essayées et à ce stade, les deux précurseurs souhaités n'ont pas pu être obtenus.

### 1.3 Analogues de DPA-713 modifiés au niveau de l'amide (Projet C).

Ce projet, pour rappel, vise aussi à surmonter les problèmes de stabilité métabolique observées pour  $[^{18}\text{F}]\text{DPA-714}$ , mais aussi pallier à la période courte du carbone-11 ( $[^{11}\text{C}]\text{DPA-713}$ ), en proposant des dérivés fluorés au niveau de la fonction amide de **DPA-713**. Les structures des trois composés visés sont présentées dans la **Figure 41**.



**Figure 41** : Structures des molécules ciblées.

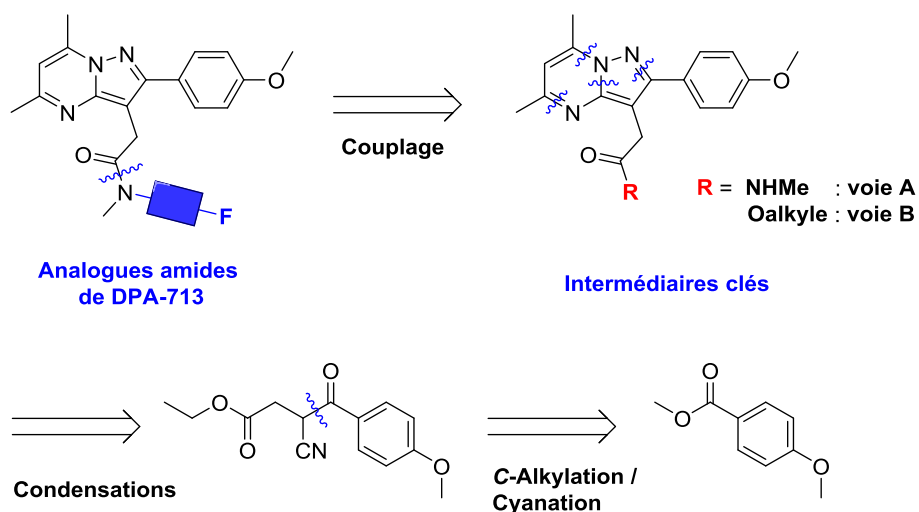
#### 1.3.1. Synthèse.

- Analyse rétrosynthétique.

Pour ces dérivés, on cherche à faire varier la fonction amide en introduisant différents groupements fluorés sélectionnés (fluoroéthyle, fluoropropyle et « fluoropyridine »). Afin d'avoir une synthèse convergente, il faudrait donc introduire ces modifications lors de la dernière étape de la séquence réactionnelle. Pour cela, plusieurs options sont possibles.

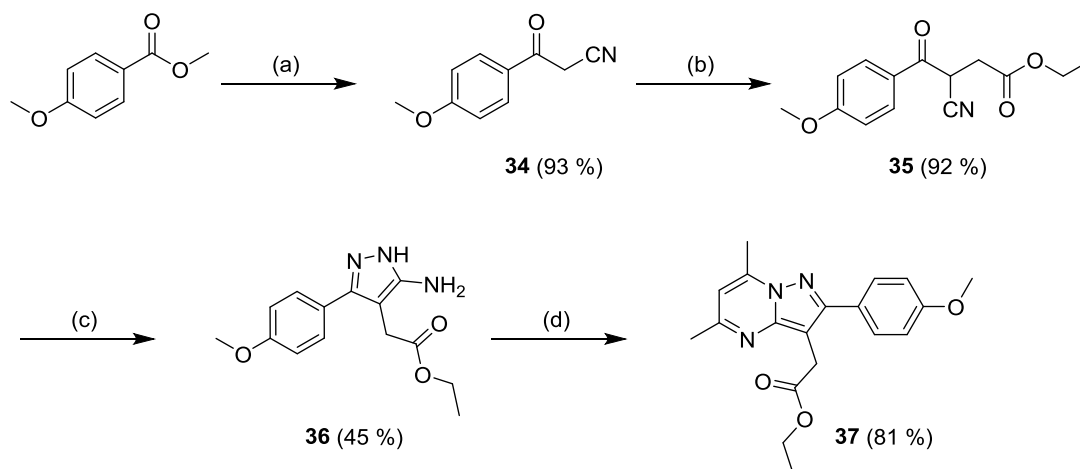
Une première méthode (**Schéma 36**, voie A) consiste à synthétiser un intermédiaire méthyle amide secondaire permettant de réaliser une *N*-alkylation pour introduire les chaînes fluorées. Cependant cette méthode ne sera pas retenue. Elle a en effet été tentée sur les dérivés de la famille des pyridazino-indoles (paragraphe **2.2.1**) et il a été montré que la *N*-alkylation n'est pas favorable sur ce type de motif acétamide, du fait de la compétition entre le proton de l'azote et les protons du  $\text{CH}_2$  en  $\alpha$  du carbonyle.

Une seconde méthode consiste à passer par un intermédiaire ester (**Schéma 36**, voie B), à partir duquel les amides souhaités pourraient être obtenus par une réaction de transamidation, ou par couplage après saponification de l'ester.

Schéma 36 : Rétrosynthèse des analogues amides de **DPA-713**.

### 1.3.1.a. Synthèse des dérivés fluoroéthyle et fluoropropyle.

L'ester éthylique **37**, un des intermédiaires clés de la synthèse, peut être obtenu par une séquence réactionnelle de cinq étapes (**Schéma 37**).



**Réactifs et conditions :** (a) i) *n*-BuLi 2,5 M dans l'hexane, CH<sub>3</sub>CN, THF anh., -60 °C, 1 h, puis ii) 4-méthoxybenzoate de méthyle, THF anh., -50 °C à -30 °C, 5 h ; (b) bromoacétate d'éthyle, NaOH, NaI, éthanol, t.a., 24 h ; (c) monohydrate d'hydrazine, acide acétique, éthanol, 80 °C, 7 h ; (d) acétylacétone, éthanol, reflux, 3 h.

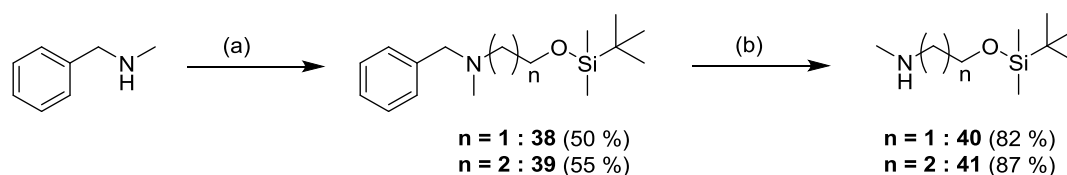
Schéma 37 : Synthèse de l'intermédiaire ester éthylique **37**.

La première étape de la séquence réactionnelle a consisté à introduire une fonction nitrile en remplacement de l'ester du 4-méthoxybenzoate de méthyle avec la méthode décrite précédemment (paragraphe 1.1.1) en employant du *n*-BuLi dans de l'acétonitrile à -60 °C. Le 1,3-cétonitrile **34**, obtenu de manière quasi quantitative (93 %), a ensuite été engagé dans une réaction de C-alkylation avec le bromoacétate d'éthyle en présence d'iodure de sodium, d'hydroxyde de sodium dans l'éthanol à température ambiante pour donner **35** avec un excellent rendement de 92 %. Cet intermédiaire a été soumis à une première condensation avec du

monohydrate d'hydrazine à 80 °C dans un mélange acide acétique/éthanol pour former l'aminopyrazole **36** avec 45 % de rendement. Une seconde condensation avec l'acétylacétone a été réalisée sur **36** permettant d'obtenir l'ester **37** avec un bon rendement de 81 %.

Les trois dérivés souhaités sont des analogues de **DPA-713** pour lesquels la fonction *N,N*-diéthylacétamide a été remplacée par les motifs *N*-méthyle-*N*-fluoroéthyle, *N*-méthyle-*N*-fluoropropyle, et 1-propanamine-3-[(2-fluoro-3-pyridinyl)oxy]-*N*-méthyle. Pour ce faire, les trois amines correspondantes ont dû être synthétisées.

Dans le cas des dérivés *N*-méthyle-*N*-fluoroéthyle, *N*-méthyle-*N*-fluoropropyle, les amines fluorées correspondantes sont des synthons très volatiles. Une réaction de transamidation entre ces amines et l'ester **37** n'est donc pas envisageable. Il a été choisi de passer par une voie alternative faisant intervenir un couplage entre l'acide carboxylique correspondant à l'ester **37** et des intermédiaires plus lourds et moins volatils (avec une fonction alcool protégée, **40** et **41**), permettant d'accéder aux amides fluorés désirés. Les amines **40** et **41** ont ainsi été synthétisées en deux étapes décrites dans le **Schéma 38**.



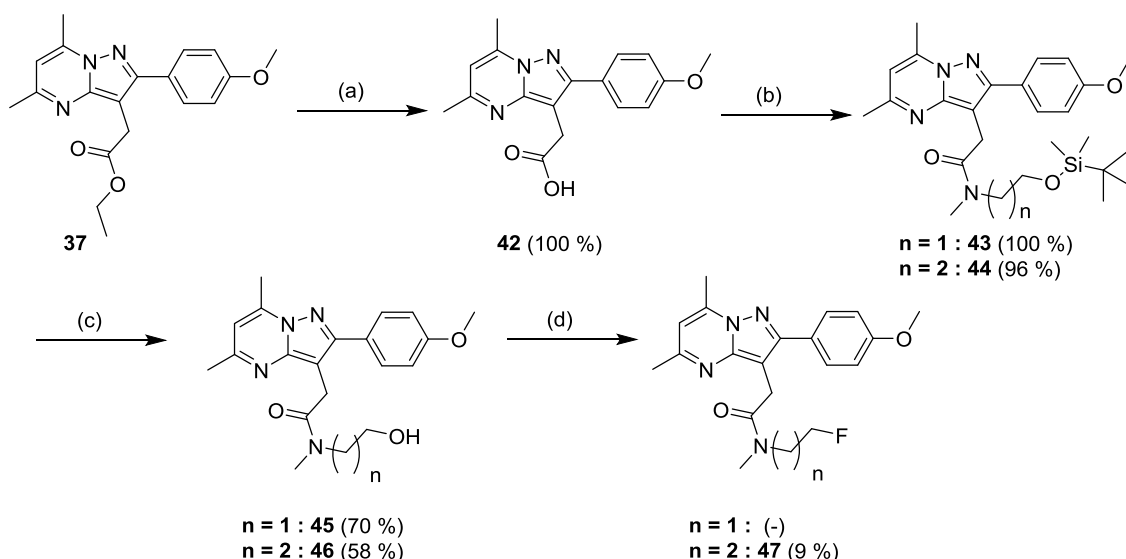
**Réactifs et conditions :** (a) i) NaH, DMF, t.a., 30 min, puis ii) (2-bromoéthoxy)(*tert*-butyl)diméthylsilane, ( $n = 1$ ) ou (2-bromopropoxy)(*tert*-butyl)diméthylsilane ( $n = 2$ ), t.a., 2 h ; (b) Pd/C 10 % 1 atm, H<sub>2</sub>, méthanol, t.a., 4 h.

**Schéma 38 :** Synthèse des amines **40** et **41**.

La *N*-méthylbenzylamine a été *N*-alkylée respectivement avec le (2-bromoéthoxy)(*tert*-butyl)diméthylsilane et le (2-bromopropoxy)(*tert*-butyl)diméthylsilane en présence d'hydrure de sodium dans du *N,N*-diméthylformamide à température ambiante pour former, au bout de 2 h, les intermédiaires **38** et **39** avec des rendements respectifs de 50 et 55 %. Le groupement benzyle a ensuite été retiré par une hydrogénolyse catalytique dans du méthanol pour donner les *N*-méthylamines *O*-silylées **40** et **41** avec des rendements respectifs de 82 et 87 %.

Dans le but de réaliser un couplage, l'ester **37** a été saponifié en présence d'hydroxyde de potassium pour donner quantitativement l'acide carboxylique **42** (**Schéma 39**).

Le couplage a ensuite été réalisé en présence de TBTU comme agent de couplage et de triéthylamine comme base, dans le dichlorométhane à température ambiante. Avec ces conditions, les composés couplés **43** et **44** ont été obtenus de manière quasi quantitative (respectivement 100 % et 96 %). La fonction hydroxyle a ensuite été déprotégée par une solution 1 M de TBAF dans le tétrahydrofurane pour donner les alcools correspondants **45** et **46** avec 70 et 58 % de rendement. Ces derniers ont été soumis à une réaction de fluorodéoxygénation en présence de Déoxo-Fluor<sup>®</sup> dans le dichlorométhane à 0 °C. Seul le dérivé fluoropropyle **47** a pu être obtenu avec un faible rendement de 9 %. Une forte dégradation a été observée au cours de la réaction de fluorodéoxygénation pour le dérivé fluoroéthyle, qui n'a pas pu être isolé (**Schéma 39**).

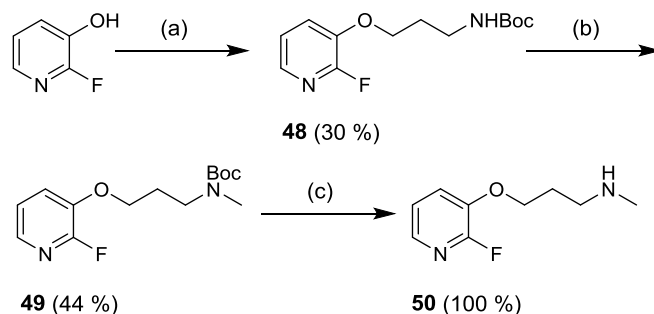


**Réactifs et conditions :** (a) KOH, méthanol, 40 °C, 5 h ; (b) **40** ou **41**, TBTU, DIPEA, DCM, t.a., 1 nuit ; (c) TBAF 1 M dans le THF, THF, t.a., 1 nuit ; (d) Déoxo-Fluor<sup>®</sup>, DCM, 0 °C, 30 min.

**Schéma 39 :** Synthèse des analogues fluoroéthyle et fluoropropyle amides.

### 1.3.1.b. Synthèse du dérivé « fluoropyridine ».

Le dernier dérivé de cette série a lui aussi été obtenu grâce à un couplage entre l'acide **42** et une amine comportant directement l'atome de fluor sur la pyridine. Cette fluoropyridine a été synthétisée en trois étapes à partir de la 2-fluoro-3-hydroxypyridine commerciale (**Schéma 40**).

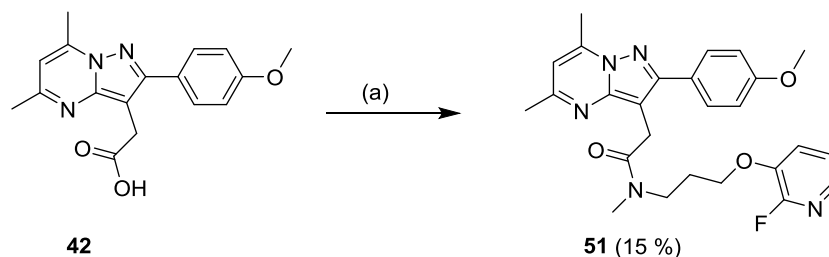


**Réactifs et conditions :** (a) 3-(Boc-amino)1-propanol, triphénylphosphine, DIAD, THF, t.a., 5 h ; (b) i) NaH, DMF, 0 °C, 30 min, puis ii) MeI 2 M dans le TBME, t.a., 1 nuit ; (c) TFA, DCM, t.a., 3 h.

**Schéma 40 :** Synthèse de la fluoropyridine **50**.

La 2-fluoro-3-hydroxypyridine a été soumise à un couplage de Mitsunobu avec le 3-(Boc-amino)propan-1-ol en présence de diisoprylazodiformate (DIAD) et de triphénylphosphine pour conduire au produit de couplage **48** avec un rendement de 30 %. Cet intermédiaire a ensuite été engagé dans une réaction de méthylation de la fonction NHBoc. Cette réaction a été réalisée en utilisant de l'hydruide de sodium comme base forte et de l'iodure de méthyle comme agent de méthylation. L'amine méthyliée correspondante **49** a été obtenue avec 44 % de rendement. Enfin, la protection Boc a été enlevée quantitativement en présence d'acide trifluoroacétique dans du dichlorométhane pour donner **50**.

La fluoropyridine **50** a ensuite été engagée dans un couplage dans les mêmes conditions que décrites précédemment pour former **51** avec 15 % de rendement (**Schéma 41**).



Réactifs et conditions : (a) **50**, TBTU, DIPEA, DCM, t.a., 5 h.

**Schéma 41** : Préparation du dérivé « fluoropropyl » **51** par couplage entre **42** et **50**.

### 1.3.2. Evaluations physico-chimique et pharmacologique *in vitro*.

Les propriétés pharmacologiques (affinité pour la TSPO et sélectivité versus CBR) et physico-chimiques ( $\text{LogD}_{7,4}$ ) des deux analogues **47** et **51** ont été déterminées et comparées à celles de **DPA-714** (**Tableau 11**). **DPA-713** n'ayant pas été évalué dans le même test que les autres composés, il ne peut pas servir de référence.

Ligand	TSPO <sup>a</sup> K <sub>i</sub> (nM)	CBR % inhib. <sup>b</sup> 1μM	LogD <sub>7,4</sub> <sup>c</sup>
<b>DPA-714</b>	0,91	0 %	2,89
<b>47</b>	1,9	4 %	2,47
<b>51</b>	36	0 %	3,07

<sup>a</sup> Valeur déterminée en utilisant des homogénats de membranes de cœur de rat en présence de [<sup>3</sup>H]PK11195 (K<sub>d</sub> = 1,8 nM, c = 0,2 nM). <sup>b</sup> Valeur déterminée en utilisant des homogénats de cortex cérébral de rat et exprimée en % d'inhibition à 1 μM contre du [<sup>3</sup>H]flunitrazepam (K<sub>d</sub> = 2,1 nM, c = 0,4 nM). <sup>c</sup> Valeur déterminée en convertissant le temps de rétention des analogues testés en utilisant une méthode HPLC validée et standardisée.

**Tableau 11** : Détermination *in vitro* de l'affinité, de la sélectivité et de la lipophilie des analogues **47** et **51**, et du composé de référence **DPA-714**.

Les résultats indiquent que le dérivé fluoropropyle **47** possède une affinité pour la TSPO proche de celle de **DPA-714** (1,9 nM contre 0,91) cependant, ce composé est légèrement moins sélectif que **DPA-714**, avec un pourcentage d'inhibition des CBR à 1 μM de 4 % contre 0 % pour le composé de référence. En revanche, une diminution de l'affinité est observée lors de l'introduction du motif fluoropyridine pour le dérivé **51** (K<sub>i</sub> = 36 nM) qui est quant à lui sélectif de la TSPO (0 % d'inhibition pour les CBR). Le motif fluoropyridine a cependant l'avantage d'apporter de la lipophilie à la structure, donnant un log D<sub>7,4</sub> de 3,07 compatible avec une bonne pénétration de la barrière hématoencéphalique.

### 1.3.3. Stabilité microsomale.

La stabilité métabolique microsomale *in vitro* de **47** a été évaluée en utilisant des microsomes hépatiques issus de trois espèces différentes : homme, rat et souris. La stabilité microsomale de

**DPA-713** n'ayant pas été déterminée par le même test que le nouveau dérivé, il a été choisi de comparer les résultats obtenus à ceux de **DPA-714**.

Composé	Clairance intrinsèque (InC, $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ protéine) <sup>a</sup>		
	Homme	Rat	Souris
<b>DPA-714</b>	68	> 1000	408
<b>47</b>	57	> 1000	608

<sup>a</sup> Clairance intrinsèque, exprimée en  $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$  protéine, reflète le taux de biotransformations du composé.

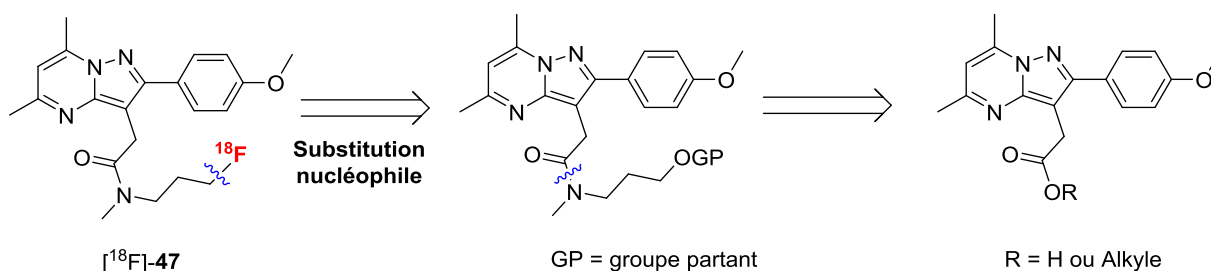
**Tableau 12** : Evaluation de la clairance intrinsèque de l'analogue **47**, et du composé de référence **DPA-714**.

Les résultats présentés dans le **Tableau 12** montrent que le dérivé **47** est métabolisé de manière très semblable à **DPA-714**. Ils sont tous deux plus rapidement métabolisés en présence de microsomes de rongeurs (> 1000  $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$  protéine pour le rat et respectivement 408 et 608  $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$  protéine pour **DPA-714** et **47** chez la souris) qu'en présence de microsomes humains. Par ailleurs, en présence de microsomes humains, le composé **47** a une valeur de clairance intrinsèque comparable à celle de **DPA-714** (57  $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$  protéine contre 68 pour **DPA-714**).

### 1.3.4. Synthèse des précurseurs de marquage.

- Analyse rétrosynthétique.

Le marquage de [<sup>18</sup>F]-**47** s'effectuera par substitution nucléophile aliphatique et à ce titre, la préparation d'un précurseur de marquage portant un groupement partant ad-hoc sur le carbone à radiofluorer a été envisagée (**Schéma 42**).



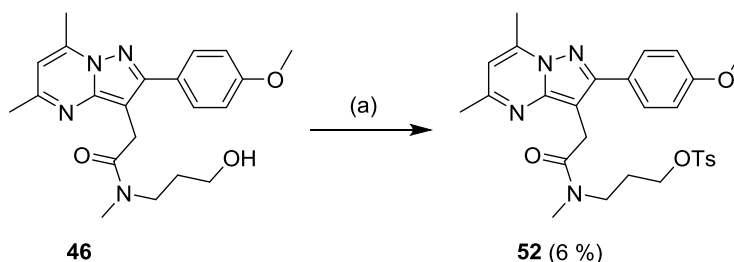
**Schéma 42** : Rétrosynthèse du précurseur de marquage **52**.

- Résultats obtenus pour la synthèse du précurseur de marquage de [<sup>18</sup>F]-**47**.

Le choix du groupe partant du précurseur de marquage s'est porté sur un groupement tosylate car celui-ci est assez largement utilisé en radiochimie pour ce type de radiofluoration. La stratégie de synthèse de ce précurseur de marquage tosylé a été envisagée de façon analogue à celle utilisée pour la synthèse des analogues fluoroéthyle et fluoropropyle des dérivés de **DPA-713** (**Schéma 43**), à l'exception de l'étape finale qui est dans ce cas est une réaction de tosylation. Cette dernière étape peut s'effectuée à partir de l'alcool **46** dont la synthèse a déjà été présentée dans le



**Schéma 43.** Une fois préparé, cet alcool a été soumis à un traitement par du chlorure de tosylate dans la pyridine à 0 °C pendant une heure puis à température ambiante pendant une nuit. Le tosylate **52** a ainsi été obtenu avec un faible rendement de 6 % (**Schéma 43**). Ce mauvais rendement peut s'expliquer par une potentielle cyclisation intramoléculaire par attaque d'un carbanion formé en  $\alpha$  du carbonyle du composé **52**, sur le carbone portant le groupement tosylate. Cela ne semble pas être la seule explication puisque le produit de cyclisation n'a pas pu être isolé, et que le contrôle de la réaction par CCM indique plutôt une dégradation du composé. La quantité de précurseur tosylé obtenue a cependant été suffisante pour entreprendre quelques essais de radiomarquage au fluor-18.

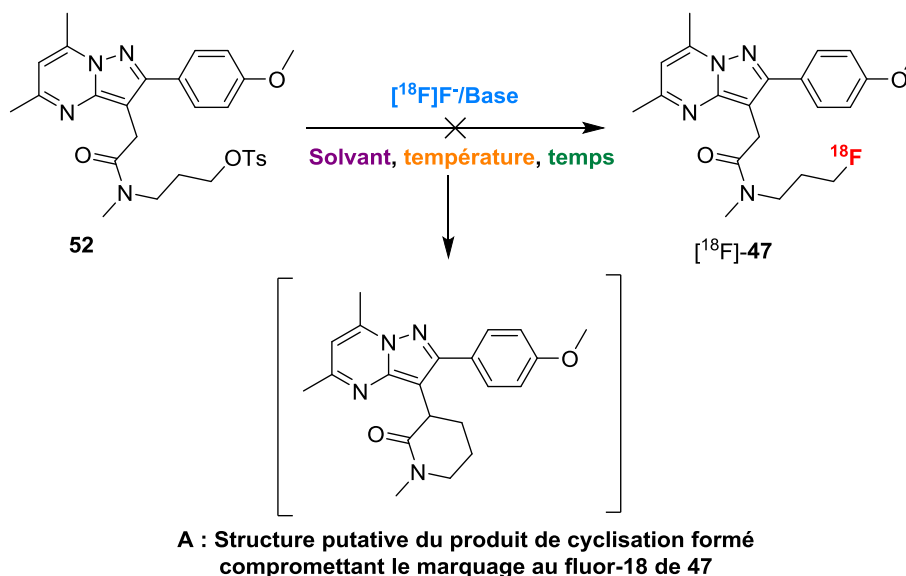


**Réactifs et conditions :** (a) TsCl, pyridine, 0 °C à t.a., 1 nuit.

**Schéma 43 :** Synthèse du précurseur de marquage tosylé **52**.

### 1.3.5. Radiomarquage au fluor-18 de **47**.

Des tentatives de radiomarquage pour obtenir [ $^{18}\text{F}$ ]-**47** ont été effectuées à partir du précurseur **52** comme présentées dans le **Schéma 44** et le **Tableau 9**.



**Schéma 44 :** Tentatives de radiosynthèse de [ $^{18}\text{F}$ ]-**47**.

Des conditions assez classiques, basiques et relativement dures ont été envisagées dans un premier temps, en utilisant des bases telles que  $\text{K}_2\text{CO}_3$  ou  $\text{TBAHCO}_3$  dans le diméthylsulfoxyde à 120 °C pendant 5 à 10 minutes (essais 1, 2 et 3, **Tableau 13**). Ces conditions ont conduit à une dégradation partielle du précurseur, ce qui peut s'expliquer par le fait que dans de telles conditions, une déprotonation en  $\alpha$  du carbonyle peut avoir lieu, induisant probablement une

cyclisation intramoléculaire conduisant au produit A du **Schéma 44**. Des conditions plus douces ont donc été testées, en utilisant de l'oxalate de potassium comme base dans l'acétonitrile à 120 °C pendant 10 minutes (essai 4, **Tableau 13**). Cette fois encore, une dégradation du précurseur a été observée. Une dernière tentative a été réalisée en présence d'iodure de potassium dans l'acétonitrile à 80 °C pendant 20 minutes (essai 5, **Tableau 13**). Cependant, ces conditions semblent trop douces, car aucune réaction n'a été observée.

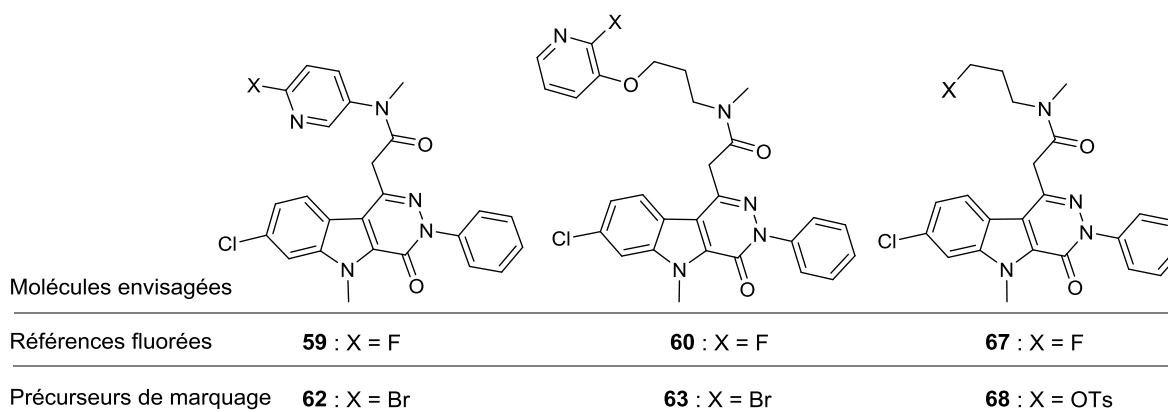
Essai	[ <sup>18</sup> F]F <sup>-</sup> /Base	Solvant	Température	Temps	Résultats
1	K[ <sup>18</sup> F]F / K <sub>222</sub> , K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	DMSO	120 °C	5 min	Dégradation du précurseur
2	K[ <sup>18</sup> F]F / K <sub>222</sub> , K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	DMSO	120 °C	10 min	Dégradation du précurseur
3	[ <sup>18</sup> F]F <sup>-</sup> / TBAHCO <sub>3</sub>	DMSO	120 °C	10 min	Dégradation du précurseur
4	[ <sup>18</sup> F]F / K <sub>222</sub> , (COOK) <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CN	120 °C	10 min	Dégradation du précurseur
5	K[ <sup>18</sup> F]F / K <sub>222</sub> , KI	CH <sub>3</sub> CN	80 °C	20 min	Pas de réaction

**Tableau 13** : Conditions de radiomarquage essayées pour la préparation de [<sup>18</sup>F]-47.

Aucune des conditions testées n'a permis d'obtenir le composé radiomarqué [<sup>18</sup>F]-47.

## 2. Dérivés pyridazino[4,5-*b*]indole acétamides (Projet D).

Différentes modifications ont été envisagées au niveau de la fonction *N,N*-diméthylacétamide initiale de **SSR180575**. L'objectif est de conserver un méthyle en place, et d'introduire différents groupements fluorés à la place du second méthyle. Ces groupements ont été sélectionnés de façon à permettre une incorporation « facilitée » du fluor-18 lors du radiomarquage. Les structures envisagées ainsi que celles de leurs précurseurs de marquages respectifs sont présentés dans la **Figure 42**.



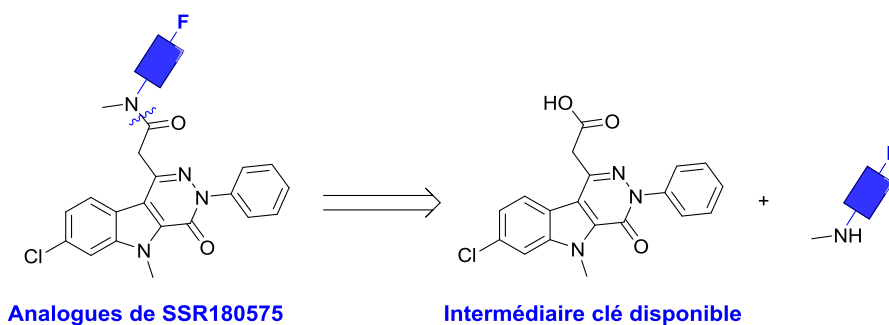
**Figure 42** : Structures des analogues de **SSR180575** envisagés (références et précurseurs de marquage).

## 2.1. Analogues « fluoropyridines » de SSR180575.

### 2.1.1. Synthèse.

- Analyse rétrosynthétique.

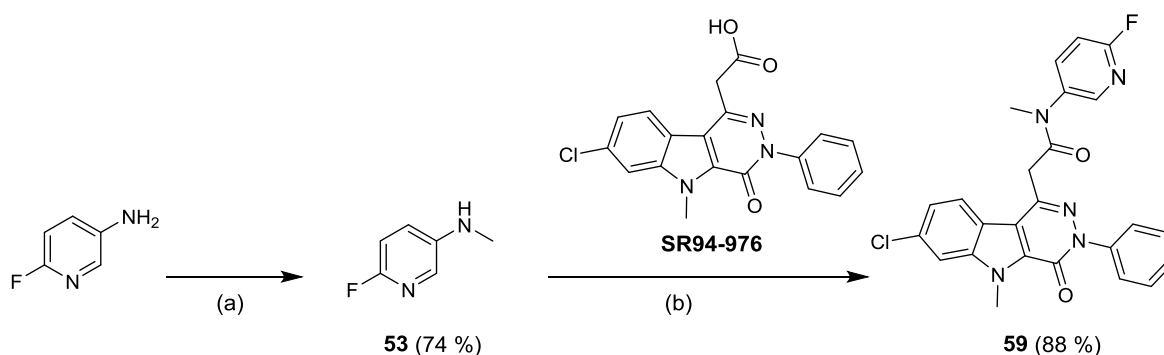
L'analyse rétrosynthétique des analogues de **SSR180575** est similaire à celle des analogues de **DPA-713** modifiés au niveau de la fonction amide. Elle fait en effet apparaître un acide carboxylique comme intermédiaire clé (**Schéma 45**), à partir duquel on peut, par couplage, obtenir les amides souhaités. Cet acide nous a par ailleurs été fourni en grande quantité par une équipe partenaire chez Sanofi.



**Schéma 45** : Rétrosynthèse des analogues fluorés de **SSR180575**.

#### 2.1.1.a. Synthèse du dérivé *FPy*-SSR180575 (**59**).

La synthèse du premier dérivé (**59**) s'est effectuée en deux étapes décrites dans le **Schéma 46**.



**Réactifs et conditions** : (a) i) NaOMe, paraformaldéhyde, méthanol, 5 h, t.a., puis ii) NaBH<sub>4</sub>, 3 h, reflux ; (b) TBTU, DIPEA, DMF, t.a., 24 h.

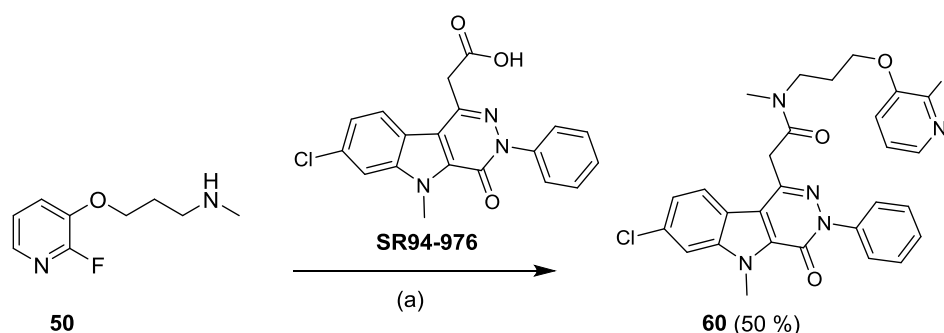
**Schéma 46** : Synthèse du dérivé **59**.

Dans un premier temps, une mono-méthylation par amination réductrice de la 5-amino-2-fluoropyridine a été réalisée en présence de méthanolate de sodium et de paraformaldéhyde pour former *in situ* l'imine correspondante, qui a ensuite été réduite par le borohydrure de sodium à reflux<sup>159</sup>. Grâce à cette méthode, seul le produit mono-méthylé est formé, donnant alors **53** avec un rendement de 74 %. D'autres réactifs auraient pu être utilisés, tel que l'iodure de méthyle, mais ce choix aurait nécessité de protéger l'aniline par un Boc par exemple, afin d'éviter la formation du dérivé diméthylé. Cette amine **53** est ensuite couplée à l'acide 2-(7-chloro-5-

méthyl-4-oxo-3-phenyl-4,5-dihydro-3H-pyridazino[4,5-b]indol-1-yl)acétique, codé **SR94-976**, en présence de TBTU et de DIPEA dans du *N,N*-diméthylformamide à température ambiante. Le composé désiré, **59**, est obtenu avec 88 % de rendement.

### 2.1.1.b. Synthèse du dérivé *FPy-OP-SSR180575* (**60**).

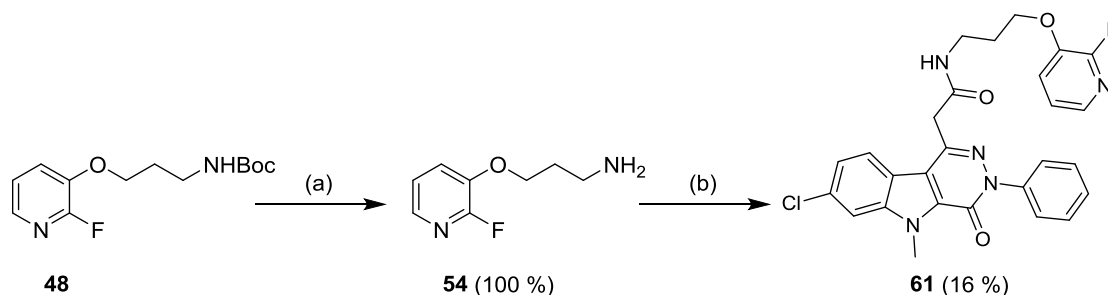
Le second dérivé, dans lequel la fluoropyridine est liée à l'amide *via* un espaceur (chaîne propyle), a été synthétisé en une étape en couplant l'amine **50** (dont la synthèse a été détaillée dans le **Schéma 40**) et l'acide **SR94-976** dans les conditions de couplage décrites précédemment. Le dérivé **60** a ainsi pu être obtenu avec 50 % de rendement (**Schéma 47**).



Réactifs et conditions : (a) TBTU, DIPEA, DMF, t.a., 24 h.

Schéma 47 : Synthèse de l'analogue **60**.

Un troisième composé, non envisagé initialement, a pu être généré en deux étapes grâce à l'intermédiaire **48** issu de la synthèse de l'amine **50**. Il s'agit de la version non-méthylée de **60**. Ce composé a également été synthétisé de manière opportuniste et de façon à évaluer l'influence de la présence du substituant *N*-méthyle de la fonction amide sur l'affinité du composé pour la TSPO, par comparaison avec le composé **60**.



Réactifs et conditions : (a) TFA, DCM, t.a., 1 nuit ; (b) **SR94-976** (acide 2-(7-chloro-5-méthyl-4-oxo-3-phenyl-4,5-dihydro-3H-pyridazino[4,5-b]indol-1-yl)acétique), TBTU, DIPEA, DMF, t.a., 24 h.

Schéma 48 : Synthèse de l'analogue **61**.

En déprotégeant la fonction Boc de l'intermédiaire **48** avec de l'acide trifluoroacétique dans du dichlorométhane à température ambiante, l'amine primaire **54** a pu être obtenue quantitativement. Cette amine a ensuite été couplée à l'acide **SR94-976** pour former l'analogue **61** avec un faible rendement de 16 % (**Schéma 48**).

### 2.1.2. Evaluations physico-chimique et pharmacologique *in vitro*.

Les propriétés pharmacologiques (affinité pour la TSPO et sélectivité versus CBR) et physico-chimiques ( $\text{LogD}_{7,4}$ ) des trois analogues **59**, **60** et **61** ont été déterminées et comparées à celles de **SSR180575** (Tableau 14).

Ligand	TSPO <sup>a</sup> K <sub>i</sub> (nM)	CBR % inhib. <sup>b</sup> 1μM	LogD <sub>7,4</sub> <sup>c</sup>
<b>SSR180575</b>	0,83	0 %	2,97
<b>59</b>	0,50	0 %	3,60
<b>60</b>	0,46	1 %	3,60
<b>61</b>	1,7	0 %	3,29

<sup>a</sup> Valeur déterminée en utilisant des homogénats de membranes de cœur de rat en présence de [<sup>3</sup>H]PK11195 (K<sub>d</sub> = 1,8 nM, c = 0,2 nM). <sup>b</sup> Valeur déterminée en utilisant des homogénats de cortex cérébral de rat et exprimée en % d'inhibition à 1 μM contre du [<sup>3</sup>H]flunitrazepam (K<sub>d</sub> = 2,1 nM, c = 0,4 nM). <sup>c</sup> Valeur déterminée en convertissant le temps de rétention des analogues testés en utilisant une méthode HPLC validée et standardisée.

**Tableau 14 :** Détermination *in vitro* de l'affinité, de la sélectivité et de la lipophilie des analogues **59-61**, et du composé de référence **SSR180575**.

Les trois dérivés (**59-61**) ont une très bonne affinité pour la TSPO avec des valeurs de K<sub>i</sub> comprises entre 0,46 et 1,7 nM, tout à fait comparables à celle de **SSR180575** (0,83 nM). On constate cependant que le fait d'avoir une amine secondaire et non tertiaire diminue l'affinité du ligand pour la protéine (1,7 à comparer à 0,46 nM respectivement pour **61** et **60**). Les trois composés synthétisés présentent aussi une excellente sélectivité pour la protéine TSPO, attestée par un pourcentage d'inhibition nul ou négligeable (1 % pour le dérivé **60**) pour les CBR en compétition avec du [<sup>3</sup>H]flunitrazepam à 1 μM.

Les valeurs de  $\text{logD}_{7,4}$  sont en adéquation avec les ordres de grandeur attendus ; on observe une valeur plus faible pour **61** (3,29) que pour **60** (3,60), due au fait que **61** ait un caractère plus hydrophile en raison de la mono-substitution de l'amide. Les valeurs de  $\text{logD}_{7,4}$  mesurées sont plus élevées que celle de **SSR180575** (2,97), ce qui est également cohérent puisque qu'on apporte de la lipophilie en introduisant une chaîne propyle et un motif pyridine comparé aux deux méthyles de **SSR180575**. Par ailleurs, les valeurs obtenues sont toutes trois compatibles avec une pénétration de la barrière hématoencéphalique ( $3 < \text{logD}_{7,4} < 4$ ).

### 2.1.3. Stabilité microsomale.

La stabilité métabolique microsomale *in vitro* des analogues **59** et **60** a été évaluée en utilisant des microsomes hépatiques issus de trois espèces différentes : homme, rat et souris (Tableau 15).

Contrairement au test précédemment effectué pour les analogues de la famille des pyrazolopyrimidines, un pourcentage de biotransformation du composé est mesuré après 20 minutes d'incubation en présence de microsomes. Les résultats montrent que le composé parent **SSR180575** semble stable à 20 minutes vis-à-vis des trois espèces, avec des pourcentages de biotransformation respectivement de 10, 14 et 21 % pour les microsomes d'homme, de rat et de

souris. Les deux nouveaux analogues en revanche semblent fortement biotransformés chez les trois espèces, avec des pourcentages largement supérieurs à 85 %.

Composé	biotransformation (% à 20min) <sup>a</sup>		
	Homme	Rat	Souris
<b>SSR180575</b>	10	14	21
<b>59</b>	96	86	98
<b>60</b>	97	100	100

<sup>a</sup> Incubation de microsomes hépatiques (souris male CD1, rat Sprague-Dawley male, humain (BD pool)) suivi d'une analyse du surnageant par HPLC/ESI-MS/MS.

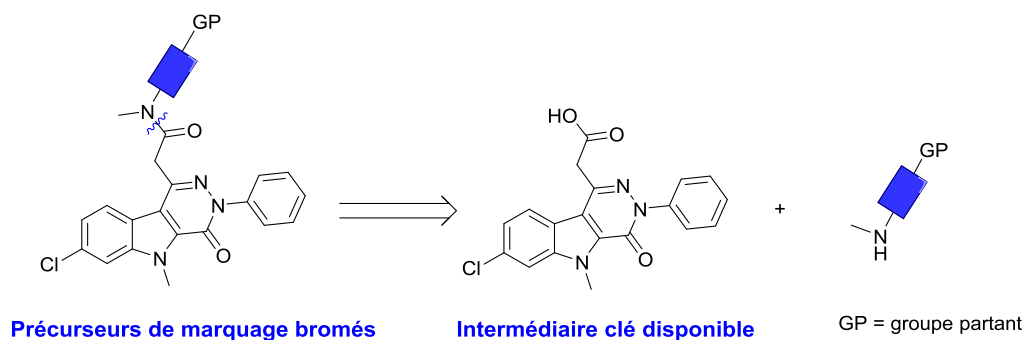
**Tableau 15** : Stabilité microsomale des analogues **59** et **60**, et du composé de référence **SSR180575**.

### 2.1.4. Synthèse des précurseurs de marquage.

Les données physico-chimiques et pharmacologiques des analogues fluoropyridines de **SSR180575** montrent que **59** et **60** présentent une haute affinité et sélectivité pour la TSPO. Il a donc été entrepris de synthétiser les précurseurs de marquage de chacun de ces deux dérivés.

- Analyse rétrosynthétique.

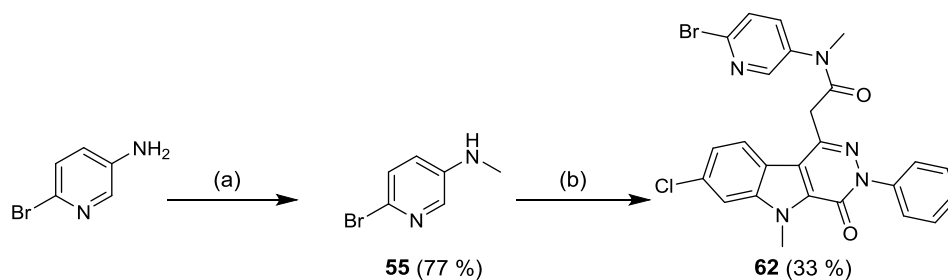
Le marquage de [<sup>18</sup>F]-**59** et [<sup>18</sup>F]-**60** s'effectuera par substitution nucléophile hétéroaromatique et à ce titre, la préparation de précurseurs de marquage portant un groupement partant ad-hoc sur le carbone à radiofluorer a été envisagée (**Schéma 49**). L'analyse rétrosynthétique est similaire à celle des références fluorées. Elle fait en effet apparaître un acide carboxylique comme intermédiaire clé à partir duquel on peut, par couplage avec les amines correspondantes, obtenir les précurseurs de marquage souhaités.



**Schéma 49** : Analyse rétrosynthétique des précurseurs de marquage au fluor-18 (**62** et **63**).

#### 2.1.4.a. Synthèse du précurseur de marquage de [<sup>18</sup>F]-**59**.

Le choix du groupe partant du précurseur de marquage s'est porté sur un brome car celui-ci est assez largement utilisé en radiochimie pour ce type de radiofluoration. La stratégie de synthèse de ce précurseur de marquage bromé a été envisagée de façon analogue à celle utilisée pour la synthèse de son analogue fluoré **59**. Ce précurseur de marquage a été synthétisé en deux étapes selon le **Schéma 50**.



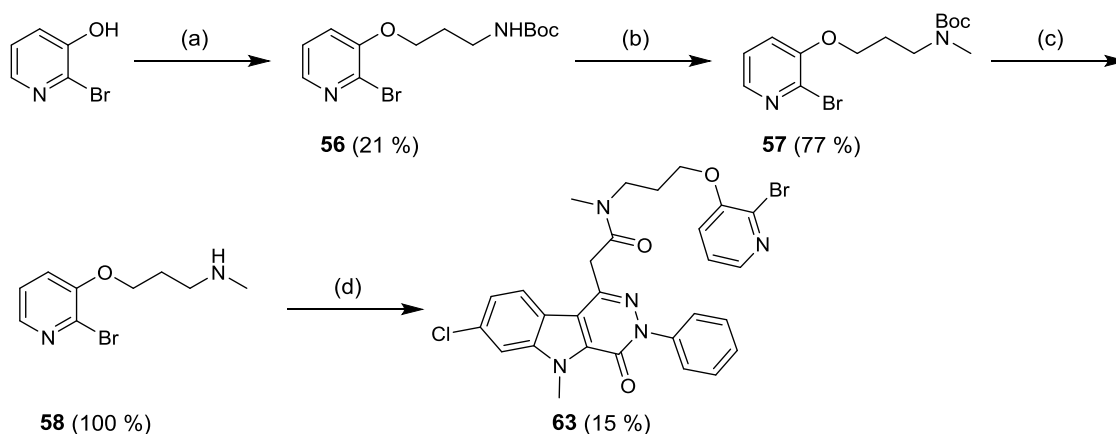
**Réactifs et conditions :** (a) i) NaOMe, paraformaldéhyde, méthanol, 5 h, t.a., puis ii) NaBH<sub>4</sub>, 3 h, reflux ; (b) **SR94-976**, TBTU, DIPEA, DMF, t.a., 24 h.

**Schéma 50 :** Synthèse du précurseur de marquage bromé **62**.

La première étape est une *N*-mono-méthylation par amination réductrice de la 2-bromo-5-aminopyridine en présence de méthanolate de sodium, de paraformaldéhyde et de borohydrure de sodium dans le méthanol à reflux. L'intermédiaire mono-méthylé **55** est ainsi obtenu avec 77 % de rendement avant d'être engagé dans un couplage avec l'acide **SR94-976** en présence de TBTU et de DIPEA dans du *N,N*-diméthylformamide à température ambiante. Le précurseur bromé **62** a ainsi été obtenu avec un rendement de 33 %.

#### 2.1.4.b. Synthèse du précurseur de marquage de [<sup>18</sup>F]-**60**.

De manière analogue au précurseur **62**, un brome a été choisi comme groupement partant pour le précurseur de marquage au fluor-18 de **60**. Ce dérivé a quant à lui, été synthétisé en quatre étapes à partir de la 2-bromo-3-hydroxypyridine selon le **Schéma 51**.



**Réactifs et conditions :** (a) 3-(Boc-amino)-1-propanol, triphénylphosphine, DIAD, THF, t.a., 5 h ; (b) i) NaH, DMF, 0 °C, 30 min, puis ii) MeI 2 M dans le TBME, t.a., 1 nuit ; (c) TFA, DCM, t.a., 3 h ; (d) **SR94-976**, TBTU, DIPEA, DMF, t.a., 24 h.

**Schéma 51 :** Synthèse du précurseur de marquage bromé **63**.

De façon analogue à la synthèse du dérivé fluoré **61** (**Schéma 47**), un couplage de Mitsunobu a été réalisé entre la 2-bromo-3-hydroxypyridine et le 3-(Boc-amino)-1-propanol en présence de DIAD et de triphénylphosphine dans le tétrahydrofurane à température ambiante pour former **56** avec 21 % de rendement. La fonction NHBoc a ensuite été méthylée en utilisant de l'hydruure de sodium comme base et de l'iodure de méthyle comme agent méthylant. **57** a ainsi été obtenu avec un rendement de 77 %. La fonction Boc a été enlevée par de l'acide trifluoroacétique pour donner l'amine **58** quantitativement qui a ensuite été couplé à l'acide **SR94-976** dans les mêmes

conditions que décrites précédemment. Le précurseur **63** a été formé avec 15 % de rendement sur cette dernière étape.

## 2.1.5. Radiomarquage au fluor-18.

### 2.1.5.a. Radiomarquage de [<sup>18</sup>F]-59.

Plusieurs tentatives de radiomarquage pour obtenir [<sup>18</sup>F]-**59** ont été effectuées à partir du précurseur **62**.

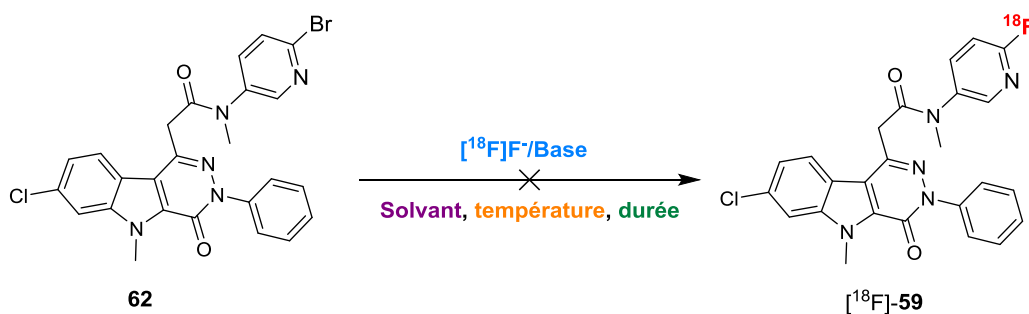


Schéma 52 : Tentatives de radiosynthèse de [<sup>18</sup>F]-**59**.

Un certain nombre de conditions différentes ont été testées afin d'obtenir [<sup>18</sup>F]-**59**. Celles-ci sont récapitulées dans le **Tableau 16**. Les conditions relativement dures, en présence de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> avec un chauffage de 160, 120 ou 80 °C ont toutes abouties à la dégradation du précurseur (entrées 1, 2 et 3). Des conditions moins basiques ont alors été envisagées, en utilisant TBAHCO<sub>3</sub> ou l'oxalate de potassium comme base dans le *N,N*-diméthylformamide ou le diméthylsulfoxyde, à 120 °C ou 80 °C, ont également conduit à la dégradation du précurseur (entrées 4, 5 et 6).

Essai	[ <sup>18</sup> F]F <sup>-</sup> /Base	Solvant	Température	Temps	Résultats
1	K[ <sup>18</sup> F]F/K <sub>222</sub> , K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	DMSO	160 °C	5 min	Dégradation du précurseur
2	K[ <sup>18</sup> F]F/K <sub>222</sub> , K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	DMSO	80 °C	10 min	Dégradation du précurseur
3	K[ <sup>18</sup> F]F/K <sub>222</sub> , K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	DMF	120 °C	5 min	Dégradation du précurseur
4	[ <sup>18</sup> F]F <sup>-</sup> /K <sub>222</sub> , (COOK) <sub>2</sub>	DMF	120 °C	5 min	Dégradation du précurseur
5	[ <sup>18</sup> F]F <sup>-</sup> /TBAHCO <sub>3</sub>	DMF	120 °C	5 min	Dégradation du précurseur
6	[ <sup>18</sup> F]F <sup>-</sup> /TBAHCO <sub>3</sub>	DMSO	80 °C	30 min	Dégradation du précurseur
7	K[ <sup>18</sup> F]F/K <sub>222</sub> , KBr	DMSO	160 °C	10 min	Dégradation du précurseur

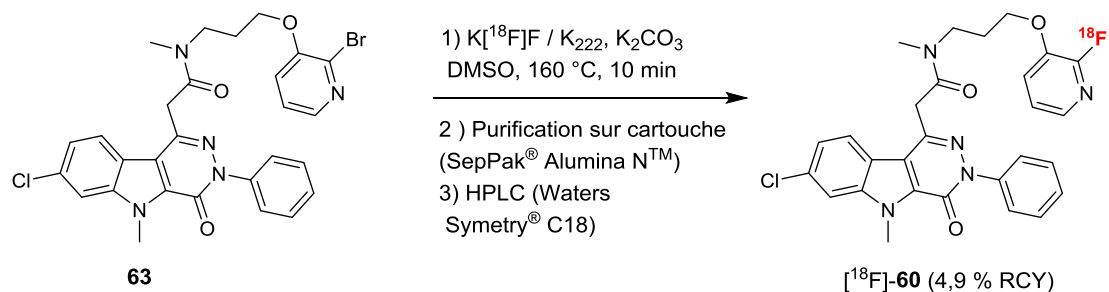
Tableau 16 : Conditions de radiomarquage testées pour la préparation de [<sup>18</sup>F]-**59**.

Enfin une dernière condition a été testée, sans base, dans le diméthylsulfoxyde à 80 °C aboutissant là encore à la dégradation du précurseur. Aucune des conditions testées n'a donc permis d'obtenir [<sup>18</sup>F]-**59**.



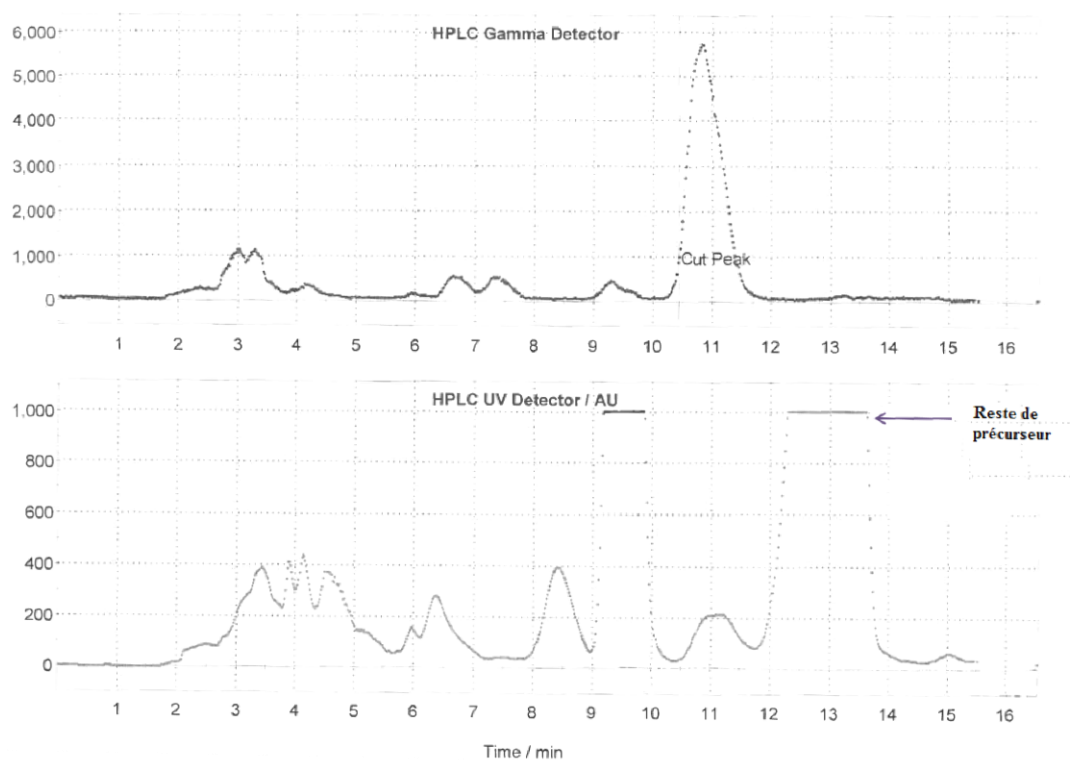
2.1.5.b. Radiomarquage de [ $^{18}\text{F}$ ]-60.

[ $^{18}\text{F}$ ]-60 a été radiomarqué au fluor-18 au laboratoire dans des conditions classiques en radiochimie du fluor-18, à savoir  $\text{K}[^{18}\text{F}]\text{F} / \text{K}_{222}$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , dans le diméthylsulfoxyde à 160 °C pendant 10 minutes comme présenté dans le **Schéma 53**.



**Schéma 53** : Radiomarquage au fluor-18 de [ $^{18}\text{F}$ ]-60.

Une fois la réaction de radiofluoration terminée, il faut séparer le radioligand [ $^{18}\text{F}$ ]-60 des ions fluorures n'ayant pas réagi. Pour cela, le brut réactionnel est pré-purifié par élution sur une cartouche d'alumine (SepPak<sup>®</sup> Alumina N<sup>TM</sup>) qui a la propriété de piéger les composés très polaires tels  $^{18}\text{F}^-$  ou  $\text{K}^+$  mais de laisser passer les composés tels que le radioligand [ $^{18}\text{F}$ ]-60. Une HPLC sur colonne Waters<sup>®</sup> C18 permet ensuite d'isoler [ $^{18}\text{F}$ ]-60 (temps de rétention de 10,8 minutes, **Figure 43**). La dernière étape du procédé de radiosynthèse est la formulation qui permet de remplacer l'éluant HPLC, non compatible avec une administration *in vivo*, par un mélange d'éthanol et de sérum physiologique.

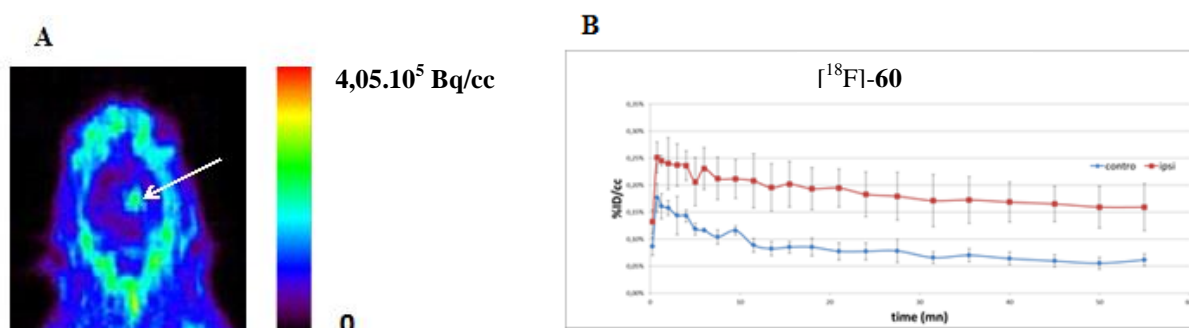


**Figure 43** : Chromatogrammes obtenus lors de la purification de [ $^{18}\text{F}$ ]-60. Détection gamma (en haut) et UV (en bas).

Une fois le radiotracer collecté, son activité est mesurée pour déterminer le rendement radiochimique (EOS) ainsi que l'activité spécifique. [ $^{18}\text{F}$ ]-**60** a été obtenu après une durée totale de radiosynthèse de 58 minutes (purification et formulation incluses), avec un rendement radiochimique de 4,9 % (non corrigé de la décroissance et calculé à partir de la quantité initiale de [ $^{18}\text{F}$ ]fluorures mis en jeu) et une activité spécifique (RAS) de 52 GBq/ $\mu\text{mol}$ .

### 2.1.6. Evaluation *in vivo* de [ $^{18}\text{F}$ ]-**60** par imagerie TEP.

Les études d'imagerie *in vivo* ont été effectuées avec un tomographe dédié au petit animal (Inveon PET/CT, Siemens) sur des rats Wistar (N = 4) anesthésiés à l'isoflurane et présentant des lésions induites par l'AMPA (stéréotaxie pratiquée sept jours avant l'imagerie TEP). Sur l'image TEP (**Figure 44, A**), la lésion de la zone ipsilatérale (indiquée par la flèche) est visible dès 5 minutes après l'injection intraveineuse du radiotracer [ $^{18}\text{F}$ ]-**60** et jusqu'à la fin de l'acquisition de l'image. Un contraste relativement important a été observé entre la zone lésée et la zone contralatérale. L'accumulation à 55 minutes de [ $^{18}\text{F}$ ]-**60** dans le striatum lésé est assez élevée (0,22 % de la dose injectée par cc (% ID /cc)), comparée à la zone contralatérale (0,052 % de la dose injectée) (**Figure 44, B**). On obtient un ratio des concentrations en [ $^{18}\text{F}$ ]-**60** dans la zone ipsilatérale par rapport à la zone contralatérale de  $2,62 \pm 0,66$ . Celui obtenu pour le composé **SSR180575** est de  $2,70 \pm 0,13$ . A titre de comparaison, le ratio mesuré pour le ligand de référence [ $^{11}\text{C}$ ]PK11195, n'est que de  $1,65 \pm 0,20$ . Le traceur [ $^{18}\text{F}$ ]-**60** a donc de meilleures propriétés en imagerie que [ $^{11}\text{C}$ ]PK11195, mais celles-ci sont comparables à celles de [ $^{11}\text{C}$ ]SSR180575. Il présente par contre l'avantage d'être marqué au fluor-18.



**Figure 44** : (A) Image microPET coronale obtenue entre 5 et 60 minutes après injection *i.v.* de [ $^{18}\text{F}$ ]-**60** dans un rat Wistar. La flèche blanche indique l'emplacement de la lésion causée par l'AMPA sur le côté droit. (B) Courbe de l'activité de [ $^{18}\text{F}$ ]-**60** en fonction du temps dans les zones lésées (ipsilatérale) et dans les zones témoins (contralatérales). Les valeurs sont indiquées en pourcentage de la dose injectée par centimètre cube (% ID /cc) en fonction du temps (min).

## 2.2. Analogues fluoroéthyle et fluoropropyle de SSR180575.

### 2.2.1. Synthèse.

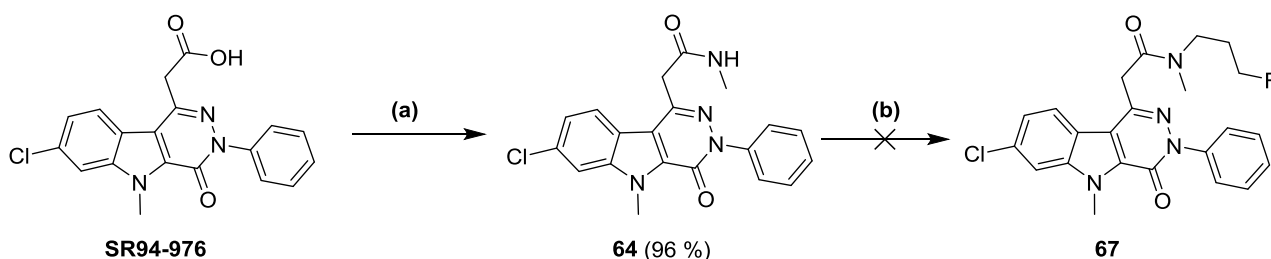
- Analyse rétrosynthétique.

L'analyse rétrosynthétique de ces deux composés est identique à celle présentée dans le **Schéma 45**, section 2.1.1.

▪ Résultats obtenus pour la synthèse du dérivé fluoropropyle **67**.

A partir de l'acide carboxylique (intermédiaire clé disponible en grande quantité au sein de notre laboratoire), deux méthodes pouvaient être considérées : la première consiste à transformer l'acide en mono-*N*-méthyle amide pour pouvoir ensuite réaliser une *N*-alkylation avec la chaîne fluorée, la deuxième consiste en un couplage entre une amine permettant l'introduction du fluor et l'acide **SR94-976**.

La première méthode envisagée pour la synthèse de **67** à partir de l'acide carboxylique **SR94-976** est présentée dans le **Schéma 54**.

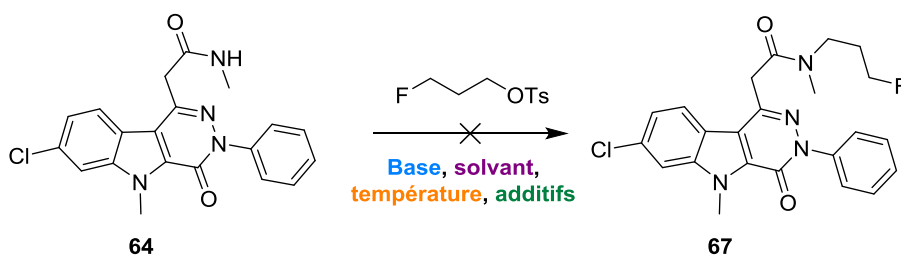


**Réactifs et conditions :** (a) i) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, méthanol, reflux, 2 h, ii) méthylamine 40 % dans l'eau, reflux, 2 h ; (b) tosylo de 3-fluoropropyle, base, solvant, chauffage.

**Schéma 54 :** Première voie de synthèse envisagée pour du composé **67**.

La première étape est une transformation de l'acide carboxylique en *N*-méthylamide **64** réalisée en deux étapes *in situ*. Dans un premier temps, l'ester méthylique est formé en présence d'acide sulfurique à reflux dans du méthanol. Après une conversion totale de l'acide en ester, une solution de *N*-méthylamine aqueuse est rajoutée pour convertir l'ester en amide et former ainsi **64** avec un excellent rendement de 96 %.

A partir de cet amide **64**, différentes tentatives de *N*-méthylation ont été réalisées pour tenter d'obtenir le composé fluoropropyle désiré. Ces différents essais sont regroupés dans le **Tableau 17**.

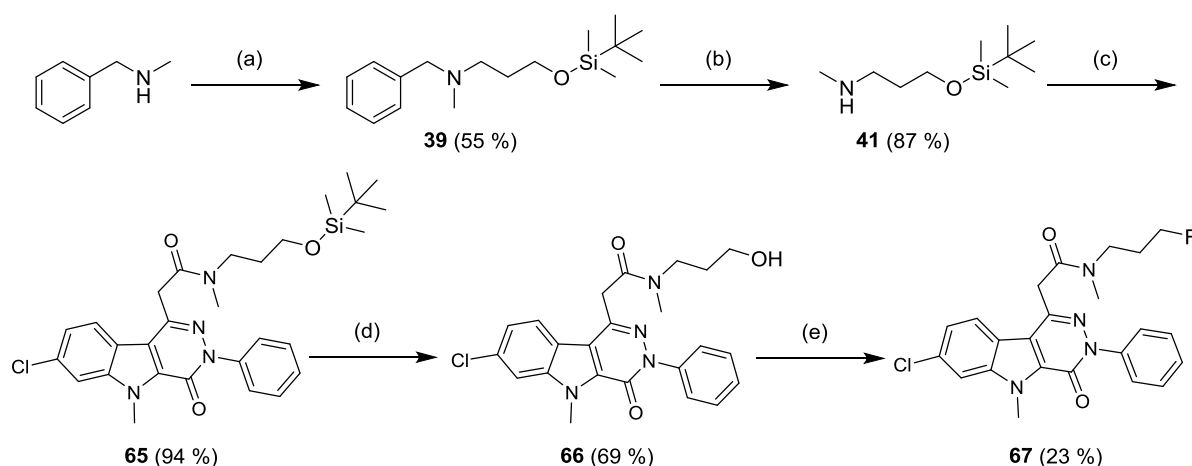


Essai	Base	Solvant	Température	Additifs	Résultats
1	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	DMF	25 °C puis 50 °C	/	Aucune conversion
2	NaH	DMSO	50°C	/	Dégradation
3	KOH / K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	DMF	50 °C	TBABr	Formation de nombreux sous-produits

**Tableau 17 :** Essais de *N*-méthylation de **64** pour la préparation du composé **67**.

Aucune de ces méthodes n'a permis d'isoler le composé attendu. Cela peut s'expliquer par le fait que les hydrogènes portés par le CH<sub>2</sub> en α du carbonyle de **64** soient suffisamment acides pour que l'un d'entre eux soit arraché en présence de base, conduisant alors à la formation de multiples sous-produits qui n'ont pas été tenté d'être isolés par ailleurs.

Une voie de synthèse alternative a donc été envisagée pour obtenir le dérivé **67**, basée sur la stratégie utilisée pour les dérivés amides de **DPA-713** (section 1.3.1, **Schéma 39**), consistant à réaliser un couplage entre l'acide **SR94-796** et la *N*-méthylamine **41** (**Schéma 55**).



**Réactifs et conditions :** (a) i) NaH, DMF, t.a., 30 min, puis ii) (2-bromopropoxy)(*tert*-butyl)diméthylsilane, t.a., 2 h ; (b) Pd/C 10 % 1 atm, H<sub>2</sub>, méthanol, t.a., 4 h ; (c) **SR94-976**, TBTU, DIPEA, DMF, t.a., 24 h ; (d) TBAF 1 M dans le THF, THF, t.a., 1 nuit ; (e) Déoxo-Fluor<sup>®</sup>, DCM, 0 °C, 30 min.

**Schéma 55 :** Synthèse permettant d'obtenir **67**.

L'amine **41** a été synthétisée en deux étapes comme présenté dans le **Schéma 38**, puis a été engagée dans un couplage avec l'acide **SR94-976** en présence de TBTU et de DIPEA dans le *N,N*-diméthylformamide à température ambiante. La fonction diméthyl-*tert*-butylsilyle de **65** a ensuite été retirée pour libérer la fonction alcool à l'aide d'une solution de fluorure de tétrabutylammonium dans le tétrahydrofurane conduisant au composé **66** avec 69 % de rendement. Enfin, la dernière étape de la séquence réactionnelle est une réaction de fluorodésoxygénation réalisée avec le réactif Déoxo-Fluor<sup>®</sup> dans du dichlorométhane pendant 30 minutes à 0 °C. Le dérivé fluoropropyle **67** a ainsi pu être obtenu avec 23 % de rendement.

L'analogue fluoroéthyle n'a pas encore été synthétisé.

## 2.2.2. Evaluations physico-chimique et pharmacologique *in vitro*.

Les propriétés pharmacologiques (affinité pour la TSPO et sélectivité versus CBR) et physico-chimiques (LogD<sub>7,4</sub>) de l'analogue **67** ont été déterminées et comparées à celles de **SSR180575** (**Tableau 18**).

Le dérivé fluoropropyle acétamide **67** présente une forte affinité pour la TSPO avec une valeur de K<sub>i</sub> de 0,45 nM. Cette affinité est tout à fait comparable à celle obtenue pour les analogues fluoropyridine (respectivement 0,46 et 0,50 pour **59** et **60**, **Tableau 14**) et pour **SSR180575** (0,83 nM)

Le nouvel analogue possède également une excellente sélectivité pour la TSPO, avec un pourcentage d'inhibition nul pour les récepteurs aux benzodiazépines (CBR) à 1  $\mu$ M contre le [<sup>3</sup>H]flunitrazepam.

Ligand	TSPO <sup>a</sup> K <sub>i</sub> (nM)	CBR % inhib. <sup>b</sup> 1 $\mu$ M	LogD <sub>7,4</sub> <sup>c</sup>
SSR180575	0,83	0 %	2,97
<b>67</b>	0,45	0 %	3,44

<sup>a</sup> Valeur déterminée en utilisant des homogénats de membranes de cœur de rat en présence de [<sup>3</sup>H]PK11195 (K<sub>d</sub> = 1,8 nM, c = 0,2 nM). <sup>b</sup> Valeur déterminée en utilisant des homogénats de cortex cérébral de rat et exprimée en % d'inhibition à 1  $\mu$ M contre du [<sup>3</sup>H]flunitrazepam (K<sub>d</sub> = 2,1 nM, c = 0,4 nM). <sup>c</sup> Valeur déterminée en convertissant le temps de rétention des analogues testés en utilisant une méthode HPLC validée et standardisée.

**Tableau 18** : Détermination *in vitro* de l'affinité, de la sélectivité et de la lipophilie l'analogue **67**, et du composé de référence **SSR180575**.

Enfin, le logD<sub>7,4</sub> mesuré de **67** est du même ordre de grandeur que ceux mesurés pour **59** et **60** (respectivement 3,44 contre 3,60), et légèrement plus élevé que celui de **SSR180575** (logD<sub>7,4</sub> = 2,97).

### 2.2.3. Stabilité microsomale.

La stabilité microsomale de **67** a été mesurée *via* le même test que celui décrit à la section 2.1.3. Les données sont comparées à celles de **SSR180575** ainsi qu'à celles de **59** et **60**.

Composé	biotransformation (% à 20 min) <sup>a</sup>		
	Homme	Rat	Souris
SSR180575	10	14	21
<b>59</b>	96	86	98
<b>60</b>	97	100	100
<b>67</b>	20	40	53

<sup>a</sup> Incubation de microsomes hépatiques (souris male CD1, rat Sprague-Dawley male, humain (BD pool)) suivi d'une analyse du surnageant par HPLC/ESI-MS/MS.

**Tableau 19** : Stabilité microsomale des analogues **59**, **60**, **67**, et du composé de référence **SSR180575**.

On remarque que contrairement aux deux fluoropyridines **59** et **60** qui sont fortement biotransformées, ce nouvel analogue fluoropropyle **67** est quant à lui beaucoup plus stable à 20 minutes chez les trois espèces, avec des valeurs de pourcentages proches de celles obtenues pour **SSR180575**. **67** semble cependant légèrement moins métabolisé par les microsomes humains (20 %) que par les microsomes de rongeurs (40 et 53 % respectivement pour le rat et la souris) (**Tableau 19**).

### 2.2.4. Synthèse du précurseur de marquage [<sup>18</sup>F]-67.

- Analyse rétrosynthétique.

Le marquage de [<sup>18</sup>F]-67 s'effectuera par substitution nucléophile aliphatique et à ce titre, la préparation d'un précurseur de marquage portant un groupement partant ad-hoc sur le carbone à radiofluorer a été envisagée (Schéma 56).

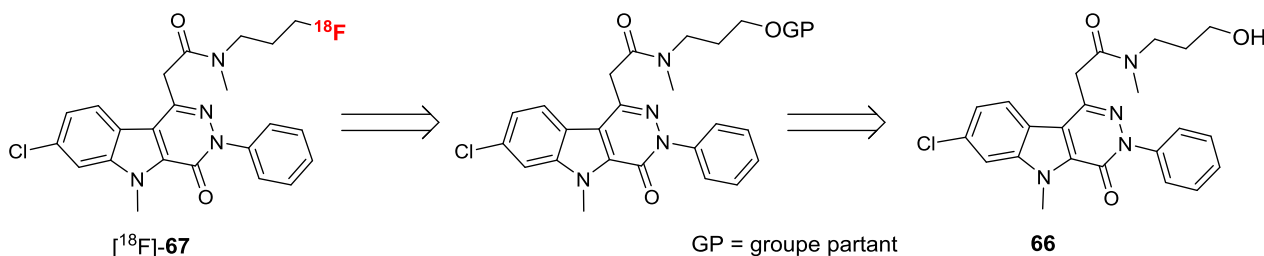
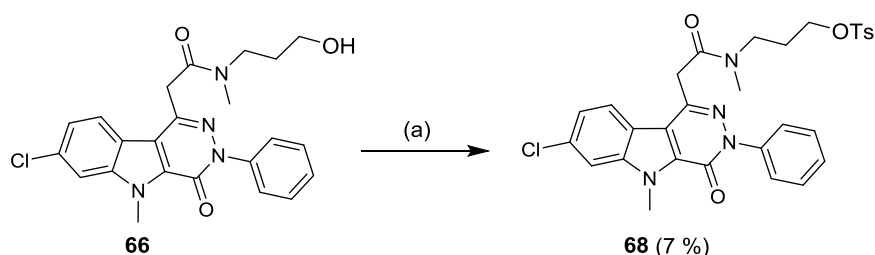


Schéma 56 : Rétrosynthèse du précurseur de marquage de [<sup>18</sup>F]-67.

- Résultats obtenus pour la synthèse du précurseur de marquage 68.

De façon analogue à la préparation du précurseur de marquage 52, le choix du groupement partant s'est porté sur un tosylate. Ce dernier, qui peut être obtenu à partir de l'alcool 66, a été synthétisé selon la stratégie déjà présentée au Schéma 55. Cet alcool a ensuite été engagé dans une réaction de tosylation en présence d'anhydride *p*-toluènesulfonique et de triéthylamine à température ambiante. Le tosylate 68 a ainsi été obtenu avec un faible rendement de 7 % (Schéma 57). De la même façon que lors de la formation du précurseur 52, ce mauvais rendement peut s'expliquer de deux manières : d'une part la potentielle cyclisation intramoléculaire sur le carbone en  $\alpha$  du carbonyle, pouvant se déprotoner en milieu basique, et conduire à une consommation du tosylate dès sa formation ; d'autre part, il semble que le composé 68 se dégrade sur gel de silice lors de la purification par chromatographie. Néanmoins, une quantité suffisante de ce précurseur a été produite pour poursuivre avec les essais de radiomarquage au fluor-18.



Réactifs et conditions : (a) anhydride *p*-toluènesulfonique, Et<sub>3</sub>N, DCM, t.a., 1 nuit.

Schéma 57 : Synthèse du précurseur de marquage 68.

### 2.2.5. Radiomarquage au fluor-18.

Des tentatives de radiomarquage pour obtenir [ $^{18}\text{F}$ ]-**67** ont été effectuées à partir du précurseur **68**.

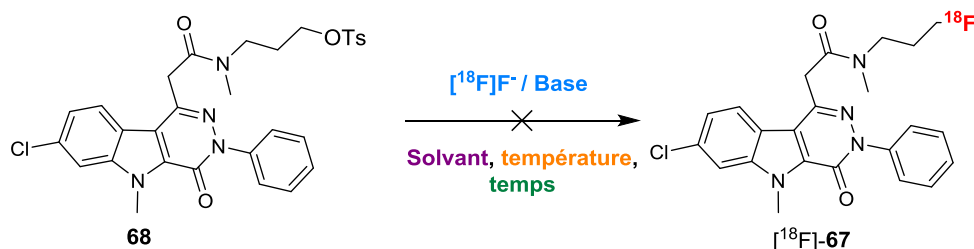


Schéma 58 : Tentatives de radiosynthèse de [ $^{18}\text{F}$ ]-**67**.

Des conditions identiques à celles testées pour radiomarquer **47** ont été essayées dans ce cas. Des conditions assez classiques, basiques et relativement dures, ont été envisagées dans un premier temps, en utilisant des bases telles que  $\text{K}_2\text{CO}_3$  ou  $\text{TBAHCO}_3$  dans le diméthylsulfoxyde à 120 °C pendant 5 à 10 minutes (essais 1, 2 et 3, **Tableau 20**). Ces conditions n'ont mené qu'à une dégradation du précurseur de marquage. Une dernière tentative a été réalisée en présence d'iodure de potassium dans l'acétonitrile à 80 °C pendant 20 minutes (essai 4, **Tableau 20**). Cependant, ces conditions semblent trop douces pour permettre l'incorporation du fluor-18 et aucune réaction n'a été observée.

Au final, les mêmes difficultés de radiomarquage ont été observées pour [ $^{18}\text{F}$ ]-**47** et [ $^{18}\text{F}$ ]-**67**, ne permettant pas l'obtention des radiotraceurs désirés.

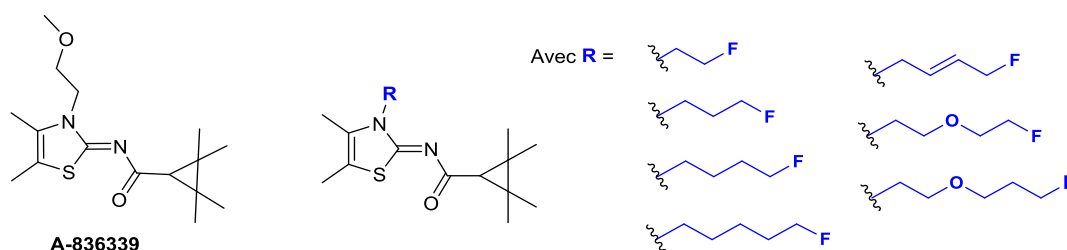
Essai	[ $^{18}\text{F}$ ]F <sup>-</sup> /Base	Solvant	Température	Temps	Résultats
1	K[ $^{18}\text{F}$ ]F / $\text{K}_{222}$ , $\text{K}_2\text{CO}_3$	DMSO	120 °C	5 min	Dégradation du précurseur
2	K[ $^{18}\text{F}$ ]F / $\text{K}_{222}$ , $\text{K}_2\text{CO}_3$	DMSO	120 °C	10 min	Dégradation du précurseur
3	[ $^{18}\text{F}$ ]F <sup>-</sup> / $\text{TBAHCO}_3$	DMSO	120 °C	10 min	Dégradation du précurseur
4	K[ $^{18}\text{F}$ ]F / $\text{K}_{222}$ , KI	$\text{CH}_3\text{CN}$	80 °C	20 min	Pas de réaction

Tableau 20 : Conditions de radiomarquage essayées pour la préparation de [ $^{18}\text{F}$ ]-**67**

# Chapitre II : Les ligands des récepteurs cannabinoïdes de type 2.

## 1. Dérivés fluorés de A-836339 (Projet F).

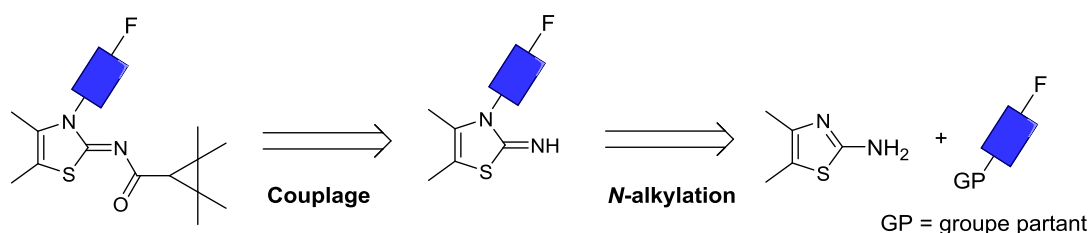
Les structures des analogues fluorés envisagés sont des dérivés du (*Z*)-*N*-(3-(2-méthoxyéthyl)-4,5-diméthylthiazol-2(3*H*)-ylidène)-2,2,3,3-tétraméthylcyclopropane-1-carboxamide – un composé codé **A-836339** – et sont présentées dans la **Figure 45**. Dans ces dérivés, la fonction *N*-méthoxy-éthyle a été remplacée par des chaînes alkyles ou alkoxy, saturées ou non, comportant un atome de fluor terminal.



**Figure 45** : Structures du **A-836339** et des analogues fluorés envisagés.

### 1.1. Analyse rétrosynthétique.

L'analyse rétrosynthétique présentée dans le **Schéma 59** est basée sur la stratégie de synthèse du **A-836339**<sup>112</sup>. Elle est relativement rapide puisqu'elle ne comporte que deux étapes : une étape permettant de construire le motif thiazolylidène, et une seconde permettant d'introduire les différentes chaînes fluorées.



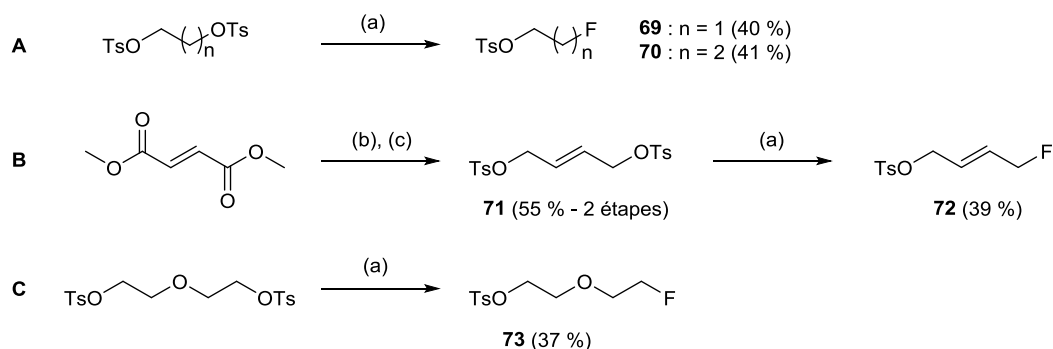
**Schéma 59** : Rétrosynthèse des analogues fluorés de **A-836339**.

### 1.2. Synthèse des dérivés fluorés.

La préparation des analogues **74** à **79** passe par une séquence réactionnelle directe en deux étapes (**Schéma 61**), basée sur la *N*-alkylation de la 4,5-diméthylthiazol-2-amine avec divers agents alkylants fluorés aliphatiques (commerciaux ou non), alors que la préparation du dérivé **81** passe par une voie alternative, en trois étapes (**Schéma 62**).



La synthèse des alkylants fluorés non commerciaux est décrite dans le **Schéma 60**. Il s'agit des tosyles de 2-fluoroéthyle **69** et 3-fluoropropyle **70**, du (*E*)-4-fluorobut-2-en-1-yl 4-méthylbenzenesulfonate **72** et du 2-(2-fluoroéthoxy)éthyl 4-méthylbenzenesulfonate **73**.

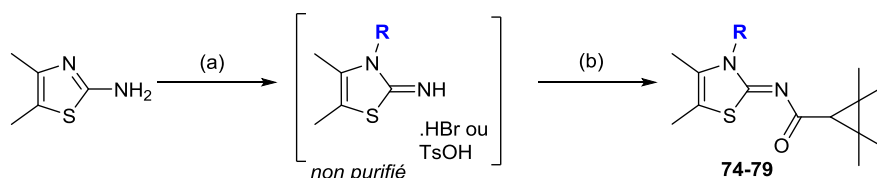


**Réactifs et conditions** : (a) TBAF 1 M dans le THF, THF, t.a. à 60 °C, 1 à 12 h ; (b) DIBAL-H, toluène, -10 °C, 2 h, puis t.a., 16 h ; (c) TsCl, KOH<sub>aq</sub>, BnEt<sub>3</sub>NCl, dioxane, t.a., 2 h.

**Schéma 60** : Synthèse des agents alkylants fluorés **69**, **70**, **72** et **73**.

Les composés **69**, **70** et **73** ont été obtenus suite à une monofluoration de l'éthylène ditosylate, du 1,3-propanediol di-*p*-tosylate et du di(éthylèneglycol)di-*p*-tosylate respectivement avec des rendements de 40, 41 et 37 %, en présence de TBAF dans le tétrahydrofurane à température ambiante (**Schéma 60**, **A**, **C**). Le composé (*E*)-1-fluoro-4-tosyloxybut-2-ène (**72**) a, quant à lui, été obtenu en trois étapes à partir du diméthylfumarate (**Schéma 60**, **B**). Les fonctions diméthyle ester ont été réduites pour conduire au diol correspondant en utilisant l'hydrure de diisobutylaluminium dans le toluène à température ambiante. Le diol, obtenu sous forme de solide, a été directement engagé dans l'étape suivante de tosylation en présence de chlorure de *N*-benzyl-*N,N,N*-triéthylammonium, d'hydroxyde de potassium et de chlorure de tosyloxy dans du dioxane pour former le ditosylate **71** avec 55 % de rendement. Enfin, **71** a été monofluoré par une solution de TBAF 1 M dans le tétrahydrofurane pour donner **72** avec un rendement de 39 %. On notera que les rendements de fluoration sont modérés (de l'ordre de 40 %) du fait de la formation du produit difluoré au cours de la réaction et qui peut être séparé lors de l'étape de purification par chromatographie.

A partir de ces synthons aliphatiques fluorés **69**, **70**, **72** et **73**, les analogues **74** à **79** ont pu être obtenus en deux étapes selon le **Schéma 61**.



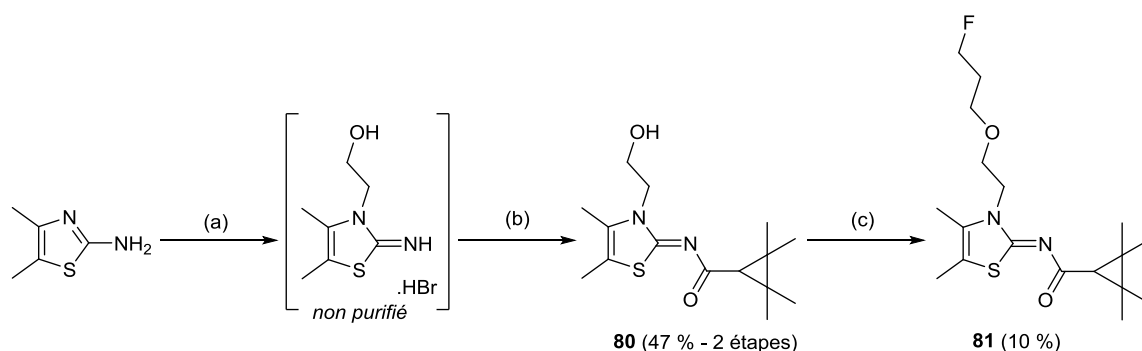
Composé	R	Agent alkylant	Rendement
74		TsO-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -F (69)	15 %
75		TsO-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -F (70)	27 %
76		Br-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -F	22 %
77		Br-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -F	6 %
78		TsO-CH <sub>2</sub> -CH=CH-CH <sub>2</sub> -F (72)	10 %
79		TsO-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -O-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -F (73)	32 %

**Réactifs et conditions :** (a) Agent alkylant, 85 °C, 1 nuit ; (b) acide 2,2,3,3-tétraméthylcyclopropane-1-carboxylique, BOP, Et<sub>3</sub>N, DCM, t.a., 12 h.

**Schéma 61 :** Synthèse des analogues fluorés **74-79**.

La construction des dérivés fluorés s'effectue en deux étapes : dans un premier temps, une réaction de *N*-alkylation permet d'introduire les chaînes fluorées puis un couplage permet de former le motif thiazolylidène. La 4,5-diméthylthiazol-2-amine a donc été *N*-alkylée avec la chaîne fluorée appropriée : **69**, **70**, **72** et **73** synthétisées préalablement (**Schéma 60**) et le 1-fluoro-4-bromobutane et 1-fluoro-5-bromopentane (qui sont commerciaux), pour former *in situ* un sel de tosylate ou de bromure qui n'a pas été isolé. Ce dernier a été engagé directement dans une réaction de couplage avec l'acide 2,2,3,3-tétraméthylcyclopropane-1-carboxylique, en présence d'héxafluorophosphate de benzotriazol-1-yloxy-tris(diméthylamino)phosphonium (BOP) comme agent de couplage et de triéthylamine comme base, dans le dichlorométhane à température ambiante. Les composés couplés correspondants **74** à **79** ont été obtenus avec des rendements variant de 6 à 32 % sur deux étapes (**Schéma 61**).

Le dernier dérivé de la série, **81**, a été préparé en une étape supplémentaire de *O*-alkylation puisque que la chaîne fluorée dissymétrique de ce dérivé n'a pas été obtenue par monofluoration. Premièrement, une réaction de *N*-alkylation entre la 4,5-diméthylthiazol-2-amine et le 2-bromoéthan-1-ol a été réalisée. L'intermédiaire formé a été engagé directement dans un couplage avec l'acide 2,2,3,3-tétraméthylcyclopropane-1-carboxylique dans les mêmes conditions que précédemment pour former l'alcool **80** avec 47 % de rendement sur les deux étapes. Cet alcool a ensuite été soumis à une réaction de *O*-alkylation avec le tosyloxy de 3-fluoropropyle (**70**), en présence d'hydruure de sodium dans le *N,N*-diméthylformamide à 50 °C. Le dérivé **81** a ainsi été obtenu avec un faible rendement de 10 % (**Schéma 62**).



**Réactifs et conditions :** (a) 2-bromoéthan-1-ol, 85 °C, 12 h ; (b) acide 2,2,3,3-tétraméthylcyclopropane-1-carboxylique, BOP, Et<sub>3</sub>N, DCM, t.a., 12 h ; (c) **71**, NaH, DMF, 50 °C, 1 nuit.

Schéma 62 : Synthèse de l'analogue **81**.

### 1.3. Evaluations physico-chimique et pharmacologique *in vitro*.

Les propriétés pharmacologiques telles que l'affinité pour les CB<sub>2</sub>R (K<sub>i</sub>) et la sélectivité versus CB<sub>1</sub>R mais aussi l'efficacité (EC<sub>50</sub>) et la lipophilie (cLogP) ont été déterminées pour les sept analogues **74-79** et **81**, comparées à celles de **A-836339** et sont reportées dans le **Tableau 21**.

Ligand	K <sub>i</sub> hCB <sub>2</sub> R <sup>a</sup> (nM)	K <sub>i</sub> hCB <sub>1</sub> R <sup>a</sup> (nM)	K <sub>i</sub> hCB <sub>1</sub> R / K <sub>i</sub> hCB <sub>2</sub> R	cAMP EC <sub>50</sub> hCB <sub>2</sub> R <sup>b</sup> (nM)	cAMP EC <sub>50</sub> hCB <sub>1</sub> R <sup>b</sup> (nM)	EC <sub>50</sub> hCB <sub>1</sub> R / EC <sub>50</sub> hCB <sub>2</sub> R	cLogP
<b>A-836339</b>	0,2	427	2137	0,014	2 256	161 143	2,97
<b>74</b>	2,7	1979	733	0,049	> 10 000	> 2 000 000	3,68
<b>75</b>	0,2	844	4220	0,019	682	35 895	4,17
<b>76</b>	0,1	91	910	0,064	56,10	875	4,66
<b>77</b>	0,1	13	130	0,023	4,97	174	5,15
<b>78</b>	0,1	39	390	0,124	77,92	621	4,44
<b>79</b>	0,1	30	300	0,030	18,95	600	3,40
<b>81</b>	0,1	26	260	0,023	11,95	478	3,89

<sup>a</sup> Valeur déterminée en utilisant des membranes préparées à partir de cellules exprimant les récepteurs CB<sub>2</sub> ou CB<sub>1</sub> humains en présence de [<sup>3</sup>H]CP55940. <sup>b</sup> Valeur déterminée en utilisant des cellules stabilisées issues d'ovaires de Hamster chinois exprimant les récepteurs CB<sub>2</sub> ou CB<sub>1</sub> humains.

**Tableau 21 :** Détermination *in vitro* de l'affinité, de la sélectivité et de la lipophilie des composés **74-79** et **81**, et du composé de référence **A-836339**.

Les résultats présentés dans le **Tableau 21** indiquent que l'élongation de la chaîne fluorée (R) a tendance à augmenter l'affinité pour les CB<sub>2</sub>R. A l'exception du composé **74**, qui possède un espaceur de seulement deux carbones entre le cycle thiazole et l'atome de fluor et un K<sub>i</sub> de 2,4 nM, les nouveaux analogues de **A-836339** (**75-79** et **81**) ont des affinités subnanomolaires comprises entre 0,3 et 0,1 nM. Les sept analogues fluorés **74-79** et **81** présentent également une bonne sélectivité pour les CB<sub>2</sub>R, avec un ratio K<sub>i</sub> hCB<sub>1</sub>R / K<sub>i</sub> hCB<sub>2</sub>R supérieur à 100. Au vu de ces données, et en particulier la sélectivité pour les CB<sub>2</sub>R, le composé **75** semble le ligand préférentiel de la série (ratio de 4220).

Des tests d'efficacité (dose - effet) ont aussi été réalisés. Les résultats montrent que les nouveaux analogues fluorés **74-79** et **81**, tout comme le composé de référence **A-836339**, possèdent des valeurs subnanomolaires de concentrations efficaces médianes (EC<sub>50</sub>) (0,014 nM < EC<sub>50</sub> < 0,124 nM) et sont donc tous des agonistes potentiels des récepteurs CB<sub>2</sub>R humains. Ce test met également en évidence une bonne sélectivité des composés pour les CB<sub>2</sub>R vis-à-vis des CB<sub>1</sub>R avec des valeurs de ratio cAMP EC<sub>50</sub> hCB<sub>1</sub>R / cAMP EC<sub>50</sub> hCB<sub>2</sub>R élevées. Le composé **74** semble particulièrement intéressant, avec un ratio > 2 000 000 et une valeur d'EC<sub>50</sub> de 0,049 nM.

Les valeurs calculées de lipophilie sont en adéquation avec la tendance attendue suite à l'élongation de la chaîne carbonée. Une augmentation du clogP est observée pour les analogues **74** à **77** avec des valeurs respectives de 3,68, 4,17, 4,66 et 5,15 pour les chaînes éthyle, propyle, butyle et pentyle. Le dérivé butényle **78** possède un clogP légèrement plus faible que son analogue butyle **76** (4,44 comparé à 4,66) et l'introduction d'un oxygène dans la chaîne fluorée induit, comme attendu, une diminution de la lipophilie (3,40 pour le composé **79** comparé à 5,15 pour **77**). Vis-à-vis de la lipophilie, les composés **74** et **78** semblent les plus adéquats pour des études *in vivo*, puisqu'ils présentent des valeurs de cLogP optimales pour une bonne pénétration de la barrière hématoencéphalique.

#### 1.4. Stabilité microsomale.

La stabilité métabolique microsomale *in vitro* des analogues **74-79** et **81** a été évaluée en utilisant des microsomes hépatiques issus de deux espèces différentes : homme et souris (**Tableau 22**).

Composé	Clairance intrinsèque (InC, µL/min/mg protéine) <sup>a</sup>	
	Homme	Souris
<b>A-836339</b>	165	>1000
<b>74</b>	107	>1000
<b>75</b>	189	>1000
<b>76</b>	262	>1000
<b>77</b>	345	>1000
<b>78</b>	307	>1000
<b>79</b>	206	>1000
<b>81</b>	376	>1000

<sup>a</sup> Clairance intrinsèque, exprimée en µL/min/mg protéine, reflète le taux de biotransformation du composé.

**Tableau 22** : Evaluation de la clairance intrinsèque des analogues fluorés **74-79** et **81**, et du composé de référence **A-836339**.

D'après le **Tableau 22**, tous les composés sont rapidement métabolisés en présence de microsomes de souris, avec des valeurs de InC supérieures à 1000. Au niveau des microsomes humains, il semble que l'élongation de la chaîne induise une diminution de la stabilité microsomale, avec une valeur de clairance de 107 µL/min/mg protéine pour le composé **74** (chaîne fluoroéthyle) contre 345 µL/min/mg protéine pour le composé **77** (chaîne fluoropentyle).

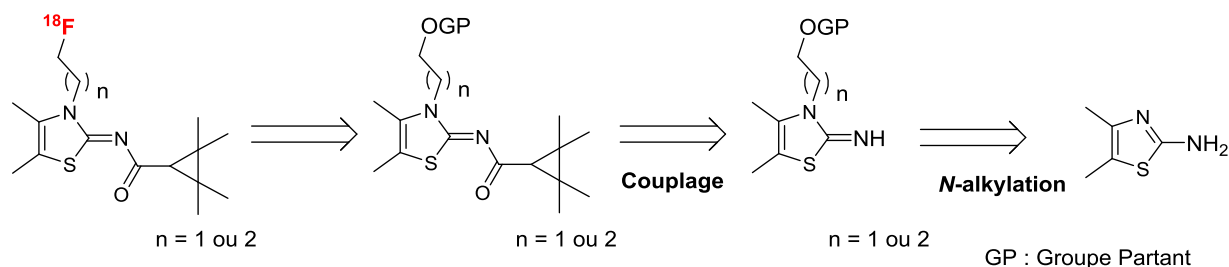
L'ajout d'un hétéroatome dans la chaîne semble apporter une certaine stabilité : 206  $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$  protéine pour le composé **79** contre 345  $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$  protéine pour le composé **77**.

## 2. Synthèse des précurseurs de marquage au fluor-18.

Sur la base des résultats biologiques présentés au paragraphe précédent, les deux dérivés présentant le meilleur compromis des données pharmacologiques et physico-chimiques évaluées, ont été sélectionnés pour un radiomarquage au fluor-18. Il s'agit des analogues fluoroéthyle et fluoropropyle **74** et **75**.

### 2.1. Analyse rétrosynthétique.

L'analyse rétrosynthétique montre que les précurseurs de marquage des analogues **74** et **75** peuvent être obtenus de manière analogue aux dérivés fluorés ; à savoir en deux étapes clé : une étape de *N*-alkylation permettant d'introduire la chaîne alkyle et un couplage pour introduire le cycle tétraméthylcyclopropyle (**Schéma 63**).

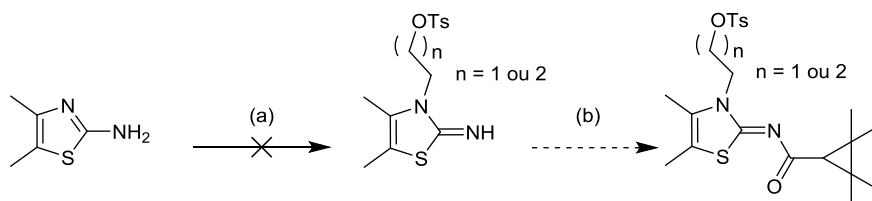


**Schéma 63** : Rétrosynthèse des précurseurs de marquage au fluor-18 des analogues **74** et **75**.

### 2.2. Synthèse des précurseurs de marquage.

Il a été choisi de préparer des analogues tosylés comme précurseurs de marquage car les tosylates sont de bons groupements partant souvent utilisés en radiochimie pour les substitutions nucléophiles au fluor-18.

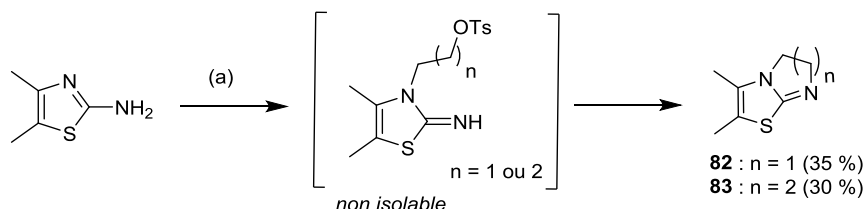
De façon analogue à la préparation des dérivés fluorés, il a été envisagé d'introduire en premier lieu (approche I) les chaînes éthyle et propyle tosylate *via* une réaction de *N*-alkylation puis de construire le motif thiazolylidène par un couplage avec l'acide 2,2,3,3-tétraméthylcyclopropane-1-carboxylique comme présenté dans le **Schéma 64**.



**Réactifs et conditions** : (a) éthylène di(*p*-toluènesulfonate) ou 1,3-propanediol di-*p*-tosylate, 85 °C, 1 nuit ; (b) acide 2,2,3,3-tétraméthylcyclopropane-1-carboxylique, BOP, Et<sub>3</sub>N, DCM, t.a., 12 h.

**Schéma 64** : Tentative (approche I) de préparation des précurseurs de marquage au fluor-18 de **74** et **75**.

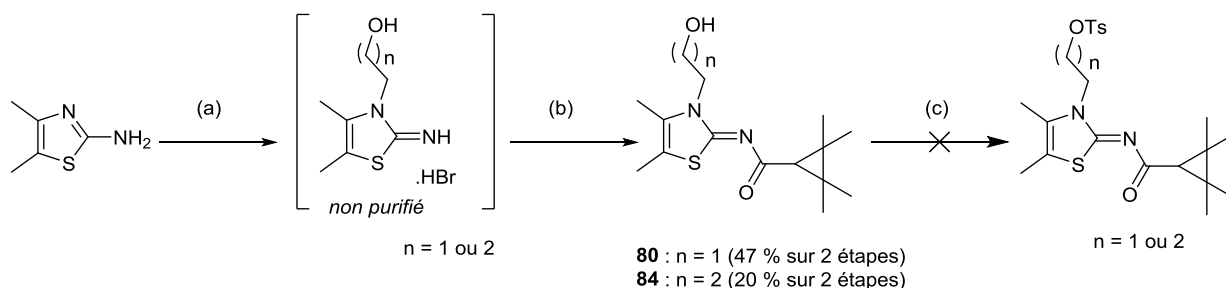
La réaction de *N*-alkylation entre la 4,5-diméthylthiazol-2-amine et l'éthylène di(*p*-toluènesulfonate) d'une part et le 1,3-propanediol di-*p*-tosylate d'autre part a été effectuée par chauffage à 85 °C pendant une nuit (**Schéma 64**). Cependant, les composés tosylés attendus n'ont pas pu être isolés car, dès leur formation, ils semblent réagir sur eux-mêmes par une réaction de cyclisation intramoléculaire, conduisant à la formation de cycles à cinq et six chaînons. Ainsi, seuls les composés **82** et **83**, dont les structures sont présentées dans le **Schéma 65** ont pu être obtenus, avec des rendements respectifs de 35 et 30 %.



**Réactifs et conditions :** (a) éthylène di(*p*-toluènesulfonate) ou 1,3-propanediol di-*p*-tosylate, 85 °C, 1 nuit.

**Schéma 65 :** Formation des sous-produits bicycliques **82** et **83**.

Une méthode alternative a été envisagée pour obtenir les précurseurs souhaités (approche II). Cette méthode a consisté à introduire les chaînes éthan-1-ol et propan-1-ol puis, après couplage avec l'acide 2,2,3,3-tétraméthylcyclopropane-1-carboxylique, à effectuer la tosylation des alcools primaires selon le **Schéma 66**.

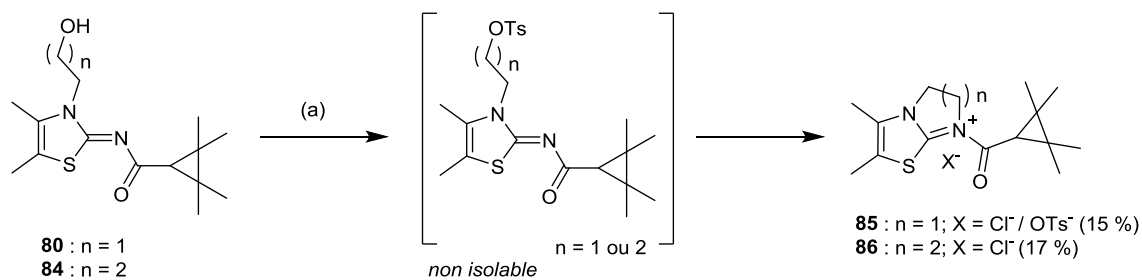


**Réactifs et conditions :** (a) 2-bromoéthan-1-ol ou 3-bromopropan-1-ol, 85 °C, 1 nuit ; (b) acide 2,2,3,3-tétraméthylcyclopropane-1-carboxylique, BOP, Et<sub>3</sub>N, DCM, t.a., 12 h ; (c) TsCl, pyridine, 0 °C, 2 h.

**Schéma 66 :** Tentative (approche II) de préparation des précurseurs de marquage au fluor-18 de **74** et **75**.

Les alcools **80** et **84** ont été synthétisés en deux étapes à partir de la 4,5-diméthylthiazol-2-amine, par une réaction de *N*-alkylation avec le 2-bromoéthan-1-ol ou le 3-bromopropan-1-ol à 85 °C pendant une nuit, puis un couplage a été effectué avec l'acide 2,2,3,3-tétraméthylcyclopropane-1-carboxylique, en présence de BOP et de triéthylamine dans le dichlorométhane. Les alcools **80** et **84** ont ainsi été obtenus avec des rendements respectifs de 47 et 20 % sur deux étapes. Ils ont ensuite été traités par le chlorure de tosylate dans la pyridine à 0 °C (**Schéma 66**). Cependant, cette fois encore, les tosylates n'ont pas pu être isolés. En effet, une attaque nucléophile intramoléculaire de l'azote du groupement imino sur le carbone portant le tosylate se produit, conduisant principalement à la formation des composés bicycliques **85** et **86** (**Schéma 67**)<sup>160</sup>. Ces deux sous-produits, obtenus avec des rendements de 15 et 17 %, ont été caractérisés par RMN du proton et du carbone ainsi que par HRMS. On remarque par ailleurs que le composé **85** possède

deux contre-ions différents, soit un chlorure soit un tosylate dont les signaux caractéristiques ont été identifiés en RMN.



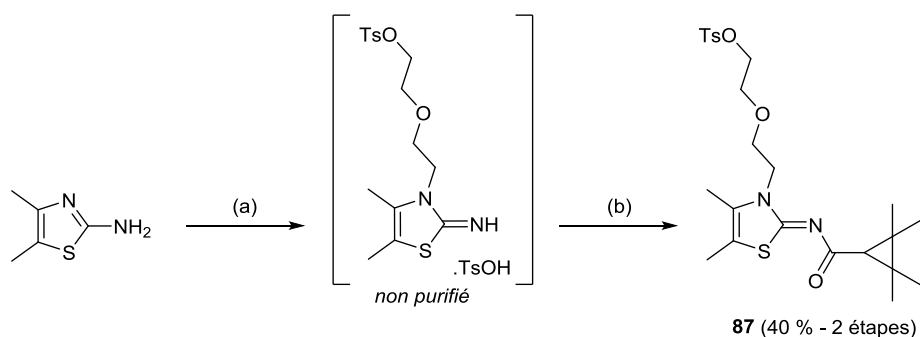
**Réactifs et conditions** : (a) TsCl, pyridine, 0 °C, 2 h.

**Schéma 67** : Formation des sous-produits bicycliques **85** et **86**

Bien que les composés tosylés envisagés n'aient pas pu être isolés, les sels **85** et **86** constituent de potentiels précurseurs de radiomarquage au fluor-18. Ainsi, des essais de fluoration de ces sels ont été tentés dans des conditions proches de celles utilisées en radiochimie, à savoir, par action de KF / K<sub>222</sub> dans le diméthylsulfoxyde à chaud. Néanmoins, ces tentatives n'ont pas conduit à la formation des composés fluorés **74** et **75** attendus.

Face à l'impossibilité de générer des précurseurs de radiofluoration de **74** et **75**, notre intérêt s'est tourné vers la production d'une version [<sup>18</sup>F]fluorée du composé **79**. En effet, ce composé présente également des propriétés intéressantes (K<sub>i</sub>, EC<sub>50</sub>, sélectivité pour les CB<sub>2</sub>R >> CB<sub>1</sub>R). **79** possède également une valeur de clogP adéquate pour un bon passage de la BHE (3,40). Le dérivé tosylé correspondant **87** a donc été préparé en deux étapes décrites dans le **Schéma 68**.

La première étape est une N-alkylation de la 4,5-diméthylthiazol-2-amine avec l'éthylène glycol ditosylate, suivi d'un couplage avec l'acide 2,2,3,3-tétraméthylcyclopropane-1-carboxylique, en présence de BOP et de triéthylamine, dans le dichlorométhane à température ambiante. Cette fois, la longueur de la chaîne latérale n'est pas favorable à une cyclisation intramoléculaire, contrairement à ce qui a été observé pour les dérivés **83** et **84**, et le composé **87** a pu être obtenu avec un rendement global de 40 % sur les deux étapes.

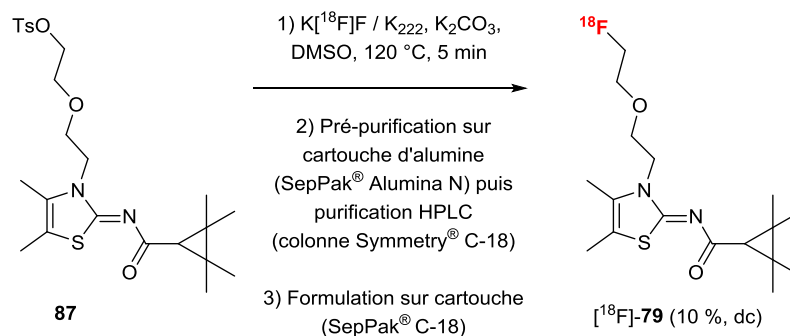


**Réactifs et conditions** : (a) diéthyl glycol ditosylate, 85 °C, 12 h ; (b) acide 2,2,3,3-tétraméthylcyclopropane-1-carboxylique, BOP, Et<sub>3</sub>N, DCM, t.a., 12 h.

**Schéma 68** : Synthèse du précurseur tosylé **87**.

### 3. Radiomarquage au fluor-18 de [<sup>18</sup>F]-79.

[<sup>18</sup>F]-79 a été radiomarqué au fluor-18 au laboratoire dans des conditions de radiomarquage classiques à partir du précurseur tosylé **87** et en utilisant le complexe de fluor activé K[<sup>18</sup>F]F / K<sub>222</sub> en présence de carbonate de potassium dans le diméthylsulfoxyde à 120 °C pendant 5 minutes (**Schéma 69**).



**Schéma 69** : Radiosynthèse de [<sup>18</sup>F]-79.

Une fois la réaction de radiofluoruration terminée, le radioligand [<sup>18</sup>F]-79 a été séparé des ions fluorures n'ayant pas réagi par une pré-purification sur cartouche d'alumine SepPak<sup>®</sup> Alumina N<sup>TM</sup>. Une purification finale a été réalisée par CLHP sur une colonne Waters<sup>®</sup> C18 et a permis d'isoler [<sup>18</sup>F]-79 (temps de rétention de 10,5 minutes). La dernière étape de la radiosynthèse a été la formulation qui permet de remplacer l'éluant CLHP par un mélange d'éthanol et de sérum physiologique, étape primordiale de préparation des radiotraceurs devant être injectés *in vivo*.

La synthèse a été intégralement automatisée et réalisée sur un automate TRACERLab FX FN. [<sup>18</sup>F]-79 a ainsi été obtenu avec un rendement radiochimique corrigé de la décroissance de 10 %, une pureté radiochimique > 95 % et une activité spécifique moyenne de 122 GBq/μmol.

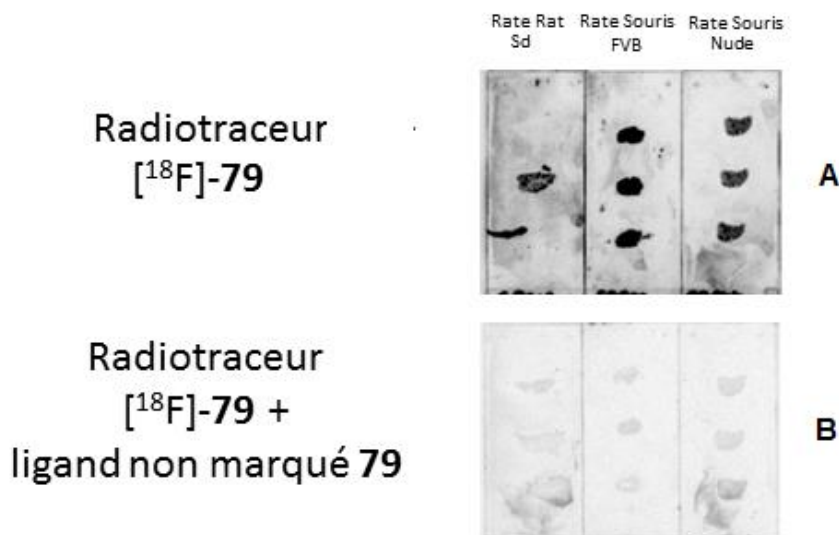
## 4. Evaluation *in vitro* par autoradiographie et *in vivo* par biodistribution de [<sup>18</sup>F]-79.

### 4.1. Autoradiographie *in vitro* de [<sup>18</sup>F]-79.

La distribution physiologique des récepteurs CB<sub>2</sub> montre une expression constitutive dans les organes du système immunitaire (rate, moelle osseuse, ganglions lymphatiques), alors qu'ils ne sont pas (ou peu) présents dans le cerveau. La rate où les CB<sub>2</sub>R sont fortement exprimés, servira d'organe « contrôle positif » pour tester le radiotraceur [<sup>18</sup>F]-79 dans un premier temps.

Des autoradiographies ont été effectuées sur des coupes de rates de rats Sprague Dawley, de souris FVB et de souris Nude. Ces autoradiographies ont été réalisées soit avec le radiotraceur seul ([<sup>18</sup>F]-79) soit en présence du radiotraceur en compétition avec du ligand non marqué (**79**).





**Figure 46 :** Autoradiographies réalisées sur des coupes de rates, en présence de  $[^{18}\text{F}]\text{-79}$ , et de  $[^{18}\text{F}]\text{-79}$  combiné au ligand non marqué 79.

Les résultats obtenus montrent une nette accumulation du traceur  $[^{18}\text{F}]\text{-79}$  dans les rates des différents animaux (**Figure 46**, série A). Lors de la compétition avec le ligand non marqué (**Figure 46**, série B), l'extinction du signal radioactif tend à démontrer la spécificité du radiotracteur  $[^{18}\text{F}]\text{-79}$  pour les CB<sub>2</sub>R.

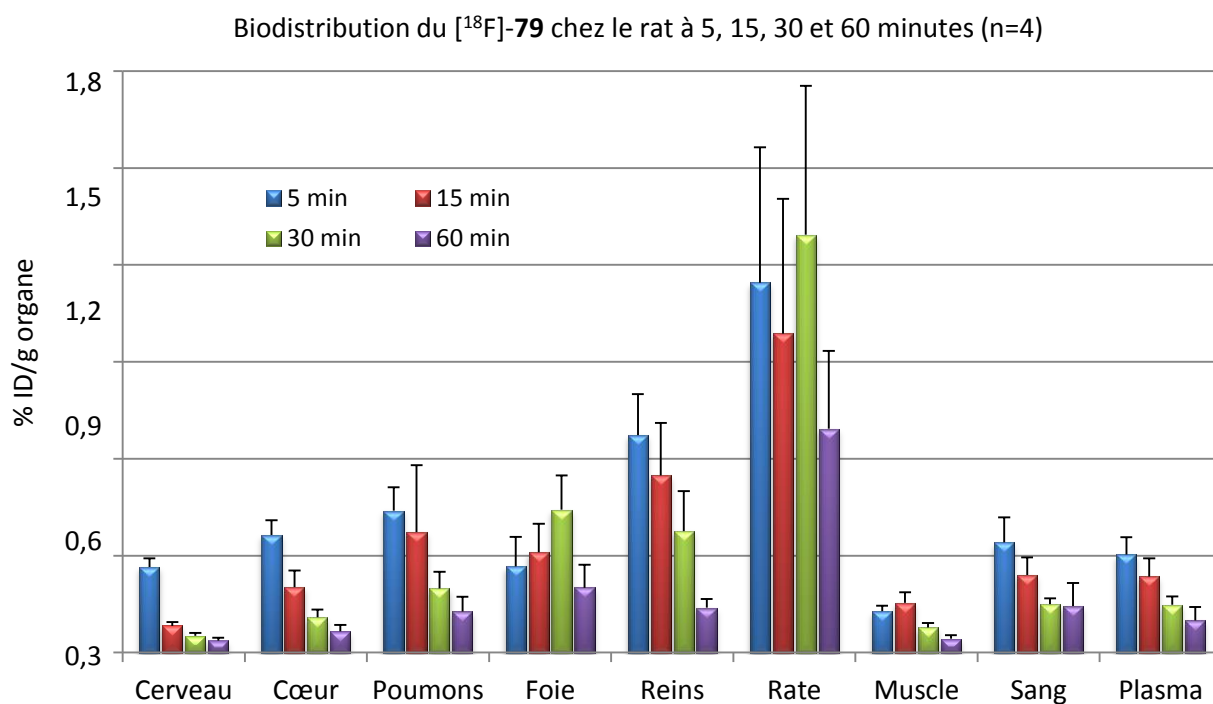
## 4.2. Biodistribution *in vivo* de $[^{18}\text{F}]\text{-79}$ .

Afin de valider les résultats obtenus par autoradiographie, une biodistribution du radiotracteur à quatre temps différents (5, 15, 30 et 60 minutes) après injection de  $[^{18}\text{F}]\text{-79}$  sur seize rats Wistar a été réalisée. L'objectif est d'évaluer la biodistribution corps entier du composé et de vérifier son ciblage spécifique pour la rate qui sert de contrôle positif.

Au cours de cette expérience, on injecte à des animaux le composé étudié ( $[^{18}\text{F}]\text{-79}$ , 15 à 37 MBq) par voie intraveineuse (veine de la queue). A différents temps après injection, les animaux sont sacrifiés, puis le sang et les organes (cerveau, cœur, poumons, foie, rein, rate et muscles) de l'animal sont prélevés. Le plasma est obtenu par centrifugation du sang. Leur radioactivité est alors déterminée par comptage radioactif dans un compteur  $\gamma$ . Les résultats obtenus sont présentés dans la **Figure 47**. Ils sont exprimés en pourcentage de dose injectée par gramme d'organes (% ID/g organe). Ils représentent la moyenne de quatre expériences indépendantes.

Les résultats obtenus indiquent un profil de distribution / élimination dans le cerveau, le cœur, les poumons, les reins, le muscle, le sang et le plasma sans accumulation spécifique du radiotracteur au cours du temps. Les concentrations maximales sont comprises entre 0,13 % ID/g (muscle) et 0,67 % ID/g (rein) à 5 minutes et sont inférieures à 0,14 % ID/g pour tous ces organes 60 minutes après injection. Le foie, organe d'élimination, présente un profil d'accumulation du traceur sur les 30 premières minutes (de 0,27 % ID/g à 5 minutes à 0,44 % ID/g à 30 minutes) puis une élimination (0,20 % ID/g à 60 minutes). Ce profil suggère une élimination hépato-biliaire du radiotracteur.

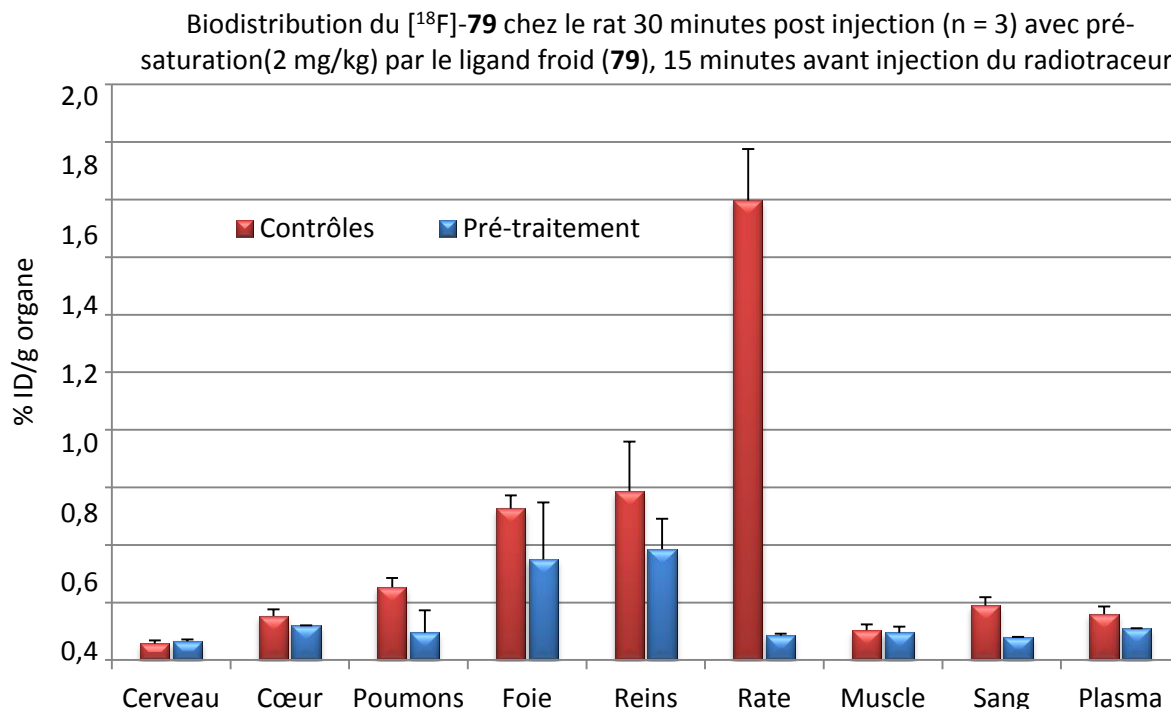
La rate par contre, est l'organe dans lequel la concentration de radioactivité est la plus élevée (> 1,0 % ID/g sur les 30 premières minutes) avec un profil spécifique de distribution (plateau entre 5 et 30 minutes). Ce résultat est cohérent avec la distribution physiologique connue des récepteurs CB<sub>2</sub> dans cet organe.



**Figure 47** : Biodistribution de [<sup>18</sup>F]-**79** chez le rat à 5, 15, 30 et 60 minutes post injection.

Afin de compléter ces premiers résultats, une expérience de pré-saturation a été également réalisée. Pour ce faire, trois animaux ont été injectés avec le traceur non marqué (**79**, 2 mg/kg) 15 minutes avant injection du radiotracer ([<sup>18</sup>F]-**79**). Trois animaux « contrôles », sans pré-saturation, ont été injectés en parallèle. Tous les animaux ont ensuite été sacrifiés 30 minutes après injection du radiotracer, puis le sang et les organes (cerveau, cœur, poumons, foie, rein, rate et muscles) ont été prélevés et la radioactivité déterminée par comptage radioactif (compteur  $\gamma$ ). Les résultats obtenus sont présentés dans la **Figure 48**. Ils sont exprimés, comme précédemment, en % ID/g organe.

Les résultats indiquent une nette diminution de la concentration de la radioactivité dans la rate lors de la pré-saturation des récepteurs (1,6 % avec [<sup>18</sup>F]-**79** seul contre 0,08 % lors de l'injection préalable du traceur froid) (**Figure 48**). Pour les autres organes, la différence entre les contrôles et l'expérience de pré-saturation ne semble pas significative sauf peut-être pour le sang. Ceci pourrait s'expliquer par la présence des globules blancs liés au système immunitaire, siège de l'expression des récepteurs cannabinoïdes.



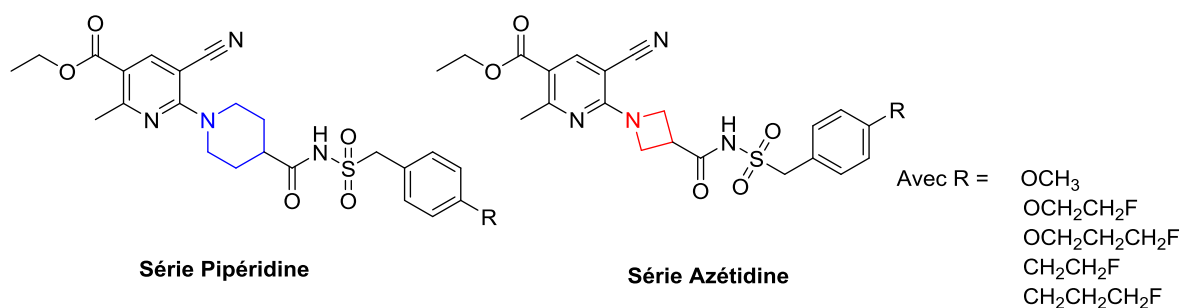
**Figure 48** : Biodistribution de [<sup>18</sup>F]-**79** chez le rat à 30 minutes post injection avec pré-saturation par le ligand non marqué (**79**), 15 minutes avant injection du radiotracer.

Les résultats de la biodistribution (accumulation du traceur dans la rate) et l'expérience de pré-saturation (nette diminution de la concentration du traceur dans la rate) semblent démontrer la spécificité de [<sup>18</sup>F]-**79** pour les CB<sub>2</sub>R.

Après la finalisation de ce manuscrit, l'équipe d'Horti a publié un article (*J. Med. Chem.*, 2016, 59 (7), pp 7840-7855) dans lequel une série de composés équivalente aux nôtres (dont les dérivés **74**, **75**, **76**, **79** et **81**) a été synthétisée. Ces résultats confirment le potentiel de nos ligands pour les CB<sub>2</sub>R, ainsi que la stratégie retenue pour le positionnement de l'atome de fluor-18. A noter, que le composé qu'ils ont retenu pour leur développement en imagerie TEP est le dérivé **76**, alors que nous avons retenu le composé **79**.

# Chapitre III : Les ligands des récepteurs purinergiques de type P2Y<sub>12</sub>.

Pour ces récepteurs, deux familles de composés provenant de la littérature ont été retenues, l'une constituée d'un motif pipéridine et l'autre d'un motif azétidine. Les structures des ligands qui ont été envisagés sont rappelées dans la **Figure 49**.



**Figure 49** : Structures des nouveaux ligands P2Y<sub>12</sub>R envisagés.

## 1. Synthèse.

### 1.1. Série pipéridine.

#### 1.1.1. Analyse rétrosynthétique.

Sur la base d'une étude bibliographique<sup>125</sup>, deux voies de synthèse, basées sur l'analyse rétrosynthétique présentée dans le **Schéma 70**, peuvent être proposées pour obtenir les dérivés souhaités. On constate que les deux voies font intervenir deux intermédiaires communs à synthétiser : un sulfonamide, et un intermédiaire nicotinate portant un groupe partant en  $\alpha$  de l'azote.

Dans la **voie A** (couplage puis S<sub>N</sub>Ar), le sulfonamide serait couplé à l'acide *N*-Boc-pipéridine carboxylique, puis le motif nicotinate serait introduit par une réaction de substitution nucléophile aromatique S<sub>N</sub>Ar.

Dans la **voie B** (S<sub>N</sub>Ar puis couplage), les réactions de substitution nucléophile aromatique et de couplage seraient inversées : une réaction de substitution nucléophile aromatique S<sub>N</sub>Ar entre l'intermédiaire nicotinate et l'acide 4-pipéridine carboxylique permettrait de former un intermédiaire acide carboxylique qui serait engagé dans une réaction de couplage avec le sulfonamide pour donner les produits attendus.

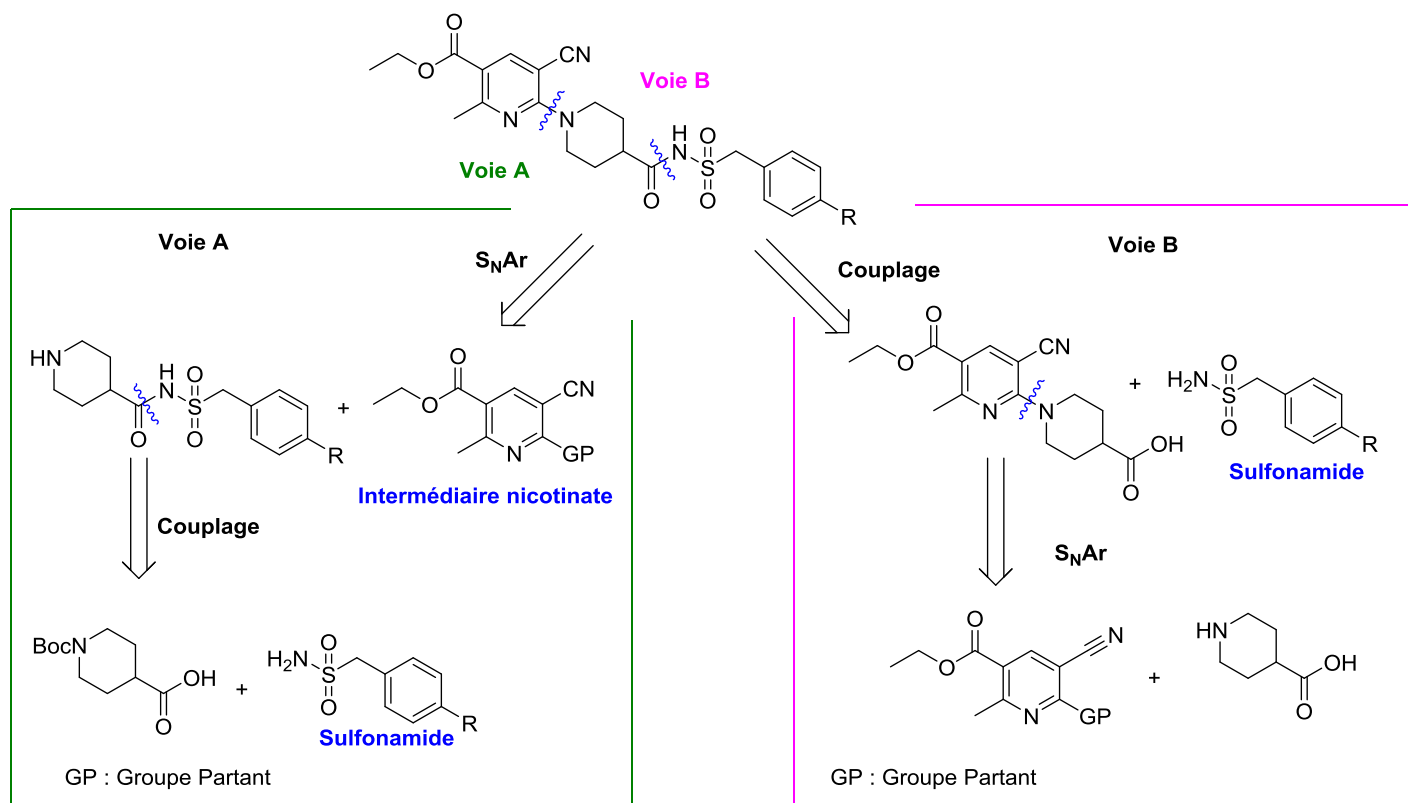
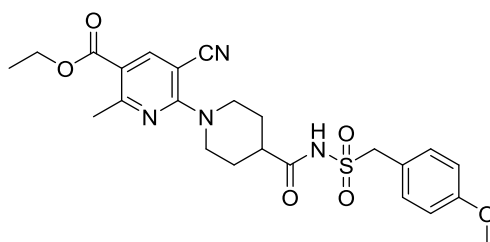


Schéma 70 : Schéma rétrosynthétique d'obtention des analogues en série pipéridine.

## 1.1.2. Résultats obtenus pour la synthèse des ligands en série pipéridine.

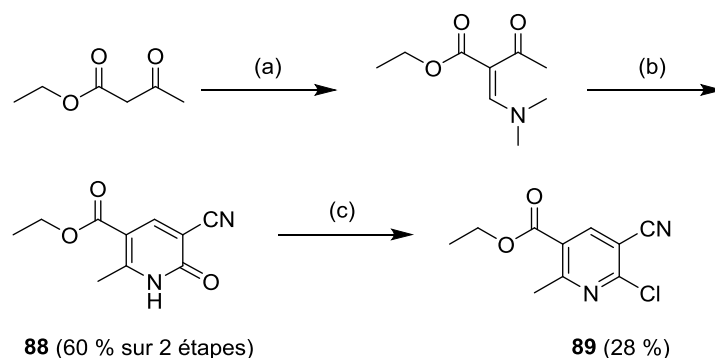
### 1.1.2.a. Synthèse du dérivé *para*-méthoxy (Projet G).

La synthèse du dérivé *para*-méthoxy en série pipéridine (**Figure 50**) nécessite tout d'abord la préparation des deux intermédiaires nicotinate et sulfonamide dont les structures sont présentées au paragraphe précédent.

Figure 50 : Dérivé *para*-méthoxy visé en série pipéridine.

- Synthèse de la partie nicotinate

L'intermédiaire choisi a été le dérivé chloré **89** décrit par Bach *et al*<sup>125</sup>, qui peut être obtenu en trois étapes à partir du réactif (commercial) 3-oxobutanoate d'éthyle selon le **Schéma 71**.



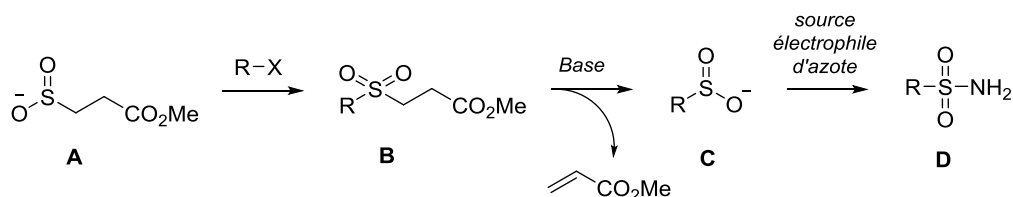
**Réactifs et conditions :** (a) 1,1-diméthoxy-*N,N*-diméthylméthanamine, t.a., 1 nuit ; (b) 2-cyanoacétamide, NaH, THF, t.a., 1 nuit ; (c) SOCl<sub>2</sub>, toluène, 70 °C, 2 h.

**Schéma 71 :** Synthèse de l'intermédiaire chloré **89**.

Dans un premier temps, le motif pyridine doit être formé. Pour cela, la première étape a été une réaction de condensation de type Knoevenagel entre le 3-oxobutanoate d'éthyle et la 1,1-diméthoxy-*N,N*-diméthylméthanamine pendant une nuit à température ambiante formant un intermédiaire énamine<sup>126</sup>. Celle-ci a ensuite été engagée sans purification dans l'étape suivante de condensation avec le 2-cyanoacétamide en présence d'hydrure de sodium dans le tétrahydrofurane à température ambiante. La pyridone **88** a été obtenue sous forme d'un solide rose avec un rendement de 60 %. Ce rendement est cohérent avec celui observé dans la littérature qui est compris entre 50 et 67 %<sup>126</sup>. Lors de la dernière étape, la pyridone a été traitée par du chlorure de thionyle dans le toluène à chaud pour former l'intermédiaire nicotinate souhaité avec un rendement de 28 %, ce qui est légèrement inférieur au rendement attendu (de l'ordre de 40 %). D'autres agents de chloration ont été testés tels que le trichlorure de phosphore (POCl<sub>3</sub>) ou le chlorure d'oxalyle afin d'optimiser le rendement de la dernière étape, cependant aucun d'eux n'a donné de meilleurs résultats.

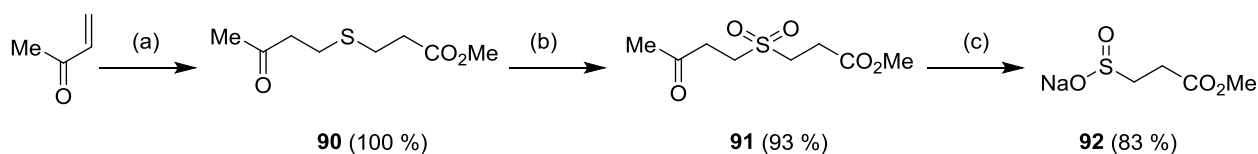
- Synthèse de la partie sulfonamide

La synthèse des sulfonamides requiert la préparation préliminaire d'un dérivé sulfinat tel que le 3-méthoxy-3-oxopropane-1-sulfinat de sodium ou SMOPS (composé **A**, **Schéma 72**), comme précurseur de sulfonation. En effet, la réaction du SMOPS avec un halogénure d'alkyle permet l'obtention du composé **B** qui après traitement par une base va générer le sulfinat **C** et de l'acrylate de méthyle suite à une β-élimination. La réaction entre le sulfinat **C** et des sources électrophiles d'azote peut alors donner accès à divers sulfonamides **D**<sup>161</sup>.



**Schéma 72 :** Procédure de formation des sulfinates (**C**) et des sulfonamides (**D**).

SMOPS a donc été synthétisé en trois étapes décrites dans le **Schéma 73**.

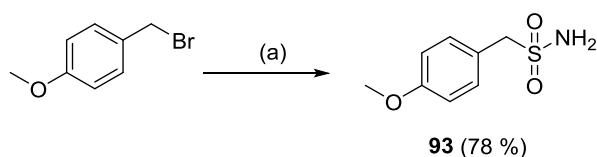


**Réactifs et conditions :** (a) méthyl-3-mercaptopropionate, Et<sub>3</sub>N, THF, t.a., 1 nuit ; (b) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>, Aliquat<sup>®</sup> 336, heptane, acétate d'éthyle, eau, 50 °C, 1 nuit ; (c) NaOMe, THF, méthanol, t.a., 30 min.

**Schéma 73 :** Synthèse de **92** (SMOPS).

L'addition conjuguée du méthyl-3-mercaptopropionate sur la méthyle vinyle cétone en présence de triéthylamine dans le tétrahydrofurane à température ambiante a permis de former quantitativement l'intermédiaire **90**. Ce dernier a ensuite été engagé dans une réaction d'oxydation avec l'eau oxygénée et du tungstène de sodium pour générer la sulfone **91** avec un excellent rendement de 93 %. Le SMOPS (**92**) a pu ensuite être isolé sous forme d'un solide blanc et stable, par traitement de la sulfone **91** par une base (ici le méthanolate de sodium) après évaporation à sec sous pression réduite du solvant de réaction.

SMOPS (**92**) a ensuite été utilisé pour la préparation du sulfonamide **93** selon le **Schéma 74**.



**Réactifs et conditions :** (a) i) SMOPS (**92**), DMSO, t.a, 10 min, ii) NaOMe, méthanol, t.a., 15 min, iii) NH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>H, NaOAc, eau, t.a., 1 nuit.

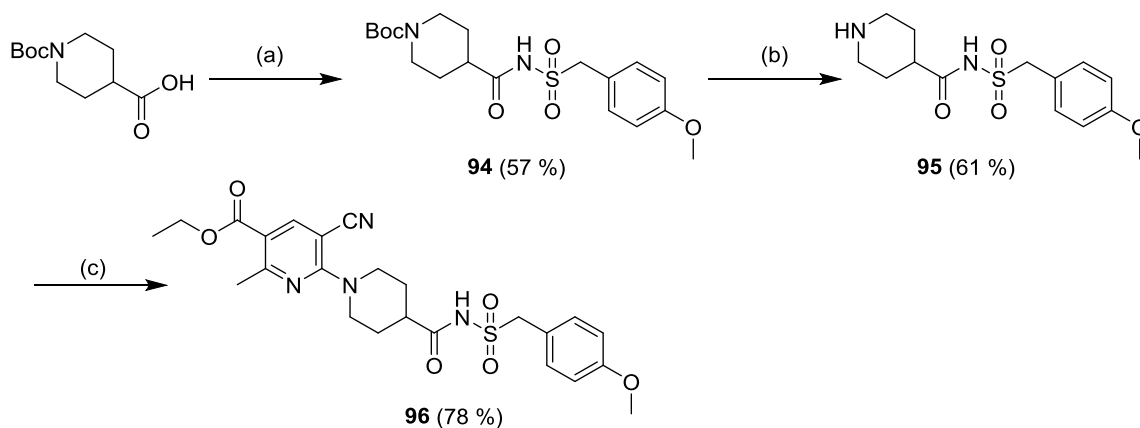
**Schéma 74 :** Synthèse du sulfonamide **93**.

La synthèse du sulfonamide **93** a été réalisée en trois étapes *in situ*. Premièrement, l'addition du SMOPS sur le 1-(bromométhyl)-4-méthoxybenzène a lieu dans le diméthylsulfoxyde pendant 10 minutes à température ambiante. L'intermédiaire sulfone est ensuite traité par le méthanolate de sodium pendant 15 minutes, puis l'acide hydroxylamine-*O*-sulfonique est ajouté comme source électrophile d'azote. De l'acétate de sodium est ajouté au milieu réactionnel afin de neutraliser l'acide sulfurique qui se forme au cours de la réaction. Après une nuit à température ambiante, le sulfonamide **93** a été isolée avec un rendement de 78 %.

Les deux voies de synthèse envisagées lors de l'analyse rétrosynthétique (**voies A et B** présentées dans le **Schéma 70**) ont été tentées pour préparer le composé *para*-méthoxy de la série pipéridine (**96**) afin de comparer les rendements et déterminer la meilleure stratégie à adopter pour la préparation des autres dérivés de la série.

- Synthèse du dérivé *para*-méthoxy **96** par la **voie A** (Couplage-S<sub>N</sub>Ar).

Par cette voie de synthèse, on s'est proposé de préparer le dérivé *para*-méthoxy **96** en trois étapes décrites dans le **Schéma 75**.



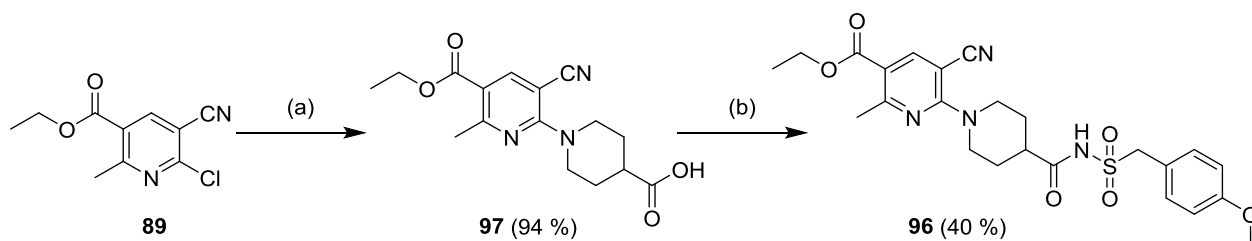
**Réactifs et conditions :** (a) **93**, TBTU, Et<sub>3</sub>N, LiCl, acétonitrile, t.a., 1 nuit ; (b) TFA, DCM, 1 h à 0 °C puis à 1 nuit à t.a. ; (c) **89**, DIPEA, éthanol, reflux.

**Schéma 75 :** Synthèse de **96** par la voie A (couplage-S<sub>N</sub>Ar).

Dans cette voie, la méthode consiste à introduire en premier lieu le motif sulfonamide de la structure. La première étape a donc consisté à faire un couplage entre l'acide *N*-Boc-pipéridine carboxylique commercial et du sulfonamide **93** préalablement synthétisée, en présence de TBTU et triéthylamine dans l'acétonitrile à température ambiante. Le produit couplé **94** a été obtenu après recristallisation dans l'éthanol avec un rendement de 57 %. L'amine est ensuite déprotégée par l'acide trifluoroacétique dans du dichlorométhane pour donner le composé **95** avec 61 % de rendement. La dernière étape permet l'introduction du motif nicotinate par une réaction de substitution nucléophile aromatique entre la pipéridine **95** et l'intermédiaire **89** à reflux dans l'éthanol en présence de DIPEA comme base. Le composé *para*-méthoxy **96** souhaité a été obtenu par précipitation et lavage du précipité dans l'éthanol avec un très bon rendement de 78 % comparable à celui de la littérature (83 %) <sup>125</sup>. Le rendement global de cette synthèse est de 27 % sur trois étapes.

- Synthèse du dérivé *para*-méthoxy **96** par la voie B (S<sub>N</sub>Ar-couplage).

Une seconde voie de synthèse plus courte en deux étapes a également pu être proposée selon le **Schéma 76**.



**Réactifs et conditions :** (a) acide pipéridine-4-carboxylique, Et<sub>3</sub>N, THF, reflux, 1 nuit ; (b) **93**, TBTU, Et<sub>3</sub>N, LiCl, acétonitrile, t.a., 1 nuit.

**Schéma 76 :** Synthèse de **96** par la voie B (S<sub>N</sub>Ar-couplage).

Cette fois, la méthode consiste à construire dans un premier temps l'enchaînement nicotinate / pipéridine par une réaction de substitution nucléophile aromatique puis à introduire la partie

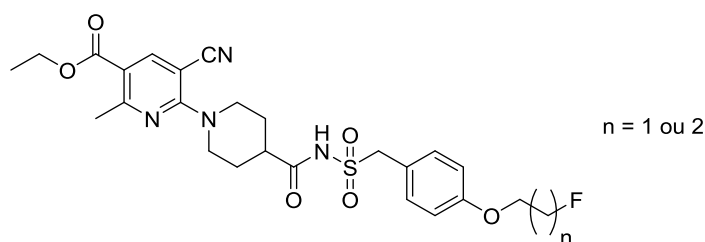


sulfonamide par un couplage dans un second temps. La réaction de substitution nucléophile aromatique a été effectuée entre l'intermédiaire **89** et l'acide pipéridine-4-carboxylique qui est commercial. Cette réaction a eu lieu dans le tétrahydrofurane à reflux pendant une nuit et a permis la formation l'acide **97** quasiment quantitativement (94 %). Cet acide a ensuite été couplé au sulfonamide **93** dans les mêmes conditions que précédemment. Le dérivé *para*-méthoxy **96** a été obtenu avec un rendement de seulement 40 %. Le rendement global de cette voie de synthèse en deux étapes est de 37 %.

La **voie B** (S<sub>N</sub>Ar-couplage) semble être la meilleure approche pour la synthèse de ce dérivé avec seulement deux étapes et un meilleur rendement global. De plus, pour la suite et la synthèse des autres dérivés de la série, cette approche plus convergente permettrait d'obtenir facilement les analogues souhaités par couplage entre l'intermédiaire **97** et les sulfonamides appropriés.

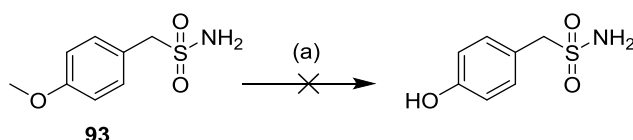
### 1.1.1.b. Synthèse des dérivés *para*-fluoroéthoxy et -fluoropropoxy (Projet H).

La stratégie permettant d'obtenir le dérivé *para*-méthoxy **96** a été envisagée pour la synthèse des deux dérivés *para*-fluoroéthoxy et *para*-fluoropropoxy dont les structures sont rappelées dans la **Figure 51**. Cette méthode nécessite la préparation préalable des deux sulfonamides adéquats à savoir le (4-(2-fluoroéthoxy)phényl)méthanesulfonamide et le (4-(3-fluoropropoxy)phényl)méthane sulfonamide.



**Figure 51** : Dérivés *para*-fluoroéthoxy et *para*-fluoropropoxy visés en série pipéridine.

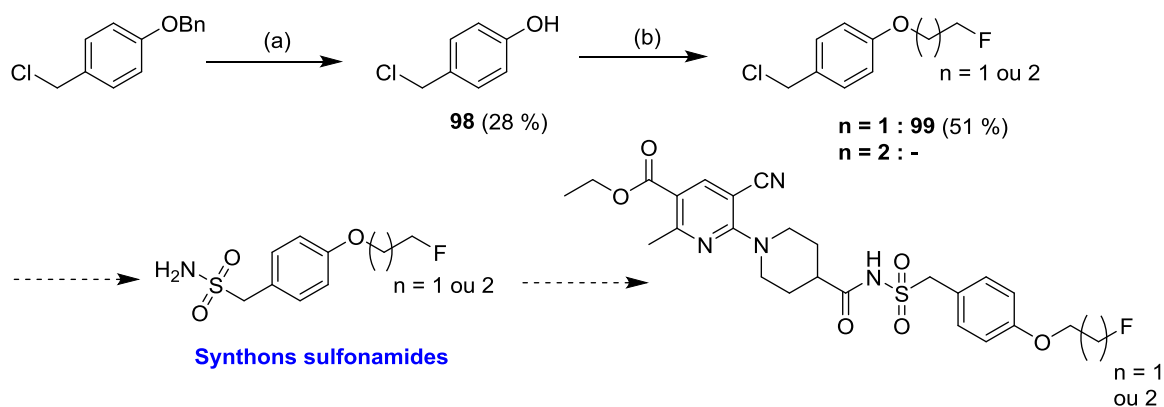
La première méthode, la plus rapide, envisagée pour obtenir les deux nouveaux sulfonamides fluorés, a consisté à *O*-déméthyle le (4-méthoxyphényl)méthanesulfonamide **93** (**Schéma 77**). A partir du composé déméthylé, on aurait pu réaliser une réaction de *O*-alkylation avec les tosyloxy de 2-fluoroéthyle et 3-fluoropropyle puis un couplage avec l'intermédiaire **97** aurait permis d'obtenir en trois étapes les analogues fluorés souhaités. Cependant, malgré l'utilisation de différentes conditions telles que, le tribromure de bore (BBr<sub>3</sub>) dans le dichlorométhane à -78 °C, ou le trichlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>) en combinaison avec l'iodure de tétrabutylammonium (TBAI) dans l'acétonitrile à 70 °C, la *O*-déméthylation de **93** n'a pas été fructueuse probablement en raison des conditions trop dures utilisées qui conduisent à la dégradation du composé.



**Réactifs et conditions** : (a) BBr<sub>3</sub>, DCM, -78 °C, 1 h ou AlCl<sub>3</sub>, TBAI, acétonitrile, 70 °C, 3 h.

**Schéma 77** : Tests de déméthylation de **93**.

Face aux échecs de préparation des synthons sulfonamides par voie directe (*O*-déméthylation / *O*-alkylation), une seconde méthode en trois étapes, présentée dans le **Schéma 78**, a été imaginée.



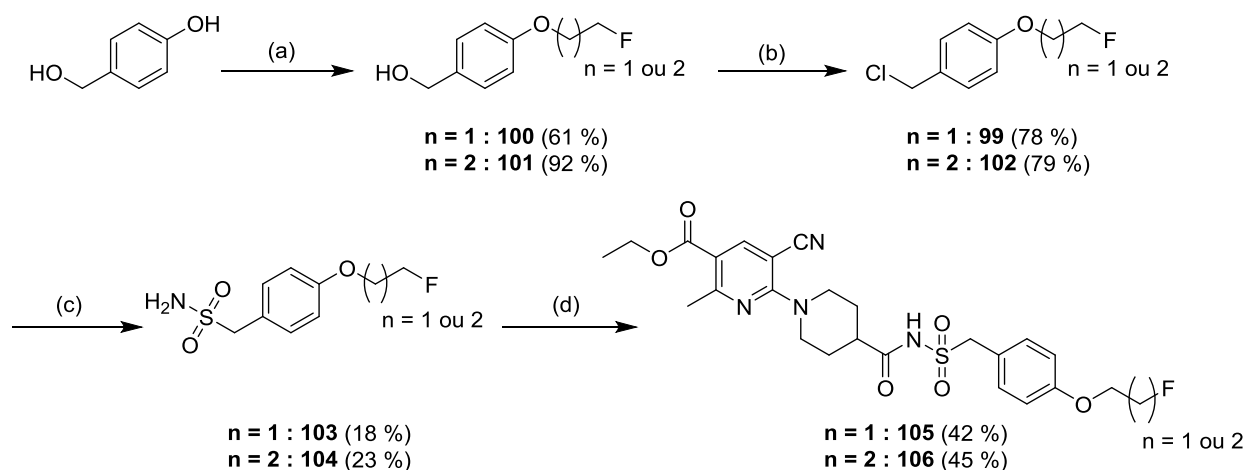
**Réactifs et conditions :** (a) TMSBr, thioanisole, TFA, 0 °C, 30 min ; (b) tosyle de 2-fluoroéthyle ou tosyle de 3-fluoropropyle, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DMF, 70 °C, 5 h.

**Schéma 78 :** Première voie de synthèse testée pour la préparation des dérivés *para*-fluoroéthoxy et *para*-fluoropropoxy.

Ainsi, dans un premier temps, la débenzylation du réactif commercial 1-(benzyloxy)-4-(chlorométhyle)benzène a été réalisée à l'aide d'un mélange de bromure de triméthylsilyle (TMSBr) et de thioanisole dans l'acide trifluoroacétique à 0 °C pendant 30 minutes. Le 4-(chlorométhyle)phénol (**98**) a été obtenu avec un faible rendement de 28 %. Ce dernier a ensuite été engagé dans une réaction de *O*-alkylation avec le tosyle de 2-fluoroéthyle dans le *N,N*-diméthylformamide à 70 °C pendant 5 h en présence de carbonate de potassium, pour former **99** avec 51 % de rendement. La suite de la séquence réactionnelle n'a pas été poursuivie et la méthode a été abandonnée pour deux raisons : la débenzylation du réactif initiale s'est avérée être peu reproductible avec des rendements variant de 4 à 28 % dû à la formation de nombreux sous-produits. De plus, au cours de la réaction d'alkylation, en présence d'une base même faible, l'intermédiaire **98** peut réagir sur lui-même, induisant de ce fait la formation de divers sous-produits.

Une nouvelle voie alternative comportant également trois étapes a donc été envisagée (**Schéma 79**), en utilisant comme réactif initial le 4-(hydroxyméthyl)phénol.

La réaction de *O*-alkylation régiosélective du phénol a été réalisée en premier lieu entre le 4-(hydroxyméthyl)phénol et le tosyle de 2-fluoroéthyle ou tosyle de 3-fluoropropyle en présence de carbonate de potassium dans le *N,N*-diméthylformamide à 70 °C, permettant l'obtention de **100** et **101** avec des rendements respectifs de 61 et 92 %. L'alcool benzylique des deux intermédiaires a ensuite été substitué par un chlore grâce au chlorure de thionyle dans le toluène pendant une heure à 70 °C. Les deux dérivés chlorés **99** et **102** ont été formés avec de bons rendements : 78 et 79 %. Les sulfonamides ont ensuite été formés grâce à la méthode décrite au paragraphe précédent, en traitant les dérivés chlorés **99** et **102** par le SMOPS (**92**), et l'acide hydroxylamine-*O*-sulfonique dans un mélange eau / diméthylsulfoxyde. Les deux sulfonamides **103** et **104** ont ainsi pu être obtenus mais, avec de faibles rendements de 18 et 23 %. Ces derniers ont enfin été soumis à un couplage avec l'acide **97** en présence de l'agent de couplage TBTU et de la base DIPEA dans le dichlorométhane à température ambiante pour donner les deux nouveaux ligands fluorés **105** et **106** avec des rendements respectifs de 42 et 45 %.



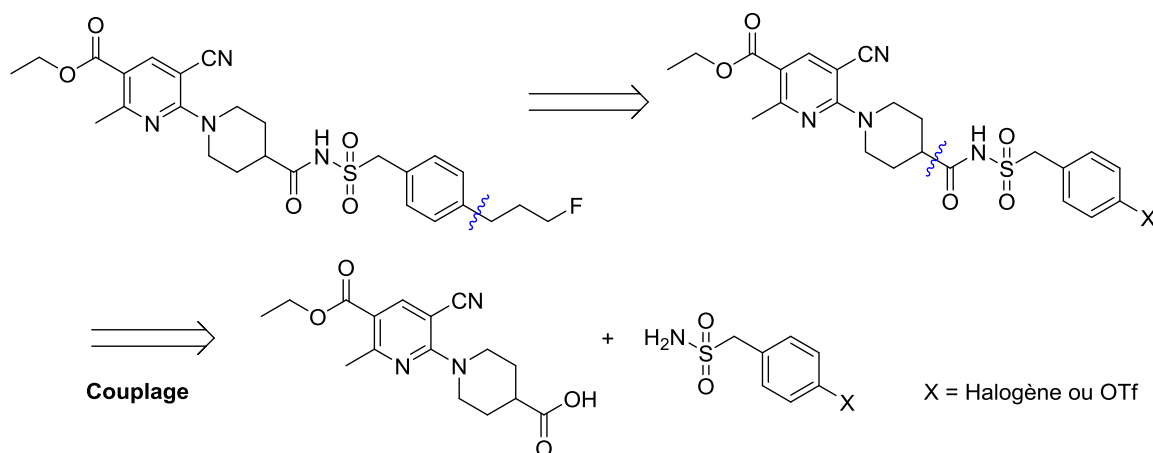
**Réactifs et conditions :** (a) tosylation de 2-fluoroéthyle (n = 1) ou de 3-fluoropropyle (n = 2), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DMF, 70 °C, 5 h ; (b) SOCl<sub>2</sub>, toluène, 70 °C, 1 h ; (c) i) **92**, DMSO, t.a., 10 min, ii) NaOMe, méthanol, t.a., 15 min, iii) NH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>H, NaOAc, eau, t.a., 1 nuit ; (d) **97**, TBTU, DIPEA, DCM, t.a., 1 nuit.

**Schéma 79 :** Voie de synthèse permettant l'obtention des sulfonamides **103** et **104**, et des composés finaux visés **105** et **106**.

### 1.1.1.c. Synthèse du dérivé *para*-fluoropropyle.

- Analyse rétrosynthétique.

L'analyse rétrosynthétique de préparation du composé *para*-fluoropropyle visé est présentée dans le **Schéma 80**. Cette analyse fait à nouveau apparaître deux synthons clé : un sulfonamide et un acide carboxylique, qui après couplage et dérivatisation du noyau benzyle permettraient d'obtenir le dérivé souhaité.



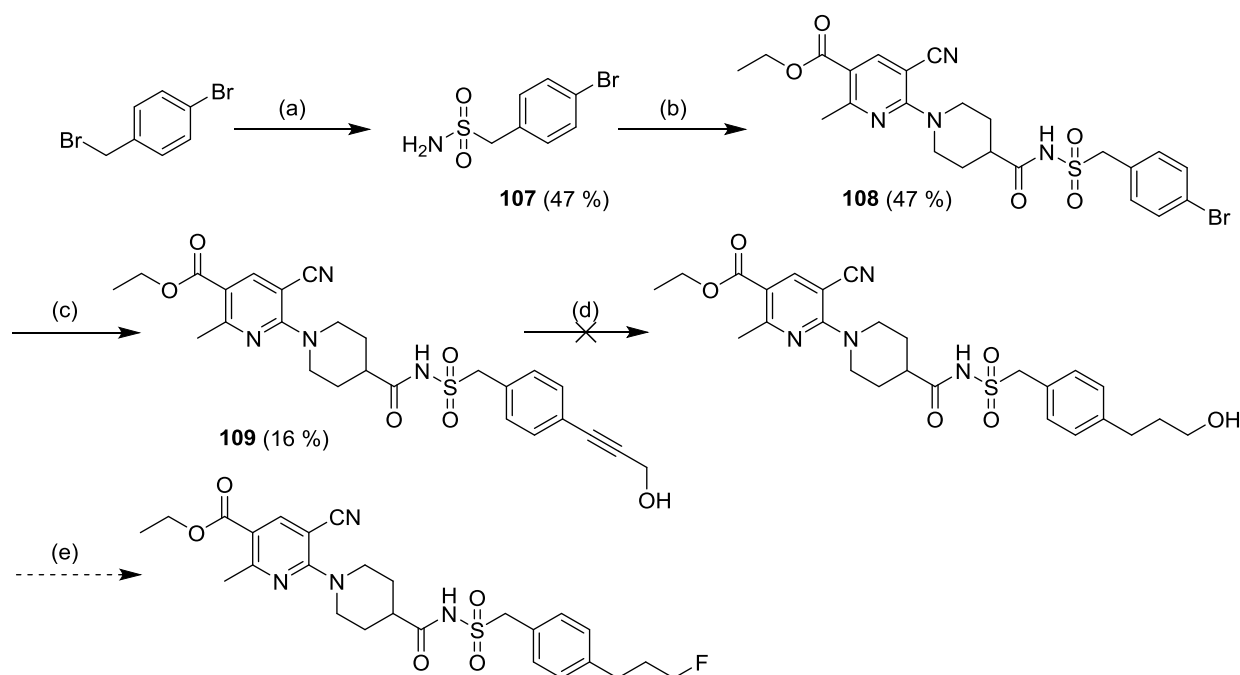
**Schéma 80 :** Analyse rétrosynthétique de préparation du dérivé *para*-fluoropropyle.

- Résultats obtenus pour la synthèse du dérivé *para*-fluoropropyle

Il a été choisi de préparer le (4-bromophényl)méthanesulfonamide **107** (**Schéma 81**) dans l'optique d'introduction de la chaîne fluoropropyle par remplacement du bromure aromatique. Celui-ci a donc été préparé selon la méthode de Baskin *et al.*<sup>161</sup> décrite précédemment à partir du 1-bromo-4-(bromométhyl)benzène. Le sulfonamide **107**, obtenu sous forme d'une poudre

blanche avec 47 % de rendement, a ensuite été engagé dans un couplage avec l'acide **97** en présence de TBTU et de triéthylamine dans l'acétonitrile pour former le composé bromé **108** avec un rendement modéré de 47 %. Afin d'introduire la chaîne fluoropropyle, l'enchaînement couplage de Sonogashira sur le bromure d'aryle **108** / réduction de la triple liaison, a été envisagé. Le couplage de Sonogashira, catalysé par l'acétate de palladium, a donc été effectué entre **108** et l'alcool propargylique en présence de potassium tribasique et de triphénylphosphine dans le diméthylsulfoxyde à 80 °C<sup>162</sup>. **109** a été formé avec seulement 16 % de rendement. Ces conditions moins conventionnelles, décrites par Kuttner *et al.*<sup>162</sup>, ont été appliquées car les conditions habituelles du couplage de Sonogashira (PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, Et<sub>3</sub>N, CuI, THF) n'avaient pas abouti.

Le composé couplé **109** a ensuite été soumis à une réaction d'hydrogénation catalytique afin de réduire sa triple liaison. Cependant, aucune conversion de l'alcyne en alcène ou en alcane n'a été observée en présence d'hydrogène et de palladium sur charbon dans le méthanol à température ambiante ou par un chauffage à 50 °C sous pression atmosphérique.



**Réactifs et conditions :** (a) i) **92**, DMSO, t.a., 10 min, ii) NaOMe, méthanol, t.a., 15 min, iii) NH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>H, NaOAc, eau, t.a., 1 nuit ; (b) **97**, TBTU, Et<sub>3</sub>N, LiCl, acétonitrile, t.a., 1 nuit ; (c) alcool propargylique, Pd(OAc)<sub>2</sub>, K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, PPh<sub>3</sub>, DMSO, 80 °C, 6 h ; (d) H<sub>2</sub>, Pd/C 10 %, méthanol, t.a. ou 50 °C, 2 jours.

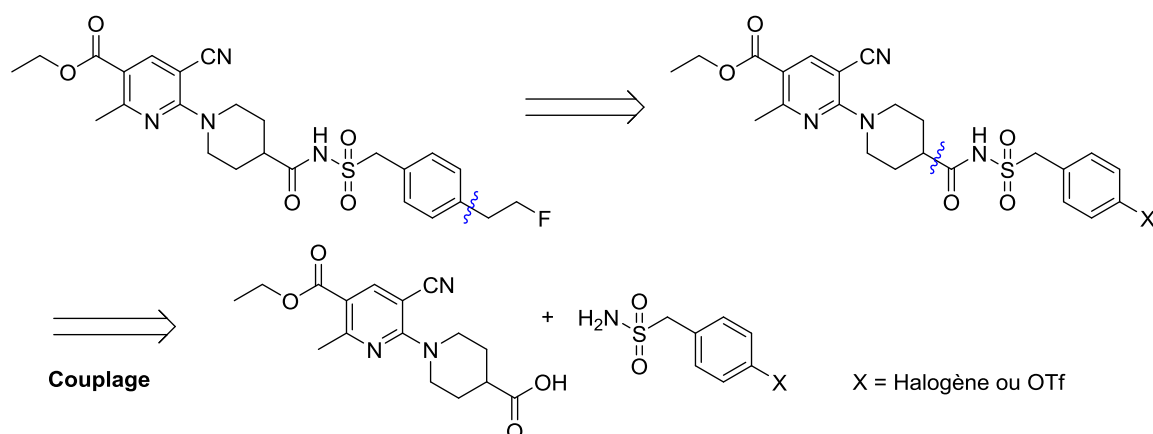
**Schéma 81 :** Tentative de synthèse du dérivé *para*-fluoropropyle.

Devant les difficultés rencontrées pour réduire la triple liaison du composé **109**, la préparation du dérivé *para*-fluoropropyle a été reportée.

#### 1.1.1.d. Synthèse du dérivé *para*-fluoroéthyle.

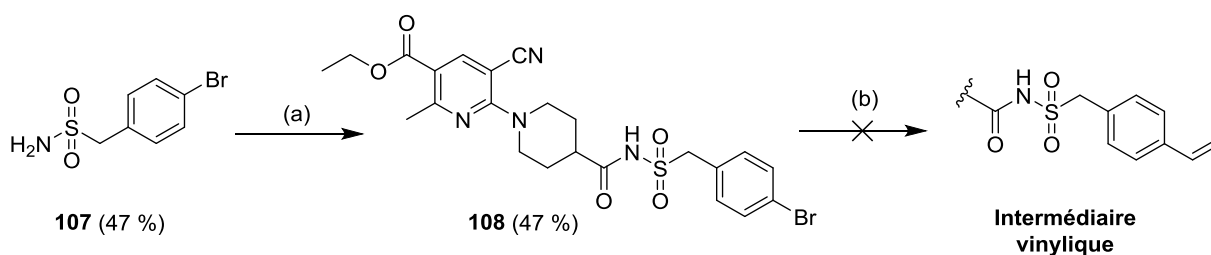
- Analyse rétrosynthétique.

L'analyse rétrosynthétique de l'analogue *para*-fluoroéthyle est semblable à celle du dérivé *para*-fluoropropyle et fait apparaître deux synthons sulfonamide et acide carboxylique comme présenté au **Schéma 82**.

Schéma 82 : Analyse rétrosynthétique du dérivé *para*-fluoroéthyle.

- Résultats obtenus pour la synthèse du dérivé *para*-fluoroéthyle.

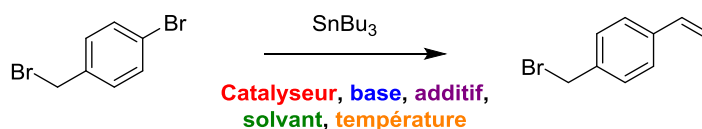
Le (4-bromophényl)méthanesulfonamide **107** préalablement préparé a été réutilisé pour la préparation du dérivé **108** présentée au Schéma 83. A partir de ce dernier, un couplage de Stille a été envisagé, suivi d'une hydroboration oxydante pour l'introduction de la chaîne fluoroéthyle. Le couplage de Stille est un couplage pallado-catalysé entre un dérivé de l'étain et des halogénures ou triflates vinyliques ou aromatiques<sup>163</sup>. Un des grands avantages de ce couplage est la compatibilité fonctionnelle des organostannanes avec un grand nombre de groupements vinyliques. L'inconvénient majeur est la production de dérivés de l'étain hautement toxiques. Ce couplage a été tenté en utilisant le PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> comme catalyseur, du chlorure de lithium connu pour accélérer l'étape de transmétallation et le tributyl(vinyl)stannane dans le *N,N*-diméthylformamide à 60 °C (Schéma 83). Après purification par chromatographie, un mélange de produits a été obtenu contenant le produit souhaité mais non isolable.



**Réactifs et conditions :** (a) **97**, TBTU, Et<sub>3</sub>N, LiCl, acétonitrile, t.a., 1 nuit ; (b) tributyl(vinyl)stannane, PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, LiCl, DMF, 60 °C, 5 h.

Schéma 83 : Tentative de formation de l'intermédiaire vinylique.

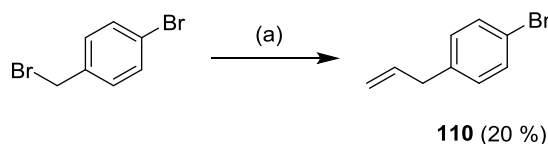
L'intermédiaire vinylique précédent étant difficile à purifier, l'introduction du motif fluoroéthyle a été envisagée plus tôt dans la synthèse. Ainsi, des essais de couplage de Stille ont été tentés sur le 1-bromo-4-(bromométhyl)benzène. Les différentes conditions testées sont récapitulées dans le Tableau 23.



Essai	Catalyseur	Base	Solvant	Température	Additifs	Résultats
1	PdCl <sub>2</sub> (PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	/	DMF	70 °C	LiCl	Aucune conversion
2	Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub>	Et <sub>3</sub> N	Toluène	120 °C	CuI	Formation du régioisomère <b>110</b>

Tableau 23 : Conditions de couplage de Stille testées.

L'essai 2 a conduit majoritairement à la formation du régioisomère du composé attendu, suite à la réaction sur l'atome de brome benzylique plutôt que phénylique (**Schéma 84**). Ce composé a pu être isolé et caractérisé par RMN du proton et du carbone.



Réactifs et conditions : (a) SnBu<sub>3</sub>, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, Et<sub>3</sub>N, CuI, toluène, 120 °C, 5 h.

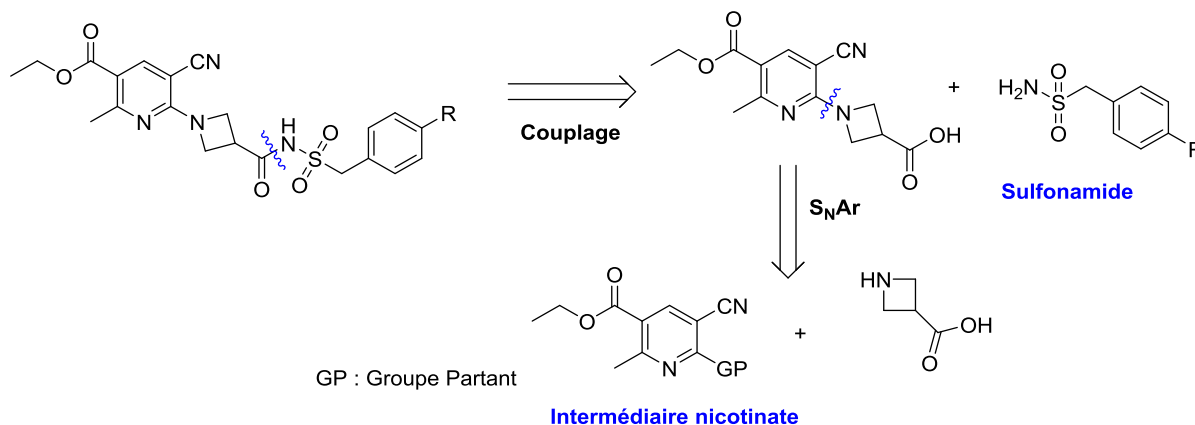
**Schéma 84** : Régioisomère **110** obtenu, résultant d'un couplage sur l'atome de brome benzylique.

Globalement, les résultats peu encourageants rencontrés avec le couplage de Stille ont conduit à un report des investigations sur ce composé.

## 1.2. Série azétidine.

### 1.2.1. Analyse rétrosynthétique.

L'analyse rétrosynthétique en série azétidine fait apparaître deux intermédiaires communs à la série pipéridine : le dérivé nicotinate et le sulfonamide (**Schéma 85**). La stratégie S<sub>N</sub>Ar suivie d'un couplage semble également indiquée pour cette série.

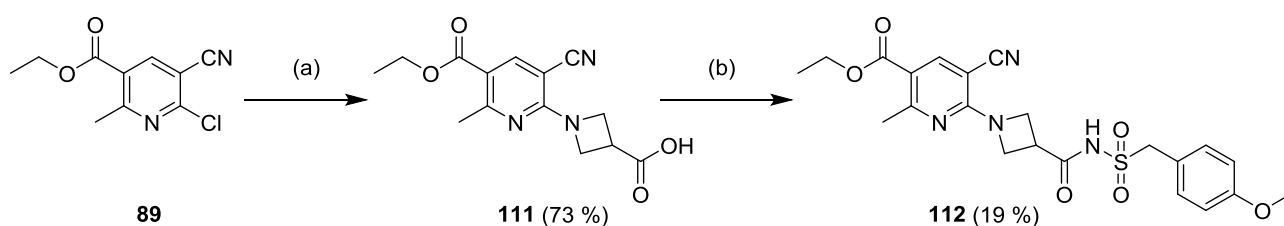


**Schéma 85** : Analyse rétrosynthétique des nouveaux analogues en série azétidine.

## 1.2.2. Résultats obtenus pour la synthèse de ligands en série azétidine.

### 1.2.2.a. Synthèse du dérivé *para*-méthoxy (Projet I).

La synthèse en deux étapes, proposée au **Schéma 86**, a été envisagée pour la préparation du dérivé *para*-méthoxy. La première étape est une réaction de substitution nucléophile aromatique entre l'intermédiaire nicotinate **89** préalablement synthétisé (**Schéma 71**, paragraphe 1.1.2.a) et l'acide azétidine-3-carboxylique en présence de DIPEA dans l'éthanol à reflux. Le produit **111** a été obtenu avec un bon rendement de 73 %. Ce dernier a ensuite été engagé dans un couplage avec le sulfonamide **93**, en utilisant le TBTU comme agent de couplage, de la triéthylamine comme base dans l'acétonitrile à température ambiante. Le dérivé *para*-méthoxy **112** a ainsi pu être obtenu sous forme d'une poudre blanche avec un rendement de 19 %.

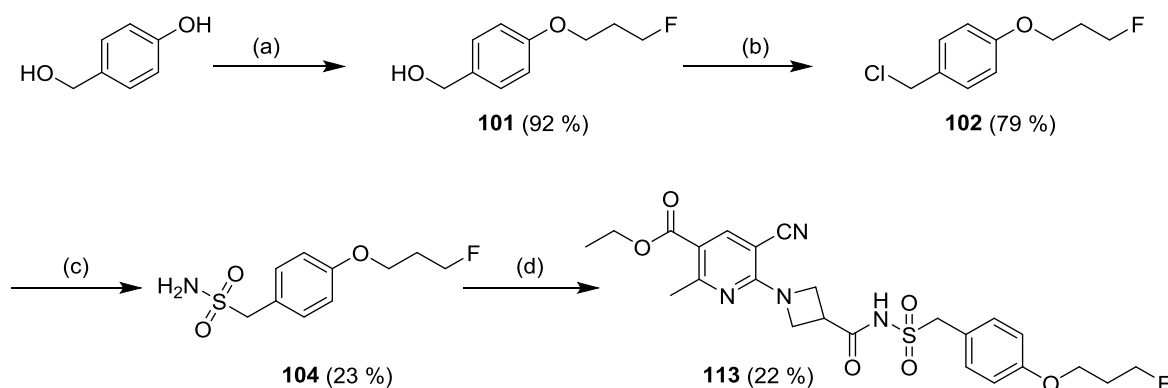


**Réactifs et conditions :** (a) acide azétidine-3-carboxylique, DIPEA, éthanol, reflux, 3 h ; (b) **93**, TBTU, Et<sub>3</sub>N, LiCl, acétonitrile, t.a., 1 nuit.

**Schéma 86 :** Synthèse de l'analogue *para*-méthoxy **112**.

### 1.2.2.b. Synthèse du dérivé *para*-fluoropropoxy (Projet J).

Le dérivé fluoropropoxy de la série azétidine a été construit de manière analogue à celui de la série pipéridine, c'est-à-dire en construisant le (4-(3-fluoropropoxy)phényl)méthanesulfonamide en trois étapes puis en le couplant à l'acide **111** selon le **Schéma 87**.



**Réactifs et conditions :** (a) tosylate de 3-fluoropropyle, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DMF, 70 °C, 5 h ; (b) SOCl<sub>2</sub>, toluène, 70 °C, 1 h ; (c) i) **92**, DMSO t.a., 10 min, ii) NaOMe, méthanol, t.a., 15 min, iii) NH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>H, NaOAc, eau, t.a., 1 nuit ; (d) **111**, TBTU, DIPEA, DCM, t.a., 1 nuit.

**Schéma 87 :** Synthèse du dérivé *para*-fluoropropoxy **113**.

La synthèse du (4-(3-fluoropropoxy)phényl)méthanesulfonamide **104** a été décrite dans le paragraphe 1.1.1.b, **Schéma 79**, et ne sera pas détaillée à nouveau dans cette partie. Ce sulfonamide, obtenu avec un rendement global sur trois étapes de 16 %, a ainsi été engagé dans un couplage avec l'acide **111** en présence de TBTU et de DIPEA dans le dichlorométhane à température ambiante. Le dérivé fluoropropoxy **113** en série azétidine a ainsi pu être obtenu avec un rendement de 22 %. Faute de temps, la synthèse de l'analogue *para*-fluoroéthoxy en série azétidine n'a pas pu être abordée.

Les données pharmacologiques *in vitro* des nouveaux dérivés **105**, **106**, **112** et **113** seront évaluées prochainement afin de connaître l'affinité de ces composés pour les récepteurs purinergiques P2Y<sub>12</sub>. Celles du dérivé *para*-méthoxy **96** étant déjà connues de la littérature<sup>125</sup> (IC<sub>50</sub> = 30 nM), son évaluation en tant que radiotracer a été envisagée.

## 2. Synthèse du précurseur de marquage de [<sup>11</sup>C]-**96**.

Le dérivé *para*-méthoxy de la série pipéridine (**96**) étant le seul dont on connait actuellement l'affinité pour les récepteurs P2Y<sub>12</sub>, il a été choisi de synthétiser son précurseur en vue d'un marquage isotopique au carbone-11, *via* une réaction de méthylation.

### 2.1. Analyse rétrosynthétique.

Le radiomarquage au carbone-11 s'effectuant le plus souvent par *O*- ou *N*-méthylation, l'introduction du carbone-11 a été envisagée sur la fonction *para*-méthoxyphényle du composé **96**. Ainsi, l'analyse rétrosynthétique fait apparaître un phénol comme précurseur de marquage, celui-ci pouvant être obtenu à partir de l'éther correspondant (**Schéma 88**).

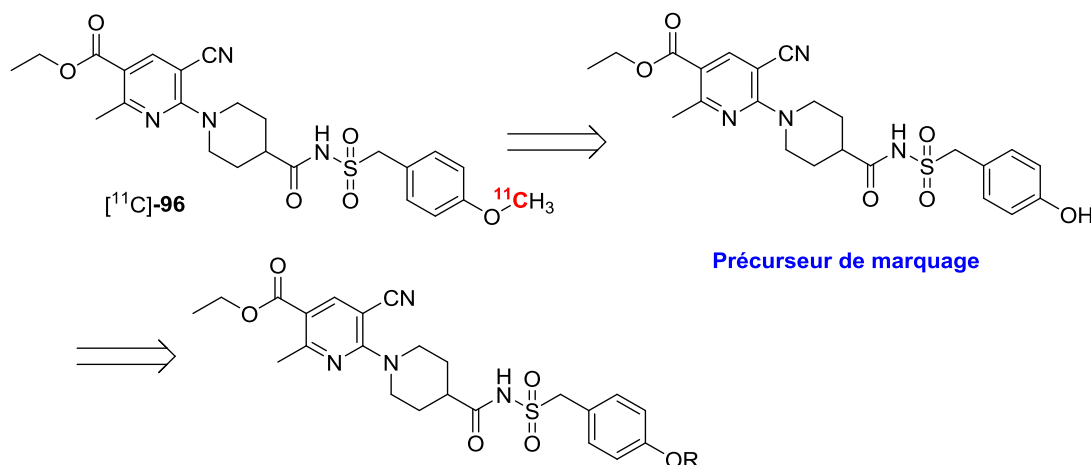


Schéma 88 : Analyse rétrosynthétique de la préparation de [<sup>11</sup>C]-**96**.

## 2.2 Résultats obtenus pour la synthèse du précurseur.

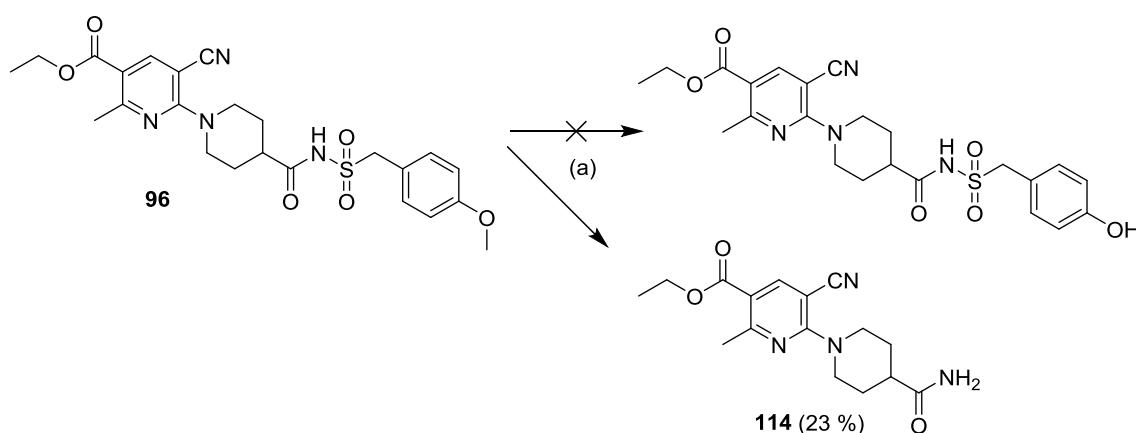
### 2.2.1. Tentative de synthèse du précurseur à partir de **96**.

La *O*-déméthylation du méthoxybenzyle **96** semblait être la voie tout indiquée pour l'obtention rapide du précurseur souhaité, bien que celle-ci peut avoir des conséquences sur la RAS. Pour



rappel, un lot de 3,7 GBq de radiotracer produit à une radioactivité spécifique de 185 GBq/ $\mu$ mol (chiffres réalistes pour une *O*- ou *N*-méthylation au laboratoire) correspond en fait à 20 nanomoles. Typiquement, 1 mg de précurseur de marquage sont mis en jeu dans ces réactions, soit pour le composé **117**, 2,1  $\mu$ moles. Si une trace du composé méthylé est toujours présente, par exemple 1% molaire, soit 21 nanomoles, la RAS sera tout simplement divisée de moitié.

La *O*-déméthylation a donc été tentée de différentes façons en utilisant soit le tribromure de bore dans le dichlorométhane à -78 °C, soit le chlorure d'aluminium dans le toluène à chaud. Dans les deux cas, le phénol attendu n'a pas été obtenu, et un produit secondaire a été formé : l'amide **114** (Schéma 89). Ce dernier a été identifié par RMN du proton. D'après ces résultats, il semblerait que la liaison N-S du sulfonamide soit sensible aux acides de Lewis. Or les méthodes classiques de *O*-déméthylation requièrent des conditions assez dures faisant intervenir des acides de Lewis qui ne semblent pas appropriées pour ce composé.



Réactifs et conditions : (a) BBr<sub>3</sub>, DCM, -78 °C, 1 h ou AlCl<sub>3</sub>, toluène, 70 °C, 2 h.

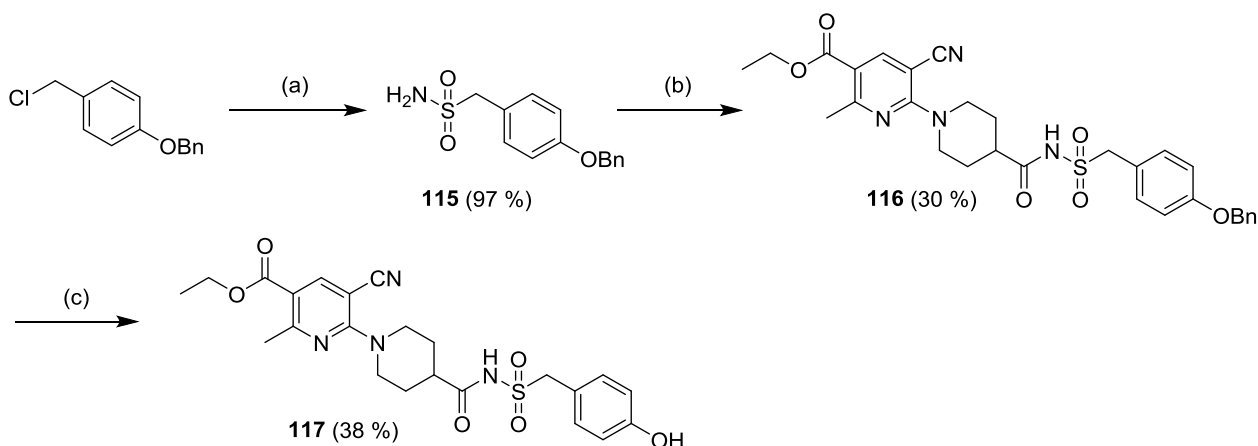
Schéma 89: Essais de *O*-déméthylation de méthoxyphényle **96**.

### 2.2.2. Tentative alternative de synthèse du précurseur.

Les difficultés rencontrées lors de la *O*-déméthylation de **96**, ont conduit à imaginer une nouvelle voie de synthèse permettant d'obtenir le phénol par des conditions plus douces. C'est pourquoi on s'est proposé de passer par un intermédiaire benzylé (**116**), car ce groupement peut s'enlever aisément sans affecter d'autres fonctions chimiques. Cette stratégie alternative présente l'avantage d'être plus respectueuse des futures RAS lors du radiomarquage.

La préparation de **116** a été effectuée en deux étapes à partir du réactif commercial 1-(benzyloxy)-4-(chlorométhyl)benzène. Le sulfonamide **115** a tout d'abord été préparé selon la méthode décrite précédemment et obtenu avec 97 % de rendement. Celui-ci a ensuite été couplé à l'acide **97** pour donner **116** avec un rendement de 30 %. La libération de la fonction phénol du composé **116** a été testée dans un premier temps par hydrogénation catalytique à température ambiante. Cependant, aucune conversion n'a été observée, même après chauffage du milieu réactionnel à 50 °C pendant plusieurs heures. Une voie alternative de *O*-débenzylation a donc été envisagée en utilisant le bromotriméthyle silane et du thioanisole dans l'acide trifluoroacétique à

0 °C pendant une heure<sup>164</sup>. Le précurseur de marquage **117** a alors été obtenu avec 38 % de rendement selon le **Schéma 90**.



**Réactifs et conditions :** (a) i) **92**, DMSO, t.a., 10 min, ii) NaOMe, méthanol, t.a., 15 min, iii) NH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>H, NaOAc, eau, t.a., 1 nuit ; (b) **97**, TBTU, DIPEA, DCM, t.a., 1 nuit ; (c) TMSBr, thioanisole, TFA, 0 °C, 1 h.

**Schéma 90** : Synthèse du précurseur de marquage **117**.

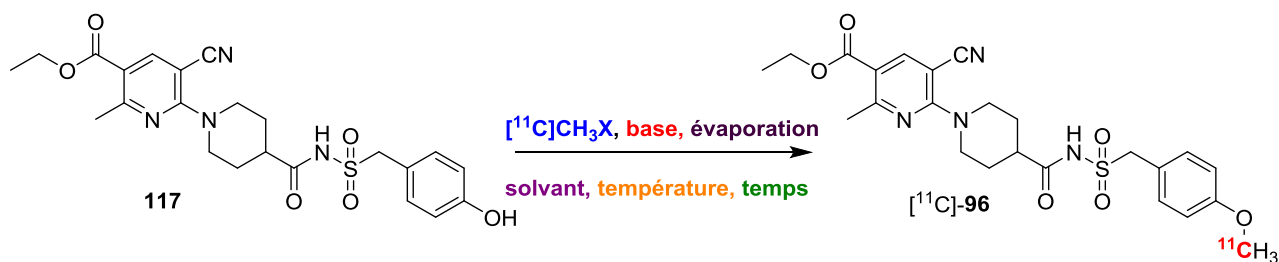
Le phénol requis pour la préparation de [<sup>11</sup>C]-**96** par *O*-méthylation ayant été obtenu, nous avons pu procéder au radiomarquage.

### 3. Radiomarquage au carbone-11.

Grâce au précurseur **117**, le radiomarquage au carbone-11 de **96** a pu être tenté au sein du laboratoire. Plusieurs conditions ont été testées avant d'obtenir une incorporation du carbone-11. Ces conditions sont récapitulées dans le **Tableau 24**. Différents paramètres ont été modifiés tels que le réactif au carbone-11 utilisé, la base, le solvant, la température, le temps de réaction ainsi que l'évaporation ou non du solvant de réaction au cours du processus de synthèse, avant purification sur CLHP.

Les essais 1 à 4, où le solvant de réaction a été évaporé, ont conduit soit à la perte de l'activité au cours de cette évaporation, soit à la formation d'un produit radioactif ne correspondant pas au produit attendu. Une hypothèse est que la concentration du milieu réactionnel en présence d'une base puisse conduire à une saponification de la fonction ester en position-3 de la pyridine.

Les conditions de l'essai 5, sans étape d'évaporation, avec le [<sup>11</sup>C]triflate de méthyle dans le *N,N*-diméthylformamide en présence d'un excès de NaOH (10 éq. par rapport à **117**) à 110 °C pendant 2 minutes, ont permis de former [<sup>11</sup>C]-**96**. Ce dernier a pu être obtenu avec et un rendement isolé et corrigé de la décroissance de 32 % (basé sur la quantité initiale de carbone-11 mise en jeu), une pureté radiochimique de 100 % et une RAS moyenne de 82 GBq/μmol.



Essai	$[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{X}$	Base	Solvant	Température	Temps	Evaporation	Résultats
1	$[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$	NaH	DMF	110 °C	5 min	Oui	Formation d'un produit secondaire
2	$[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	DMF	100 °C	4 min	Oui	Pas de marquage
3	$[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$	NaOH	Acétone	100 °C	2 min	Oui	Pas de marquage
4	$[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$	NaH	DMF	80 °C	2 min	Oui	Formation d'un produit secondaire
5	$[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$	NaOH	DMF	110 °C	2 min	Non	Obtention de $[^{11}\text{C}]\text{-96}$

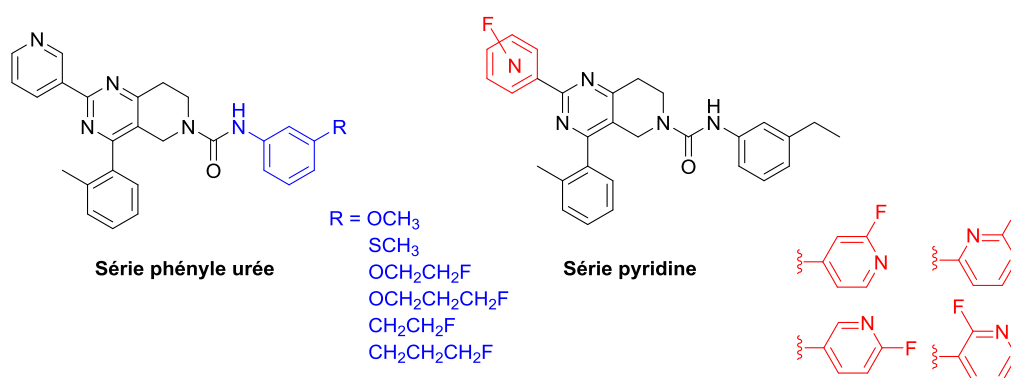
Conditions classiques de  $[^{11}\text{C}]\text{-O}$ -méthylation : précurseur (1 mg), base (3M aq. NaOH, 7  $\mu\text{L}$  ; NaH, 2-3 mg ; K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 10 mg), solvant (300 – 400  $\mu\text{L}$ ).

**Tableau 24** : Conditions testées pour le radiomarquage au carbone-11 de **96**.

Des études *in vitro* par autoradiographie sur des coupes de cerveaux de rats et de l'imagerie TEP *in vivo* sur petit animal sont également prévues.

# Chapitre IV : Les ligands des récepteurs purinergiques de type P2Y<sub>14</sub>.

Pour ces récepteurs, une famille de composés comportant un corps tétrahydropyrido[4,3-*d*]pyrimidine et provenant de la littérature a été retenue<sup>136</sup>. Deux types de modifications ont été envisagées sur la base de ces structures : l'une au niveau de la fonction phényle urée (en bleu, **Figure 52**) et la seconde au niveau de la pyridine en position 2 de la pyrimidine (en rouge, **Figure 52**).



**Figure 52** : Structures des ligands potentiels des P2Y<sub>14</sub>R envisagés.

## 1. Synthèse.

### 1.1. Série phényle urée.

#### 1.1.1. Analyse rétrosynthétique.

L'analyse rétrosynthétique des nouveaux ligands dédiés aux récepteurs P2Y<sub>14</sub> fait apparaître un intermédiaire clé (**Schéma 91**) à partir duquel on peut obtenir les urées souhaitées par un couplage avec les isocyanates correspondants au cours de la dernière étape de la séquence réactionnelle. Les isocyanates, s'ils ne sont pas disponibles commercialement, peuvent être synthétisés en une étape à partir des amines correspondantes.

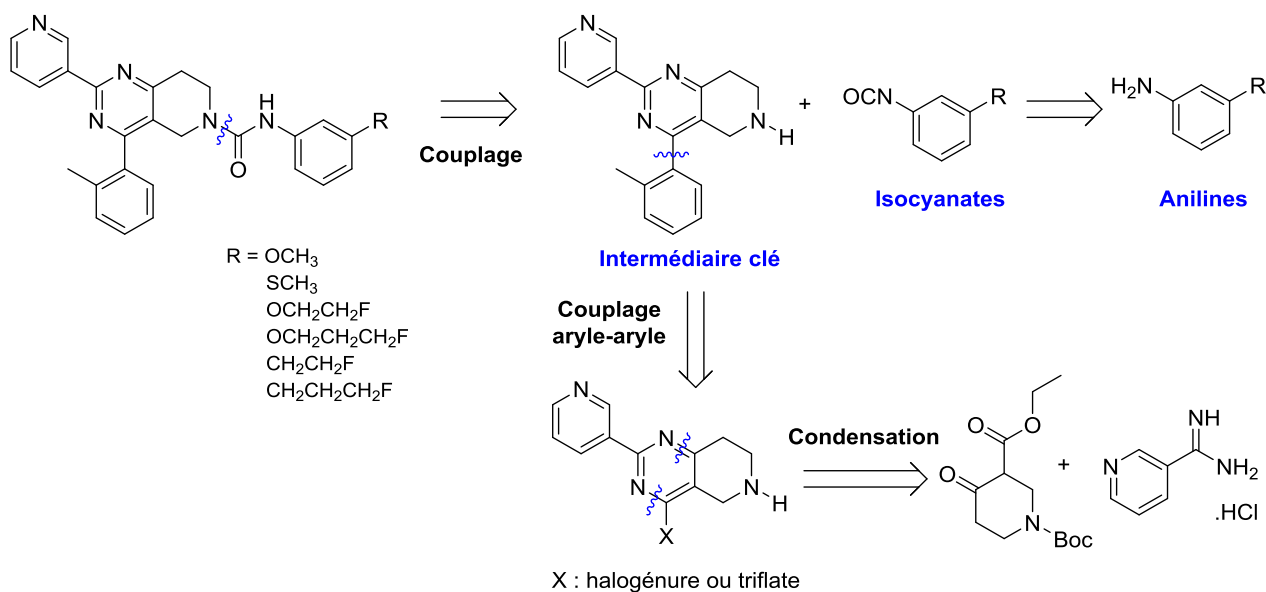
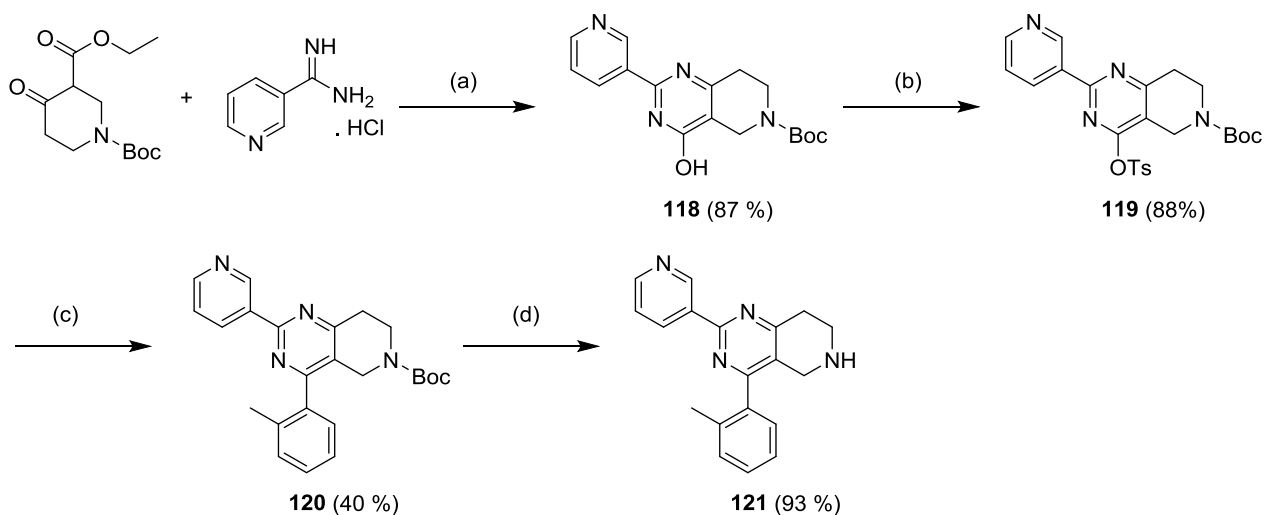


Schéma 91 : Analyse rétrosynthétique de construction des analogues de la série phényle urée.

### 1.1.2. Résultats obtenus pour la synthèse des ligands en série phényle urée (Projet K et L).

#### 1.1.2.a. Synthèse de l'intermédiaire clé tetrahydropyrido[4,3-d]pyrimidine.

La première partie de la synthèse est dédiée à la préparation de l'intermédiaire clé **121** (Schéma 92) faisant apparaître le motif 5,6,7,8-tétrahydropyrido[4,3-d]pyrimidine auquel sont greffés la pyridine en position 2 et le *o*-tolyle en position 4. Cet intermédiaire peut être obtenu en quatre étapes décrites dans le Schéma 92.



**Réactifs et conditions :** (a) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, méthanol, reflux, 4 h ; (b) TsCl, Et<sub>3</sub>N, DCM, t.a., 1 nuit ; (c) acide tolylboronique, K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, Pd(OAc)<sub>2</sub>, CyJohnPhos, dioxane, 90 °C, 6 h ; (d) TFA, DCM, t.a., 4 h.

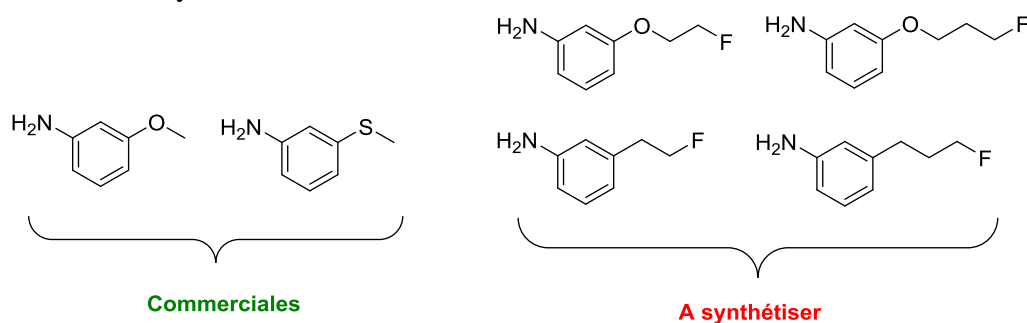
Schéma 92 : Synthèse de l'intermédiaire clé **121**.

La première étape de la synthèse a consisté à construire le bicyclic 5,6,7,8-tétrahydropyrido[4,3-d]pyrimidine. Pour ce faire, une réaction de condensation entre la *N*-Boc-3-carboéthoxy-4-

pipéridone et l'hydrochlorure de 3-amidinopyridinium a été réalisée en présence de carbonate de potassium dans l'éthanol à reflux. L'intermédiaire **118** a été obtenu après traitement et trituration dans le diéther sous forme d'une poudre blanche peu soluble, avec un très bon rendement de 87 %. L'introduction du motif *o*-tolyle a été réalisée *via* un couplage aryle-aryle après activation de la fonction hydroxyle par un tosylate. Ce dernier a été introduit grâce au chlorure de tosyloyle et à la triéthylamine dans le dichlorométhane à température ambiante. Le tosylate **119** a été obtenu avec un rendement de 88 %. Le motif *o*-tolyle a ensuite été incorporé grâce à un couplage de Suzuki entre **119** et l'acide tolylboronique en présence de palladium acétate, de potassium tribasique et de CyJohnPhos dans le dioxane à 90 °C pendant 6 h<sup>137</sup>. Le produit couplé **120** a été obtenu avec 40 % de rendement. Enfin, la protection Boc a été retirée par l'acide trifluoroacétique dans le dichlorométhane à température ambiante, pour donner l'amine **121** souhaitée avec d'excellents rendements (93 %).

### 1.1.2.b. Synthèse des anilines.

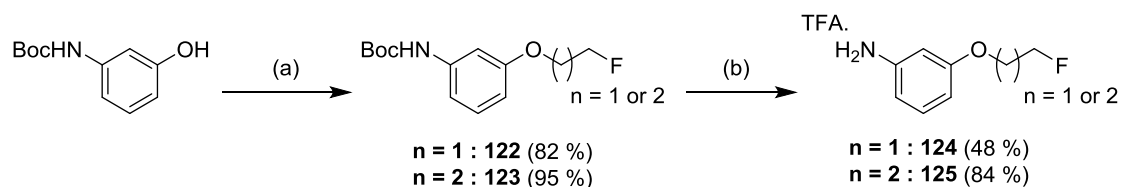
L'analyse rétrosynthétique de préparation des nouveaux ligands visés, fait apparaître des isocyanates pour le couplage avec l'intermédiaire clé **121**. Ces isocyanates peuvent être obtenus à partir des anilines correspondantes présentées dans la **Figure 52**. Deux d'entre elles sont disponibles commercialement (*mé*ta-méthoxy et *mé*ta-thiométhoxy) alors que les quatre anilines fluorées doivent être synthétisées.



**Figure 53** : Structures des anilines requises.

- Synthèse des 3-fluoroéthoxy et 3-fluoropropoxy anilines.

Les sels de TFA de ces deux anilines ont été préparés en deux étapes à partir du *N*-Boc-aminophénol (**Schéma 93**).



**Réactifs et conditions** : (a) tosyloyle de 2-fluoroéthyle ( $n = 1$ ) ou tosyloyle de 3-fluoropropyle ( $n = 2$ ),  $K_2CO_3$ , DMF, 70 °C, 12 h à 48 h ; (b) TFA, DCM, t.a., 1 nuit.

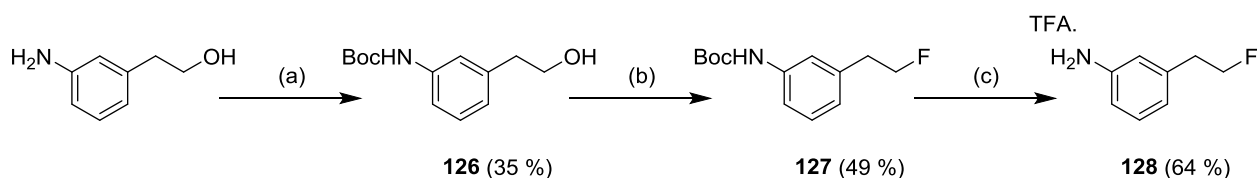
**Schéma 93** : Synthèse des 3-fluoroéthoxy et 3-fluoropropoxy anilines **124** et **125**.

Une première étape de *O*-alkylation entre le *N*-Boc-aminophénol et les tosyloyles de 2-fluoroéthyle et 3-fluoropropyle a été réalisée en présence de carbonate de potassium dans le *N,N*-diméthylformamide à 70 °C. Les produits alkylés **122** et **123** ont été formés avec des rendements

respectifs de 82 % et 95 %. La fonction Boc a ensuite été enlevée par action d'acide trifluoroacétique pour donner les anilines correspondantes **124** et **125** avec respectivement 48 et 84 % de rendement.

- Synthèse de la 3-fluoroéthyle aniline.

Le sel de TFA de la 2-fluoroéthyle aniline a pu être obtenu à la suite d'une séquence réactionnelle en trois étapes, à partir du 2-(3-aminophényl)éthan-1-ol selon le **Schéma 94**.



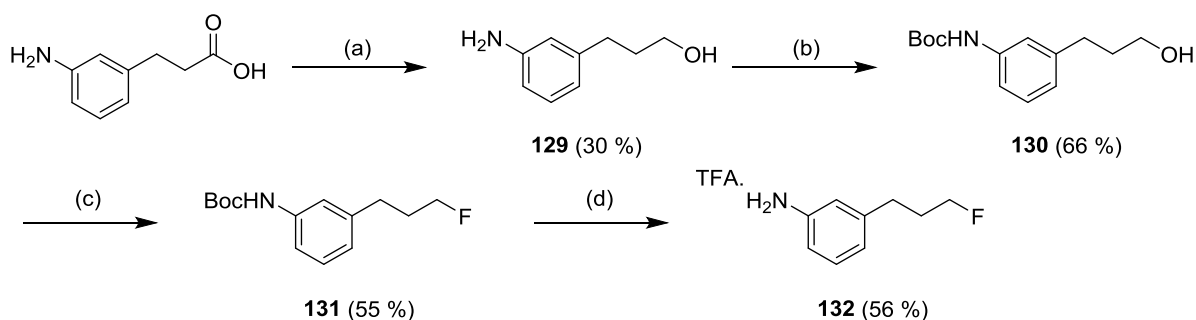
**Réactifs et conditions :** (a) Boc<sub>2</sub>O, DCM, t.a., 1 nuit ; (b) Déoxo-Fluor<sup>®</sup>, DCM, 30 min, 0 °C ; (c) TFA, DCM, t.a., 1 nuit.

**Schéma 94 :** Synthèse de la 3-fluoroéthyle aniline **128**.

La fonction amine a tout d'abord été protégée par un groupement *tert*-butoxycarbone, grâce au dicarbonate de di-*tert*-butyle dans du dichlorométhane à température ambiante. L'aniline protégée **126** a été formée avec un rendement de 35 %. Cet intermédiaire a été engagé dans une réaction de déhydroxyfluoruration à l'aide de Déoxo-Fluor<sup>®</sup> dans le dichlorométhane à 0 °C. La *N*-Boc-3-fluoroéthyle aniline **127** a pu être obtenue avec un rendement de 49 %. Elle a ensuite été traitée par l'acide trifluoroacétique pour éliminer le groupement Boc.

- Synthèse de la 3-fluoropropyle aniline.

Le sel de TFA de la 3-fluoropropyle aniline a pu être obtenu à la suite d'une séquence réactionnelle en quatre étapes à partir de l'acide 3-(3-aminophényl)propanoïque selon le **Schéma 95**.



**Réactifs et conditions :** (a) LiAlH<sub>4</sub>, diéthyle éther, 0 °C à t.a., 1 nuit ; (b) Boc<sub>2</sub>O, DCM, t.a., 1 nuit ; (b) Déoxo-Fluor<sup>®</sup>, DCM, 30 min, 0 °C ; (d) TFA, DCM, t.a., 1 nuit.

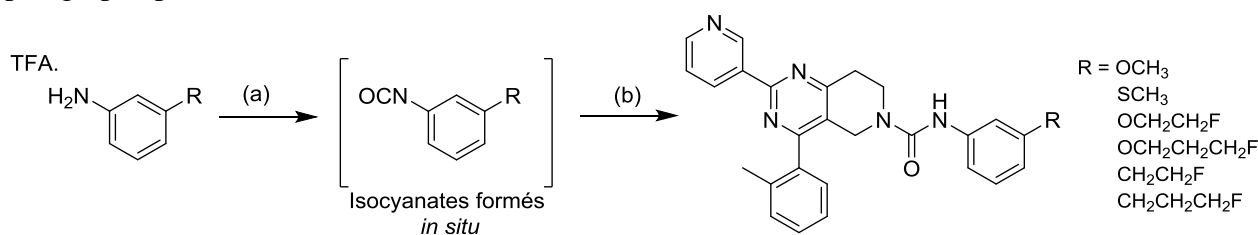
**Schéma 95 :** Synthèse de la 3-fluoropropyle aniline **132**.

Dans un premier temps, la fonction acide carboxylique du réactif commercial a été réduite en alcool par traitement au tétrahydroaluminat de lithium dans le diéthyle éther. Un réducteur fort a dû être utilisé car des réducteurs plus doux tel que le tétrahydroborate de sodium ou l'hydrure

de diisobutylaluminium, ne permettent pas d'obtenir l'alcool à partir de l'acide carboxylique correspondant. La suite de la synthèse est analogue à celle proposée pour la 3-fluoroéthyle aniline **128**. L'aniline **129**, obtenue avec un rendement de 30 %, a été protégée par un Boc, le fluor a été introduit par une réaction de déhydroxyfluoruration en présence de Déoxo-Fluor<sup>®</sup>, puis la protection Boc a été retirée par l'acide trifluoroacétique pour donner la 3-fluoropropyle aniline **132** avec un rendement global sur quatre étapes de 6 %.

### 1.1.2.c. Couplage entre l'intermédiaire clé **121** et les anilines.

La dernière étape de la synthèse permettant d'obtenir les ligands souhaités (dont les structures ont été présentées dans la **Figure 52**), a été un couplage entre l'amine **121** et les anilines décrites au paragraphe précédent.



**Réactifs et conditions :** (a) triphosgène, Et<sub>3</sub>N, DCM t.a., 2 h ; (b) **121**, Et<sub>3</sub>N, DCM, t.a., 1 nuit.

**Schéma 96 :** Préparation des composés finaux visés.

Les diverses anilines ont tout d'abord été traitées par une solution de triphosgène dans le dichlorométhane en présence de triéthylamine, pour former *in situ* les isocyanates correspondants. A ce milieu réactionnel, a été rajoutée l'amine **121** dissoute dans 0,1 mL de *N,N*-diméthylformamide pour des raisons de solubilité. Après une nuit à température ambiante, six urées visées (**133-138**) ont ainsi pu être formées selon le **Schéma 96**. Les rendements obtenus lors de la dernière étape de synthèse varient entre 19 et 42 % et sont résumés dans le **Tableau 25**.

Composé	R	Rendement
<b>133</b>		33 %
<b>134</b>		20 %
<b>135</b>		27 %
<b>136</b>		19 %
<b>137</b>		35 %
<b>138</b>		42 %

**Tableau 25 :** Rendements de l'étape de couplage entre l'intermédiaire **121** et les diverses anilines.

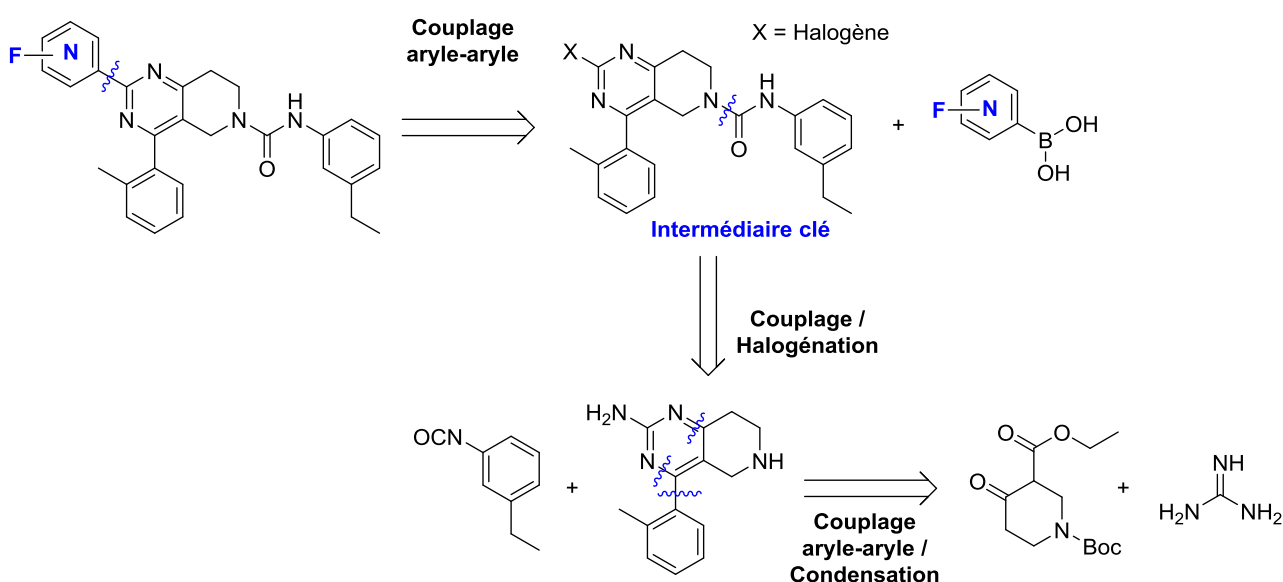


Les six urées visées (**133-138**) ont été obtenues en quantité suffisante pour permettre de réaliser de futures analyses pharmacologiques. Les données d'affinité *in vitro* des dérivés méthoxy (**133**) et thiométhoxy (**134**) pour les récepteurs P2Y<sub>14</sub> sont déjà connues de la littérature ( $IC_{50} = 5,1$  et  $0,63 \mu\text{M}$  respectivement)<sup>136</sup>. Celles des dérivés fluorés seront prochainement évaluées afin de connaître l'affinité des composés pour les P2Y<sub>14</sub>R. D'autres paramètres physico-chimiques tels que la lipophilie ( $\log D_{7,4}$ ) ou la stabilité microsomale pourront également être déterminés.

## 1.2. Série pyridine.

### 1.2.1. Analyse rétrosynthétique.

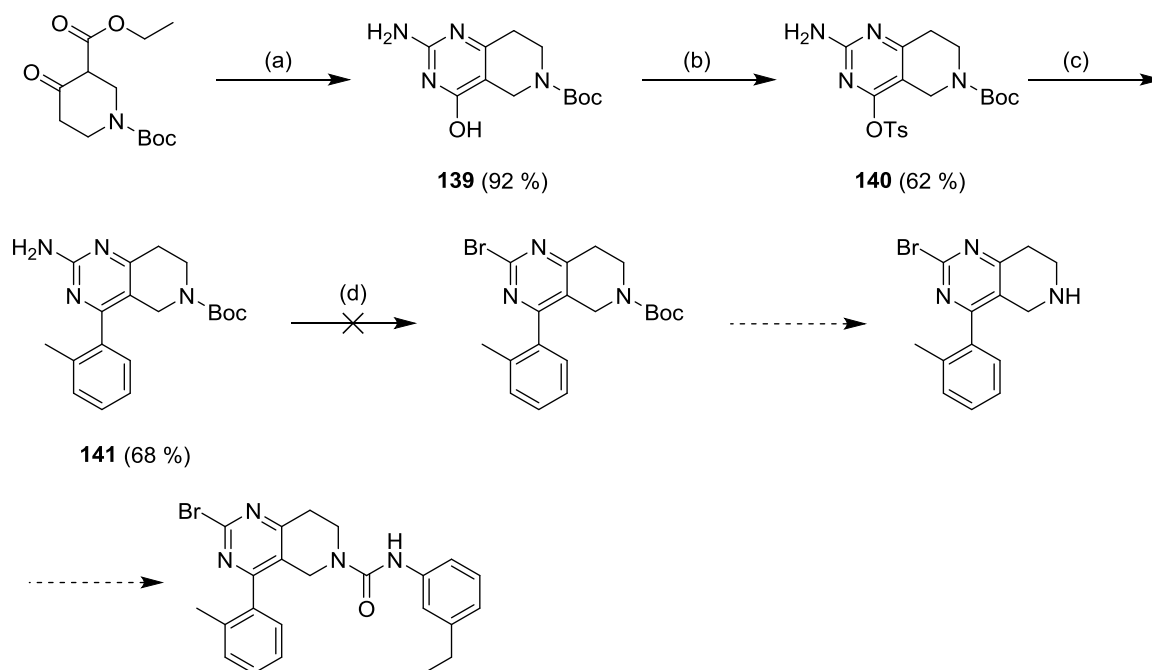
L'analyse rétrosynthétique présentée dans le **Schéma 97** fait apparaître une construction des analogues de la série pyridine relativement proche de celle de la série phényle urée. Un intermédiaire clé halogéné, permettrait grâce à un coulage aryle-aryle, lors d'une dernière étape, d'obtenir de manière convergente les quatre dérivés ciblés.



**Schéma 97** : Analyse rétrosynthétique de construction des analogues de la série pyridine.

### 1.2.2. Résultats obtenus pour la synthèse des ligands en série pyridine (Projet M).

Une voie de synthèse en six étapes, décrite dans le **Schéma 98**, a été proposée afin d'obtenir l'intermédiaire clé halogéné décrit au paragraphe précédent. Notre premier choix s'est porté sur un dérivé bromé.



**Réactifs et conditions** : (a) guanidine.HCl, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, méthanol, reflux, 3 h ; (b) Ts<sub>2</sub>O, Et<sub>3</sub>N, DCM, t.a., 5 h ; (c) acide *o*-tolylboronique, K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, Pd(OAc)<sub>2</sub>, CyJohnPhos, DMF, eau, 90 °C, 5 h ; (d) *t*-BuONO, SbBr<sub>3</sub>, DCM, 0 °C, 2 h.

**Schéma 98** : Voie de synthèse proposée pour l'obtention de l'intermédiaire clé bromé.

De manière analogue à la synthèse de l'amine **121**, la première étape a consisté à construire le bicyclic 5,6,7,8-tétrahydropyrido[4,3-*d*]pyrimidine. Pour cela une réaction de condensation entre la *N*-Boc-3-carboéthoxy-4-pipéridone et l'hydrochlorure de guanidine a été réalisée dans le méthanol à reflux pour conduire presque quantitativement (92 %) au phénol **139** sous forme d'une poudre blanche très peu soluble. Afin d'introduire le motif *o*-tolyle par un couplage aryle-aryle, l'hydroxyle du composé **139** a été activé par du chlorure de tosyloxy en présence de triéthylamine dans le dichlorométhane à température ambiante, pour mener au tosylate **140** avec 62 % de rendement. Un couplage de Suzuki a ensuite été réalisé entre **140** et l'acide tolylboronique en présence de palladium acétate, de potassium tribasique et de CyJohnPhos dans un mélange *N,N*-diméthylformamide / eau à 90 °C. Le produit de couplage **141** a ainsi été formé avec un bon rendement 68 %. Une réaction de Sandmeyer a ensuite été envisagée pour remplacer la fonction amine par un atome de brome. Différentes conditions de réaction ont été testées et les résultats de ces essais sont résumés dans le **Tableau 26**.

Les quatre premières conditions réactionnelles testées (essais 1 à 4), faisant varier la nature des nitrites (en bleu, **Tableau 26**) et la source de bromures (en vert, **Tableau 26**), n'ont pas permis l'obtention du produit bromé visé. Dans ces quatre cas, il semblerait que la formation du sel de diazonium n'ait pas lieu. Une absence de conversion ou une forte dégradation ont été observées dans ces conditions plutôt acides.

Des conditions plus douces et moins acides comme celles décrites par Trusova *et al.*<sup>165</sup>, ont alors été envisagées (Essai 5). Cette méthode consiste à préparer une résine saturée en ions NO<sub>2</sub><sup>-</sup> à partir d'une résine échangeuse d'ions (échange des ions OH<sup>-</sup> de la résine Amberlist<sup>®</sup> par les ions NO<sub>2</sub><sup>-</sup> du nitrite de sodium). Cette résine est ensuite mise à réagir avec l'amine primaire en présence d'acide *p*-toluène sulfonique dans l'eau ou l'acétonitrile à température ambiante.

Cependant, dans notre cas, l'amine **141** étant très peu soluble dans l'eau ou dans l'acétonitrile aucune conversion n'a été observée.

Essai	Réactifs	Solvant	Température	Résultats
1	NaNO <sub>2</sub> , TMSBr	DCM	0 °C	Pas de formation du sel de diazonium
2	NaNO <sub>2</sub> , CuBr	HBr 48 %	0 °C puis 70 °C	Pas de formation du sel de diazonium
3	NaNO <sub>2</sub> , Br <sub>2</sub>	HBr 48 %	0 °C	Prise en masse du milieu réactionnel
4	<i>t</i> -BuONO, BF <sub>3</sub> .Et <sub>2</sub> O, KBr, CuBr, CuBr <sub>2</sub>	DCM puis CH <sub>3</sub> CN	-20 °C	Pas de formation du sel de diazonium
5	Résine NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> , <i>p</i> -TsOH, KBr	Eau	25 °C	Mauvaise solubilité
6	<i>t</i> -BuONO, SbBr <sub>3</sub>	DCM	0 °C	Formation partielle du produit bromé

**Tableau 26** : Conditions de réaction de Sandmeyer testées.

Un dernier essai (essai 6) a été tenté en utilisant le *tert-butyl* nitrite et le tribromure d'antimoine comme source de brome<sup>166</sup>. Ces conditions ont conduit à la formation d'un nouveau produit. L'analyse par RMN et par LC-MS de la fraction récoltée par chromatographie a montré qu'elle contenait le produit bromé en mélange avec un sous-produit co-éluant qui n'a pas pu être identifié.

Ne parvenant pas à obtenir le dérivé bromé avec une pureté suffisante, la synthèse n'a pour l'instant pas été poursuivie.

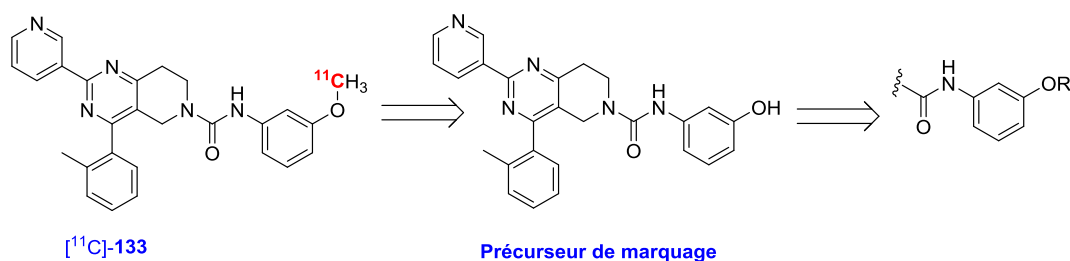
A l'heure actuelle, seuls les composés visés en série phényle urée ont été obtenus. Les affinités pour les P2Y<sub>14</sub>R étant connues pour les dérivés *mé*ta-méthoxy **133** et *mé*ta-thiométhoxy **134**, leur évaluation en tant que radiotraceurs TEP a été envisagée nécessitant au préalable la préparation de leur précurseur de marquage respectif.

## 2. Synthèse du précurseur de marquage de [<sup>11</sup>C]-133.

Il a été choisi de préparer le précurseur de marquage du composé *mé*ta-méthoxy **133** de la série phényle urée afin de pouvoir, après radiomarquage au carbone-11, faire les premières études *in vivo* par imagerie TEP ou *in vitro* par autoradiographie.

### 2.1. Analyse rétrosynthétique.

Les radiomarquages au carbone-11 étant fréquemment réalisés par réaction de *O*-[<sup>11</sup>C]méthylation, le précurseur envisagé pour la préparation de [<sup>11</sup>C]-**133** a été le phénol correspondant présenté au **Schéma 99**.

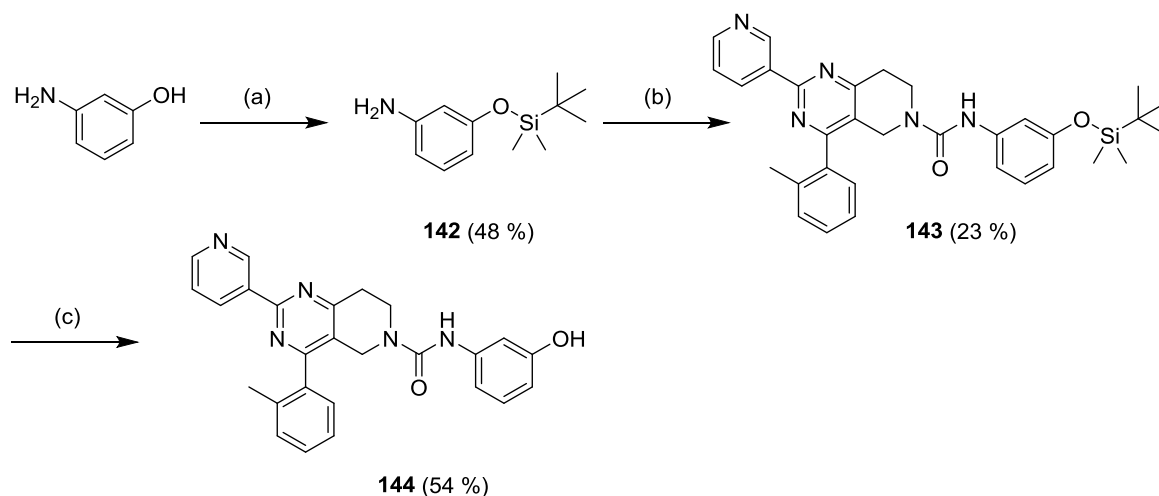
Schéma 99 : Analyse rétrosynthétique du précurseur de marquage de [<sup>11</sup>C]-133.

## 2.2. Résultats obtenus pour la synthèse du précurseur de marquage [<sup>11</sup>C]-133.

La synthèse du phénol peut être envisagée selon plusieurs méthodes. La plus rapide consiste à *O*-déméthyle le composé **133**. Cependant, cette méthode n'a pas été retenue car le dérivé **133** a été obtenu avec de faibles rendements et n'est disponible au laboratoire qu'en faible quantité. D'autre part, une telle approche ne garantit pas l'absence totale du composé de départ dans le produit final, même après purification précautionneuse et la RAS du radiotracer pourrait en être affectée. Pour rappel, un lot de 3,7 GBq de radiotracer produit à une radioactivité spécifique de 185 GBq/μmol (chiffres réalistes pour une *O*- ou *N*-méthylation au laboratoire) correspond en fait à 20 nanomoles. Typiquement, 1 mg de précurseur de marquage sont mis en jeu dans ces réactions, soit pour le composé **144**, 2,3 μmoles. Si une trace du composé méthylyé est toujours présente, par exemple 1 % molaire, soit 23 nanomoles, la RAS sera tout simplement divisée de moitié.

Il a donc été choisi de préparer un intermédiaire dans lequel le phénol serait protégé par un groupement facilement retirable lors d'une dernière étape de synthèse. Le groupement protecteur choisi a été un groupement silylé permettant une libération efficace du phénol par action d'ions fluorures.

L'intermédiaire silylé **143** a été synthétisé en deux étapes selon le Schéma 100.



**Réactifs et conditions :** (a) TBSCl, imidazole, DMF, t.a., 1 nuit ; (b) i) triphosgène, Et<sub>3</sub>N, DCM, t.a., 2 h, ii) **121**, Et<sub>3</sub>N, DCM, t.a., 1 nuit ; (c) TBAF 1 M dans le THF, THF, 1 nuit.

Schéma 100 : Synthèse du précurseur de marquage **144**.

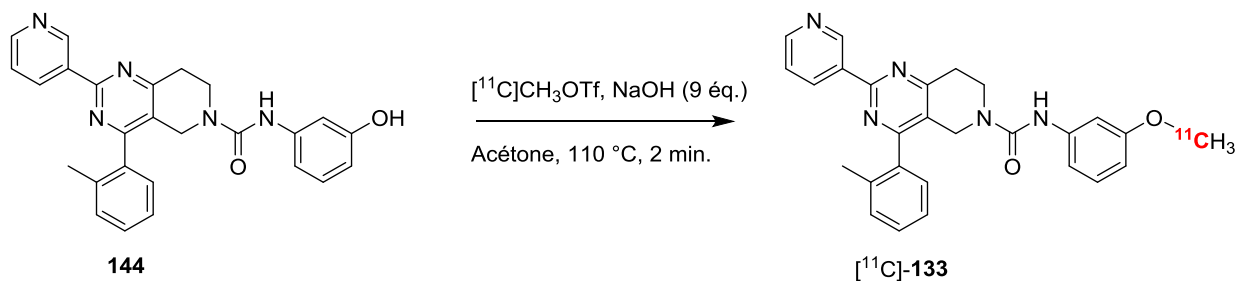
Dans un premier temps, l'hydroxyle du 3-aminophénol a été protégé sélectivement par le groupement diméthyle-*tert*-butylsilyle en présence d'imidazole dans du *N,N*-diméthylformamide à température ambiante pour conduire à **142** avec 48 % de rendement. La seconde étape a consisté à construire la fonction urée en formant *in situ* l'isocyanate correspondant à **142** par traitement de l'aniline par du triphosgène, puis en couplant ce dernier à l'amine **121** préalablement synthétisée (paragraphe 1.1.2.a) en présence de triéthylamine dans le dichlorométhane afin d'obtenir **143** avec 23 % de rendement. Le phénol a ensuite été libéré par une solution de fluorure de tétrabutylammonium dans le tétrahydrofurane pour former le précurseur **144** avec 54 % de rendement.

Le précurseur de marquage au carbone-11 de **133** ainsi obtenu a pu être engagé dans les premiers essais de *O*-[<sup>11</sup>C]méthylation.

La préparation du précurseur de marquage du composé thiométhoxy **134** pourra être effectuée de la même façon.

### 3. Radiomarquage au carbone-11 de **133**.

Le radiomarquage au carbone-11 de **133** a pu être réalisé au sein du laboratoire par *O*-[<sup>11</sup>C]méthylation à partir du précurseur phénol **144** préalablement préparé. Cette réaction a eu lieu dans l'acétone à 110 °C pendant 2 minutes en présence d'un excès d'hydroxyde de sodium (9 éq. par rapport à **144**) et de triflate de [<sup>11</sup>C]méthyle ([<sup>11</sup>C]CH<sub>3</sub>OTf) comme agent de méthylation selon le **Schéma 101**.



**Schéma 101** : Radiosynthèse de [<sup>11</sup>C]-**133**.

Le composé [<sup>11</sup>C]-**133** a ainsi pu être obtenu avec un rendement radiochimique corrigé de la décroissance de 5 % (et basé sur la quantité initiale de carbone-11 mise en jeu), une pureté radiochimique supérieure à 98 % et une RAS moyenne de 133 GBq/μmol. Ces résultats préliminaires pourront être optimisés pour permettre une évaluation du radiotraceur en imagerie TEP.

# Troisième partie

## Conclusion et perspectives



# Conclusion et perspectives.

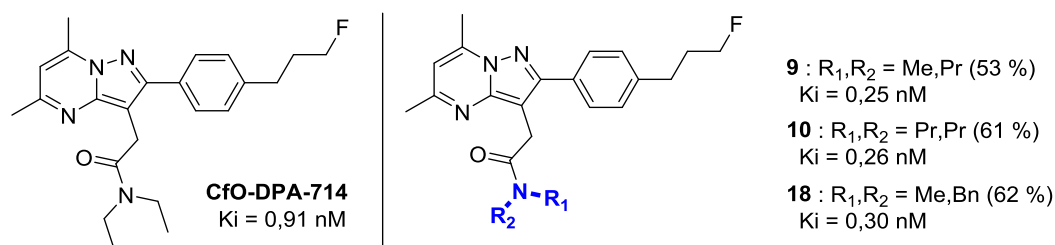
Mon projet de thèse se divise en quatre parties principales, chacune dédiée à l'une des cibles pharmacologiques retenues pour le développement de radioligands pour l'imagerie par TEP de la neuroinflammation : TSPO, CB<sub>2</sub>R, P2Y<sub>12</sub>R et P2Y<sub>14</sub>R. Il s'appuie sur des développements de type chimie médicinale, et se caractérise par la synthèse organique de nouvelles molécules et leur caractérisation *in vitro*, ainsi que pour certains candidats, par le marquage par un isotope émetteur de positons à vie brève (fluor-18, carbone-11) de la structure sélectionnée et son évaluation *in vitro* par autoradiographie et / ou *in vivo* par imagerie TEP et biodistribution chez le petit animal.

## 1. Conclusion et perspectives sur les ligands de la TSPO.

La première et majeure partie de ma thèse a été consacrée à la protéine de translocation 18 kDa (TSPO), pour laquelle deux familles chimiques ont particulièrement été visées : les pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidines et les pyridazino[4,5-*b*]indoles, et ceci au travers de différents projets de R&D (Projets A-E).

### 1.1. Analogues de CfO-DPA-714, modifiés au niveau de l'amide.

L'objectif de ce premier projet en série pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine était de moduler la partie amide de **CfO-DPA-714** en introduisant des amides tertiaires comportant différents substituants. Au total, quatorze nouvelles pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidines ont été synthétisées avec succès, en utilisant une voie de synthèse linéaire jusqu'à l'avant-dernière étape, conduisant à un intermédiaire clé commun : un ester éthylique. Cet ester a été obtenu en sept étapes et 11 % de rendement global, et les quatorze amides visés en une étape supplémentaire (transamidation) avec des rendements variant de 23 à 81 %. Tous ont été testés *in vitro* pour leur affinité pour la TSPO et leur sélectivité. Trois d'entre eux (composés **9**, **10** et **18**, **Figure 54**) montrent des affinités pour la TSPO légèrement supérieures ( $K_i = 0,25 - 0,30$  nM) à celle du composé de référence **CfO-DPA-714** ( $K_i = 0,91$  nM). Au vu des données issues des études de métabolisme *in vitro*, le candidat à retenir pour un futur marquage au fluor-18 est le composé **9**, présentant une fonction *N*-méthyle-*N*-propyle amide.



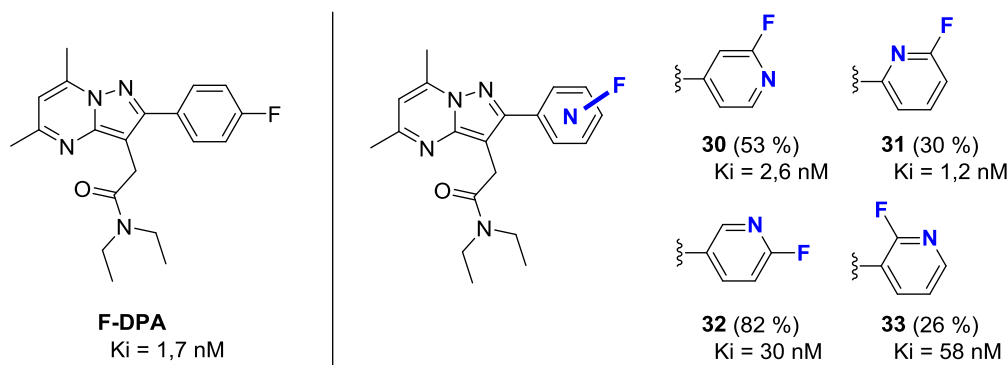
**Figure 54** : Structures et affinités des trois meilleurs dérivés amides de **CfO-DPA-714** obtenus (**9**, **10** et **18**).

### 1.2. Analogues fluoropyridines de F-DPA.

L'objectif de ce deuxième projet était de synthétiser des analogues de **F-DPA**, pour lesquels un marquage par le fluor-18 à haute activité spécifique et par fluoration hétéroaromatique serait



envisageable. Pour ce faire, le noyau phényle porté par la pyrazolopyrimidine a été remplacé par une pyridine, cette dernière portant toujours le fluor. Les quatre fluoropyridines (théoriquement) possibles (composés **30** à **33**, **Figure 55**, structures issues de la combinaison de la position de l'azote et du fluor en conservant une fonction *ortho*-fluoropyridine) ont été synthétisées en cinq étapes. Elles ont été obtenues avec des rendements moyens à bons (26 - 82 %), par couplage de Suzuki entre les acides boroniques ad-hoc et un intermédiaire commun de type triflate, synthétisé lui en quatre étapes avec un rendement global de 21 %.

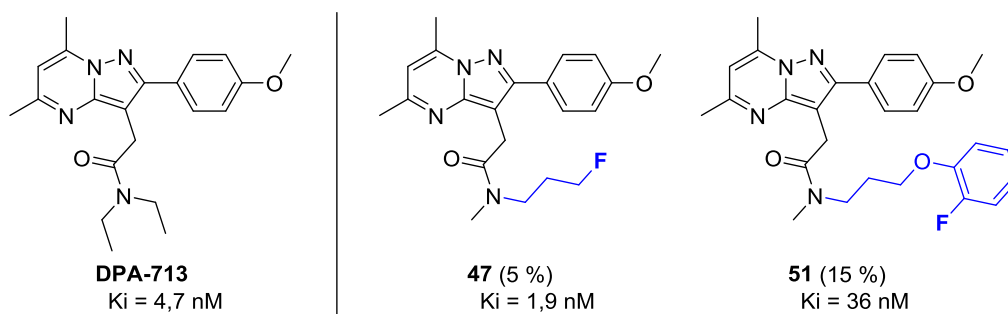


**Figure 55** : Structures et affinité pour la TSPO des fluoropyridines **30-33**, analogues de **F-DPA**.

L'affinité et la sélectivité pour la TSPO de ces quatre nouveaux dérivés ont été déterminées, mettant en avant le potentiel de deux isomères substitués par le fluor en *mé*ta du phényle (par rapport à l'hétérocycle), les composés **30** et **31** (Ki = 2,6 nM et 1,2 nM). Les précurseurs correspondants pour un marquage par le fluor-18 (dérivés nitrés ou bromés) n'ont, à ce stade, pas pu être encore obtenu mais des optimisations des conditions de couplage de Suzuki sont en cours.

### 1.3. Analogues fluorés de DPA-713, modifiés au niveau de l'amide.

Pour rappel, ce troisième projet visait à développer, sur la base du ligand **DPA-713**, quelques structures fluorées au niveau de la fonction acétamide. Il est complémentaire aux deux premiers projets, et permet notamment de pallier à la période courte du carbone-11 associée à [<sup>11</sup>C]**DPA-713**. Deux nouveaux dérivés (composés **47** et **51**, **Figure 56**) ont été obtenus en respectivement trois étapes et une étape de synthèse (5 % et 15 % de rendement) à partir d'un intermédiaire « acide carboxylique » clé. Ce dernier a été obtenu en quatre étapes avec 31 % de rendement global.

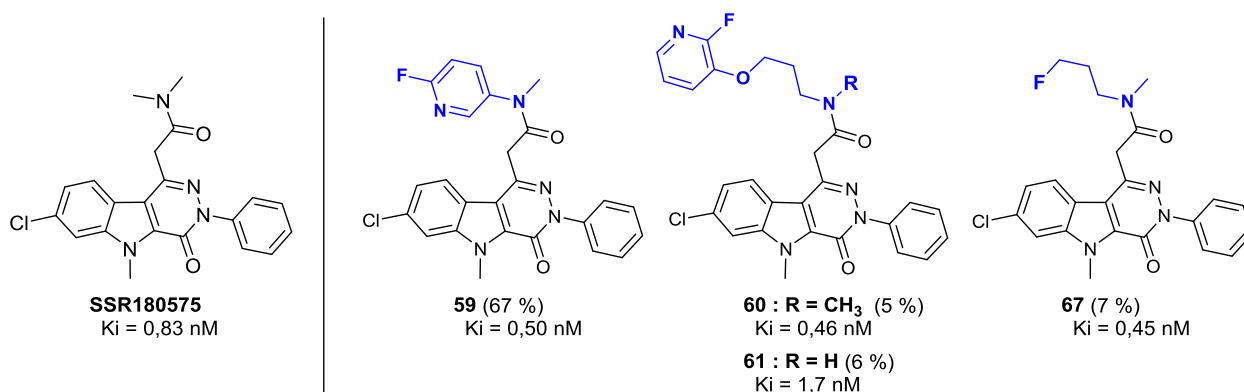


**Figure 56** : Structures et affinités pour la TSPO des dérivés fluorés de **DPA-713** obtenus (**47**, **51**).

Ces deux composés ont été évalués pour leur affinité et sélectivité pour la TSPO, nous conduisant à retenir le dérivé fluoropropyle pour le marquage au fluor-18. A ce titre, le dérivé tosylé correspondant à **47** a été synthétisé (en trois étapes et 3 % de rendement seulement à partir de l'acide carboxylique précédemment cité) et des tentatives de radiomarquage ont été entreprises. Le radiotracer visé n'a pu être obtenu, le précurseur (ou la molécule radiofluorée) semblant rapidement se dégrader dans les conditions testées pour le marquage.

## 1.4 Analogues fluorés de SSR180575, modifiés au niveau de l'amide.

L'objectif de quatrième projet consacré à la TSPO, en série pyridazino[4,5-*b*]indole cette fois, était de modifier la fonction *N,N*-diméthylacétamide de **SSR180575**, en y introduisant un motif fluoré compatible avec un radiomarquage au fluor-18. Quatre dérivés choisis (composé **59**, **60**, **61** et **67**, **Figure 57**) ont ainsi été préparés à partir d'un nouvel intermédiaire de type « acide carboxylique », fourni par notre partenaire Sanofi. Le dérivé **59** a été synthétisé en deux étapes et obtenu avec 67 % de rendement global. Les dérivés **60** et **61** ont, quant à eux, été obtenus en 4 étapes avec des rendements globaux respectifs de 6 et 5 % et le dérivé fluoropropyle **67** en cinq étapes et 7 % de rendement (**Figure 57**).



**Figure 57** : Structures et affinités pour la TSPO des dérivés de **SSR180575** obtenus (**59-61**, **67**).

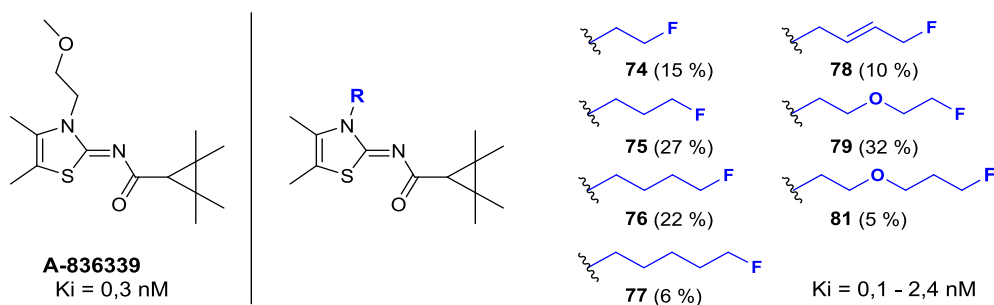
Ces quatre composés présentent tous de bonnes affinités et sélectivité pour la TSPO (Ki = 0,46 - 1,7 nM) comparable à celles obtenues pour le **SSR180575** (Ki = 0,83 nM).

Les précurseurs de marquage correspondants aux trois *N*-méthylacétamides **59**, **60** et **67** ont également été synthétisés – de manière analogue aux dérivés fluorés – et obtenus avec respectivement 25, 2 et 2 % de rendements globaux. Des tentatives de radiomarquage au fluor-18 ont été effectuées pour ces trois dérivés, mais seul [<sup>18</sup>F]-**60** a pu être obtenu avec un rendement radiochimique corrigé de la décroissance de 7 % et une RAS moyenne de 52 GBq/μmol. Ce composé a été évalué *in vivo* par imagerie TEP du petit animal : rats Wistar présentant une lésion induite par l'administration d'une neurotoxine (AMPA). Dans ce modèle de neuroinflammation, un ratio ipsi / contra de 2,62 a été obtenu pour [<sup>18</sup>F]-**60** contre un ratio de 2,70 observé pour le composé de référence [<sup>11</sup>C]**SSR180575**.

A noter aussi que d'autres structures, volontairement non divulguées dans ce manuscrit, ont aussi été synthétisées, et ceci dans le cadre du contrat de collaboration de recherche CEA C17074 / SANOFI 126013 (Projet E).

## 2. Conclusion et perspectives sur les ligands CB<sub>2</sub>R.

La seconde partie de ma thèse a été dédiée aux récepteurs cannabinoïdes de type 2 (CB<sub>2</sub>R), pour lesquels l'objectif était de synthétiser des dérivés fluorés du ligand thiazol-2-ylidène **A-836339** (Projet F). Une série de sept nouvelles molécules a été préparée par remplacement de la fonction méthoxy-éthyle par des chaînes alkyles saturées ou non, comportant par contre un atome de fluor en position terminale (**Figure 58**). Les sept dérivés visés ont été obtenus avec des rendements globaux variant de 6 à 32 %, à partir de la 4,5-dimethylthiazol-2-amine.



**Figure 58** : Structures et affinités pour les CB<sub>2</sub>R des dérivés fluorés de **A-836339** obtenus (**74-79** et **81**).

Tous les composés préparés présentent une excellente affinité et sélectivité pour les CB<sub>2</sub>R ( $K_i$  nanomolaires et  $EC_{50}$  picomolaires ; Ratio  $hCB_1 / hCB_2$  sur la base des  $EC_{50} \gg 100$ ). De cette série, un premier composé a été sélectionné pour poursuivre son développement en tant que radioligand (dérivé **79**). Son précurseur de marquage correspondant (tosylate) a été préparé avec succès (rendement de 40 % sur deux étapes) et le radiomarquage au fluor-18 a proprement dit permis l'obtention de [<sup>18</sup>F]-**79** avec un rendement radiochimique corrigé de la décroissance de 20 % et une RAS de 122 GBq/ $\mu$ mol.

Des évaluations *in vitro* par autoradiographie sur des coupes de rates de rat et de souris, ainsi que des biodistributions *in vivo* chez le rat, ont été effectuées. Ces dernières mettent en évidence l'affinité de notre dérivé pour les CB<sub>2</sub>R, avec notamment un pourcentage de dose injectée de 1,7 % dans la rate 30 minutes après injection contre 0,2 % en moyenne pour les autres organes. Les performances de ce nouveau radiotracer fluoré seront, dans un futur proche, comparées avec celles de [<sup>11</sup>C]**A-836339**.

## 3. Conclusion et perspectives sur les ligands P2Y<sub>12</sub>R.

La troisième partie de ma thèse a été consacrée au développement de (radio)ligands ciblant les récepteurs purinergiques P2Y<sub>12</sub>. Pour ces récepteurs, deux familles de composés de structure « 6-aminonicotinate », et comportant soit un cœur piperidine (Projets G et H), soit un cœur azétidine (Projets I et J), avaient été sélectionnées après étude bibliographique. Les objectifs associés à ces développements étaient, dans un premier temps, la resynthèse d'un composé « lead » en série piperidine (Projets G) ainsi que son précurseur en vue d'un marquage au carbone-11, puis la synthèse de nouveaux analogues fluorés (Projet H). Dans un même temps, une approche similaire devait être menée en série azétidine (Projets I et J).

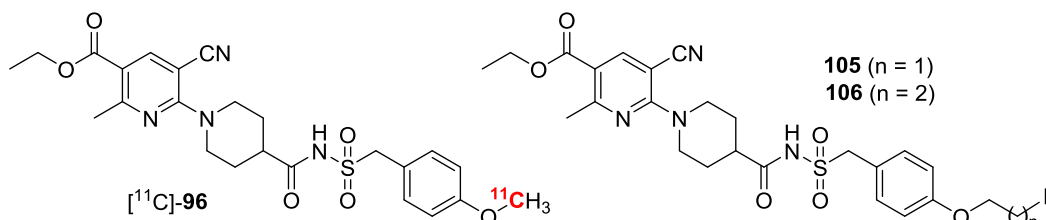
### 3.1. Série pipéridine : Dérivé méthoxy et son précurseur de marquage au carbone-11.

Le dérivé méthoxy **96** (série pipéridine) a été resynthétisé avec un rendement global de 37 % sur deux étapes, à partir de trois synthons clés : l'éthyle 6-chloro-5-cyano-2-méthylnicotinate, la (4-méthoxyphényl)méthanesulfonamide et l'acide *N*-Boc-pipéridine-4-carboxylique. Son précurseur de marquage correspondant (phénol) a lui aussi été préparé en trois étapes et 11 % de rendement. Le radiomarquage au carbone-11 ( $^{11}\text{C}$ ]méthylation) a été effectué et a permis d'obtenir  $^{11}\text{C}$ ]-**96** avec un rendement radiochimique corrigé de la décroissance de 10 % et une RAS de 82 GBq/ $\mu\text{mol}$  (**Figure 59**).

L'évaluation *in vivo* de  $^{11}\text{C}$ ]-**96** par autoradiographie *in vitro* à partir de coupes de cerveaux de rats représentatifs de différents modèles inflammatoires, puis par imagerie *in vivo* par TEP chez le rat, est programmée.

### 3.2. Pipéridine : Dérivés fluoro-alkoxy et fluoro-alcanes.

Sur les quatre dérivés fluorés envisagés initialement, seuls les dérivés fluoroéthoxy **105** et fluoropropoxy **106** (**Figure 59**) ont été synthétisés à ce jour. Ces dérivés ont été obtenus en quatre étapes avec des rendements globaux respectifs de 3 et 7 %, de manière analogue à la préparation de **96**. Ces deux composés devront, dans un premier temps, être évalués *in vitro* afin de déterminer leurs propriétés pharmacologiques vis-à-vis des P2Y<sub>12</sub>R et les données comparées à celles obtenues pour la tête de série (**96**). Dans un deuxième temps, leurs précurseurs de marquage (les tosylates correspondants), pourront être synthétisés, le radiomarquage effectué, et des évaluations *in vivo* de ces nouveaux  $^{18}\text{F}$ ]radiotraceurs envisagés.



**Figure 59** : Série pipéridine : Structure de  $^{11}\text{C}$ ]-**96** et deux dérivés fluorés (**105**, **106**).

### 3.3. Série azétidine : Dérivé méthoxy.

L'analogie méthoxy de **96**, en série azétidine, a également été synthétisé dans le but d'un marquage isotopique au carbone-11 par  $^{11}\text{C}$ ]méthylation. Ce composé (**112**) a été obtenu en deux étapes de synthèse avec 14 % de rendement (**Figure 60**), à partir de l'acide azétidine-2-carboxylique, et comme précédemment, de l'éthyle 6-chloro-5-cyano-2-méthylnicotinate et de la (4-méthoxyphényl)méthanesulfonamide. Ce composé est dans l'attente d'une évaluation *in vitro* vis-à-vis de des P2Y<sub>12</sub>R.

### 3.4. Série azétidine : Dérivés fluoro-alkoxy et fluoro-alcanes.

Pour rappel, ce projet consistait, en série azétidine, à synthétiser des analogues fluorés du composé précédent (**112**), marquables au fluor-18. Sur les quatre dérivés envisagés initialement, seul le composé fluoropropoxy **113** a pu être obtenu à ce jour en quatre étapes de synthèse, avec 4 % de rendement global, de manière analogue à la préparation de **112** (Figure 60). Ce composé est aussi dans l'attente d'une évaluation *in vitro* vis-à-vis de des P2Y<sub>12</sub>R.

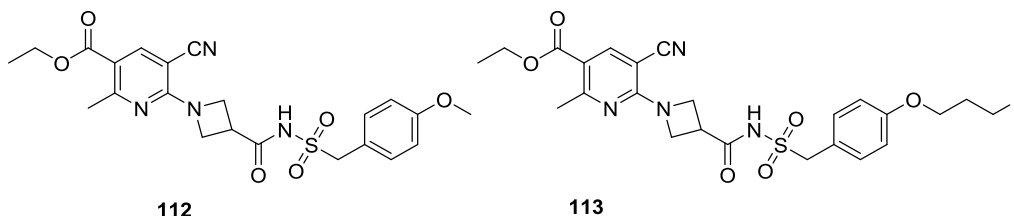


Figure 60 : Série azétidine : structure du méthoxyphényl **112** et du dérivé fluoré **113**.

## 4. Conclusion et perspectives sur les ligands P2Y<sub>14</sub>R.

La quatrième et dernière partie de ma thèse était dédiée au développement de (radio)ligands ciblant les récepteurs purinergiques P2Y<sub>14</sub>. L'objectif était de développer de nouveaux ligands « marquables » au carbone-11 ou au fluor-18, basés sur une famille de 5,6,7,8-tétrahydropyrido[4,3-*d*]pyrimidines issue de la littérature. La première partie du projet consistait en la resynthèse d'un dérivé *mé*ta-méthoxyphényl (première tête de série), et de son analogue *mé*ta-thiométhyle éther, dans le but d'un marquage isotopique au carbone-11 (Projet K). La seconde partie du projet devait permettre la dérivation de ces composés, au niveau de la fonction *mé*ta-méthoxyphényl, afin d'obtenir des ligands de type fluoro-alkoxy ou fluoro-alcanes « marquables » au fluor-18 (Projet L). Enfin, une dernière partie était consacrée à l'introduction d'un motif *ortho*-fluoropyridine en remplacement du motif fluorophényle associé à une deuxième tête de série (Projet M), pour un marquage également au fluor-18.

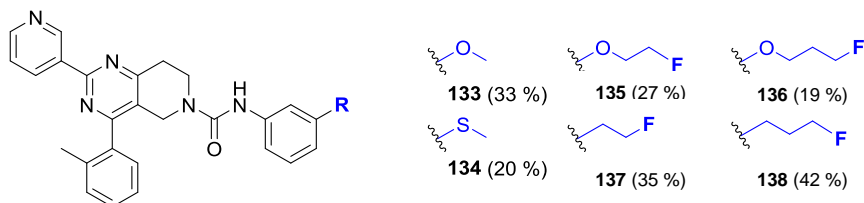
### 4.1 Dérivés méthoxy et thiométhoxy.

Le dérivé *mé*ta-méthoxyphényl **133**, et son analogue *mé*ta-thiométhyle éther **134** (Figure 61) ont été synthétisés en cinq étapes par couplage, lors de la dernière étape de la séquence réactionnelle, avec une amine clé contenant le motif 5,6,7,8-tétrahydropyrido[4,3-*d*]pyrimidine (préparée en quatre étapes avec 28 % de rendement) et les isocyanates ad-hoc préparés *in situ* à partir des méthoxy- et thiométhoxy-anilines correspondantes.

Le précurseur de marquage correspondant à **133** (phénol) a lui aussi été préparé en trois étapes et obtenu avec 5 % de rendement global. Le radiomarquage au carbone-11 (<sup>11</sup>C)méthylation) a été effectué et a permis d'obtenir [<sup>11</sup>C]-**133** avec un rendement radiochimique corrigé de la décroissance de 5 % et une RAS de 133 GBq/μmol.

## 4.2. Dérivés fluoro-alkoxy et fluoro-alcanes.

Les quatre dérivés fluorés visés (fluoroéthoxy **135**, fluoropropoxy **136**, fluoroéthyle **137** et fluoropropyle **138**) ont également été synthétisés de manière analogue à **133** et obtenus avec des rendements variant de 13 à 26 % pour la dernière étape (**Figure 61**).



**Figure 61** : Structure des dérivés méthoxy **133** et thiométhoxy **134**, et analogues fluorés **135-138**.

## 4.3. Dérivés fluoropyridines.

Aucune des molécules envisagées (projet M), n'a pu, à ce jour, être obtenue. Les trois premières étapes de la voie de synthèse proposée ont bien été réalisées, mais la réaction de Sandmeyer, permettant de passer de la fonction 2-amino-1,3-pyrimidine au dérivé bromé correspondant, et ainsi d'obtenir l'intermédiaire clé de la synthèse, reste sur un échec. Une nouvelle voie de rétrosynthèse est donc très certainement à reconsidérer.



# Quatrième partie

## Partie expérimentale





# Chapter I: Organic synthesis.

## 1. General information.

### 1.1. Chemicals.

Commercially available reagents were purchased from Sigma-Aldrich and used as supplied without further purification unless otherwise stated.

### 1.2 TLC analysis, HPLC conditions and flash chromatography.

TLCs were run on aluminium pre-coated plates of silica gel 60F<sub>254</sub> (VWR). The compounds were localized when possible at 254 nm or 365 nm using a UV-lamp and / or by dipping the TLC-plates in a 1 % ethanolic ninhydrin solution, a basic KMnO<sub>4</sub> aqueous solution or a 1 % MeOH / H<sub>2</sub>O (50 / 50, v / v) FeCl<sub>3</sub> solution and developing with a heat gun. Flash chromatographies were carried out on silica gel (0.63 - 0.200 mm, VWR) columns. Retention time of final compounds were determined by HPLC with the conditions following: [**HPLC A**]: Waters system equipped with a 600E System Controller, a Prep LC 3000 pump, a 490E programmable multiwavelength UV-detector and a Kipp and Zonen BD12E flatbed recorder; column: preparative Zorbax<sup>®</sup> RX-SIL, Hewlett Packard (250 x 21.2 mm); porosity 5 µm; conditions: DCM / MeOH: 98.5 / 1.5 (v / v); 10 mL / min at r.t.; UV detection at 230 nm.

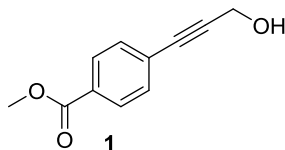
### 1.2. Spectroscopic analyses.

Proton nuclear magnetic resonance (<sup>1</sup>H-NMR) and carbon-13 nuclear magnetic resonance (<sup>13</sup>C-NMR) spectra were recorded on a Bruker (Wissembourg, France) Avance (400 MHz) apparatus. All NMR spectra were recorded at 23 °C. Proton and carbon chemical shifts (δ) are expressed in parts per million (ppm) downfield from tetramethylsilane and are referenced to the proton resonance of the hydrogenated residue of the deuterated solvents CDCl<sub>3</sub> (CHCl<sub>3</sub>, δ = 7.26 ppm), CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (CDHCl<sub>2</sub>, δ = 5.32 ppm), CD<sub>3</sub>CN (CHD<sub>2</sub>CN, δ = 1.96 ppm), MeOD-*d*<sub>4</sub> (CHD<sub>2</sub>OH, δ = 3.31 ppm), DMSO-*d*<sub>6</sub> (DMSO-*d*<sub>5</sub>, δ = 2.50 ppm) or C<sub>6</sub>D<sub>6</sub> (δ = 7.16 ppm) for <sup>1</sup>H-NMR and the carbon resonance of CDCl<sub>3</sub> (δ = 77.2 ppm), CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (δ = 54.0 ppm), CD<sub>3</sub>CN (δ = 118.3 ppm), MeOD-*d*<sub>4</sub> (δ = 49.0 ppm), DMSO-*d*<sub>6</sub> (δ = 49.0 ppm) or C<sub>6</sub>D<sub>6</sub> (δ = 128.1 ppm) for <sup>13</sup>C-NMR. For <sup>1</sup>H-NMR, data are presented as follows: chemical shift, multiplicity (s: singlet; d: doublet; t: triplet; q: quadruplet; q<sup>5</sup>: quintuplet; dt: doublet of triplet; m: multiplet; bs: broad signal), coupling constants (J in Hertz) and integration. For <sup>13</sup>C-NMR, data are presented as follows: chemical shift, multiplicity (s: singlet; d: doublet; q: quadruplet), coupling constants (J in Hertz) and integration.

The mass spectra (MS) were measured on a Thermo Electron (Les Ulis, France) Ion Trap LCQ Deca XP+ spectrometer (ESI+). The high resolution mass spectrometry (HRMS) analyses were performed by Imagif (ICSN-CNRS, Gif-sur-Yvette) by electrospray with positive (ESI+) or negative (ESI-) ionization mode.

## 2. Experimental procedures.

### Methyl 4-(3-hydroxyprop-1-yn-1-yl)benzoate (**1**).

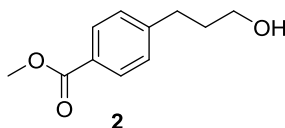


To a solution of methyl 4-iodobenzoate (25 g, 95.4 mmol) in triethylamine (500 mL) was added prop-2-yn-1-ol (6.7 mL, 115 mmol). The reaction mixture was degassed under vacuum and filled with argon (2 cycles). Then, palladium bis(triphenylphosphine)dichloride (670 mg, 0.95 mmol) and copper iodide (182 mg, 0.95 mmol) were added to the suspension and the reaction mixture was stirred at room temperature overnight. Then, it was concentrated to dryness and the residue was dissolved in ethyl acetate (400 mL). The resulting solution was washed successively with a 1.0 M hydrochloric acid aqueous solution (100 mL), water (2 x 200 mL), brine (200 mL), then dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (heptane / ethyl acetate: 60 / 40) to afford **1** (15.6 g, 86 %) as a yellow crystalline powder. Mp: 85 - 86 °C.  $R_f$  (heptane / ethyl acetate: 60 / 40): 0.24.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.98 (d, 2H,  $J = 8.0$  Hz), 7.48 (d, 2H,  $J = 8.0$  Hz), 4.52 (d, 2H,  $J = 4.4$  Hz), 3.90 (s, 3H), 1.93 (bt,  $w_{1/2} = 13$  Hz, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  166.5 [C], 131.5 [2CH], 129.7 [C], 129.4 [2CH], 127.2 [C], 90.1 [C], 84.8 [C], 52.2 [ $\text{CH}_3$ ], 51.5 [ $\text{CH}_2$ ].

### Methyl 4-(3-hydroxypropyl)benzoate (**2**).

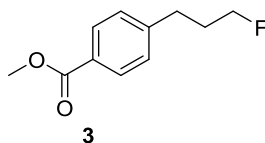


To a solution of **1** (10.0 g, 52.6 mmol) in methanol (250 mL) was cautiously added 10 % palladium on charcoal in one portion to each reaction mixture (400 mg, 3.7 mmol, 40 mg/g). Then, each reaction flask was degassed and filled with hydrogen at 1 atm. The reaction mixture was stirred at ambient temperature overnight and the balloon was refilled when necessary. Once completed (NMR monitoring), the reaction mixture was cautiously filtered on a pad of Celite<sup>®</sup> and the catalyst was washed with dichloromethane / methanol: 80 / 20 (500 mL). The filtrate was concentrated to dryness and the residue was purified by flash chromatography on silica gel (heptane / ethyl acetate: 50 / 50) to afford **2** (6.7 g, 65 %) as an orange oil.  $R_f$  (heptane / ethyl acetate: 50 / 50): 0.18.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.93 (d, 2H,  $J = 8.0$  Hz), 7.24 (d, 2H,  $J = 8.0$  Hz), 3.88 (s, 3H), 3.65 (t, 2H,  $J = 6.4$  Hz), 2.74 (t, 2H,  $J = 7.6$  Hz), 2.36 (s, 1H), 1.88 (tt, 2H,  $J = 7.6, 6.4$  Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  167.2 [C], 147.5 [C], 129.6 [2CH], 128.4 [2CH], 127.6 [C], 61.7 [ $\text{CH}_2$ ], 51.9 [ $\text{CH}_3$ ], 33.7 [ $\text{CH}_2$ ], 32.0 [ $\text{CH}_2$ ].

### Methyl 4-(3-fluoropropyl)benzoate (**3**).



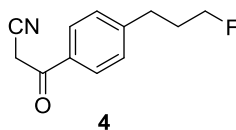
To a solution of **2** (5.00 g, 25.7 mmol) in dichloromethane (200 mL) cooled at 0 °C was added dropwise a 50 % Deoxo-Fluor<sup>®</sup> solution in tetrahydrofuran (20 mL) over 15 min. The reaction mixture was warmed up to ambient

temperature and stirred overnight. Then, it was cooled at 0 °C and water (100 mL) was slowly and cautiously added. The organic layer was separated, washed twice with water (2 x 100 mL) and brine (100 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (heptane / ethyl acetate: 90 / 10 to 50 / 50) to afford **3** (3.55 g, 70 %) as a yellow oil.  $R_f$  (heptane / ethyl acetate: 50 / 50): 0.52.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.96 (d, 2H,  $J = 8.0$  Hz), 7.26 (d, 2H,  $J = 8.0$  Hz), 4.44 (dt, 2H,  $J_{\text{H-F}}^2 = 47.2$  Hz,  $J = 6.0$  Hz), 3.89 (s, 3H), 2.80 (t, 2H,  $J = 7.6$  Hz), 2.01 (dtt, 2H,  $J_{\text{H-F}}^3 = 27.2$  Hz,  $J = 7.6, 6.0$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  166.9 [C], 146.5 [C], 129.7 [2CH], 128.4 [2CH], 128.0 [C], 82.8 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J_{\text{C-F}}^1 = 164$  Hz], 51.9 [ $\text{CH}_3$ ], 31.6 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J_{\text{C-F}}^2 = 19$  Hz], 31.3 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J_{\text{C-F}}^3 = 5$  Hz].

### 3-(4-(3-Fluoropropyl)phenyl)-3-oxopropanenitrile (**4**).

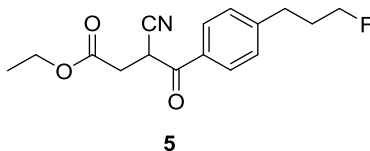


To anhydrous tetrahydrofuran (50 mL) cooled at -60 °C, was carefully added a 2.5 M *n*-butyllithium solution in hexanes (23 mL, 57.5 mmol). A solution of acetonitrile (3.0 mL, 57.8 mmol) in anhydrous tetrahydrofuran (10 mL) was cautiously added dropwise while maintaining the temperature below -50 °C. The reaction mixture was stirred for 1 h at -60 °C. Then, a solution of **3** (3.78 g, 19.3 mmol) in anhydrous tetrahydrofuran (50 mL) was gently added to the mixture over 15 min while maintaining the temperature below -50 °C. After the addition, the content was stirred for an additional 2 h at -50 °C and the reaction was then quenched with methanol (10 mL) at -40 °C, poured into water (400 mL) and acidified with a 37 % hydrochloric acid aqueous solution to pH 3. The mixture was extracted twice with ethyl acetate (2 x 200 mL) and the combined organic layers were then washed with water (2 x 100 mL) and brine (100 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (heptane / ethyl acetate: 70 / 30 to 60 / 40) to afford **4** (3.33 g, 16.2 mmol) as white crystals (84 %). Mp: 63 - 64 °C.  $R_f$  (heptane / ethyl acetate: 50 / 50): 0.37.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.86 (d, 2H,  $J = 8.0$  Hz), 7.35 (d, 2H,  $J = 8.0$  Hz), 4.46 (dt, 2H,  $J_{\text{H-F}}^2 = 47.2$  Hz,  $J = 6.0$  Hz), 4.07 (s, 2H), 2.84 (t, 2H,  $J = 7.6$  Hz), 2.04 (dtt, 2H,  $J_{\text{H-F}}^3 = 25.6$  Hz,  $J = 7.6, 6.0$  Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  186.6 [C], 148.9 [C], 132.3 [C], 129.2 [2CH], 128.7 [2CH], 113.8 [C], 82.7 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J_{\text{C-F}}^1 = 164$  Hz], 31.5 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J_{\text{C-F}}^2 = 5$  Hz], 31.4 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J_{\text{C-F}}^3 = 20$  Hz], 29.3 [ $\text{CH}_2$ ].

### Ethyl 3-cyano-4-(4-(3-fluoropropyl)phenyl)-4-oxobutanoate (**5**).

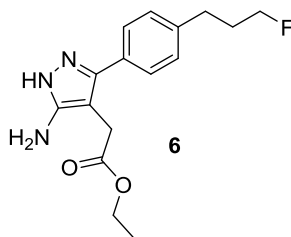


To a solution of **4** (5.34 g, 26.0 mmol) in ethanol (150 mL) was added in one portion, under vigorous stirring, sodium hydroxide (1.14 g, 28.6 mmol). The reaction mixture was stirred at ambient temperature for 15 min. Then, sodium iodide (3.90 g, 26.0 mmol) and ethyl bromoacetate (3.18 mL, 28.6 mmol) were added to the reaction mixture which was stirred at ambient temperature for 24 h. The reaction mixture was concentrated to dryness and the residue was partitioned between acidified water (100 mL, pH 1) and ethyl acetate (200 mL). The organic layer was separated, washed with water (200 mL) and brine (100 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (heptane / ethyl acetate: 80 / 20 to 50 / 50) to afford **5** (6.15 g, 81 %) as a yellow oil.  $R_f$  (heptane / ethyl acetate: 50 / 50): 0.5.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.98 (d, 2H,  $J = 8.0$  Hz), 7.36 (d, 2H,  $J = 8.0$  Hz), 4.74 (dd, 1H,  $J = 5.6, 8.4$  Hz), 4.46 (dt, 2H,  $J_{\text{H-F}}^2 = 47.2$  Hz,  $J = 5.6$  Hz), 4.18 (q, 2H,  $J = 7.6$  Hz), 3.26 (dd, 1H,  $J = 17.2, 8.4$  Hz), 2.92 (dd, 1H,  $J = 17.2, 5.6$  Hz), 2.84 (t, 2H,  $J = 7.6$  Hz), 2.04 (dt, 2H,  $J_{\text{H-F}}^3 = 19.6$  Hz,  $J = 7.6, 5.6$  Hz), 1.26 (t, 3H,  $J = 7.2$  Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  188.0 [C], 169.5 [C], 148.9 [C], 131.8 [C], 129.3 [2CH], 129.2 [2CH], 116.4 [C], 82.6 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J_{\text{C-F}}^1 = 165$  Hz], 61.6 [ $\text{CH}_2$ ], 34.1 [CH], 32.8 [ $\text{CH}_2$ ], 31.5 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J_{\text{C-F}}^3 = 5$  Hz], 31.4 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J_{\text{C-F}}^2 = 20$  Hz], 14.0 [ $\text{CH}_3$ ].

**Ethyl 2-(5-amino-3-(4-(3-fluoropropyl)phenyl)-1H-pyrazol-4-yl)acetate (6).**

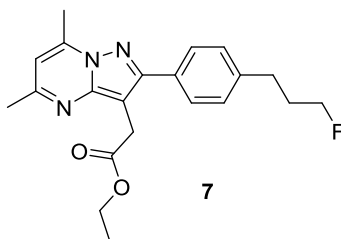


To a solution of **5** (6.15 g, 21.1 mmol) in ethanol (120 mL) were added dropwise, at ambient temperature, monohydrated hydrazine (3 mL, 63.3 mmol) and acetic acid (2 mL, 35.8 mmol). The reaction mixture was refluxed for 2 h. Then, it was concentrated to dryness and the residue was partitioned between ethyl acetate (50 mL) and a 10 % potassium carbonate aqueous solution (20 mL). The organic layer was separated, washed twice with water (2 x 20 mL) and brine (20 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane / methanol: 97 / 3) to afford **6** (3.25 g, 50 %) as an orange oil.  $R_f$  (dichloromethane / methanol: 95 / 5): 0.38.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.45 (d, 2H,  $J = 8.0$  Hz), 7.26 (d, 2H,  $J = 8.0$  Hz), 6.24 (b, 3H,  $w_{1/2} = 88$  Hz), 4.46 (dt,  $J_{\text{H-F}}^2 = 47.2$  Hz,  $J = 6.0$  Hz), 4.17 (q, 2H,  $J = 7.2$  Hz), 3.41 (s, 2H), 2.77 (t, 2H,  $J = 7.6$  Hz), 2.08 - 1.95 (m, 2H), 1.27 (t, 3H,  $J = 7.2$  Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  171.9 [C], 153.8 [C], 143.0 [C], 141.7 [C], 129.0 [2CH], 127.8 [2CH], 127.7 [C], 96.8 [C], 82.9 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J_{\text{C-F}}^1 = 164$  Hz], 61.1 [ $\text{CH}_2$ ], 31.8 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J_{\text{C-F}}^2 = 19$  Hz], 31.0 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J_{\text{C-F}}^3 = 5$  Hz], 29.4 [ $\text{CH}_2$ ], 14.1 [ $\text{CH}_3$ ].

**Ethyl 2-(2-(4-(3-fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)acetate (7).**



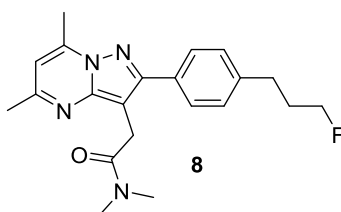
To a solution of **6** (748 mg, 2.44 mmol) in ethanol (50 mL) was added acetylacetone (0.50 mL, 4.87 mmol). The reaction mixture was refluxed for 5 h. Once the reaction completed, the mixture was concentrated to dryness and the residue was dissolved in ethyl acetate (100 mL). The solution was then washed twice with water (2 x 50 mL) and brine (50 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane / methanol: 99 / 1 to 98 / 2) to afford **7** (773 mg, 86 %) as light yellow crystals.  $R_f$  (dichloromethane / methanol: 96 / 4): 0.60.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.70 (d, 2H,  $J = 8.0$  Hz), 7.30 (d, 2H,  $J = 8.0$  Hz), 6.54 (s, 1H), 4.47 (dt, 2H,  $J_{\text{H-F}}^2 = 47.2$  Hz,  $J = 6.0$  Hz), 4.13 (q,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 3.97 (s, 2H), 2.80 (t, 2H,  $J = 7.6$  Hz), 2.75 (s, 3H), 2.57 (s, 3H), 2.04 (dt, 2H,  $J_{\text{H-F}}^3 = 26.8$  Hz,  $J = 7.6, 6.0$  Hz), 1.19 (t, 3H,  $J = 7.2$  Hz).

$^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  171.8 [C], 157.9 [C], 154.7 [C], 147.6 [C], 144.8 [C], 141.4 [C], 131.3 [C], 128.7 [2CH], 128.4 [2CH], 108.5 [CH], 99.4 [C], 83.0 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J_{\text{C-F}}^1 = 164$  Hz], 60.7 [ $\text{CH}_2$ ], 31.9 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J_{\text{C-F}}^2 = 20$  Hz], 31.0 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J_{\text{C-F}}^3 = 5$  Hz], 29.2 [ $\text{CH}_2$ ], 24.6 [ $\text{CH}_3$ ], 16.8 [ $\text{CH}_3$ ], 14.1 [ $\text{CH}_3$ ].

**General procedure for the preparation of compounds 8-21:** To a solution of the appropriate amine (4 eq) in anhydrous toluene (3 mL) was added dropwise, under argon and at room temperature, a 2.0 M trimethylaluminum solution in toluene (3 to 4 eq). The resulting solution was stirred at room temperature for 1 h. Then, a solution of the ester **7** (50 - 300 mg, 1 eq) in toluene (1 mL) was added in one portion and the mixture was heated at 110 °C (except otherwise stated) until completion (TLC) of the reaction. The mixture was then quenched with water (20 mL) and further diluted with a 0.1 M hydrochloric acid aqueous solution (10 mL), unless otherwise stated. The mixture was finally extracted twice with ethyl acetate (2 x 20 mL) and the combined organic layers were washed with water (20 mL) and brine (10 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness. The residue was either triturated in diethyl ether (2 mL) or purified by flash chromatography on silica gel (using dichloromethane / methanol: 99 / 1 to 94 / 6 or dichloromethane / acetone: 95 / 5 to 85 / 15) to afford the desired products **8** to **20**.

**2-(2-(4-(3-Fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)-*N,N*-dimethyl acetamide (8).**



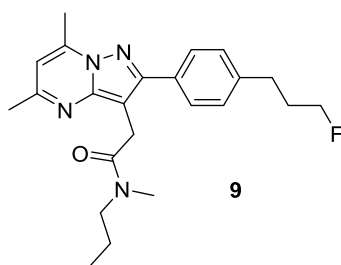
This amide was prepared following the general procedure described above using 50 mg of the ester **7** (0.13 mmol), 44 mg of dimethylamine hydrochloride (4 eq, 0.52 mmol), 271  $\mu\text{L}$  of 2.0 M trimethylaluminum solution in toluene (4 eq, 0.54 mmol), and heating for 30 min. **8** (30 mg, 60 %) was obtained as beige crystals after trituration in diethyl ether. Mp: 162 - 164 °C.  $R_f$  (dichloromethane / methanol: 97 / 3): 0.20.  $t_R$  (HPLC A) = 1.18 min.

$^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.75 (d, 2H,  $J = 8.0$  Hz), 7.29 (d, 2H,  $J = 8.0$  Hz), 6.52 (s, 1H), 4.48 (dt, 2H,  $J_{\text{H-F}}^2 = 47.2$  Hz,  $J = 6.0$  Hz), 3.94 (s, 2H), 3.16 (s, 3H), 2.98 (s, 3H), 2.79 (t, 2H,  $J = 7.6$  Hz), 2.75 (s, 3H), 2.55 (s, 3H), 2.04 (dq<sup>5</sup>, 2H,  $J_{\text{H-F}}^3 = 25.2$  Hz,  $J = 7.6$  Hz).

$^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  170.8 [C], 157.5 [C], 155.1 [C], 147.4 [C], 144.9 [C], 141.2 [C], 131.5 [C], 128.7 [2CH], 128.7 [2CH], 108.3 [CH], 100.6 [C], 83.0 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J_{\text{C-F}}^1 = 163$  Hz], 37.6 [ $\text{CH}_3$ ], 35.8 [ $\text{CH}_3$ ], 31.9 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J_{\text{C-F}}^2 = 20$  Hz], 31.1 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J_{\text{C-F}}^3 = 5$  Hz], 28.2 [ $\text{CH}_2$ ], 24.6 [ $\text{CH}_3$ ], 16.9 [ $\text{CH}_3$ ].

HR-ESI (+)-MS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{FN}_4\text{O}$ : 369.2085 [ $\text{M}+\text{H}$ ]<sup>+</sup>, found 369.2087.

**2-(2-(4-(3-Fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)-*N*-methyl-*N*-propylacetamide (9).**



This amide was prepared following to the general procedure described above using 300 mg of the ester **7** (0.81 mmol), 163 mg of *N*-methylpropyl (2 eq, 1.63 mmol), 163  $\mu\text{L}$  of 2 M trimethylaluminum solution in toluene (4 eq, 3.25 mmol), and heating for 4 h. **9** was obtained as light yellow solid after flash chromatography on silica gel

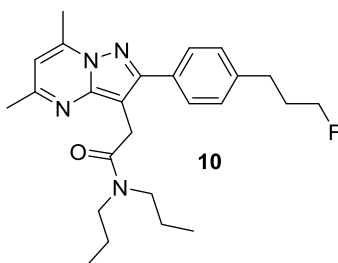
(dichloromethane / acetone: 95 / 5 to 85 / 15) (170 mg, 53 %). Mp: 122 - 124 °C.  $R_f$  (dichloromethane / acetone: 90 / 10): 0.22.  $t_R$  (HPLC A) = 1.39 min.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.75 (d, 2H,  $J = 8.0$  Hz), 7.28 (d, 2H,  $J = 8.0$  Hz), 6.51 (s, 1H), 4.52 (dt, 2H,  $J^2_{\text{H-F}} = 47.2$  Hz,  $J = 6.0$  Hz), 3.94 (s, 1H, *rot A*), 3.92 (s, 1H, *rot B*), 3.42 (t, 1H,  $J = 7.2$  Hz, *rot A*), 3.36 (t, 1H,  $J = 7.2$  Hz, *rot B*), 3.12 (s, 1.5H, *rot A*), 2.95 (s, 1.5H, *rot B*), 2.79 (t, 2H,  $J = 7.2$  Hz), 2.74 (s, 3H), 2.54 (s, 3H), 2.03 (dq<sup>5</sup>, 2H,  $J^3_{\text{H-F}} = 25.2$  Hz,  $J = 7.2$  Hz), 1.65 (q<sup>5</sup>, 1H,  $J = 7.2$  Hz, *rot A*), 1.54 (q<sup>5</sup>, 1H,  $J = 7.2$  Hz, *rot B*), 0.91 (t, 1.5H,  $J = 7.2$  Hz, *rot A*), 0.87 (t, 1.5H,  $J = 7.2$  Hz, *rot B*).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  170.6 [C, *rot A*], 170.5 [C, *rot B*], 157.4 [C], 155.0 [C], 174.5 [C], 144.4 [C], 141.1 [C], 131.5 [C], 128.7 [2CH], 128.6 [2CH], 108.2 [CH], 100.8 [C], 82.9 [CH<sub>2</sub>, d,  $J^1_{\text{C-F}} = 164$  Hz], 51.6 [CH<sub>2</sub>, *rot A*], 49.6 [CH<sub>2</sub>, *rot B*], 35.6 [CH<sub>3</sub>, *rot A*], 33.7 [CH<sub>3</sub>, *rot B*], 31.9 [CH<sub>2</sub>, d,  $J^2_{\text{C-F}} = 19$  Hz], 31.0 [CH<sub>2</sub>, d,  $J^3_{\text{C-F}} = 5$  Hz], 28.4 [CH<sub>2</sub>, *rot A*], 27.9 [CH<sub>2</sub>, *rot B*], 24.5 [CH<sub>3</sub>], 21.5 [CH<sub>2</sub>, *rot A*], 20.3 [CH<sub>2</sub>, *rot B*], 16.8 [CH<sub>3</sub>], 11.1 [CH<sub>3</sub>, *rot A*], 11.0 [CH<sub>3</sub>, *rot B*].

HR-ESI(+)-MS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{FN}_4\text{O}$ : 397.2398 [M+H]<sup>+</sup>, found 397.2389.

### 2-(2-(4-(3-Fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)-*N,N*-dipropyl acetamide (10).



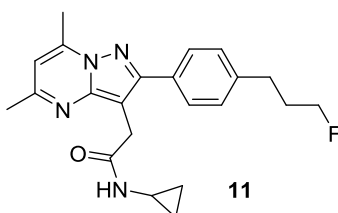
This amide was prepared following the general procedure described above document using 150 mg of the ester **7** (0.41 mmol), 222  $\mu\text{L}$  of dipropylamine (4 eq, 1.62 mmol), 810  $\mu\text{L}$  of 2.0 M trimethylaluminum solution in toluene (4 eq, 1.62 mmol), and heating at 100 °C for 1 h. **10** (105 mg, 61 %) was obtained as a beige solid after flash chromatography on silica gel (dichloromethane / methanol: 99 / 1). Mp: 82 - 84 °C.  $R_f$  (dichloromethane / methanol: 97 / 3): 0.25.  $t_R$  (HPLC A) = 1.55 min.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.76 (d, 2H,  $J = 8.0$  Hz), 7.28 (d, 2H,  $J = 8.0$  Hz), 6.52 (s, 1H), 4.48 (dt, 2H,  $J^2_{\text{H-F}} = 47.2$  Hz,  $J = 6.0$  Hz), 3.95 (s, 2H), 3.38 (t, 2H,  $J = 7.6$  Hz), 3.31 (t, 2H,  $J = 7.6$  Hz), 2.80 (t, 2H,  $J = 7.6$  Hz), 2.75 (s, 3H), 2.55 (s, 3H), 2.04 (dt, 2H,  $J^3_{\text{H-F}} = 25.2$  Hz,  $J = 7.6, 6.0$  Hz), 1.65 (sext, 2H,  $J = 7.6$  Hz), 1.55 (sex, 2H,  $J = 7.6$  Hz), 0.91 (t, 3H,  $J = 7.6$  Hz), 0.86 (t, 3H,  $J = 7.6$  Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  170.4 [C], 157.4 [C], 155.0 [C], 147.5 [C], 144.8 [C], 141.2 [C], 131.5 [C], 128.7 [2CH], 128.6 [2CH], 108.2 [CH], 101.1 [C], 83.0 [CH<sub>2</sub>, d,  $J^1_{\text{C-F}} = 164$  Hz], 49.9 [CH<sub>2</sub>], 48.0 [CH<sub>2</sub>], 31.9 [CH<sub>2</sub>, d,  $J^2_{\text{C-F}} = 19$  Hz], 31.0 [CH<sub>2</sub>, d,  $J^3_{\text{C-F}} = 5$  Hz], 28.1 [CH<sub>2</sub>], 24.5 [CH<sub>3</sub>], 22.2 [CH<sub>2</sub>], 20.8 [CH<sub>2</sub>], 16.8 [CH<sub>3</sub>], 11.3 [CH<sub>3</sub>], 11.2 [CH<sub>3</sub>].

HR-ESI (+)-MS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{25}\text{H}_{33}\text{FN}_4\text{O}$ : 425.2711 [M+H]<sup>+</sup>, found 425.2720.

### *N*-Cyclopropyl-2-(2-(4-(3-fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (11).



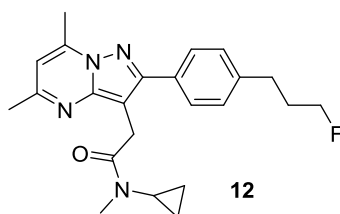
This amide was prepared following the general procedure described above using 50 mg of the ester **7** (0.13 mmol), 38  $\mu$ L of cyclopropylamine (4 eq, 0.55 mmol), 274  $\mu$ L of 2.0 M trimethylaluminum solution in toluene (4 eq, 0.55 mmol), and heating for 45 min. **11** (42 mg, 81 %) was obtained as a white solid after trituration in cold diethyl ether. Mp: 174 - 176 °C.  $R_f$  (dichloromethane / methanol: 95 / 5): 0.28.  $t_R$  (HPLC A) = 1.18 min.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.81 (d, 2H,  $J = 8.0$  Hz), 7.33 (d, 2H,  $J = 8.0$  Hz), 6.88 (b, 1H,  $w_{1/2} = 21$  Hz), 6.60 (s, 1H), 4.48 (dt, 2H,  $J_{\text{H-F}}^2 = 47.2$  Hz,  $J = 6.0$  Hz), 3.80 (s, 2H), 2.81 (t, 2H,  $J = 7.6$  Hz), 2.79 (s, 3H), 2.65 (m, 1H), 2.60 (s, 3H), 2.05 (dt, 2H,  $J_{\text{H-F}}^3 = 25.2$  Hz,  $J = 7.6, 6.0$  Hz), 0.68 (q, 2H,  $J = 6.8$  Hz), 0.33 (bt, 2H,  $w_{1/2} = 21$  Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  172.6 [C], 158.1 [C], 155.0 [C], 147.2 [C], 145.5 [C], 141.8 [C], 130.4 [C], 128.9 [2CH], 128.8 [2CH], 108.5 [CH], 100.1 [C], 83.0 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J_{\text{C-F}}^1 = 164$  Hz], 31.9 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J_{\text{C-F}}^2 = 20$  Hz], 31.7 [ $\text{CH}_2$ ], 31.1 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J_{\text{C-F}}^3 = 5$  Hz], 24.4 [CH], 22.5 [ $\text{CH}_3$ ], 16.9 [ $\text{CH}_3$ ], 6.3 [ $2\text{CH}_2$ ].

HR-ESI (+)-MS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{FN}_4\text{O}$ : 381.2085  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , found 381.2089.

***N*-Cyclopropyl-2-(2-(4-(3-fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)-*N*-methylacetamide (**12**)**. Note: The general procedure described above failed to generate the desired amide in acceptable amount and purity. The following alternative pathway was thus used.

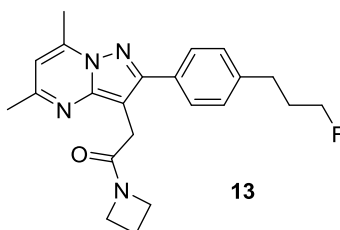


To a solution of **25** (277 mg, 0.81 mmol) in dichloromethane (5 mL), were added successively **24** (66 mg, 0.62 mmol), *N,N,N',N'*-tetramethyl-*O*-(benzotriazol-1-yl)uroniumtetrafluoroborate (TBTU) (260 mg, 0.81 mmol) and DIPEA (1.08 mL, 6.2 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 4 h. Then, it was partitioned between water (25 mL) and dichloromethane (25 mL). The aqueous layer was separated and extracted thrice with dichloromethane (3 x 15 mL). The combined organic layers were washed with a 1 M hydrochloric acid aqueous solution (20 mL), brine (20 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness under vacuum. The crude was purified on silica gel chromatography (toluene / acetone: 80 / 20 to 70 / 30) to afford **12** as a pale yellow oil (40 mg, 15 %).  $R_f$  (toluene / acetone: 50 / 50): 0.53.  $t_R$  (HPLC A) = 1.35 min.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.73 (d, 2H,  $J = 8.8$  Hz), 7.28 (d, 2H,  $J = 8.8$  Hz), 6.51 (s, 1H), 4.47 (dt, 2H,  $J_{\text{H-F}}^2 = 45.2$  Hz,  $J = 6.0$  Hz), 4.13 (s, 2H), 2.95 (s, 3H), 2.88 - 2.86 (m, 1H), 2.79 (t, 2H,  $J = 7.6$  Hz), 2.74 (s, 3H), 2.54 (s, 3H), 2.03 (m, 2H,  $J_{\text{H-F}}^3 = 18.3$  Hz), 0.91 - 0.85 (m, 4H).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  173.8 [C], 157.4 [C], 155.0 [C], 147.6 [C], 144.6 [C], 141.1 [C], 131.6 [C], 128.6 [4CH], 108.2 [CH], 101.1 [C], 83.0 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J_{\text{C-F}}^1 = 163$  Hz], 34.2 [CH], 31.9 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J_{\text{C-F}}^2 = 19$  Hz], 31.3 [ $\text{CH}_3$ ], 31.0 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J_{\text{C-F}}^3 = 5$  Hz], 28.8 [ $\text{CH}_2$ ], 24.6 [ $\text{CH}_3$ ], 16.8 [ $\text{CH}_3$ ], 9.26 [ $2\text{CH}_2$ ].

**1-(Azetidin-1-yl)-2-(2-(4-(3-fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)ethanone (**13**)**.



This amide was prepared following the general procedure described above using 150 mg of the ester **7** (0.406 mmol), 110  $\mu$ L of azetidine (4 eq, 1.63 mmol), 609  $\mu$ L of 2.0 M trimethylaluminum solution in toluene (3 eq, 1.22 mmol),



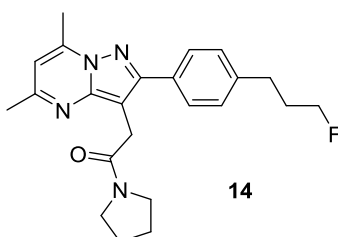
and heating at 70 °C for 1 h. No acidic treatment was made for the work up of this reaction. **13** (75 mg, 49 %) was obtained as a beige powder after trituration in cold diethyl ether. Mp: 163 - 164 °C.  $R_f$  (dichloromethane / methanol: 96 / 4): 0.18.  $t_R$  (HPLC A) = 1.19 min.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.77 (d, 2H,  $J = 8.0$  Hz), 7.24 (d, 2H,  $J = 8.0$  Hz), 6.46 (s, 1H), 4.41 (dt, 2H,  $J_{\text{H-F}}^2 = 47.2$  Hz,  $J = 6.0$  Hz), 4.20 (t, 2H,  $J = 7.6$  Hz), 3.97 (t, 2H,  $J = 7.6$  Hz), 3.63 (s, 2H), 2.73 (t, 2H,  $J = 7.6$  Hz), 2.67 (s, 3H), 2.49 (s, 3H), 2.17 (q<sup>5</sup>, 2H,  $J = 7.6$  Hz), 2.04 (dt, 2H,  $J_{\text{H-F}}^3 = 25.2$  Hz,  $J = 7.6, 6.0$  Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  171.0 [C], 157.6 [C], 155.2 [C], 147.4 [C], 144.8 [C], 141.3 [C], 131.3 [C], 128.8 [2CH], 128.7 [2CH], 108.3 [CH], 100.0 [C], 83.0 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J_{\text{C-F}}^1 = 164$  Hz], 50.7 [ $\text{CH}_2$ ], 48.1 [ $\text{CH}_2$ ], 31.9 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J_{\text{C-F}}^2 = 20$  Hz], 31.1 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J_{\text{C-F}}^3 = 5$  Hz], 26.4 [ $\text{CH}_2$ ], 24.6 [ $\text{CH}_3$ ], 16.8 [ $\text{CH}_3$ ], 15.1 [ $\text{CH}_2$ ].

HR-ESI(+)-MS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{FN}_4\text{O}$ : 381.2085 [ $\text{M}+\text{H}$ ]<sup>+</sup>, found 381.2093.

**2-(2-(4-(3-Fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)-1-(pyrrolidin-1-yl) ethanone (14).**



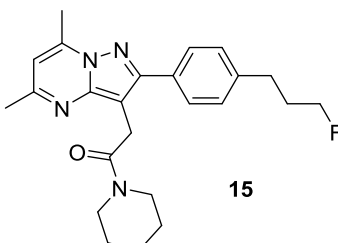
This amide was prepared following the general procedure described above using 150 mg of the ester **7** (0.406 mmol), 136  $\mu\text{L}$  of pyrrolidine (4 eq, 1.63 mmol), 710  $\mu\text{L}$  of 2.0 M trimethylaluminum solution in toluene (3.5 eq, 1.42 mmol), and heating for 1 h. **14** (107 mg, 67 %) was obtained as a white shiny foam after flash chromatography on silica gel (dichloromethane / methanol: 99 / 1 to 97 / 3). Mp: 156 - 159 °C.  $R_f$  (dichloromethane / methanol: 95 / 5): 0.29.  $t_R$  (HPLC A) = 1.27 min.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.79 (d, 2H,  $J = 8.0$  Hz), 7.29 (d, 2H,  $J = 8.0$  Hz), 6.52 (s, 1H), 4.47 (dt, 2H,  $J_{\text{H-F}}^2 = 47.2$  Hz,  $J = 6.0$  Hz), 3.88 (s, 2H), 3.65 (t, 2H,  $J = 6.8$  Hz), 3.50 (t, 2H,  $J = 6.8$  Hz), 2.79 (t, 2H,  $J = 7.6$  Hz), 2.74 (s, 3H), 2.54 (s, 3H), 2.03 (dt, 2H,  $J_{\text{H-F}}^3 = 26.8$  Hz,  $J = 7.6, 6.0$  Hz), 1.99 (q<sup>5</sup>, 2H,  $J = 6.8$  Hz), 1.86 (q<sup>5</sup>, 2H,  $J = 6.8$  Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  169.4 [C], 157.5 [C], 155.2 [C], 147.5 [C], 144.8 [C], 141.2 [C], 131.5 [C], 128.8 [2CH], 128.6 [2CH], 108.2 [CH], 100.6 [C], 83.0 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J_{\text{C-F}}^1 = 164$  Hz], 46.8 [ $\text{CH}_2$ ], 45.9 [ $\text{CH}_2$ ], 31.9 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J_{\text{C-F}}^2 = 19$  Hz], 31.0 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J_{\text{C-F}}^3 = 5$  Hz], 29.5 [ $\text{CH}_2$ ], 26.2 [ $\text{CH}_2$ ], 24.6 [ $\text{CH}_3$ ], 24.4 [ $\text{CH}_2$ ], 16.8 [ $\text{CH}_3$ ].

HR-ESI (+)-MS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{FN}_4\text{O}$ : 395.2242 [ $\text{M}+\text{H}$ ]<sup>+</sup>, found 395.2252.

**2-(2-(4-(3-Fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)-1-(piperidin-1-yl)ethanone (15).**



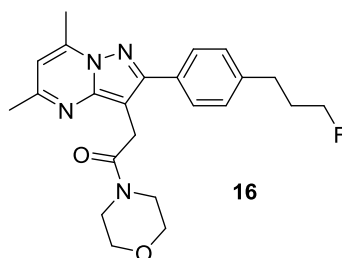
This amide was prepared following the general procedure described above using 150 mg of the ester **7** (0.41 mmol), 160  $\mu\text{L}$  of piperidine (4 eq, 1.62 mmol), 710  $\mu\text{L}$  of 2.0 M trimethylaluminum solution in toluene (3.5 eq, 1.42 mmol), and heating for 2 h. **15** (101 mg, 61 %) was obtained as beige crystals after trituration in cold diethyl ether. Mp: 145 - 146 °C.  $R_f$  (dichloromethane / methanol: 96 / 4): 0.34.  $t_R$  (HPLC A) = 1.38 min.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.76 (d, 2H,  $J = 8.0$  Hz), 7.29 (d, 2H,  $J = 8.0$  Hz), 6.52 (s, 1H), 4.47 (dt, 2H,  $J_{\text{H-F}}^2 = 47.2$  Hz,  $J = 6.0$  Hz), 3.95 (s, 2H), 3.57 (bs, 4H,  $w_{1/2} = 18$  Hz), 2.79 (t, 2H,  $J = 7.6$  Hz), 2.75 (s, 3H), 2.55 (s, 3H), 2.03 (dt, 2H,  $J_{\text{H-F}}^3 = 25.2$  Hz,  $J = 7.6, 6.0$  Hz), 1.64 - 1.63 (m, 2H,  $w_{1/2} = 18$  Hz), 1.53-1.52 (m, 4H,  $w_{1/2} = 18$  Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  169.1 [C], 157.5 [C], 155.0 [C], 147.5 [C], 144.8 [C], 141.2 [C], 131.5 [C], 128.7 [2CH], 128.6 [2CH], 108.3 [CH], 100.8 [C], 83.0 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J_{\text{C-F}}^1 = 164$  Hz], 46.9 [ $\text{CH}_2$ ], 43.1 [ $\text{CH}_2$ ], 31.9 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J_{\text{C-F}}^2 = 20$  Hz], 31.0 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J_{\text{C-F}}^3 = 6.0$  Hz], 28.1 [ $\text{CH}_2$ ], 26.4 [ $\text{CH}_2$ ], 25.6 [ $\text{CH}_2$ ], 24.6 [ $\text{CH}_3$ ], 24.5 [ $\text{CH}_2$ ], 16.9 [ $\text{CH}_3$ ].

HR-ESI (+)-MS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{FN}_4\text{O}$ : 409.2398[M+H] $^+$ , found 409.2393.

**2-(2-(4-(3-Fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)-1-morpholino ethanone (16).**



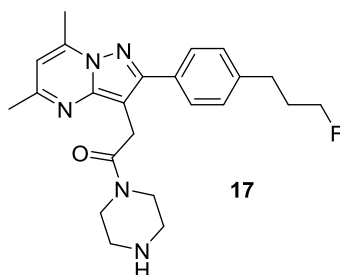
This amide was prepared following the general procedure described above using 100 mg of the ester **7** (0.27 mmol), 94 mg of morpholine (4 eq, 1.08 mmol), 540  $\mu\text{L}$  of 2.0 M trimethylaluminum solution in toluene (4 eq, 1.08 mmol), and heating at 100  $^\circ\text{C}$  for 1 h. **16** (89 mg, 80 %) was obtained as an ochre solid after flash chromatography on silica gel (dichloromethane / methanol: 99 / 1 to 97 / 3). Mp: 118 - 120  $^\circ\text{C}$ .  $R_f$  (dichloromethane / methanol: 95 / 5): 0.33.  $t_R$  (HPLC A) = 1.15 min.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.80 (d, 2H,  $J = 8.0$  Hz), 7.31 (d, 2H,  $J = 8.0$  Hz), 6.54 (s, 1H), 4.48 (dt, 2H,  $J_{\text{H-F}}^2 = 47.2$  Hz,  $J = 5.6$  Hz), 3.95 (s, 2H), 3.75 - 3.60 (m, 8H), 2.80 (t, 2H,  $J = 7.2$  Hz), 2.76 (s, 3H), 2.56 (s, 3H), 2.04 (dt, 2H,  $J_{\text{H-F}}^3 = 25.2$  Hz,  $J = 7.2, 5.6$  Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  169.7 [C], 157.6 [C], 155.0 [C], 147.3 [C], 144.9 [C], 141.4 [C], 131.3 [C], 128.8 [2CH], 128.7 [2CH], 108.4 [CH], 100.2 [C], 83.0 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J_{\text{C-F}}^1 = 164$  Hz], 66.9 [ $\text{CH}_2$ ], 66.7 [ $\text{CH}_2$ ], 46.4 [ $\text{CH}_2$ ], 42.3 [ $\text{CH}_2$ ], 31.9 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J_{\text{C-F}}^2 = 19$  Hz], 31.1 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J_{\text{C-F}}^3 = 5$  Hz], 27.9 [ $\text{CH}_2$ ], 24.6 [ $\text{CH}_3$ ], 16.9 [ $\text{CH}_3$ ].

HR-ESI (+)-MS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{FN}_4\text{O}_2$ : 411.2191[M+H] $^+$ , found 411.2187.

**2-(2-(4-(3-Fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)-1-(piperazin-1-yl) ethanone (17).**



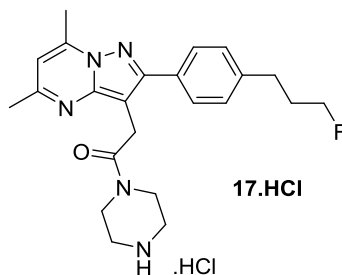
This amide was prepared following the general procedure described above using 150 mg of the ester **7** (0.41 mmol), 140 mg of piperazine (4 eq, 1.63 mmol), 710  $\mu\text{L}$  of 2.0 M trimethylaluminum solution in toluene (3.5 eq, 1.42 mmol), and heating for 1 h. A basic treatment was used as work up. The reaction mixture was quenched with a 1.0 M sodium bicarbonate aqueous solution (10 mL) and the resulting inorganic precipitate was filtered off on a Büchner funnel. The filtrate was extracted as described in the general procedure. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane / methanol: 97 / 3 to 94 / 6) to afford **17** (141 mg, 85 %) as a pale yellow solid. Mp: 69 - 70  $^\circ\text{C}$ .  $R_f$  (dichloromethane / methanol: 80 / 20): 0.36.  $t_R$  (HPLC A) = 0.69 min.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.78 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz), 7.30 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz), 6.53 (s, 1H), 4.48 (dt, 2H,  $J_{\text{H-F}}^2 = 47.2$  Hz,  $J = 6.0$  Hz), 3.94 (s, 2H), 3.66 (t, 2H,  $J = 4.8$  Hz), 3.62 (t, 2H,  $J = 4.8$  Hz), 2.85 - 2.82 (m, 4H), 2.80 (bt, 2H,  $J = 7.6$  Hz), 2.75 (s, 3H), 2.55 (s, 3H), 2.04 (dtt, 2H,  $J_{\text{H-F}}^3 = 26.0$  Hz,  $J = 7.6, 7.2$  Hz) 1.96 (s, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  169.5 [C], 157.7 [C], 155.0 [C], 147.3 [C], 144.9 [C], 141.4 [C], 131.2 [C], 128.8 [2CH], 128.7 [2CH], 108.4 [CH], 100.2 [C], 83.0 [d,  $J_{\text{C-F}}^1 = 164$  Hz,  $\text{CH}_2$ ], 46.3 [ $\text{CH}_2$ ], 45.7 [ $\text{CH}_2$ ], 45.3 [ $\text{CH}_2$ ], 42.2 [ $\text{CH}_2$ ], 31.9 [d,  $J_{\text{C-F}}^2 = 20$  Hz,  $\text{CH}_2$ ], 31.0 [d,  $J_{\text{C-F}}^3 = 5$  Hz,  $\text{CH}_2$ ], 28.0 [ $\text{CH}_2$ ], 24.6 [ $\text{CH}_3$ ], 16.8 [ $\text{CH}_3$ ].

HR-ESI (+)-MS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{FN}_4\text{O}_2$ : 410.2351[M+H] $^+$ , found 410.2358.

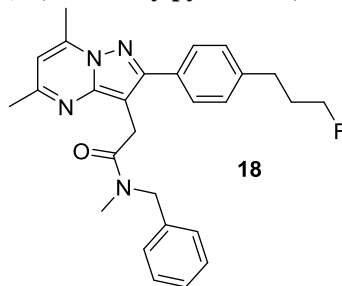
**2-(2-(4-(3-Fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)-1-(piperazin-1-yl)ethanone hydrochloride (17.HCl).**



To a solution of **17** (28 mg, 0.068 mmol) in dichloromethane (0.50 mL) were added a few drops of a 1.25 M hydrochloric acid solution in methanol. The resulting precipitate was filtered on a Büchner funnel, washed with cold diethyl ether (4 x 2 mL) and suck-dried to afford **17.HCl** (14 mg, 46 %) as bright yellow crystals. Mp: 120 - 122 °C.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{MeOD-}d_4$ , 400 MHz):  $\delta$  7.65 (d, 2H,  $J = 8.0$  Hz), 7.40 (d, 2H,  $J = 8.0$  Hz), 7.15 (s, 1H), 4.47 (dt, 2H,  $J_{\text{H-F}}^2 = 47.6$  Hz,  $J = 6.0$  Hz), 4.20 (s, 2H), 3.99 (bt, 2H,  $w_{1/2} = 16$  Hz), 3.89 (bt, 2H,  $w_{1/2} = 16$  Hz), 3.41 (bt, 2H,  $w_{1/2} = 16$  Hz), 3.31 (m, 2H), 2.96 (s, 3H), 2.85 - 2.80 (m, 5H), 2.04 (dtt, 2H,  $J_{\text{H-F}}^3 = 24.8$  Hz,  $J = 7.2, 6.0$  Hz).

***N*-Benzyl-2-(2-(4-(3-fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)-*N*-methyl acetamide (18).**



This amide was prepared following the general procedure described above using 150 mg of the ester **7** (0.41 mmol), 210  $\mu\text{L}$  of *N*-benzylmethylamine (4 eq, 1.63 mmol), 710  $\mu\text{L}$  of 2.0 M trimethylaluminum solution in toluene (3.5 eq, 1.42 mmol), and heating for 1 h. **18** (112 mg, 62 %) was obtained as an orange gum after flash chromatography on silica gel (dichloromethane / methanol: 99 / 1) and a trituration in cold diethyl ether.  $R_f$  (dichloromethane / methanol: 98 / 2): 0.25.  $t_R$  (HPLC A) = 1.47 min.

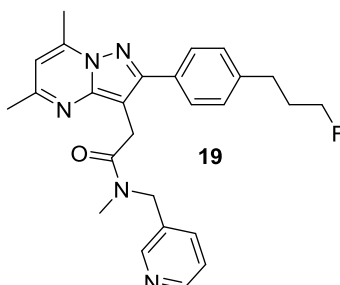
$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.78 - 7.74 (d,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 7.32 - 7.10 (m, 7H), 6.54 (s, 0.55H, *rot A*), 6.48 (s, 0.45H, *rot B*), 4.73 (s, 0.90H, *rot B*), 4.63 (s, 1.10H, *rot A*), 4.48 (dt, 2H,  $J_{\text{H-F}}^2 = 47.2$  Hz,  $J = 6.0$  Hz), 4.03 (s, 0.90H, *rot B*), 4.01 (s, 1.10H, *rot A*), 3.06 (s, 1.65H, *rot A*), 2.96 (s, 1.35H, *rot B*), 2.81 (t, 2H,  $J = 7.2$  Hz), 2.76 (s, 1.65H, *rot A*), 2.70 (s, 1.35H, *rot B*), 2.56 (s, 1.65H, *rot A*), 2.54 (s, 1.35H, *rot B*), 2.04 (dtt, 2H,  $J_{\text{H-F}}^3 = 25.6$  Hz,  $J = 7.2, 6.0$  Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  171.3 [C, *rot B*], 171.0 [C, *rot A*], 157.6 [C, *rot B*], 157.4 [C, *rot A*], 155.1 [C], 147.3 [C, *rot A*], 147.5 [C, *rot B*], 144.9 [C], 141.2 [C], 137.4 [C, *rot A*], 136.7 [C, *rot B*], 131.3 [C], 128.7 [2CH], 128.6 [2CH], 128.5 [CH, *rot B*], 124.8 [CH, *rot A*], 128.0 [CH, *rot A*], 127.1 [CH, *rot B*], 127.1 [CH, *rot A*], 126.1

[CH, *rot B*], 108.2 [CH], 100.5 [C], 83.0 [d, CH<sub>2</sub>,  $J^1_{C-F} = 164$  Hz], 53.5 [CH<sub>2</sub>, *rot B*], 51.2 [CH<sub>2</sub>, *rot A*], 35.1 [CH<sub>3</sub>, *rot A*], 34.2 [CH<sub>3</sub>, *rot B*], 31.9 [CH<sub>2</sub>, d,  $J^2_{C-F} = 20$  Hz], 31.1 [CH<sub>2</sub>], 28.4 [CH<sub>2</sub>], 24.5 [CH<sub>3</sub>], 16.8 [CH<sub>3</sub>].

HR-ESI (+)-MS *m/z* calcd for C<sub>27</sub>H<sub>29</sub>FN<sub>4</sub>O: 445.2398[M+H]<sup>+</sup>, found 445.2414.

**2-(2-(4-(3-Fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)-*N*-methyl-*N*-(pyridin-3-yl)methyl)acetamide (19).**



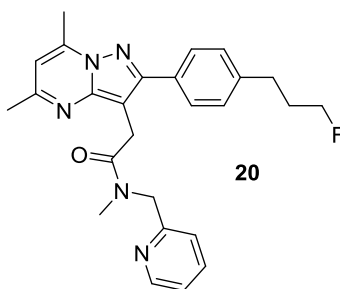
This amide was prepared following the general procedure described above using 198  $\mu$ L of 3-[(methylamino)methyl]pyridine (4 eq, 1.62 mmol), 710  $\mu$ L of 2 M trimethylaluminium solution in toluene (3.5 eq 1.42 mmol), 150 mg of the ester **7** (0.41 mmol) and heating for 1 h. No acidic treatment was made for the work up of this reaction. **19** was obtained as a pale yellow solid after flash chromatography on silica gel (dichloromethane / methanol: 98 / 2 to 97 / 3) and trituration in cold diethyl ether (141 mg, 78 %). Mp: 149 - 151 °C. *R<sub>f</sub>* (dichloromethane / methanol: 94 / 4): 0.20. *t<sub>R</sub>* (HPLC A) = 0.88 min.

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  8.52 - 8.48 (m, 2H), 7.80 (d, 0.6H,  $J = 8.0$  Hz, *rot B*), 7.72 (d, 1.4H,  $J = 8.0$  Hz, *rot A*), 7.57 (d, 0.7H,  $J = 8.0$  Hz, *rot A*), 7.41 (d, 0.3H,  $J = 8.0$  Hz, *rot B*), 7.31 - 7.20 (m, 3H), 6.54 (s, 0.7H, *rot A*), 6.48 (s, 0.3H, *rot B*), 4.74 (s, 0.6H, *rot B*), 4.62 (s, 1.4H, *rot A*), 4.48 (dt, 2H,  $J^2_{H-F} = 47.2$  Hz,  $J = 6.0$  Hz), 4.05 (s, 0.6H, *rot B*), 4.01 (s, 1.4H, *rot A*), 3.09 (s, 2.1H, *rot A*), 2.93 (s, 0.9H, *rot B*), 2.80 (t, 2H,  $J = 7.2$  Hz), 2.75 (s, 2.1H, *rot A*), 2.68 (s, 0.9H, *rot B*), 2.55 (s, 2.1H, *rot A*), 2.54 (s, 0.9H, *rot B*), 2.04 (dt, 2H,  $J^3_{H-F} = 25.6$  Hz,  $J = 7.2, 6.0$  Hz).

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  171.4 [C, *rot B*], 171.3 [C, *rot A*], 157.7 [C], 155.0 [C], 149.2 [CH, *rot A*], 148.7 [CH, *rot A*], 148.6 [CH, *rot B*], 147.9 [CH, *rot B*], 147.5 [C, *rot A*], 147.0 [C, *rot B*], 144.8 [C, *rot A*], 144.7 [C, *rot B*], 141.3 [C], 135.9 [CH, *rot A*], 133.6 [CH, *rot B*], 133.1 [C, *rot A*], 132.2 [C, *rot B*], 131.4 [C, *rot A*], 131.1 [C, *rot B*], 128.6 [4CH], 123.5 [CH, *rot A*], 123.2 [CH, *rot B*], 108.3 [CH], 100.2 [C], 83.0 [CH<sub>2</sub>, d,  $J^1_{C-F} = 164$  Hz], 51.2 [CH<sub>2</sub>, *rot A*], 48.9 [CH<sub>2</sub>, *rot B*], 35.4 [CH<sub>3</sub>, *rot A*], 34.2 [CH<sub>3</sub>, *rot B*], 31.8 [CH<sub>2</sub>, d,  $J^2_{C-F} = 20$  Hz], 31.1 [CH<sub>2</sub>], 28.7 [CH<sub>2</sub>, *rot B*], 28.4 [CH<sub>2</sub>, *rot A*], 24.63 [CH<sub>3</sub>], 16.8 [CH<sub>3</sub>].

HR-ESI (+)-MS *m/z* calcd for C<sub>26</sub>H<sub>28</sub>FN<sub>5</sub>O<sub>2</sub>: 446.2351[M+H]<sup>+</sup>, found 446.2346.

**2-(2-(4-(3-Fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)-*N*-methyl-*N*-(2-(pyridin-2-yl)methyl)acetamide (20).**



This amide was prepared following the general procedure described above using 300 mg of the ester **7** (0.81 mmol), 198 mg of *N*-methyl-1-(pyridin-2-yl)methanamine (198 mg, 1.63 mmol, 2 eq), 163  $\mu$ L of 2 M trimethylaluminium solution in toluene (4 eq, 3.25 mmol), and heating for 5 h. **20** (110 mg, 30 %) was obtained as a light yellow foam

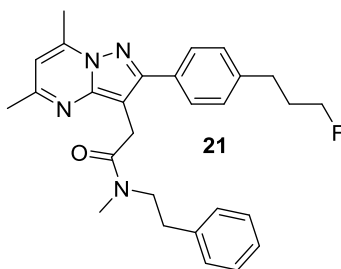
after flash chromatography on silica gel (dichloromethane / methanol: 95 / 5).  $R_f$  (dichloromethane / acetone: 90 / 10): 0.19.  $t_R$  (HPLC A) = 1.07 min.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  8.56 (m, 1H), 7.78 (d, 0.8H,  $J = 8.0$  Hz, *rot B*), 7.74 (d, 1.2H,  $J = 8.0$  Hz, *rot A*), 7.63-7.57 (m, 1H), 7.29 - 7.14 (m, 4H), 6.53 (s, 0.6H, *rot A*), 6.48 (s, 0.4H, *rot B*), 4.83 (s, 0.8H, *rot B*), 4.75 (s, 1.2H, *rot A*), 4.48 (dt, 2H,  $J^2_{\text{H-F}} = 47.2$  Hz,  $J = 5.6$  Hz), 4.05 (s, 1.2H, *rot B*), 4.03 (s, 1.8H, *rot A*), 3.20 (s, 1.8H, *rot A*), 3.00 (s, 1.2H, *rot B*), 2.80 (t, 2H,  $J = 7.2$  Hz), 2.77 (s, 1.8H, *rot A*), 2.69 (s, 1.2H, *rot B*), 2.55 (s, 1.8H, *rot A*), 2.53 (s, 1.2H, *rot B*), 2.04 (m, 2H,  $J^3_{\text{H-F}} = 25.6$  Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  171.6 [C, *rot B*], 171.1 [C, *rot A*], 157.6 [C], 156.9 [C], 155.0 [C, *rot A*], 154.9 [C, *rot B*], 149.4 [CH, *rot B*], 148.9 [CH, *rot A*], 147.5 [C, *rot A*], 147.3 [C, *rot B*], 144.8 [C, *rot A*], 144.6 [C, *rot B*], 141.2 [C], 136.6 [CH], 131.4 [C, *rot A*], 131.3 [C, *rot B*], 128.7 [2CH], 128.6 [2CH], 122.1 [CH], 120.1 [CH], 108.3 [CH, *rot A*], 108.2 [CH, *rot B*], 100.5 [C, *rot A*], 100.3 [C, *rot B*], 82.9 [CH<sub>2</sub>, d,  $J^1_{\text{C-F}} = 163$  Hz], 55.5 [CH<sub>2</sub>, *rot B*], 53.5 [CH<sub>2</sub>, *rot A*], 36.1 [CH<sub>3</sub>, *rot A*], 34.6 [CH<sub>3</sub>, *rot B*], 31.9 [CH<sub>2</sub>, d,  $J^2_{\text{C-F}} = 19$  Hz], 31.0 [CH<sub>2</sub>, d,  $J^3_{\text{C-F}} = 5$  Hz], 28.5 [CH<sub>2</sub>, *rot B*], 28.3 [CH<sub>2</sub>, *rot A*], 24.5 [CH<sub>3</sub>], 16.8 [CH<sub>3</sub>].

HR-ESI (+)-MS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{FN}_5\text{O}_2$ : 446.2351 [M+H]<sup>+</sup>, found 446.2367.

**2-(2-(4-(3-Fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)-N-methyl-N-phenethylacetamide (21).**



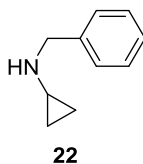
This amide was prepared following the general procedure described above using 300 mg of the ester **7** (0.81 mmol), 215 mg of *N*-methylphenethylamine (2 eq, 1.63 mmol), 163  $\mu\text{L}$  of 2 M trimethylaluminium solution in toluene (4 eq, 3.25 mmol), and heating at 110  $^\circ\text{C}$  for 4 h. **21** (84 mg, 23 %) was obtained as pale orange solid after flash chromatography on silica gel (dichloromethane / acetone: 95 / 5 to 80 / 20). Mp: 99 - 101  $^\circ\text{C}$ .  $R_f$  (dichloromethane / acetone: 90 / 10): 0.19.  $t_R$  (HPLC A) = 1.39 min.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.70 - 7.72 (m, 2H), 7.30-7.25 (m, 4H), 7.22 - 7.19 (m, 2H), 7.18-7.14 (m, 1H), 6.53 (s, 0.5H, *rot A*), 6.51 (s, 0.5H, *rot B*), 4.48 (dt, 2H,  $J^2_{\text{H-F}} = 48.0$  Hz,  $J = 6.0$  Hz), 3.92 (s, 1H, *rot A*), 3.88 (s, 1H, *rot B*), 3.71 (t, 0.98H,  $J = 7.2$  Hz, *rot B*), 3.61 (t, 1.02H,  $J = 7.2$  Hz, *rot A*), 3.02 (s, 1.5H, *rot A*), 2.93 (s, 1.5H, *rot B*), 2.85-2.77 (m, 4H), 2.76 (s, 1.5H, *rot A*), 2.74 (s, 1.5H, *rot B*), 2.57 (s, 1.5H, *rot A*), 2.52 (s, 1.5H, *rot B*), 2.09-1.96 (dq<sup>5</sup>, 2H,  $J^3_{\text{H-F}} = 26.8$  Hz,  $J = 6.0$  Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  170.8 [C, *rot B*], 170.5 [C, *rot A*], 157.4 [C], 155.0 [C], 174.3 [C], 144.7 [C], 141.2 [C], 139.3 [C, *rot A*], 138.3 [C, *rot B*], 131.4 [C, *rot A*], 131.3 [C, *rot B*], 128.8 [2CH], 128.7 [2CH], 128.6 [4CH], 126.5 [CH, *rot B*], 126.1 [CH, *rot A*], 108.2 [CH], 100.6 [C], 82.9 [CH<sub>2</sub>, d,  $J^1_{\text{C-F}} = 164$  Hz], 51.9 [CH<sub>2</sub>, *rot B*], 50.6 [CH<sub>2</sub>, *rot A*], 36.5 [CH<sub>3</sub>, *rot A*], 34.9 [CH<sub>2</sub>, *rot B*], 34.1 [CH<sub>3</sub>, *rot B*], 33.6 [CH<sub>2</sub>, *rot A*], 31.9 [CH<sub>2</sub>, d,  $J^2_{\text{C-F}} = 20$  Hz], 31.0 [CH<sub>2</sub>, d,  $J^3_{\text{C-F}} = 5$  Hz], 28.5 [CH<sub>2</sub>, *rot A*], 27.9 [CH<sub>2</sub>, *rot B*], 24.5 [CH<sub>3</sub>], 16.8 [CH<sub>3</sub>].

HR-ESI (+)-MS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{28}\text{H}_{31}\text{FN}_4\text{O}$ : 459.2555 [M+H]<sup>+</sup>, found 459.2556.

***N*-Benzylcyclopropanamine (22).**

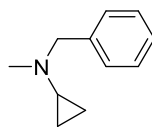


To a solution of cyclopropylamine (5.0 g, 87 mmol) in tetrahydrofuran (120 mL) was added triethylamine (19 mL, 131 mmol) at ambient temperature. Benzyl bromide (12 mL, 105 mmol) was then carefully added dropwise to the reaction mixture which was stirred overnight at ambient temperature. The reaction mixture was partitioned between water (50 mL) and ethyl acetate (50 mL). The aqueous layer was separated and extracted twice with ethyl acetate (2 x 100 mL). The combined organic layers were washed with water (2 x 100 mL) and brine (100 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness under vacuum. The residue was purified by chromatography on silica gel (dichloromethane / methanol: 100 / 0 to 98 / 2) to afford **22** (3.25 g, 49 %) as a light yellow oil.  $R_f$  (dichloromethane / methanol: 96 / 4): 0.36.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.33 (m, 4H), 7.29 - 7.24 (m, 1H), 3.86 (s, 2H), 2.17 (m, 1H), 1.91 (s, 1H), 0.48 - 0.44 (m, 2H), 0.43 - 0.39 (m, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  140.5 [C], 128.4 [2CH], 128.2 [2CH], 126.8 [CH], 53.7 [ $\text{CH}_2$ ], 30.0 [CH], 6.4 [ $2\text{CH}_2$ ].

#### ***N*-Benzyl-*N*-methylcyclopropanamine (23).**



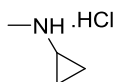
**23**

To a cooled solution (0 °C) of **22** (3.0 g, 20.3 mmol) in methanol (40 mL) was added a 37 % wt. aqueous formaldehyde solution (2.5 mL, 30.5 mmol). Sodium borohydride (1.15 g, 30.5 mmol) was cautiously added to the mixture (exothermic reaction) which was then stirred for 30 min at 0 °C. Once completed, the reaction was quenched with a saturated potassium carbonate aqueous solution (100 mL). The mixture was then extracted twice with ethyl acetate (2 x 50 mL). The organic layers were combined, washed twice with water (2 x 25 mL) and brine (25 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness under vacuum. The residue was purified by chromatography on silica gel (dichloromethane pure to dichloromethane / methanol: 99 / 1) to afford **23** (2.45 g, 74 %) as a colorless oil.  $R_f$  (dichloromethane / methanol: 95 / 5): 0.41.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.32 - 7.24 (m, 5H), 3.68 (s, 2H), 2.27 (s, 3H), 1.73 - 1.70 (m, 1H), 0.49 - 0.45 (m, 4H).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  138.4 [C], 129.3 [2CH], 128.0 [2CH], 126.8 [CH], 62.2 [ $\text{CH}_2$ ], 41.9 [CH], 38.4 [ $\text{CH}_3$ ], 7.1 [ $2\text{CH}_2$ ].

#### ***N*-Methylcyclopropanamine hydrochloride (24).**

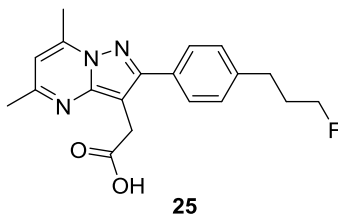


**24**

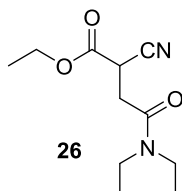
To a solution of **23** (417 mg, 2.59 mmol) in methanol (10 mL) was cautiously added 10 % palladium on charcoal (26 mg, 1 mol %). The reaction vessel was degassed under reduced pressure and filled with hydrogen at 1 atm (two cycles). The reaction mixture was stirred at ambient temperature overnight. Then, the catalyst was filtered off using a Celite<sup>®</sup> pad and washed with dichloromethane / methanol: 80 / 20 (100 mL). A methanolic 10 M hydrochloric acid solution (3 mL) was added. The filtrate was further concentrated to dryness to afford **24** (177 mg, 63 %) as a pale yellow oil stored under argon.  $R_f$  (dichloromethane / methanol: 90 / 10): 0.1.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{MeOH-}d_4$ , 400 MHz):  $\delta$  2.77 (m, 4H), 0.91 - 0.89 (m, 4H).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{MeOH-}d_4$ , 100 MHz):  $\delta$  32.5 [ $\text{CH}_3$ ], 31.2 [CH], 2.6 [ $2\text{CH}_2$ ].

**2-(2-(4-(3-Fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)acetic acid (25).**

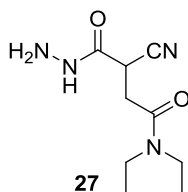
To a solution of the ester **7** (460 mg, 1.26 mmol) in methanol (10 mL), was added potassium hydroxide (212 mg, 3.78 mmol). The reaction mixture was heated at 40 °C for 5 h. Water (5 mL) was added to quench the reaction. The reaction mixture was then acidified to pH 2 with a 1 M hydrochloric acid aqueous solution. The formed precipitate was filtered off, washed with diethyl ether, and dried under vacuum to afford **25** as a beige solid (277 mg, 64 %), that was engaged without further purification in the coupling step (see preparation of **12** above).

**Ethyl 2-cyano-4-(diethylamino)-4-oxobutanoate (26).**

Ethyl 2-cyanoacetate (5.3 g, 46.99 mmol) was added slowly to a suspension containing sodium hydride (2.25 g, 56.38 mmol) in tetrahydrofuran (100 mL). The mixture was then heated to reflux for 1 h. After cooling to room temperature, 2-chloro-*N,N*-dimethylacetamide was added (5.92 mL, 46.99 mmol), and the reaction mixture was stirred for another 3 h at room temperature. The volatiles were then evaporated to dryness. The crude residue was partitioned between water (100 mL) and dichloromethane (100 mL). The aqueous layer was separated and extracted thrice with dichloromethane (3 x 100 mL). The combined organic layers were washed with brine (200 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness under vacuum. The crude was purified by flash chromatography on silica gel (heptane / ethyl acetate: 9 / 1 to 2 / 3) to afford **26** (4.8 g, 50 %) as a colorless oil.  $R_f$  (heptane / ethyl acetate: 2 / 1): 0.29.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  4.27 (q, 2H,  $J = 7.2$  Hz), 4.09 (dd, 1H,  $J = 7.2, 5.2$  Hz), 3.37 (m, 2H), 3.31 (q, 2H,  $J = 7.2$  Hz), 3.08 (dd, 1H,  $J = 16.4, 7.2$  Hz), 2.85 (dd, 1H,  $J = 16.4, 5.2$  Hz), 1.32 (t, 3H,  $J = 7.2$  Hz), 1.22 (t, 3H,  $J = 7.2$  Hz), 1.11 (t, 3H,  $J = 7.2$  Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  166.5 [C], 165.6 [C], 116.6 [C], 62.9 [ $\text{CH}_2$ ], 41.8 [ $\text{CH}_2$ ], 40.5 [ $\text{CH}_2$ ], 32.9 [ $\text{CH}_2$ ], 32.8 [CH], 13.9 [ $\text{CH}_3$ ], 13.8 [ $\text{CH}_3$ ], 12.8 [ $\text{CH}_3$ ].

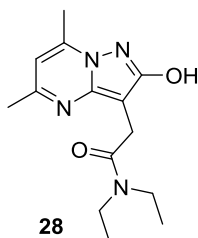
**3-Cyano-*N,N*-diethyl-4-hydrazinyl-4-oxobutanamide (27).**

To **26** (500 mg, 2.21 mmol) in ethanol (6 mL) was added hydrazine monohydrate (0.53 mL, 12.36 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature overnight. The mixture was then concentrated to dryness under vacuum and the crude was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane / methanol: 98 / 2 to 93 / 7) to afford **27** (225 mg, 48 %) as a colorless oil.  $R_f$  (dichloromethane / methanol: 95 / 5): 0.27.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  4.04 (dd, 1H,  $J = 8.4, 5.2$  Hz), 3.41 - 3.28 (m, 4H), 3.14 (dd, 1H,  $J = 16.4, 8.4$  Hz), 2.90 (dd, 1H,  $J = 16.4, 5.2$  Hz), 1.21 (t, 3H,  $J = 7.2$  Hz), 1.09 (t, 3H,  $J = 7.2$  Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  167.3 [C], 165.3 [C], 117.4 [C], 41.9 [ $\text{CH}_2$ ], 40.7 [ $\text{CH}_2$ ], 33.0 [ $\text{CH}_2$ ], 32.1 [CH], 13.9 [ $\text{CH}_3$ ], 12.8 [ $\text{CH}_3$ ].

***N,N*-Diethyl-2-(2-hydroxy-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (28).**

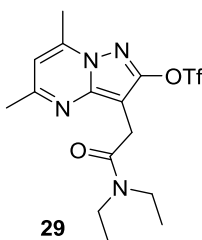


To a solution of **27** (1.0 g, 4.71 mmol) in acetic acid (15 mL), was added acetylacetone (0.5 mL, 4.71 mmol). The reaction mixture was stirred at 80 °C for 2 h. After cooling to room temperature, the mixture was concentrated to dryness under vacuum. The residue was then partitioned between water (30 mL) and ethyl acetate (30 mL). The aqueous layer was separated and extracted thrice with ethyl acetate (3 x 50 mL). The combined organic layers were washed with brine (100 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness under vacuum. The residue was triturated in diethyl ether to afford **28** (1.24 g, 95 %) as beige solid. Mp: 135 - 137 °C.  $R_f$  (dichloromethane / methanol: 95 / 5): 0.52.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  6.36 (s, 1H), 3.85 (s, 2H), 3.49 (q, 2H,  $J = 6.8$  Hz), 3.40 (q, 2H,  $J = 6.8$  Hz), 2.58 (s, 3H), 2.47 (s, 3H), 1.24 (t, 3H,  $J = 6.8$  Hz), 1.14 (t, 3H,  $J = 6.8$  Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  172.5 [C], 165.4 [C], 157.8 [C], 146.2 [C], 144.9 [C], 106.4 [CH], 84.2 [C], 43.5 [ $\text{CH}_2$ ], 41.3 [ $\text{CH}_2$ ], 26.5 [ $\text{CH}_2$ ], 24.1 [ $\text{CH}_3$ ], 16.8 [ $\text{CH}_3$ ], 14.3 [ $\text{CH}_3$ ], 12.7 [ $\text{CH}_3$ ].

**3-(2-(Diethylamino)-2-oxoethyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-2-yl trifluoromethanesulfonate (29).**



To a solution of **28** (600 mg, 2.17 mmol) in dichloromethane (30 mL), at 0 °C were added trifluoromethanesulfonic anhydride (0.40 mL, 2.39 mmol) and triethylamine (0.92 mL, 6.52 mmol). The reaction mixture was stirred at 0 °C for 3 h. Water (30 mL) was then added. The aqueous layer was separated and extracted thrice with dichloromethane (3 x 50 mL). The combined organic layers were washed with brine (100 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness under vacuum. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane / methanol: 98 / 2 to 95 / 5) to afford **29** (840 mg, 94 %) as an orange sticky solid.  $R_f$  (dichloromethane / methanol: 95 / 5): 0.38.

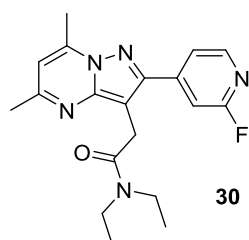
$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  6.62 (s, 1H), 3.81 (s, 2H), 3.45 (q, 2H,  $J = 6.8$  Hz), 3.39 (q, 2H,  $J = 6.8$  Hz), 2.63 (s, 3H), 2.53 (s, 3H), 1.25 (t, 3H,  $J = 6.8$  Hz), 1.11 (t, 3H,  $J = 6.8$  Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  167.7 [C], 159.5 [C], 155.3 [C], 146.5 [C], 145.3 [C], 118.4 [q, C,  $J_{\text{C-F}} = 330$  Hz], 109.8 [CH], 93.5 [C], 42.2 [ $\text{CH}_2$ ], 40.6 [ $\text{CH}_2$ ], 25.9 [ $\text{CH}_2$ ], 24.6 [ $\text{CH}_3$ ], 16.4 [ $\text{CH}_3$ ], 14.1 [ $\text{CH}_3$ ], 12.8 [ $\text{CH}_3$ ].



**General procedure for the preparation of 30-33.** To a solution of **29** (1 eq), in a 50 / 50 (v / v) mixture of toluene and ethanol under argon, were added successively the appropriate boronic acid derivative (1.5 eq, 2-fluoropyridine-4-boronic acid, 6-fluoropyridine-2-boronic acid, 6-fluoropyridine-3-boronic acid, and 2-fluoropyridine-3-boronic acid respectively), Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0.13 eq) and a 2 M potassium carbonate aqueous solution (1.3 eq). The reaction mixture was heated at 70 °C for 5 h. After cooling to room temperature, the mixture was partitioned between water (50 mL) and ethyl acetate (50 mL). The aqueous layer was separated and extracted thrice with ethyl acetate (3 x 50 mL). The combined organic layers were washed with a 0.1 M hydrochloric acid aqueous solution (100 mL), brine (100 mL), dried over sodium sulfate, filtered off and concentrated to dryness under vacuum. The residue was purified by flash chromatography on silica gel. The recovered products were finally triturated in diethyl ether / ethanol 9 / 1 to afford the pure expected compounds **30- 33**.

***N,N*-Diethyl-2-(2-(2-fluoropyridin-4-yl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (**30**).**



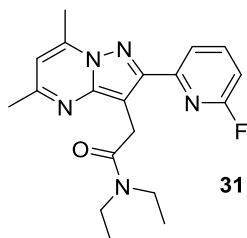
This derivative was prepared according to the general procedure described above using 250 mg of the sulfonate **29** (0.61 mmol), 129.6 mg of 2-fluoropyridine-4-boronic acid (0.92 mmol), 95.2 mg of Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0.08 mmol), 2.5 mL of 2 M potassium carbonate aqueous solution (0.79 mmol), 2.5 mL of ethanol, and 2.5 mL of toluene. **30** (116 mg, 53 %) was obtained as a white solid after flash chromatography (dichloromethane / acetone: 95 / 5 to 80 / 20) and trituration in diethyl ether and ethanol. Mp: 136 - 138 °C. R<sub>f</sub> (dichloromethane / acetone: 90 / 10): 0.30.

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 8.28 (d, 1H, *J* = 5.2 Hz), 7.77 (d, 1H, *J* = 5.2 Hz), 7.49 (s, 1H), 6.60 (s, 1H), 3.99 (s, 2H), 3.58 (q, 2H, *J* = 7.2 Hz), 3.41 (q, 2H, *J* = 7.2 Hz), 2.75 (s, 3H), 2.55 (s, 3H), 1.29 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz), 1.12 (s, 3H, *J* = 7.2 Hz).

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): δ 169.3 [C], 164.1 [C, d, *J*<sub>C-F</sub> = 236 Hz], 158.2 [C], 150.9 [C], 147.7 [CH, d, *J*<sub>C-F</sub> = 6 Hz], 147.5 [C], 147.0 [C, d, *J*<sub>C-F</sub> = 8 Hz], 144.8 [C], 120.5 [CH, d, *J*<sub>C-F</sub> = 4 Hz], 109.3 [CH], 108.3 [CH, d, *J*<sub>C-F</sub> = 38 Hz], 102.3 [C], 42.3 [CH<sub>2</sub>], 40.7 [CH<sub>2</sub>], 27.6 [CH<sub>2</sub>], 24.6 [CH<sub>3</sub>], 16.7 [CH<sub>3</sub>], 14.3 [CH<sub>3</sub>], 13.0 [CH<sub>3</sub>].

HR-ESI(+)-MS *m/z* calcd for C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>FN<sub>5</sub>: 356.1881 [M+H]<sup>+</sup>, found 356.1877.

***N,N*-Diethyl-2-(2-(6-fluoropyridin-2-yl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (**31**).**



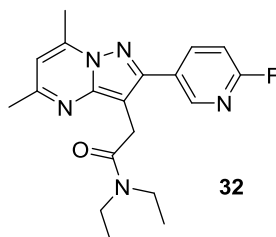
This derivative was prepared according to the general procedure described above using 250 mg of the sulfonate **29** (0.61 mmol), 129.6 mg of 6-fluoropyridine-2-boronic acid (0.92 mmol), 95.2 mg of Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0.08 mmol), 2.5 mL of 2 M potassium carbonate aqueous solution (0.79 mmol), 2.5 mL of ethanol, and 2.5 mL of toluene. **31** (67 mg, 30 %) was obtained as a beige powder after flash chromatography (dichloromethane / methanol: 99 / 1 to 95 / 5) and a trituration in diethyl ether and ethanol. Mp: 194 - 195 °C. R<sub>f</sub> (dichloromethane / methanol: 95 / 5): 0.33.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  8.14 (dd, 1H,  $J = 8.0, 2.8$  Hz), 7.81 (q, 1H,  $J = 8.0$  Hz), 6.82 (dd, 1H,  $J = 8.0, 2.8$  Hz), 6.54 (s, 1H), 4.30 (s, 2H), 3.61 (q, 2H,  $J = 7.2$  Hz), 3.37 (q, 2H,  $J = 7.2$  Hz), 2.73 (s, 3H), 2.54 (s, 3H), 1.39 (t, 3H,  $J = 7.2$  Hz), 1.07 (t, 3H,  $J = 7.2$  Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  170.0 [C], 162.8 [C, d,  $J^1_{\text{C-F}} = 235$  Hz], 157.7 [C], 152.2 [C, d,  $J^3_{\text{C-F}} = 14$  Hz], 150.7 [C], 148.1 [C], 144.6 [C], 141.0 [CH, d,  $J^3_{\text{C-F}} = 7$  Hz], 118.7 [CH, d,  $J^4_{\text{C-F}} = 4$  Hz], 109.0 [CH], 107.8 [CH, d,  $J^2_{\text{C-F}} = 37$  Hz], 103.7 [C], 42.3 [CH<sub>2</sub>], 40.5 [CH<sub>2</sub>], 28.0 [CH<sub>2</sub>], 24.6 [CH<sub>3</sub>], 16.6 [CH<sub>3</sub>], 14.1 [CH<sub>3</sub>], 12.8 [CH<sub>3</sub>].

HR-ESI (+)-MS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{FN}_5$ : 356.1881 [M+H]<sup>+</sup>, found 356.1885.

***N,N*-Diethyl-2-(2-(6-fluoropyridin-3-yl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (32).**



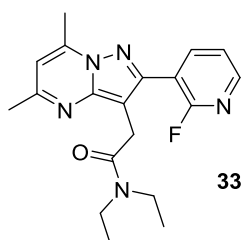
This derivative was prepared according to the general procedure described above using 200 mg of the sulfonate **29** (0.49 mmol), 103.5 mg of 6-fluoropyridine-3-boronic acid (0.74 mmol), 69.3 mg of  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (0.06 mmol), 2 mL of 2 M potassium carbonate aqueous solution (0.63 mmol), 2 mL of ethanol, and 2 mL of toluene. **32** (144 mg, 82 %) was obtained as a beige solid after flash chromatography (toluene / acetone: 95 / 5 to 90 / 10) and a trituration in diethyl ether and ethanol. Mp: 150 - 151 °C.  $R_f$  (toluene / acetone: 80 / 20): 0.26.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  8.64 (d, 1H,  $J = 1.6$  Hz), 8.44 (td, 1H,  $J = 8.4, 1.6$  Hz), 7.02 (dd, 1H,  $J = 8.4, 2.8$  Hz), 6.56 (s, 1H), 3.92 (s, 2H), 3.55 (q, 2H,  $J = 7.2$  Hz), 3.38 (q, 2H,  $J = 7.2$  Hz), 2.74 (s, 3H), 2.55 (s, 3H), 1.25 (t, 3H,  $J = 7.2$  Hz), 1.09 (t, 3H,  $J = 7.2$  Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  169.5 [C], 163.4 [C, d,  $J^1_{\text{C-F}} = 238$  Hz], 158.0 [C], 151.1 [C], 147.4 [CH, d,  $J^3_{\text{C-F}} = 19$  Hz], 147.1 [C], 144.7 [C], 141.4 [CH, d,  $J_{\text{C-F}} = 8$  Hz], 127.9 [C], 109.2 [CH, d,  $J^2_{\text{C-F}} = 37$  Hz], 108.7 [CH], 101.5 [C], 42.3 [CH<sub>2</sub>], 40.6 [CH<sub>2</sub>], 27.6 [CH<sub>2</sub>], 24.6 [CH<sub>3</sub>], 16.7 [CH<sub>3</sub>], 14.3 [CH<sub>3</sub>], 13.0 [CH<sub>3</sub>].

HR-ESI (+)-MS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{FN}_5$ : 356.1881 [M+H]<sup>+</sup>, found 356.1887.

***N,N*-Diethyl-2-(2-(2-fluoropyridin-3-yl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (33).**



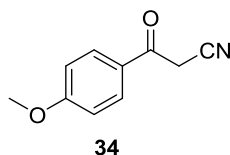
This derivative was prepared according to the general procedure described above using 230 mg of the sulfonate **29** (0.56 mmol), 119.2 mg of 2-fluoropyridine-3-boronic acid (0.85 mmol), 78.1 mg of  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (0.07 mmol), 2 mL of 2 M potassium carbonate aqueous solution (0.72 mmol), 2 mL of ethanol, and 2 mL of toluene. **33** (52 mg, 26 %) was obtained as a white powder after flash chromatography (dichloromethane / methanol: 99 / 1 to 96 / 4) and a trituration in diethyl ether and ethanol. Mp: 136 - 138 °C.  $R_f$  (dichloromethane / methanol: 95 / 5): 0.22.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  8.29 - 8.24 (m, 2H), 7.32 - 7.28 (m, 1H), 6.57 (s, 1H), 3.95 (s, 2H), 3.47 (q, 2H,  $J = 7.2$  Hz), 3.27 (q, 2H,  $J = 7.2$  Hz), 2.73 (s, 3H), 2.56 (s, 3H), 1.22 (t, 3H,  $J = 7.2$  Hz), 0.98 (t, 3H,  $J = 7.2$  Hz).

$^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  169.1 [C], 160.5 [C, d,  $J^1_{\text{C-F}} = 238$  Hz], 158.0 [C], 149.0 [C], 147.3 [CH, d,  $J^3_{\text{C-F}} = 14$  Hz], 147.0 [C], 144.8 [C], 142.5 [CH, d,  $J^3_{\text{C-F}} = 4$  Hz], 121.6 [CH, d,  $J^4_{\text{C-F}} = 4$  Hz], 117.2 [C, d,  $J^2_{\text{C-F}} = 30$  Hz], 108.8 [CH], 103.2 [C], 42.2 [CH<sub>2</sub>], 40.4 [CH<sub>2</sub>], 27.5 [CH<sub>2</sub>], 24.5 [CH<sub>3</sub>], 16.8 [CH<sub>3</sub>], 14.1 [CH<sub>3</sub>], 12.9 [CH<sub>3</sub>].

HR-ESI (+)-MS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{FN}_5$ : 356.1881 [M+H]<sup>+</sup>, found 356.1883.

### 3-(4-Methoxyphenyl)-3-oxopropanenitrile (34).

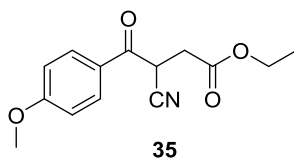


To an airtight flask under argon containing anhydrous tetrahydrofuran (100 mL) cooled at  $-78$  °C was carefully added a 2.5 M *n*-butyllithium solution in hexanes (39.1 mL, 86.1 mmol). A solution of acetonitrile (4.5 mL, 86.1 mmol) was then cautiously added dropwise while maintaining the temperature below  $-60$  °C and the reaction mixture was stirred for 1 h at  $-60$  °C. Then, a solution of methyl 4-methoxybenzoate (6.5 g, 39.1 mmol) in anhydrous tetrahydrofuran (20 mL) was added to the mixture. After the addition, the content was stirred between  $-50$  °C and  $-20$  °C for 5 h. Once completed (TLC-follow up), the reaction was quenched with methanol (10 mL) at  $-10$  °C, poured into water (400 mL) and the resulting solution was acidified with a 37 % hydrochloric acid aqueous solution to pH 3. A precipitate appeared. It was filtered off, washed with diethyl ether and dry under vacuum to afford **34** (6.3 g, 93 %) as a beige shiny solid. Mp:  $128 - 130$  °C.  $R_f$  (heptane / ethyl acetate: 50 / 50): 0.47.

$^1\text{H}$ -NMR (Benzene- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  7.37 (d, 2H,  $J = 8.8$  Hz), 6.48 (d, 2H,  $J = 8.8$  Hz), 3.13 (s, 3H), 2.73 (s, 2H).

$^{13}\text{C}$ -NMR (Benzene- $d_6$ , 100 MHz):  $\delta$  185.1 [C], 164.1 [C], 130.5 [2CH], 127.9 [C], 113.8 [C], 113.7 [2CH], 54.6 [CH<sub>3</sub>], 28.0 [CH<sub>2</sub>].

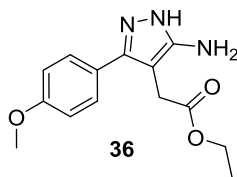
### Ethyl 3-cyano-4-(4-methoxyphenyl)-4-oxobutanoate (35).



To a solution of **34** (10 g, 57 mmol) in ethanol (350 mL), was added sodium hydroxide (2.51 g, 63 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 15 min and then, sodium iodide (8.55 g, 57 mmol) and ethyl bromoacetate (6.7 mL, 63 mmol) were added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 24 h. Then, the volatiles were evaporated under vacuum. The residue was partitioned between water (100 mL) and ethyl acetate (150 mL). The aqueous layer was extracted thrice with ethyl acetate (3 x 200 mL). The combined organic layers were washed with brine (200 mL), dried over sodium sulfate, filtered, and concentrated to dryness under vacuum. The crude was purified by flash chromatography on silica gel (heptane / ethyl acetate: 80 / 20 to 50 / 50) to afford **35** (13.71 g, 92 %) as a yellow oil.  $R_f$  (heptane / ethyl acetate: 50 / 50): 0.57.

$^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  8.02 (d, 2H,  $J = 8.8$  Hz), 6.99 (d, 2H,  $J = 8.8$  Hz), 4.71 (dd, 1H,  $J = 8.8, 5.2$  Hz), 4.19 (q, 2H,  $J = 7.2$  Hz), 3.90 (s, 3H), 3.25 (dd, 1H,  $J = 17.4, 8.8$  Hz), 2.91 (dd, 1H,  $J = 17.4, 5.2$  Hz), 1.26 (t, 3H,  $J = 7.2$  Hz).

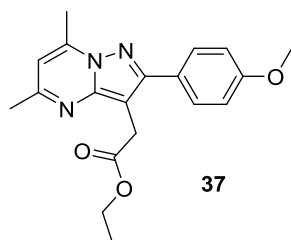
$^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  186.6 [C], 169.6 [C], 164.7 [C], 131.3 [2CH], 126.6 [C], 116.6 [C], 114.2 [2CH], 61.5 [CH<sub>2</sub>], 55.5 [CH<sub>3</sub>], 33.7 [CH], 32.8 [CH<sub>2</sub>], 13.9 [CH<sub>3</sub>].

**Ethyl 2-(5-amino-3-(4-methoxyphenyl)-1H-pyrazol-4-yl)acetate (36).**

To a solution of **35** (13.7 g, 47 mmol) in ethanol (250 mL), were added hydrazine monohydrate (6.9 mL, 141 mmol) and acetic acid (4.6 mL, 80 mmol). The reaction mixture was heated at 80 °C for 7 h. After cooling to room temperature, the mixture was concentrated to dryness. The residue was partitioned between water (100 mL) and dichloromethane (200 mL). The aqueous layer was extracted thrice with dichloromethane (3 x 200 mL). The combined organic layers were washed with brine (200 mL), dried over sodium sulfate, filtered, and concentrated to dryness under vacuum. The crude was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane / methanol: 99 / 1 to 90 / 10) to afford **36** (6.46 g, 45 %) as an orange oil.  $R_f$  (dichloromethane / methanol: 95 / 5): 0.45.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.43 (d, 2H,  $J = 8.8$  Hz), 6.96 (d, 2H,  $J = 8.8$  Hz), 4.17 (q, 2H,  $J = 7.2$  Hz), 3.83 (s, 3H), 3.39 (s, 2H), 1.27 (t, 3H,  $J = 7.2$  Hz).

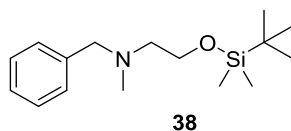
$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  171.9 [C], 159.7 [C], 153.9 [C], 142.6 [C], 128.9 [2CH], 122.5 [C], 114.2 [2CH], 96.4 [C], 61.0 [ $\text{CH}_2$ ], 55.2 [ $\text{CH}_3$ ], 29.4 [ $\text{CH}_2$ ], 14.1 [ $\text{CH}_3$ ].

**Ethyl 2-(2-(4-methoxyphenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)acetate (37).**

To a solution of **36** (2.25 g, 7.37 mmol) in ethanol (20 mL), was added acetylacetone (1.51 mL, 14.74 mmol). The reaction mixture was heated at reflux for 3 h. After cooling to room temperature, the volatiles were evaporated. The formed precipitate was triturated in diethyl ether, filtered off and dried under vacuum to afford **37** (2.0 g, 81 %) as a beige solid. Mp: 135 - 136 °C.  $R_f$  (dichloromethane / methanol: 95 / 5): 0.88.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.71 (d, 2H,  $J = 8.8$  Hz), 6.99 (d, 2H,  $J = 8.8$  Hz), 6.53 (s, 1H), 4.12 (q, 2H,  $J = 7.2$  Hz), 3.95 (s, 2H), 3.85 (s, 3H), 2.74 (s, 3H), 2.56 (s, 3H), 1.19 (t, 3H,  $J = 7.2$  Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  171.8 [C], 159.7 [C], 157.8 [C], 154.6 [C], 147.6 [C], 144.7 [C], 129.6 [2CH], 125.9 [C], 114.0 [2CH], 108.3 [CH], 99.0 [C], 60.7 [ $\text{CH}_2$ ], 55.2 [ $\text{CH}_3$ ], 29.2 [ $\text{CH}_2$ ], 24.5 [ $\text{CH}_3$ ], 16.8 [ $\text{CH}_3$ ], 14.1 [ $\text{CH}_3$ ].

***N*-benzyl-2-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-*N*-methylethan-1-amine (38).**

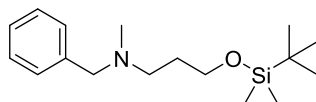
To a solution of *N*-benzyl-*N*-methylamine (1.5 g, 12.39 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (20 mL), was added sodium hydride (356 mg, 14.86 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 30 min and then (2-bromoethoxy)(*tert*-butyl)dimethylsilane (5.28 mL, 24.77 mmol) was added and the mixture was stirred at room temperature for 2 h more. Then, the mixture was partitioned between water (50 mL) and ethyl acetate (50 mL). The aqueous layer was separated and extracted with ethyl acetate (3 x 100 mL). The combined organic layers were washed with brine (150 mL), dried over sodium sulfate, filtered, and concentrated to dryness under vacuum. The

crude was purified by flash chromatography on silica gel (heptane / ethyl acetate: 9 / 1) to afford **38** (1.74 g, 50 %) as a pale yellow oil.  $R_f$  (heptane / ethyl acetate: 2 / 1): 0.46.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.32 - 7.30 (m, 5H), 3.75 (t, 2H,  $J = 6.8$  Hz), 3.56 (s, 2H), 2.57 (t, 2H,  $J = 6.8$  Hz), 2.27 (s, 3H), 0.89 (s, 9H), 0.05 (s, 6H).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  139.0 [C], 128.9 [2CH], 128.1 [2CH], 126.8 [CH], 62.7 [CH<sub>2</sub>], 61.6 [CH<sub>2</sub>], 59.1 [CH<sub>2</sub>], 42.9 [CH<sub>3</sub>], 25.8 [3CH<sub>3</sub>], 18.2 [C], - 5.3 [2CH<sub>3</sub>].

***N*-Benzyl-3-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-*N*-methylpropan-1-amine (39).**



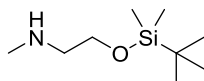
**39**

To a solution of *N*-benzyl-*N*-methylamine (1.50 g, 12.39 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (20 mL), was added sodium hydride (356 mg, 14.86 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 30 min, then (3-bromopropoxy)(*tert*-butyl)dimethylsilane (5.71 mL, 24.77 mmol) was added and the mixture stirred at room temperature for another 2 h. Then, the mixture was partitioned between water (50 mL) and ethyl acetate (50 mL). The aqueous layer was separated and extracted thrice with ethyl acetate (3 x 100 mL). The combined organic layers were washed with brine (150 mL), dried over sodium sulfate, filtered, and concentrated to dryness under vacuum. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (heptane / ethyl acetate: 9 / 1 to 8 / 2) to afford **39** (1.99 g, 55 %) as a colorless oil.  $R_f$  (heptane / ethyl acetate: 2 / 1): 0.35.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.31-7.30 (m, 5H), 3.66 (t, 2H,  $J = 6.8$  Hz), 3.49 (s, 2H), 2.45 (t, 2H,  $J = 6.8$  Hz), 2.18 (s, 3H), 1.74 (q<sup>5</sup>, 2H,  $J = 6.8$  Hz), 0.88 (s, 9H), 0.04 (s, 6H).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  139.0 [C], 129.0 [2CH], 128.1 [2CH], 126.8 [CH], 62.1 [CH<sub>2</sub>], 61.3 [CH<sub>2</sub>], 54.0 [CH<sub>2</sub>], 42.1 [CH<sub>3</sub>], 30.4 [CH<sub>2</sub>], 25.8 [3CH<sub>3</sub>], 18.2 [C], - 5.3 [2CH<sub>3</sub>].

**2-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)-*N*-methylethan-1-amine (40).**



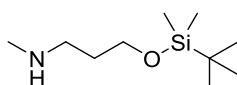
**40**

To a solution of **38** (1.70 g, 6.23 mmol) in methanol (80 mL), was cautiously added 10 % palladium on charcoal (331 mg, 3.11 mmol). The reaction flask was degassed and filled with hydrogen (1 atm). The reaction mixture was stirred at room temperature for 4 h. Then, the mixture was filtered off on a pad of Celite<sup>®</sup> and the catalyst was washed with dichloromethane / methanol: 90 / 10. The filtrate was concentrated to dryness under vacuum to afford **40** (970 mg, 82 %), which was used in the next step without further purification.  $R_f$  (dichloromethane / methanol: 90 / 10): 0.19.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  3.71 (t, 2H,  $J = 5.2$  Hz), 2.67 (t, 2H,  $J = 5.2$  Hz), 2.44 (s, 3H), 0.88 (s, 9H), 0.05 (s, 6H).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  58.7 [CH<sub>2</sub>], 50.4 [CH<sub>2</sub>], 32.9 [CH<sub>3</sub>], 22.6 [3CH<sub>3</sub>], 15.0 [C], - 8.6 [2CH<sub>3</sub>].

**3-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)-*N*-methylpropan-1-amine (41).**



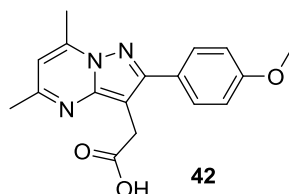
**41**

To a solution of **39** (1.90 g, 6.76 mmol) in methanol (80 mL), was cautiously added 10 % palladium on charcoal (361 mg, 3.39 mmol). The reaction flask was degassed and filled with hydrogen (1 atm). The reaction mixture was stirred at room temperature for 4 h. Then, the mixture was filtered off on a pad of Celite® and the catalyst was washed with dichloromethane / methanol: 90 / 10. The filtrate was concentrated to dryness to afford **41** (1.20 g, 87 %), which was used in the next step without further purification.  $R_f$  (dichloromethane / methanol: 90 / 10): 0.08.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  3.68 (t, 2H,  $J = 6.8$  Hz), 2.66 (t, 2H,  $J = 6.8$  Hz), 2.42 (s, 3H), 1.71 (q<sup>5</sup>, 2H,  $J = 6.8$  Hz), 0.88 (s, 9H), 0.04 (s, 6H).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  61.6 [ $\text{CH}_2$ ], 49.2 [ $\text{CH}_2$ ], 36.2 [ $\text{CH}_3$ ], 32.4 [ $\text{CH}_2$ ], 25.8 [ $3\text{CH}_3$ ], 18.1 [C], -5.4 [ $2\text{CH}_3$ ].

### 2-(2-(4-Methoxyphenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetic acid (**42**).

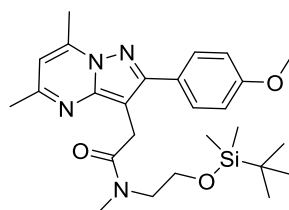


To a solution of **37** (1.0 g, 2.95 mmol) in methanol (10 mL), was added potassium hydroxide (660 mg, 11.78 mmol). The reaction mixture was stirred at 40 °C for 5 h. After cooling to room temperature, water (5 mL) was added to quench the reaction. Then, the mixture was acidified to pH 2 with a 1 M hydrochloric acid aqueous solution. The formed precipitate was filtered off, washed with diethyl ether and dried under vacuum to afford **42** (920 mg, 100 %) as a beige powder. Mp: 201 - 204 °C.  $R_f$  (dichloromethane / methanol: 95 / 5): 0.45.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.62 (d, 2H,  $J = 8.8$  Hz), 6.95 (d, 2H,  $J = 8.8$  Hz), 6.53 (s, 1H), 3.85 (s, 2H), 3.79 (s, 3H), 2.69 (s, 3H), 2.51 (s, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  177.3 [C], 163.2 [C], 161.8 [C], 158.4 [C], 150.7 [C], 148.7 [C], 133.0 [ $2\text{CH}$ ], 128.7 [C], 117.3 [ $2\text{CH}$ ], 111.9 [CH], 102.5 [C], 58.5 [ $\text{CH}_3$ ], 31.9 [ $\text{CH}_2$ ], 27.2 [ $\text{CH}_3$ ], 20.0 [ $\text{CH}_3$ ].

### *N*-(2-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)ethyl)-2-(2-(4-methoxyphenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)-*N*-methylacetamide (**43**)



**43**

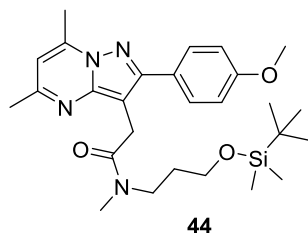
To a solution of **40** (400 mg, 2.17 mmol) in dichloromethane, were added **42** (878 mg, 2.82 mmol), *N,N,N',N'*-tetramethyl-*O*-(benzotriazol-1-yl)uronium tetrafluoroborate (TBTU) (906 mg, 2.82 mmol), and *N,N*-diisopropylethylamine (DIPEA) (3.78 mL, 21.71 mmol). The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. Then, the mixture was partitioned between water (50 mL) and dichloromethane (50 mL). The aqueous layer was separated and extracted thrice with dichloromethane (3 x 100 mL). The combined organic layers were washed with a 1 M hydrochloric acid aqueous solution (100 mL), brine (100 mL), dried over sodium sulfate, filtered, and concentrated to dryness under vacuum. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane / acetone: 95 / 5 to 80 / 20) to afford **43** (1.07 g, 100 %) as a pale orange oil.  $R_f$  (dichloromethane / acetone: 95 / 5): 0.19.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.80 (d, 0.9H,  $J = 8.8$  Hz, *rot B*), 7.76 (d, 1.1H,  $J = 8.8$  Hz, *rot A*), 6.97 (d, 2H,  $J = 8.8$  Hz), 6.49 (s, 1H), 3.94 (s, 0.9H, *rot B*), 3.91 (s, 1.1H, *rot A*), 3.83 (s, 3H), 3.77 (t, 1.1H,  $J = 5.6$  Hz, *rot A*), 3.73

(t, 0.9H,  $J = 5.6$  Hz, *rot B*), 3.64 (t, 1.1H,  $J = 5.6$  Hz, *rot A*), 3.49 (t, 0.9H,  $J = 5.6$  Hz, *rot B*), 3.23 (s, 1.65H, *rot A*), 3.00 (s, 1.35H, *rot B*), 2.73 (s, 3H), 2.52 (s, 3H), 0.88 (s, 9H), 0.04 (s, 6H).

$^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  171.2 [C, *rot A*], 170.7 [C, *rot B*], 159.8 [C, *rot A*], 159.6 [C, *rot B*], 157.4 [C, *rot B*], 157.3 [C, *rot A*], 155.0 [C], 147.4 [C], 144.6 [C], 129.9 [2CH], 126.2 [C], 113.9 [2CH], 108.0 [CH], 100.5 [C, *rot A*], 100.3 [C, *rot B*], 61.8 [ $\text{CH}_2$ , *rot B*], 61.3 [ $\text{CH}_2$ , *rot A*], 55.2 [ $\text{CH}_3$ ], 52.2 [ $\text{CH}_2$ , *rot A*], 51.1 [ $\text{CH}_2$ , *rot B*], 37.9 [ $\text{CH}_3$ , *rot A*], 34.9 [ $\text{CH}_3$ , *rot B*], 28.4 [ $\text{CH}_2$ , *rot B*], 28.0 [ $\text{CH}_2$ , *rot A*], 25.8 [3 $\text{CH}_3$ ], 24.5 [ $\text{CH}_3$ ], 18.1 [C], 16.9 [ $\text{CH}_3$ ], -5.4 [2 $\text{CH}_3$ ].

***N*-(3-((*tert*-Butyldimethylsilyloxy)propyl)-2-(2-(4-methoxyphenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)-*N*-methylacetamide (44).**

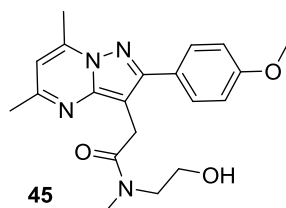


To a solution of **41** (600 mg, 3.26 mmol) in dichloromethane, were added **42** (1.31 g, 4.23 mmol), *N,N,N',N'*-tetramethyl-*O*-(benzotriazol-1-yl)uronium tetrafluoroborate (TBTU) (1.35 g, 4.23 mmol), and *N,N*-diisopropylethylamine (DIPEA) (5.67 mL, 32.57 mmol). The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. Then, the mixture was partitioned between water (50 mL) and dichloromethane (50 mL). The aqueous layer was separate and extracted thrice with dichloromethane (3 x 100 mL). The combined organic layers were washed with a 1 M hydrochloric acid aqueous solution (100 mL), brine (100 mL), dried over sodium sulfate, filtered, and concentrated to dryness under vacuum. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane / acetone: 90 / 10 to 80 / 20) to afford **44** (1.56 g, 96 %) as a yellow oil.  $R_f$  (dichloromethane / acetone: 80 / 20): 0.34.

$^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.75 (d, 2H,  $J = 8.8$  Hz), 6.98 (d, 1H,  $J = 8.8$  Hz, *rot A*), 6.96 (d, 1H,  $J = 8.8$  Hz, *rot B*), 6.51 (s, 0.5H, *rot A*), 6.50 (s, 0.5H, *rot B*), 3.97 (s, 1H, *rot A*), 3.91 (s, 1H, *rot B*), 3.84 (s, 3H), 3.66 - 3.57 (m, 3H), 3.45 (t, 1H,  $J = 6.0$  Hz, *rot B*), 3.15 (s, 1.5H, *rot A*), 2.96 (s, 1.5H, *rot B*), 2.74 (s, 3H), 2.55 (s, 1.5H, *rot A*), 2.53 (s, 1.5H, *rot B*), 1.82 ( $q^5$ , 1H,  $J = 6.0$  Hz, *rot A*), 1.74 ( $q^5$ , 1H,  $J = 6.0$  Hz, *rot B*), 0.9 (s, 4.5H, *rot A*), 0.83 (s, 4.5H, *rot B*), 0.04 (s, 3H, *rot A*), 0.03 (s, 3H, *rot B*).

$^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  172.4 [C, *rot A*], 171.5 [C, *rot B*], 159.8 [C], 157.7 [C, *rot A*], 157.6 [C, *rot B*], 156.1 [C, *rot A*], 155.0 [C, *rot B*], 147.3 [C, *rot A*], 146.3 [C, *rot B*], 145.7 [C, *rot A*], 144.8 [C, *rot B*], 130.0 [2CH, *rot B*], 129.8 [2CH, *rot A*], 125.9 [C], 113.9 [2CH], 108.2 [CH, *rot A*], 107.9 [CH, *rot B*], 100.8 [C, *rot A*], 99.9 [C, *rot B*], 57.5 [ $\text{CH}_2$ , *rot A*], 55.5 [ $\text{CH}_2$ , *rot B*], 55.2 [ $\text{CH}_3$ ], 45.4 [ $\text{CH}_2$ , *rot A*], 44.3 [ $\text{CH}_2$ , *rot B*], 38.5 [ $\text{CH}_3$ , *rot A*], 35.7 [ $\text{CH}_3$ , *rot B*], 29.3 [ $\text{CH}_2$ , *rot A*], 29.0 [ $\text{CH}_2$ , *rot B*], 28.3 [ $\text{CH}_2$ , *rot A*], 26.3 [ $\text{CH}_2$ , *rot B*], 25.5 [3 $\text{CH}_3$ ], 24.4 [ $\text{CH}_3$ , *rot A*], 23.6 [ $\text{CH}_3$ , *rot B*], 17.8 [C], 16.8 [ $\text{CH}_3$ ], -3.6 [2 $\text{CH}_3$ ].

***N*-(2-Hydroxyethyl)-2-(2-(4-methoxyphenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)-*N*-methylacetamide (45).**



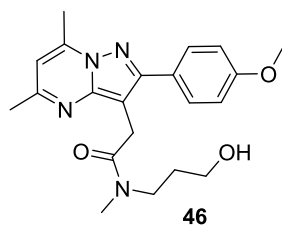
To a solution of **43** (650 mg, 1.36 mmol) in tetrahydrofuran (15 mL), was added a 1 M tetra-*n*-butylammonium fluoride (TBAF) solution in tetrahydrofuran (2.72 mL, 2.72 mmol). The reaction mixture was stirred overnight at

room temperature. The volatiles were evaporated under vacuum. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane / methanol: 97 / 3 to 95 / 5) to afford **45** (352 mg, 70 %) as a pale yellow oil.  $R_f$ (dichloromethane / methanol: 95 / 5): 0.43.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.85 (d, 1H,  $J = 8.8$  Hz, *rot A*), 7.71 (d, 1H,  $J = 8.8$  Hz, *rot B*), 6.98 (d, 2H,  $J = 8.8$  Hz), 6.50 (s, 0.5H, *rot A*), 6.48 (s, 0.5H, *rot B*), 4.02 (s, 1H, *rot A*), 3.93 (s, 1H, *rot B*), 3.88 (t, 1H,  $J = 4.4$  Hz, *rot A*), 3.75 (s, 3H), 3.74 (t, 1H,  $J = 4.4$  Hz, *rot B*), 3.69 (t, 1H,  $J = 4.4$  Hz, *rot A*), 3.55 (t, 1H,  $J = 4.4$  Hz, *rot B*), 3.16 (s, 1.5H, *rot A*), 3.00 (s, 1.5H, *rot B*), 2.72 (s, 3H), 2.53 (s, 1.5H, *rot A*), 2.51 (s, 1.5H, *rot B*).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  172.7 [C, *rot A*], 172.0 [C, *rot B*], 159.8 [C], 157.8 [C, *rot A*], 157.5 [C, *rot B*], 155.7 [C, *rot A*], 154.9 [C, *rot B*], 147.2 [C, *rot A*], 146.3 [C, *rot B*], 145.4 [C, *rot A*], 144.9 [C, *rot B*], 130.2 [CH, *rot A*], 129.8 [CH, *rot B*], 125.9 [C, *rot A*], 125.8 [C, *rot B*], 113.9 [2CH], 108.2 [CH, *rot A*], 108.0 [CH, *rot B*], 101.3 [C, *rot A*], 99.8 [C, *rot B*], 61.1 [CH<sub>2</sub>, *rot A*], 60.3 [CH<sub>2</sub>, *rot B*], 55.2 [CH<sub>3</sub>], 53.4 [CH<sub>2</sub>, *rot A*], 52.1 [CH<sub>2</sub>, *rot B*], 37.3 [CH<sub>3</sub>, *rot A*], 34.1 [CH<sub>3</sub>, *rot B*], 28.9 [CH<sub>2</sub>, *rot A*], 26.9 [CH<sub>2</sub>, *rot B*], 24.4 [CH<sub>3</sub>, *rot A*], 24.0 [CH<sub>3</sub>, *rot B*], 19.6 [CH<sub>3</sub>].

***N*-(3-Hydroxypropyl)-2-(2-(4-methoxyphenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)-*N*-methylacetamide (46).**

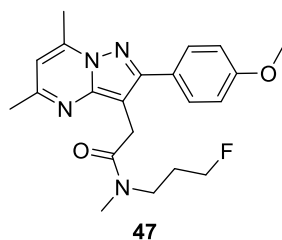


To a solution of **44** (1.50 g, 3.02 mmol) in tetrahydrofuran (20 mL), was added a 1 M tetra-*n*-butylammonium fluoride (TBAF) solution in tetrahydrofuran (6.04 mL, 6.04 mmol). The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. The volatiles were evaporated under vacuum. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane / methanol: 97 / 3 to 95 / 5) to **46** (680 mg, 58 %) as a pale yellow oil.  $R_f$ (dichloromethane / methanol: 95 / 5): 0.48.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.88 (d, 0.8H,  $J = 8.8$  Hz, *rot A*), 7.69 (d, 1.2H,  $J = 8.8$  Hz, *rot B*), 6.98 (d, 2H,  $J = 8.8$  Hz), 6.50 (s, 0.6H, *rot B*), 6.48 (s, 0.4H, *rot A*), 4.09 (s, 0.8H, *rot A*), 3.92 (s, 1.2H, *rot B*), 3.83 (s, 3H), 3.73 (m, 2H), 3.54 (t, 0.8H,  $J = 5.6$  Hz, *rot A*), 3.44 (t, 1.2H,  $J = 5.6$  Hz, *rot B*), 3.10 (s, 1.8H, *rot B*), 2.96 (s, 1.2H, *rot A*), 2.71 (s, 3H), 2.56 (s, 3H), 1.84 (q<sup>5</sup>, 0.8H,  $J = 5.6$  Hz, *rot A*), 1.65 (q<sup>5</sup>, 1.2H,  $J = 5.6$  Hz, *rot B*).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  172.4 [C, *rot A*], 171.5 [C, *rot B*], 159.8 [C], 157.6 [C], 156.1 [C, *rot A*], 155.0 [C, *rot B*], 147.4 [C, *rot A*], 146.3 [C, *rot B*], 145.6 [C, *rot A*], 144.8 [C, *rot B*], 130.0 [2CH, *rot A*], 129.8 [2CH, *rot B*], 126.0 [C], 113.9 [2CH], 108.2 [CH, *rot A*], 107.9 [CH, *rot B*], 100.8 [C, *rot A*], 99.9 [C, *rot B*], 57.6 [CH<sub>2</sub>, *rot A*], 55.5 [CH<sub>2</sub>, *rot B*], 55.2 [CH<sub>3</sub>], 45.5 [CH<sub>2</sub>, *rot A*], 44.3 [CH<sub>2</sub>, *rot B*], 38.5 [CH<sub>3</sub>, *rot A*], 35.6 [CH<sub>3</sub>, *rot B*], 29.3 [CH<sub>2</sub>, *rot A*], 29.1 [CH<sub>2</sub>, *rot B*], 28.3 [CH<sub>2</sub>, *rot A*], 26.3 [CH<sub>2</sub>, *rot B*], 24.5 [CH<sub>3</sub>, *rot A*], 23.7 [CH<sub>3</sub>, *rot B*], 16.8 [CH<sub>3</sub>].

***N*-(3-Fluoropropyl)-2-(2-(4-methoxyphenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)-*N*-methylacetamide (47).**





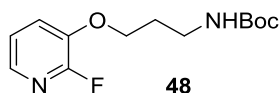
To a solution of **46** (400 mg, 1.05 mmol) in dichloromethane (20 mL), was added Deoxo-Fluor<sup>®</sup> 50 % wt in toluene (1 mL). The reaction mixture was stirred at 0 °C for 30 min, then the volatiles were evaporated under vacuum. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane / methanol: 99 / 1 to 95 / 5) to afford **47** (37 mg, 9 %) as a colorless oil.  $R_f$  (dichloromethane / methanol: 95 / 5): 0.47.

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 7.78 (d, 0.8H,  $J = 8.8$  Hz, *rot A*), 7.75 (d, 1.2H,  $J = 8.8$  Hz, *rot B*), 6.98 (d, 2H,  $J = 8.8$  Hz), 6.51 (s, 1H), 4.52 (dt, 0.8H,  $J^2_{H-F} = 41.6$  Hz,  $J = 5.6$  Hz, *rot A*), 4.43 (dt, 1.2H,  $J^2_{H-F} = 47.2$  Hz,  $J = 5.6$  Hz, *rot B*), 3.95 (s, 0.8H, *rot A*), 3.92 (s, 1.2H, *rot B*), 3.85 (s, 3H), 3.65 (t, 0.8H,  $J = 7.2$  Hz, *rot A*), 3.50 (t, 1.2H,  $J = 7.2$  Hz, *rot B*), 3.16 (s, 1.8H, *rot B*), 2.96 (s, 1.2H, *rot A*), 2.74 (s, 3H), 2.54 (s, 1.8H, *rot B*), 2.53 (s, 1.2H, *rot A*), 2.04 - 1.89 (m, 2H).

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): δ 171.0 [C], 159.7 [C], 157.5 [C], 155.0 [C], 147.4 [C], 144.6 [C], 129.8 [2CH], 126.1 [C], 113.9 [2CH], 108.1 [CH], 100.2 [C], 81.9 [CH<sub>2</sub>, d,  $J^1_{C-F} = 163$  Hz, *rot A*], 80.8 [CH<sub>2</sub>, d,  $J^1_{C-F} = 164$  Hz, *rot B*], 55.2 [CH<sub>3</sub>], 46.1 [CH<sub>2</sub>, d,  $J^3_{C-F} = 4$  Hz, *rot A*], 45.0 [CH<sub>2</sub>, d,  $J^3_{C-F} = 5$  Hz, *rot B*], 36.4 [CH<sub>3</sub>, *rot A*], 33.8 [CH<sub>3</sub>, *rot B*], 29.2 [CH<sub>2</sub>, d,  $J^2_{C-F} = 20$  Hz, *rot A*], 28.6 [CH<sub>2</sub>, *rot A*], 28.3 [CH<sub>2</sub>, d,  $J^2_{C-F} = 19$  Hz, *rot B*], 27.8 [CH<sub>2</sub>, *rot B*], 24.5 [CH<sub>3</sub>], 16.8 [CH<sub>3</sub>].

HR-ESI (+)-MS  $m/z$  calcd for C<sub>21</sub>H<sub>26</sub>FN<sub>4</sub>O<sub>2</sub>: 385.2034 [M+H]<sup>+</sup>, found 385.2039.

**tert-Butyl 3-((2-fluoropyridin-3-yl)oxy)propyl)carbamate (48).**

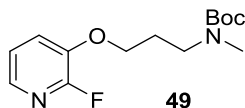


To a solution of 2-fluoropyridin-3-ol (200 mg, 1.77 mmol) in tetrahydrofuran (15 mL), were added 3-(Boc-amino)-1-propanol (0.64 mL, 3.86 mmol), triphenylphosphine (1.10 g, 3.86 mmol) and diisopropyl azodicarboxylate (DIAD) (0.76 mL, 3.68 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 5 h. The volatiles were evaporated to dryness. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (heptane / ethyl acetate: 3 / 1 to 1 / 4) to afford **48** (74 mg, 30 %) as a colorless oil.  $R_f$  (heptane / ethyl acetate: 1 / 1): 0.30.

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 7.70 (m, 1H), 7.32 (ddd, 1H,  $J = 1.2, 8.0, 9.6$  Hz), 7.12 (dd, 1H,  $J = 4.8, 8.0$  Hz), 6.52 (broad s, 1H), 4.09 (t, 2H,  $J = 6.4$  Hz), 3.29 (t, 2H,  $J = 6.4$  Hz), 1.99 (q<sup>5</sup>, 2H,  $J = 6.4$  Hz), 1.47 (s, 9H).

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): δ 157.3 [C], 152.6 [C, d,  $J^1_{C-F} = 237$  Hz], 142.4 [C, d,  $J^2_{C-F} = 25$  Hz], 137.3 [CH, d,  $J^3_{C-F} = 13$  Hz], 122.7 [CH], 121.6 [CH, d,  $J^3_{C-F} = 4$  Hz], 79.0 [C], 70.0 [CH<sub>2</sub>], 37.7 [CH<sub>2</sub>], 29.3 [CH<sub>2</sub>], 28.3 [3CH<sub>3</sub>].

**tert-Butyl 3-((2-fluoropyridin-3-yl)oxy)propyl)(methyl)carbamate (49).**

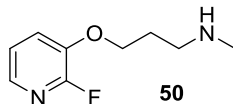


To a solution of **48** (600 mg, 2.22 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (15 mL) at 0 °C, was added sodium hydride (64 mg, 2.66 mmol). The reaction mixture was stirred at 0 °C for 30 min and a 2 M solution of methyl iodide in *tert*-butyl methyl ether (TBME) (1.33 mL, 2.66 mmol) was added. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. The mixture was then partitioned between ethyl acetate (50 mL) and water (50 mL). The aqueous layer was separated and extracted thrice with ethyl acetate (3 x 100 mL). The combined organic layers were washed with brine (150 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness under vacuum. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (heptane / ethyl acetate: 7 / 3 to 6 / 2) to afford **49** (281 mg, 44 %) as a pale yellow oil.  $R_f$  (heptane / ethyl acetate: 1 / 1): 0.27.

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 7.72 (m, 1H), 7.25 (m, 1H), 7.08 (m, 1H), 4.04 (t, 2H,  $J = 6.8$  Hz), 3.41 (t, 2H,  $J = 6.8$  Hz), 2.83 (s, 3H), 2.01 (m, 2H), 1.40 (s, 9H).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  157.3 [C], 152.6 [C, d,  $J^1_{\text{C-F}} = 237$  Hz], 142.4 [C, d,  $J^2_{\text{C-F}} = 25$  Hz], 137.3 [CH, d,  $J^3_{\text{C-F}} = 13$  Hz], 122.7 [CH], 121.6 [CH, d,  $J^3_{\text{C-F}} = 4$  Hz], 79.0 [C], 70.0 [ $\text{CH}_2$ ], 37.7 [ $\text{CH}_2$ ], 32.9 [ $\text{CH}_3$ ], 29.3 [ $\text{CH}_2$ ], 28.3 [ $3\text{CH}_3$ ].

### 3-((2-Fluoropyridin-3-yl)oxy)-*N*-methylpropan-1-amine (50).

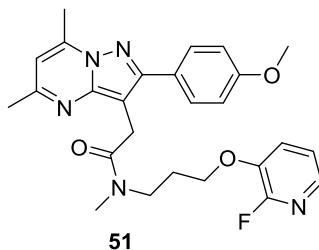


To a solution of **49** (270 mg, 0.95 mmol) in dichloromethane (10 mL), was added trifluoroacetic acid (0.92 mL, 12.6 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 3 h. The volatiles were evaporated to dryness. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane / methanol: 90 / 10 to 85 / 15) to afford **50** (174 mg, 100 %) as a colorless oil.  $R_f$  (dichloromethane / methanol: 80 / 20): 0.21.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.71 (d, 1H,  $J = 4.8$  Hz), 7.30 - 7.28 (m, 1H), 7.10 - 7.08 (m, 1H), 4.11 (t, 2H,  $J = 6.0$  Hz), 3.17 (m, 2H), 2.68 (s, 3H), 2.20 (q<sup>5</sup>, 2H,  $J = 6.0$  Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  153.5 [C, d,  $J^1_{\text{C-F}} = 237$  Hz], 141.5 [C, d,  $J^2_{\text{C-F}} = 25$  Hz], 137.6 [CH, d,  $J^3_{\text{C-F}} = 13$  Hz], 123.1 [CH, d,  $J^4_{\text{C-F}} = 4$  Hz], 121.9 [CH, d,  $J^3_{\text{C-F}} = 4$  Hz], 65.9 [ $\text{CH}_2$ ], 46.5 [ $\text{CH}_2$ ], 32.9 [ $\text{CH}_3$ ], 25.4 [ $\text{CH}_2$ ].

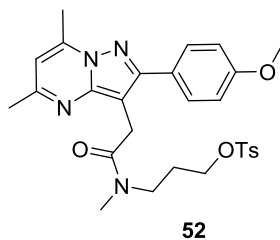
### *N*-(3-((2-Fluoropyridin-3-yl)oxy)propyl)-2-(2-(4-methoxyphenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)-*N*-methylacetamide (51).



To a solution of **50** (50 mg, 0.27 mmol) in dichloromethane (5 mL), were added **42** (109 mg, 0.35 mmol), *N,N,N',N'*-tetramethyl-*O*-(benzotriazol-1-yl)uronium tetrafluoroborate (TBTU) (113 mg, 0.35 mmol) and *N,N*-diisopropylethylamine (DIPEA) (0.47 mL, 2.71 mmol). The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. Then, the mixture was partitioned between water (25 mL) and dichloromethane (25 mL). The aqueous layer was separated and extracted thrice with dichloromethane (3 x 50 mL). The combined organic layers were washed with a 1 M hydrochloric acid aqueous solution (50 mL), brine (50 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness under vacuum. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane / methanol: 99 / 1 to 98 / 2) to **51** (20 mg, 15 %) as a pale yellow oil.  $R_f$  (dichloromethane / methanol: 95 / 5): 0.30.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.76 (d, 2H,  $J = 8.8$  Hz), 7.75 - 7.70 (m, 1H), 7.20 - 7.15 (m, 1H), 7.05 - 7.02 (m, 1H), 6.96 (d, 2H,  $J = 8.8$  Hz), 6.50 (s, 1H), 4.08 (t, 0.6H,  $J = 6.0$  Hz, rot B), 3.99 (t, 1.4H,  $J = 6.0$  Hz, rot A), 3.96 (s, 2H), 3.84 (s, 0.9H, rot B), 3.83 (s, 2.1H, rot A), 3.76 (t, 0.6H,  $J = 6.0$  Hz, rot B), 3.59 (t, 1.4H,  $J = 6.0$  Hz, rot A), 3.19 (s, 2.1H, rot A), 2.90 (s, 0.9H, rot B), 2.74 (s, 2.1H, rot A), 2.73 (s, 0.9H, rot B), 2.52 (s, 2.1H, rot A), 2.51 (s, 0.9H, rot B), 2.17 (q<sup>5</sup>, 0.6H,  $J = 6.0$  Hz, rot B), 2.07 (q<sup>5</sup>, 1.4H,  $J = 6.0$  Hz, rot A).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  171.1 [C], 159.8 [C], 157.5 [C], 155.0 [C], 153.5 [C, d,  $J^1_{\text{C-F}} = 237$  Hz], 147.4 [C], 141.9 [C, d,  $J^2_{\text{C-F}} = 25$  Hz], 137.1 [CH, d,  $J^3_{\text{C-F}} = 13$  Hz], 134.5 [C], 129.9 [CH], 129.7 [2CH], 122.7 [C], 121.6 [CH, d,  $J^4_{\text{C-F}} = 4$  Hz], 113.9 [2CH], 108.1 [CH], 100.3 [C], 67.0 [ $\text{CH}_2$ ], 55.2 [ $\text{CH}_3$ ], 45.3 [ $\text{CH}_2$ ], 36.3 [ $\text{CH}_3$ ], 28.6 [ $\text{CH}_3$ ], 27.9 [ $\text{CH}_2$ ], 27.1 [ $\text{CH}_2$ ], 16.9 [ $\text{CH}_3$ ].

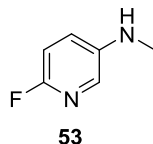
**3-(2-(2-(4-Methoxyphenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)-*N*-methylacetamido)propyl 4-methylbenzenesulfonate (52).**

To a solution of **46** (400 mg, 1.05 mmol) in pyridine (15 mL) at 0 °C, was added tosyl chloride (239 mg, 1.26 mmol). The reaction mixture was stirred at 0 °C for 1 h and then overnight at room temperature. Then, the mixture was poured on ice and acidified to pH 4 with a 37 % hydrochloric acid aqueous solution. Dichloromethane (20 mL) was added and the aqueous layer was separated and extracted thrice with dichloromethane (3 x 20 mL). The combined organic layers were washed with a 1 M hydrochloric acid aqueous solution (2 x 50 mL), brine (50 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness under vacuum. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (heptane / ethyl acetate: 7 / 3 to 1 / 1) to afford **52** (37 mg, 6 %) as a pale yellow oil.  $R_f$  (heptane / ethyl acetate: 7 / 3): 0.51.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.70 (d, 2H,  $J = 8.8$  Hz), 7.62 (d, 2H,  $J = 8.8$  Hz), 7.29 (d, 2H,  $J = 8.8$  Hz), 6.99 (d, 2H,  $J = 8.8$  Hz), 6.53 (s, 1H), 4.12 (t, 2H,  $J = 7.2$  Hz), 3.95 (s, 2H), 3.86 (s, 3H), 2.97 (t, 2H,  $J = 7.2$  Hz), 2.74 (s, 3H), 2.64 (s, 3H), 2.53 (s, 3H), 2.41 (s, 3H), 1.78 (q<sup>5</sup>, 2H,  $J = 7.2$  Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  171.7 [C], 159.8 [C], 157.9 [C], 154.4 [C], 147.7 [C], 144.7 [C], 143.2 [C], 134.2 [C], 129.6 [2CH], 129.5 [2CH], 127.3 [2CH], 125.8 [C], 114.0 [2CH], 108.4 [CH], 98.8 [C], 61.9 [CH<sub>2</sub>], 55.2 [CH<sub>3</sub>], 47.0 [CH<sub>2</sub>], 34.9 [CH<sub>3</sub>], 29.1 [CH<sub>2</sub>], 27.0 [CH<sub>2</sub>], 24.5 [CH<sub>3</sub>], 21.4 [CH<sub>3</sub>], 16.8 [CH<sub>3</sub>].

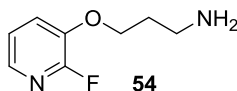
HR-ESI(+)-MS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{28}\text{H}_{33}\text{N}_4\text{O}_5\text{S}$ : 537.2166 [M+H]<sup>+</sup>, found 537.2173.

**6-Fluoro-*N*-methylpyridin-3-amine (53).**

To a solution of 2-fluoro-5-aminopyridine (500 mg, 4.45 mmol) in methanol (10 mL), were added successively sodium methoxide (1.2 g, 25.25 mmol), and a suspension of paraformaldehyde (187 mg, 6.23 mmol) in methanol (5 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 5 h and sodium borohydride (169 mg, 4.45 mmol) was added. The reaction mixture was then heated at reflux for 3 h. After cooling to room temperature, a sodium hydroxide aqueous solution (5 mL) was added. The mixture was then partitioned between ethyl acetate (50 mL) and water (50 mL). The aqueous layer was separated and extracted thrice with ethyl acetate (3 x 100 mL). The combined organic layers were washed with brine (150 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness under vacuum. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane / acetone: 98 / 2 to 95 / 5) to afford **53** (502 mg, 74 %) as a colorless oil.  $R_f$  (heptane / ethyl acetate: 1 / 1): 0.32.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.48 (s, 1H), 7.01 (m, 1H), 6.43 (dd, 1H,  $J = 8.8, 3.2$  Hz), 3.80 (s broad, 1H), 2.80 (s, 3H).

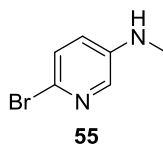
$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  156.6 [C, d,  $J^1_{\text{C-F}} = 227$  Hz], 143.3 [C, d,  $J^4_{\text{C-F}} = 3$  Hz], 130.0 [CH, d,  $J^3_{\text{C-F}} = 15$  Hz], 124.7 [CH, d,  $J^3_{\text{C-F}} = 7$  Hz], 109.0 [CH, d,  $J^2_{\text{C-F}} = 40$  Hz], 30.9 [CH<sub>3</sub>].

**3-((2-Fluoropyridin-3-yl)oxy)propan-1-amine (54)**

To a solution of **48** (428 mg, 1.58 mmol) in dichloromethane (20 mL), was added trifluoroacetic acid (2.06 mL, 1.3 mL / mmol). The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. The volatiles were evaporated under vacuum and the residue was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane / methanol / ammonium hydroxide aqueous solution 30 %: 90 / 10 / 1) to afford **54** (354 mg, 100 %) as a colorless oil.  $R_f$  (dichloromethane / methanol: 80 / 20): 0.50.

$^1\text{H-NMR}$  (MeOD- $d_4$ , 400 MHz):  $\delta$  7.72 (d, 1H,  $J = 5.2$  Hz), 7.59 (td, 1H,  $J = 8.0, 0.8$  Hz), 7.25 (dd, 1H,  $J = 8.0, 4.8$  Hz), 4.32 (t, 2H,  $J = 6.0$  Hz), 3.17 (t, 2H,  $J = 6.0$  Hz), 2.20 (q $^5$ , 2H,  $J = 6.0$  Hz).

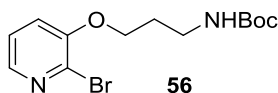
$^{13}\text{C-NMR}$  (CDCl $_3$ , 100 MHz):  $\delta$  153.5 [C, d,  $J^1_{\text{C-F}} = 237$  Hz], 141.5 [C, d,  $J^2_{\text{C-F}} = 25$  Hz], 137.6 [CH, d,  $J^3_{\text{C-F}} = 12$  Hz], 123.1 [CH, d,  $J^4_{\text{C-F}} = 4$  Hz], 121.9 [CH, d,  $J^5_{\text{C-F}} = 4$  Hz], 66.4 [CH $_2$ ], 37.3 [CH $_2$ ], 26.7 [CH $_2$ ].

**6-Bromo-N-methylpyridin-3-amine (55).**

To a solution of 3-amino-6-bromopyridine (500 mg, 2.89 mmol) in methanol (10 mL), were added successively sodium methoxide (780 mg, 14.45 mmol), and a suspension of paraformaldehyde (121 mg, 4.05 mmol) in methanol (5 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 5 h and sodium borohydride (109 mg, 2.89 mmol) was added. The reaction mixture was then heated at 80 °C for 5 h. After cooling to room temperature, a sodium hydroxide aqueous solution (5 mL) was added. The mixture was then partitioned between ethyl acetate (50 mL) and water (50 mL). The aqueous layer was separated and extracted thrice with ethyl acetate (3 x 100 mL). The combined organic layers were washed with brine (150 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness under vacuum. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (heptane / ethyl acetate: 4 / 2 to 2 / 1) to afford **55** (496 mg, 77 %) as a colorless oil.  $R_f$  (heptane / ethyl acetate: 1 / 1): 0.35.

$^1\text{H-NMR}$  (CDCl $_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.72 (d, 1H,  $J = 3.2$  Hz), 7.19 (d, 1H,  $J = 8.8$  Hz), 6.75 (dd, 1H,  $J = 8.8, 3.2$  Hz), 3.73 (s broad, 1H), 2.81 (s, 3H).

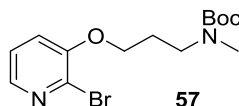
$^{13}\text{C-NMR}$  (CDCl $_3$ , 100 MHz):  $\delta$  144.6 [C], 134.7 [CH], 127.8 [C], 127.5 [CH], 121.5 [CH], 30.2 [CH $_3$ ].

**tert-Butyl 3-((2-bromopyridin-3-yl)oxy)propylcarbamate (56).**

To a solution of 2-bromopyridin-3-ol (400 mg, 2.30 mmol) in tetrahydrofuran (20 mL), were added 3-(Boc-amino)-1-propanol (0.86 mL, 5.01 mmol), triphenylphosphine (1.31 g, 5.01 mmol) and diisopropyl azodicarboxylate (DIAD) (1 mL, 5.01 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 5 h. The volatiles were evaporated to dryness. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (heptane / ethyl acetate: 3 / 1 to 1 / 2) to afford **56** (159 mg, 21 %) as a pale yellow oil.  $R_f$  (heptane / ethyl acetate: 1 / 1): 0.38.

$^1\text{H-NMR}$  (CDCl $_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.98 (dd, 1H,  $J = 4.8, 1.6$  Hz), 7.22 - 7.18 (m, 1H), 7.12 (dd, 1H,  $J = 8.4, 1.6$  Hz), 4.10 (t, 2H,  $J = 6.0$  Hz), 3.38 (q, 2H,  $J = 6.0$  Hz), 2.06 (q $^5$ , 2H,  $J = 6.0$  Hz), 1.49 (s, 9H).

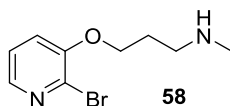
$^{13}\text{C-NMR}$  (CDCl $_3$ , 100 MHz):  $\delta$  156.1 [C], 152.1 [C], 141.3 [CH], 132.8 [C], 123.4 [CH], 119.4 [CH], 79.2 [C], 67.5 [CH $_2$ ], 38.1 [CH $_2$ ], 28.9 [CH $_2$ ], 28.2 [3CH $_3$ ].

**tert-Butyl 3-((2-bromopyridin-3-yl)oxy)propyl(methyl)carbamate (57).**

To a solution of **56** (400 mg, 1.21 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (10 mL) at 0 °C, was added sodium hydride (58 mg, 1.45 mmol). The reaction mixture was stirred at 0 °C for 30 min, and then a solution of 2 M methyl iodide in *tert*-butyl methyl ether (TBME) (1.4 mL, 1.45 mmol) was added. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. The mixture was then partitioned between ethyl acetate (50 mL) and water (50 mL). The aqueous layer was separated and extracted thrice with ethyl acetate (3 x 100 mL). The combined organic layers were washed with brine (150 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness under vacuum. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (heptane / ethyl acetate: 8 / 2 to 6 / 4) to afford **57** (321 mg, 77 %) as a colorless oil.  $R_f$  (heptane / ethyl acetate: 1 / 1): 0.37.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.95 (d, 1H,  $J = 4.0$  Hz), 7.21 - 7.17 (m, 1H), 7.11 - 7.09 (m, 1H), 4.05 (t, 2H,  $J = 6.0$  Hz), 3.46 (t, 2H,  $J = 6.0$  Hz), 2.89 (s, 3H), 2.07 (m, 2H), 1.41 (s, 9H).

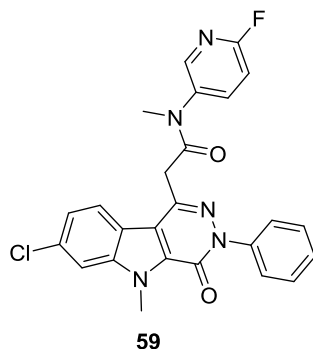
$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  155.8 [C], 152.2 [C], 141.2 [CH], 133.0 [C], 123.3 [CH], 119.7 [CH], 73.4 [C], 45.8 [CH<sub>3</sub>], 66.4 [CH<sub>2</sub>], 34.5 [CH<sub>2</sub>], 28.3 [3CH<sub>3</sub>], 27.7 [CH<sub>2</sub>].

**3-((2-Bromopyridin-3-yl)oxy)-*N*-methylpropan-1-amine (58).**

To a solution of **57** (321 mg, 0.93 mmol) in dichloromethane (10 mL), was added trifluoroacetic acid (0.50 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 3 h. The volatiles were evaporated to dryness. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane / methanol: 90 / 10 to 85 / 15) to afford **58** (227 mg, 100 %) as a colorless oil.  $R_f$  (dichloromethane / methanol: 95 / 5): 0.07.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.96 (d, 1H,  $J = 4.0$  Hz), 7.20 - 7.17 (m, 1H), 7.11 - 7.08 (m, 1H), 4.07 (t, 2H,  $J = 6.0$  Hz), 3.40 (t, 2H,  $J = 6.0$  Hz), 2.87 (s, 3H), 2.04 (m, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  156.1 [C], 152.1 [C], 141.3 [CH], 132.8 [C], 123.4 [CH], 119.4 [CH], 67.5 [CH<sub>2</sub>], 38.1 [CH<sub>2</sub>], 28.4 [CH<sub>3</sub>], 28.9 [CH<sub>2</sub>].

**2-(7-Chloro-5-methyl-4-oxo-3-phenyl-4,5-dihydro-3H-pyridazino [4,5-*b*] indol-1-yl)-*N*-(6-fluoropyridin-3-yl)-*N*-methylacetamide (59).**

To a solution of **53** (50 mg, 0.39 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (5 mL), were added 2-(7-chloro-5-methyl-4-oxo-3-phenyl-4,5-dihydro-3H-pyridazino[4,5-*b*]indol-1-yl)acetic acid (186 mg, 0.51 mmol), *N,N,N',N'*-tetramethyl-*O*-(benzotriazol-1-yl)uronium tetrafluoroborate (TBTU) (162 mg, 0.51 mmol) and *N,N*-diisopropylethylamine

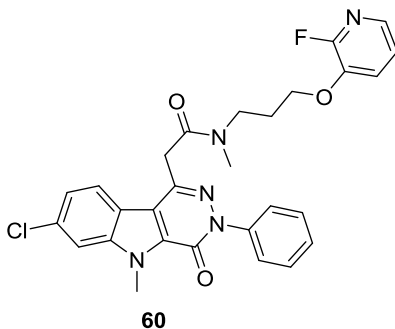
(DIPEA) (0.67 mL, 3.9 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 24 h. The mixture was then partitioned between ethyl acetate (50 mL) and water (50 mL). The aqueous layer was separated and extracted with ethyl acetate (3 x 50 mL). The combined organic layers were washed with, water (100 mL), brine (100 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness under vacuum. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (toluene / acetone: 99 / 1 to 90 / 10) to afford **59** (221 mg, 88 %) as a white powder after a trituration in ethanol. Mp: 188 - 190 °C.  $R_f$  (toluene / acetone: 90 / 10): 0.25.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  8.45 (s, 0.8H, *rot A*), 8.20 (s, 0.2H, *rot B*), 7.92 (d, 1H,  $J = 2.4$  Hz), 7.72 (d, 1H,  $J = 2.4$  Hz), 7.58 (m, 1H), 7.50 (m, 3H), 7.40 (t, 2H, 8.0 Hz), 7.37 (m, 2H), 6.97 (dd, 1H,  $J = 8.0, 3.2$  Hz), 4.39 (s, 0.4H, *rot B*), 4.3 (s, 3H), 3.94 (s, 1.6H, *rot A*), 3.55 (s, 0.6H, *rot B*), 3.28 (s, 2.4H, *rot A*).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  168.1 [C], 162.0 [C, d,  $J^1_{\text{C-F}} = 240$  Hz], 154.8 [C], 146.7 [CH, d,  $J^3_{\text{C-F}} = 15$  Hz], 141.7 [C], 141.2 [C], 140.4 [CH, d,  $J^2_{\text{C-F}} = 9$  Hz], 139.6 [C], 138.0 [C], 132.9 [C], 131.2 [C], 128.4 [2CH], 127.6 [CH], 126.0 [2CH], 122.7 [CH, d,  $J^3_{\text{C-F}} = 14$  Hz], 118.6 [C], 116.8 [C], 110.8 [CH, d,  $J^2_{\text{C-F}} = 40$  Hz], 110.3 [CH], 40.1 [CH<sub>2</sub>], 37.6 [CH<sub>3</sub>], 31.6 [CH<sub>3</sub>].

HR-ESI (+)-MS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{25}\text{H}_{20}\text{ClFN}_4\text{O}_2$ : 476.1284 [M+H]<sup>+</sup>, found 476.1285.

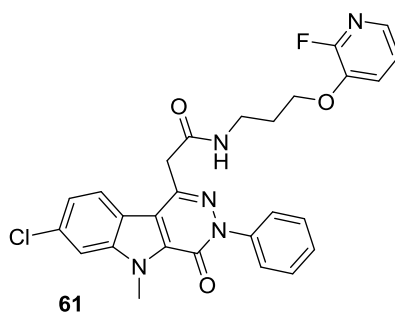
**2-(7-Chloro-5-methyl-4-oxo-3-phenyl-4,5-dihydro-3H-pyridazino [4,5-*b*]indol-1-yl)-*N*-(3-((2-fluoropyridin-3-yl)oxy)propyl)-*N*-methylacetamide (60).**



To a solution of **50** (70 mg, 0.38 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (10 mL), were added 2-(7-chloro-5-methyl-4-oxo-3-phenyl-4,5-dihydro-3H-pyridazino[4,5-*b*]indol-1-yl)acetic acid (182 mg, 0.49 mmol), *N,N,N',N'*-tetramethyl-*O*-(benzotriazol-1-yl)uronium tetrafluoroborate (TBTU) (158 mg, 0.49 mmol) and *N,N*-diisopropylethylamine (DIPEA) (0.7 mL, 3.80 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h. The mixture was then partitioned between ethyl acetate (50 mL) and water (50 mL). The aqueous layer was separated and extracted thrice with ethyl acetate (3 x 50 mL). The combined organic layers were washed with water (100 mL), brine (100 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness under vacuum. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (toluene / acetone: 95 / 5) to afford **60** (102 mg, 50 %) as a yellow powder. Mp: 188 - 190 °C.  $R_f$  (toluene / acetone: 90 / 10): 0.16.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.95 (d, 0.3H,  $J = 8.8$  Hz, *rot A*), 7.88 (d, 0.7H,  $J = 8.8$  Hz, *rot B*), 7.73 - 7.70 (m, 1H), 7.62 - 7.59 (m, 2H), 7.54 - 7.51 (m, 1H), 7.46 (t, 2H,  $J = 7.6$  Hz), 7.39 - 7.35 (m, 1H), 7.29 - 7.25 (m, 1H), 7.04 - 6.99 (m, 2H), 4.33 (s, 2.1H, *rot B*), 4.32 (s, 0.9H, *rot A*), 4.27 (s, 0.6H, *rot A*), 4.22 (s, 1.4H, *rot B*), 4.03 (t, 0.6H,  $J = 6.0$  Hz, *rot A*), 3.94 (t, 1.4H,  $J = 6.0$  Hz, *rot B*), 3.80 (t, 0.6H,  $J = 6.0$  Hz, *rot A*), 3.63 (t, 1.4H,  $J = 6.0$  Hz, *rot B*), 3.23 (s, 2.1H, *rot B*), 3.00 (s, 0.9H, *rot A*), 2.18 - 2.11 (m, 2H).

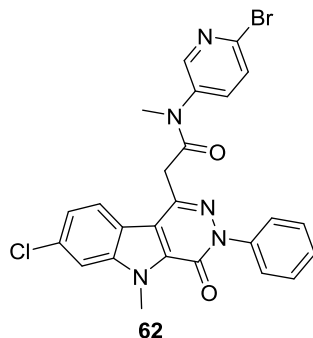
$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  169.1 [C, *rot A*], 169.0 [C, *rot B*], 155.7 [C, *rot A*], 155.3 [C, *rot B*], 152.9 [C, d,  $J^1_{\text{C-F}} = 230$  Hz], 142.4 [C, d,  $J^2_{\text{C-F}} = 25$  Hz], 142.0 [C], 141.8 [C], 140.9 [C, *rot B*], 140.6 [C, *rot A*], 138.3 [CH, d,  $J^3_{\text{C-F}} = 4$  Hz, *rot A*], 137.6 [CH, d,  $J^3_{\text{C-F}} = 4$  Hz, *rot B*], 133.8 [C, *rot A*], 133.7 [C, *rot B*], 131.7 [C], 129.1 [2CH], 128.3 [CH, *rot A*], 128.2 [CH, *rot B*], 126.6 [2CH], 123.5 [2CH], 123.0 [CH, d,  $J^3_{\text{C-F}} = 5$  Hz], 122.1 [CH, d,  $J^3_{\text{C-F}} = 5$  Hz], 119.4 [C, *rot A*], 119.3 [C, *rot B*], 117.6 [C], 111.3 [CH, *rot A*], 111.1 [CH, *rot B*], 67.4 [CH<sub>2</sub>, *rot A*], 66.15 [CH<sub>2</sub>, *rot B*], 47.0 [CH<sub>2</sub>, *rot B*], 45.9 [CH<sub>2</sub>, *rot A*], 40.4 [CH<sub>2</sub>, *rot A*], 39.6 [CH<sub>2</sub>, *rot B*], 36.3 [CH<sub>3</sub>, *rot A*], 33.8 [CH<sub>3</sub>, *rot B*], 32.1 [CH<sub>3</sub>], 28.2 [CH<sub>2</sub>, *rot A*], 27.5 [CH<sub>2</sub>, *rot B*].

**2-(7-Chloro-5-methyl-4-oxo-3-phenyl-4,5-dihydro-3H-pyridazino [4,5-b] indol-1-yl)-N-(3-((2-fluoropyridin-3-yl) oxy) propyl) acetamide (61).**

To a solution of **54** (50 mg, 0.29 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (5 mL), were added 2-(7-chloro-5-methyl-4-oxo-3-phenyl-4,5-dihydro-3*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-1-yl)acetic acid (140 mg, 0.38 mmol), *N,N,N',N'*-tetramethyl-*O*-(benzotriazol-1-yl)uronium tetrafluoroborate (TBTU) (123 mg, 0.38 mmol), and *N,N*-diisopropylethylamine (DIPEA) (0.5 mL, 2.94 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 24 h. The mixture was then partitioned between ethyl acetate (50 mL) and water (50 mL). The aqueous layer was separated and extracted thrice with ethyl acetate (3 x 50 mL). The combined organic layers were washed with water (100 mL), brine (100 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness under vacuum. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (toluene / acetone: 95 / 5 to 80 / 20) to afford **61** (24 mg, 16 %) as a yellow solid. Mp: 192 - 193 °C.  $R_f$  (toluene / acetone: 90 / 10): 0.15.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.26 (d, 1H,  $J = 8.0$  Hz), 7.52 (s, 1H), 7.50 - 7.46 (m, 2H), 7.41 - 7.39 (m, 3H), 7.36 - 7.34 (m, 2H), 7.03 (m, 2H), 6.39 (broad, 1H), 4.32 (s, 3H), 4.09 (s, 2H), 3.89 (t, 2H,  $J = 6.0$  Hz), 3.46 (q, 2H,  $J = 6.0$  Hz), 1.95 (q<sup>5</sup>, 2H,  $J = 6.0$  Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  168.8 [C], 155.51 [C], 154.1 [C, d,  $J^1_{\text{C-F}} = 240$  Hz], 142.3 [C], 142.1 [C], 141.8 [C, d,  $J^2_{\text{C-F}} = 20$  Hz], 140.6 [C], 138.2 [CH, d,  $J^3_{\text{C-F}} = 14$  Hz], 134.1 [C], 131.8 [C], 129.2 [2CH], 128.5 [CH], 126.5 [2CH], 123.9 [2CH], 123.4 [CH, d,  $J^4_{\text{C-F}} = 4$  Hz], 122.1 [CH, d,  $J^5_{\text{C-F}} = 4$  Hz], 119.1 [C], 117.1 [C], 111.2 [CH], 68.0 [CH<sub>2</sub>], 42.5 [CH<sub>2</sub>], 37.7 [CH<sub>2</sub>], 32.2 [CH<sub>3</sub>], 29.2 [CH<sub>2</sub>].

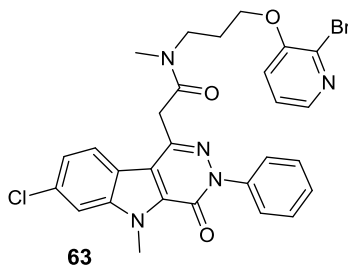
***N*-(6-Bromopyridin-3-yl)-2-(7-chloro-5-methyl-4-oxo-3-phenyl-4,5-dihydro-3H-pyridazino[4,5-*b*]indol-1-yl)-*N*-methylacetamide (62).**

To a solution of **55** (117 mg, 0.63 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (5 mL), were added 2-(7-chloro-5-methyl-4-oxo-3-phenyl-4,5-dihydro-3*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-1-yl)acetic acid (300 mg, 0.82 mmol), *N,N,N',N'*-tetramethyl-*O*-(benzotriazol-1-yl)uronium tetrafluoroborate (TBTU) (262 mg, 0.82 mmol) and *N,N*-diisopropylethylamine (DIPEA) (1.1 mL, 6.30 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 24 h. The mixture was then partitioned between ethyl acetate (50 mL) and water (50 mL). The aqueous layer was separated and extracted thrice with ethyl acetate (3 x 50 mL). The combined organic layers were washed with water (100 mL), brine (100 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness under vacuum. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane / methanol: 99 / 1 to 98 / 2) to afford **62** (111 mg, 33 %) as a white powder. Mp: 233 - 235 °C.  $R_f$  (dichloromethane / methanol: 95 / 5): 0.55.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  8.39 (s, 1H) 7.84 (d, 1H,  $J = 8.4$  Hz), 7.54 (m, 3H), 7.53 - 7.49 (m, 4H), 7.46 - 7.32 (m, 2H), 4.30 (s, 3H), 4.11 (s, 0.4H, *rot A*), 3.96 (s, 1.6H, *rot B*), 3.55 (s, 0.6H, *rot A*), 3.27 (s, 2.4H, *rot B*).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  168.1 [C], 155.0 [C], 148.8 [CH], 141.4 [C], 141.3 [C], 141.1 [C], 139.4 [CH], 137.4 [C], 133.4 [C], 131.3 [C], 128.9 [CH], 128.7 [2CH], 128.5 [C], 127.9 [CH], 126.0 [2CH], 123.1 [CH], 122.8 [CH], 118.6 [C], 116.9 [C], 110.9 [CH], 40.2 [CH<sub>2</sub>], 37.9 [CH<sub>3</sub>], 31.7 [CH<sub>3</sub>].

***N*-(3-((2-Bromopyridin-3-yl)oxy)propyl)-2-(7-chloro-5-methyl-4-oxo-3-phenyl-4,5-dihydro-3H-pyridazino[4,5-*b*]indol-1-yl)-*N*-methylacetamide (63).**

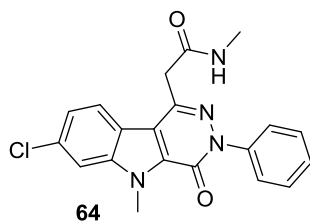


To a solution of **58** (200 mg, 0.82 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (5 mL), were added 2-(7-chloro-5-methyl-4-oxo-3-phenyl-4,5-dihydro-3H-pyridazino[4,5-*b*]indol-1-yl)acetic acid (391 mg, 1.07 mmol), *N,N,N',N'*-tetramethyl-*O*-(benzotriazol-1-yl)uronium tetrafluoroborate (TBTU) (342 mg, 1.07 mmol), and *N,N*-diisopropylethylamine (DIPEA) (1.43 mL, 8.20 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 24 h. The mixture was then partitioned between ethyl acetate (100 mL) and water (100 mL). The aqueous layer was separated and extracted thrice with ethyl acetate (3 x 100 mL). The combined organic layers were washed with water (100 mL), brine (100 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness under vacuum. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane / methanol: 99 / 1 to 98 / 2) to afford **63** (74 mg, 15 %) as a white shiny solid. Mp: 185 - 186 °C.  $R_f$  (dichloromethane / methanol: 95 / 5): 0.46.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.93 (d, 1H,  $J = 3.2$  Hz), 7.88 (d, 1H,  $J = 8.8$  Hz), 7.62 - 7.43 (m, 5H), 7.36 (t, 1H,  $J = 7.2$  Hz), 7.28 - 7.26 (m, 1H), 7.10 - 7.07 (m, 1H), 7.21 (d, 0.3H,  $J = 8.8$  Hz, *rot A*), 6.85 (d, 0.7H,  $J = 8.8$  Hz, *rot B*), 4.32 (s, 3H), 4.30 (s, 0.6H, *rot A*), 4.22 (s, 1.4H, *rot B*), 4.01 (t, 0.6H,  $J = 6.0$  Hz, *rot A*), 3.92 (t, 1.4H,  $J = 6.0$  Hz, *rot B*), 3.84 (t, 0.6H,  $J = 6.0$  Hz, *rot A*), 3.66 (t, 1.4H,  $J = 6.0$  Hz, *rot B*), 3.23 (s, 2.1H, *rot B*), 3.00 (s, 0.9H, *rot A*), 2.13 - 2.10 (m, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  168.6 [C], 155.1 [C], 152.0 [C], 141.6 [C], 141.6 [CH, *rot A*], 141.5 [CH, *rot B*], 141.3 [C, *rot A*], 141.2 [C, *rot B*], 140.4 [C, *rot A*], 141.1 [C, *rot B*], 133.3 [C], 132.8 [C], 131.7 [C], 128.6 [2CH], 127.8 [CH, *rot A*], 127.6 [CH, *rot B*], 126.1 [2CH], 123.3 [CH], 123.0 [CH], 119.4 [CH], 119.3 [CH], 118.9 [C, *rot A*], 118.8 [C, *rot B*], 117.3 [C, *rot A*], 117.1 [C, *rot B*], 110.7 [CH, *rot A*], 110.6 [CH, *rot B*], 66.8 [CH<sub>2</sub>, *rot A*], 65.4 [CH<sub>2</sub>, *rot B*], 46.7 [CH<sub>2</sub>, *rot B*], 45.6 [CH<sub>2</sub>, *rot A*], 39.9 [CH<sub>2</sub>, *rot A*], 39.1 [CH<sub>2</sub>, *rot B*], 36.5 [CH<sub>3</sub>], 33.3 [CH<sub>3</sub>, *rot B*], 31.7 [CH<sub>3</sub>, *rot A*], 27.8 [CH<sub>2</sub>, *rot B*], 26.9 [CH<sub>2</sub>, *rot A*].

**2-(7-Chloro-5-methyl-4-oxo-3-phenyl-4,5-dihydro-3H-pyridazino[4,5-*b*]indol-1-yl)-*N*-methylacetamide (64).**



To a suspension of 2-(7-chloro-5-methyl-4-oxo-3-phenyl-4,5-dihydro-3H-pyridazino[4,5-*b*]indol-1-yl)acetic acid (1.0 g, 2.70 mmol) in methanol (20 mL) was added a 95 % sulfuric acid aqueous solution (1 mL). The reaction mixture was heated at reflux for 2 h. Once the reaction completed (TLC monitoring), the mixture was cooled to room temperature and a 40 % methylamine aqueous solution (50 mL, 14.80 mmol) was added over 90 min. Then, the

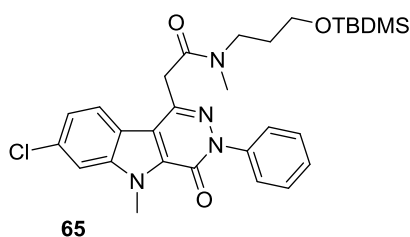


mixture was heated to reflux for another 2 h. After cooling to room temperature, a precipitate appeared. It was filtered off, washed with water and with methanol, and dried under vacuum to afford **64** (975 mg, 95 %) as a white fluffy solid. Mp: 307 - 309 °C.  $R_f$  (dichloromethane / methanol: 95 / 5): 0.52.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  8.17 (d, 1H,  $J = 8.8$  Hz), 7.63 (d, 2H,  $J = 7.6$  Hz), 7.52 - 7.50 (m, 3H), 7.43 (d, 1H,  $J = 7.6$  Hz), 7.39 (d, 1H,  $J = 8.8$  Hz), 6.03 (s broad, 1H), 4.48 (s, 3H), 4.18 (s, 2H), 2.75 (d, 3H,  $J = 4.8$  Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  169.6 [C], 155.5 [C], 141.7 [C], 141.6 [C], 140.9 [C], 134.1 [C], 131.5 [C], 129.1 [2CH], 128.5 [CH], 126.5 [2CH], 123.8 [CH], 123.7 [CH], 119.0 [C], 117.5 [C], 111.0 [CH], 41.6 [CH<sub>2</sub>], 31.9 [CH<sub>3</sub>], 26.5 [CH<sub>3</sub>].

***N*-(3-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)propyl)-2-(7-chloro-5-methyl-4-oxo-3-phenyl-4,5-dihydro-3*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-1-yl)-*N*-methylacetamide (**65**).**

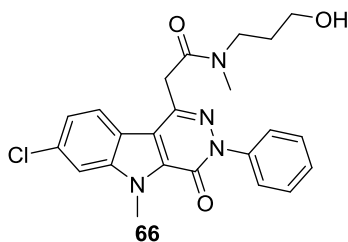


To a solution of **41** (900 mg, 4.43 mmol) in dichloromethane (100 mL) were added added 2-(7-chloro-5-methyl-4-oxo-3-phenyl-4,5-dihydro-3*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-1-yl)acetic acid (2.11 g, 5.76 mmol), *N,N,N',N'*-tetramethyl-*O*-(benzotriazol-1-yl)uronium tetrafluoroborate (TBTU) (1.85 g, 5.76 mmol) and *N,N*-diisopropylethylamine (DIPEA) (7.72 mL, 44.30 mmol). The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. Water (100 mL) was added. The aqueous layer was separated and extracted thrice with dichloromethane (3 x 100 mL). The combined organic layers were then washed with brine (150 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness under vacuum. The residue was triturated in a mixture of diethyl ether and ethanol to afford **65** (2.03 g, 94 %) as a white powder. Mp: 171 - 173°C.  $R_f$  (heptane / ethyl acetate: 1 / 1): 0.33.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.83 (d, 0.5H,  $J = 8.8$  Hz, *rot A*), 7.78 (d, 0.5H,  $J = 8.8$  Hz, *rot B*), 7.55 - 7.49 (m, 2H), 7.48 - 7.40 (m, 2H), 7.35 - 7.33 (m, 2H), 7.32 (dd, 1H,  $J = 2.4, 8.0$  Hz), 4.26 (s, 3H), 4.21 (s, 1H, *rot A*), 4.12 (s, 1H, *rot B*), 3.61 (t, 1H,  $J = 6.0$  Hz, *rot A*), 3.56 (t, 1H,  $J = 6.0$  Hz, *rot B*), 3.51 (t, 1H,  $J = 6.0$  Hz, *rot A*), 3.40 (t, 1H,  $J = 6.0$  Hz, *rot B*), 2.88 (s, 1.5H, *rot A*), 2.73 (s, 1.5H, *rot B*), 1.78 (q<sup>5</sup>, 1H,  $J = 6.0$  Hz, *rot A*), 1.68 (q<sup>5</sup>, 1H,  $J = 6.0$  Hz, *rot B*), 0.80 (s, 4.5H, *rot A*), 0.76 (s, 4.5H, *rot B*), - 0.04 (s, 6H).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  168.6 [C, *rot A*], 168.2 [C, *rot B*], 155.3 [C], 141.3 [C], 140.7 [C], 140.4 [C], 133.3 [C, *rot A*], 133.2 [C, *rot B*], 131.2 [C], 128.7 [2CH, *rot A*], 128.6 [2CH, *rot B*], 127.9 [CH, *rot A*], 127.8 [CH, *rot B*], 126.1 [2CH], 123.5 [CH, *rot A*], 123.2 [CH, *rot B*], 122.9 [CH], 118.9 [C, *rot A*], 118.8 [C, *rot B*], 117.6 [C, *rot A*], 117.4 [C, *rot B*], 110.7 [CH, *rot A*], 110.6 [CH, *rot B*], 60.4 [CH<sub>2</sub>, *rot A*], 59.2 [CH<sub>2</sub>, *rot B*], 46.7 [CH<sub>2</sub>, *rot A*], 45.7 [CH<sub>2</sub>, *rot B*], 39.8 [CH<sub>2</sub>, *rot A*], 39.0 [CH<sub>2</sub>, *rot B*], 36.3 [CH<sub>3</sub>, *rot A*], 33.3 [CH<sub>3</sub>, *rot B*], 31.7 [CH<sub>3</sub>, *rot A*], 31.6 [CH<sub>3</sub>, *rot B*], 31.1 [CH<sub>2</sub>, *rot A*], 30.3 [CH<sub>2</sub>, *rot B*], 25.8 [3CH<sub>3</sub>, *rot A*], 25.7 [3CH<sub>3</sub>, *rot B*], 18.1 [C, *rot A*], 18.0 [C, *rot B*], - 5.5 [2CH<sub>3</sub>].

**2-(7-Chloro-5-methyl-4-oxo-3-phenyl-4,5-dihydro-3*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-1-yl)-*N*-(3-hydroxypropyl)-*N*-methylacetamide (**66**).**

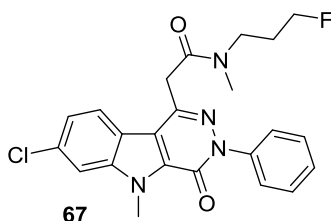


To a solution of **65** (1.1 g, 2.0 mmol) in tetrahydrofuran (30 mL), was added a 1 M tetra-*n*-butylammonium fluoride (TBAF) in tetrahydrofuran (4 mL, 4.0 mmol). The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. The volatiles were evaporated and the residue was partitioned between water (50 mL) and ethyl acetate (50 mL). The aqueous layer was separated and extracted thrice with ethyl acetate (3 x 50 mL). The combined organic layers were washed with brine (100 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness under vacuum. The residue was purified triturated in a mixture of diethyl ether and ethanol to afford **66** (597 mg, 69 %) as a white powder. Mp: 173 - 176 °C.  $R_f$  (dichloromethane / methanol: 95 / 5): 0.44.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.98 (d, 0.2H,  $J = 8.8$  Hz, *rot B*) 7.87 (d, 0.8H,  $J = 8.8$  Hz, *rot A*), 7.60 (d, 2H,  $J = 8.8$  Hz), 7.51 (s, 1H), 7.47 (t, 2H,  $J = 8.8$  Hz), 7.39 - 7.33 (m, 2H), 4.32 (s, 2.4H, *rot A*), 4.29 (s, 0.6H, *rot B*), 4.26 (s, 0.4H, *rot B*), 4.23 (s, 1.6H, *rot A*), 3.64 (t, 0.4H,  $J = 6.0$  Hz, *rot B*), 3.57 (t, 1.6H,  $J = 6.0$  Hz, *rot A*), 3.42 (bt, 2H), 3.16 (s, 2.4H, *rot A*), 2.94 (s, 0.6H, *rot B*), 1.83 (m, 0.4H, *rot B*), 1.69 - 1.66 (m, 1.6H, *rot A*).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  169.8 [C, *rot A*], 168.7 [C, *rot B*], 155.2 [C], 141.3 [2C], 139.9 [C], 133.5 [C], 131.2 [C], 128.7 [2CH], 128.0 [CH], 126.2 [2CH], 123.3 [CH], 122.8 [CH], 118.7 [C], 117.1 [C], 110.9 [CH], 57.8 [ $\text{CH}_2$ ], 44.3 [ $\text{CH}_2$ ], 39.6 [ $\text{CH}_2$ ], 35.8 [ $\text{CH}_3$ ], 31.6 [ $\text{CH}_3$ ], 29.2 [ $\text{CH}_2$ ].

**2-(7-Chloro-5-methyl-4-oxo-3-phenyl-4,5-dihydro-3H-pyridazino[4,5-*b*]indol-1-yl)-*N*-(3-fluoropropyl)-*N*-methylacetamide (67).**



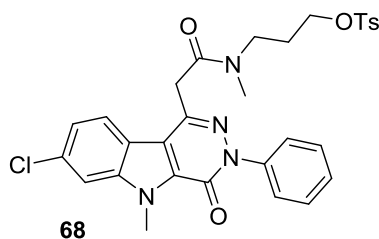
To a solution of **66** (150 mg, 0.34 mmol) in dichloromethane (5 mL) at 0 °C, was added Deoxo-Fluor<sup>®</sup> 50 % wt in toluene (0.2 mL). The reaction mixture was stirred 30 min at 0 °C. The volatiles were evaporated under vacuum and the residue was purified by flash chromatography on silica gel (toluene / acetone: 95 / 5 to 90 / 10) to afford **67** (34 mg, 23 %) as a pale yellow oil.  $R_f$  (toluene / acetone: 80 / 20): 0.48.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.95 (d, 0.4H,  $J = 8.8$  Hz, *rot A*), 7.88 (d, 0.6H,  $J = 8.8$  Hz, *rot B*), 7.64 - 7.61 (m, 3H), 7.53 - 7.49 (m, 2H), 7.38 - 7.35 (m, 2H), 4.54 (dt, 0.6H,  $J_{\text{H-F}}^2 = 41.6$  Hz,  $J = 6.0$  Hz, *rot A*), 4.43 (dt, 1.2H,  $J_{\text{H-F}}^2 = 41.6$  Hz,  $J = 6.0$  Hz, *rot B*), 4.35 (s, 3H), 4.22 (s, 0.8H, *rot A*), 4.19 (s, 1.2H, *rot B*), 3.67 (t, 0.8H,  $J = 6.0$  Hz, *rot A*), 3.52 (t, 1.2H,  $J = 6.0$  Hz, *rot B*), 3.21 (s, 1.8H, *rot B*), 2.95 (s, 1.2H, *rot A*), 1.98 - 1.81 (m, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  168.4 [C], 155.2 [C], 141.5 [C], 141.3 [C], 140.4 [C, *rot A*], 140.2 [C, *rot B*], 133.3 [C], 131.3 [C], 128.8 [2CH], 127.9 [CH], 126.1 [2CH], 123.1 [CH], 122.9 [CH], 118.9 [C], 117.3 [C], 110.7 [CH], 81.8 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J_{\text{C-F}}^1 = 163$  Hz, *rot A*], 80.6 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J_{\text{C-F}}^1 = 163$  Hz, *rot B*], 45.2 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J_{\text{C-F}}^3 = 5$  Hz], 39.8 [ $\text{CH}_2$ , *rot A*], 39.2 [ $\text{CH}_2$ , *rot B*], 36.4 [ $\text{CH}_3$ ], 33.3 [ $\text{CH}_3$ , *rot A*], 31.7 [ $\text{CH}_3$ , *rot B*], 29.0 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J_{\text{C-F}}^2 = 20$  Hz, *rot A*], 28.2 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J_{\text{C-F}}^2 = 20$  Hz, *rot A*].

HR-ESI (+)-MS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{ClFN}_4\text{O}_2$ : 441.1488 [ $\text{M}+\text{H}$ ]<sup>+</sup>, found 441.1483.

**3-(2-(7-Chloro-5-methyl-4-oxo-3-phenyl-4,5-dihydro-3H-pyridazino[4,5-*b*]indol-1-yl)-*N*-methylacetamido)propyl 4-methylbenzenesulfonate (68).**



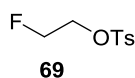
To a solution of **66** (200 mg, 0.46 mmol) in dichloromethane (5 mL) were added *p*-toluenesulfonic anhydride (178 mg, 0.55 mmol) and triethylamine (0.32 mL, 2.28 mmol). The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. Water (50 mL) was then added and the aqueous layer was separated and extracted thrice with dichloromethane (3 x 50 mL). The combined organic layers were washed with brine (100 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness under vacuum. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane / methanol: 99 / 1 to 98 / 2) to afford **68** (19 mg, 7 %) as a white solid. Mp: 128 - 130 °C.  $R_f$  (dichloromethane / methanol: 95 / 5): 0.63.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.98 (d, 0.3H,  $J = 8.4$  Hz, *rot A*), 7.86 (d, 0.7H,  $J = 8.4$  Hz, *rot B*), 7.74 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz), 7.62 - 7.46 (m, 6H), 7.40 - 7.27 (m, 3H), 4.33 (s, 3H), 4.18 (s, 2H), 4.05 (t, 0.6H,  $J = 6.0$  Hz, *rot A*), 3.98 (t, 1.4H,  $J = 6.0$  Hz, *rot B*), 3.60 (t, 0.6H,  $J = 6.0$  Hz, *rot A*), 3.44 (t, 1.4H,  $J = 6.0$  Hz, *rot B*), 3.19 (s, 2.1H, *rot B*), 2.90 (s, 0.9H, *rot A*), 2.43 (s, 3H), 1.95 - 1.90 (m, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  169.3 [C, *rot B*], 168.6 [C, *rot A*], 155.2 [C, *rot A*], 115.1 [C, *rot B*], 144.8 [C], 141.5 [C], 141.3 [C], 140.6 [C, *rot B*], 140.1 [C, *rot A*], 138.9 [C], 133.3 [C], 131.2 [C], 129.8 [2CH], 128.9 [2CH], 128.7 [CH], 126.1 [2CH], 125.7 [2CH], 123.3 [CH, *rot A*], 123.0 [CH, *rot B*], 122.9 [CH, *rot A*], 122.8 [CH, *rot B*], 118.8 [C, *rot A*], 118.5 [C, *rot B*], 117.2 [C, *rot A*], 116.7 [C, *rot B*], 110.8 [CH], 68.2 [CH<sub>2</sub>], 46.6 [CH<sub>2</sub>, *rot B*], 45.3 [CH<sub>2</sub>, *rot A*], 39.8 [CH<sub>2</sub>], 33.3 [CH<sub>3</sub>], 31.7 [CH<sub>3</sub>], 26.8 [CH<sub>2</sub>, *rot A*], 25.1 [CH<sub>2</sub>, *rot B*], 21.5 [CH<sub>3</sub>, *rot A*], 21.2 [CH<sub>3</sub>, *rot B*].

HR-ESI (+)-MS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{30}\text{H}_{30}\text{ClN}_4\text{O}_5\text{S}$ : 593.1620  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , found 593.1631.

### 2-Fluoroethyl 4-methylbenzenesulfonate (**69**).

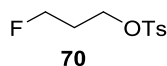


To a solution of ethane-1,2-diyl bis(4-methylbenzenesulfonate) (3.0 g, 8.09 mmol) in tetrahydrofuran (100 mL), was added 1 M tetra-*n*-butylammonium fluoride in tetrahydrofuran (6.47 mL, 6.47 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 12 h. The volatiles were removed under vacuum. The residue was partitioned between water (100 mL) and ethyl acetate (100 mL). The aqueous layer was separated, and extracted thrice with ethyl acetate (3 x 100 mL). The combined organic layers were washed with brine (200 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness under vacuum. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (heptane / ethyl acetate: 9 / 1 to 7 / 3) to afford **69** (705 mg, 40 %) as a colorless oil.  $R_f$  (heptane / ethyl acetate: 1 / 1): 0.48.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.81 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz), 7.35 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz), 4.56 (dt, 2H,  $J_{\text{H-F}}^2 = 46.8$  Hz,  $J = 4.0$  Hz), 4.24 (dt, 2H,  $J_{\text{H-F}}^3 = 27.2$  Hz,  $J = 4.0$  Hz), 2.44 (s, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  145.1 [C], 132.4 [C], 129.8 [2CH], 127.8 [2CH], 80.4 [CH<sub>2</sub>, d,  $J_{\text{C-F}}^1 = 172$  Hz], 68.4 [CH<sub>2</sub>, d,  $J_{\text{C-F}}^2 = 20$  Hz], 21.5 [CH<sub>3</sub>].

### 3-Fluoropropyl 4-methylbenzenesulfonate (**70**).

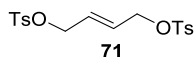


To a solution of 1,3-propanediol di-*p*-tosylate (6.0 g, 15.6 mmol) in tetrahydrofuran (200 mL), was added 1 M tetra-*n*-butylammonium fluoride in tetrahydrofuran (12.48 mL, 12.48 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 12 h. The volatile were removed under vacuum. The residue was partitioned between water (150 mL) and ethyl acetate (150 mL). The aqueous layer was separated, extracted thrice with ethyl acetate (3 x 150 mL). The combined organic layers were washed with brine (200 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness under vacuum. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (heptane / ethyl acetate: 9 / 1 to 7 / 3) to afford **70** (1.48 g, 41 %) as a colorless oil.  $R_f$  (heptane / ethyl acetate: 1 / 1): 0.48.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.79 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz), 7.35 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz), 4.48 (dt, 2H,  $J_{\text{H-F}}^2 = 46.8$  Hz,  $J = 5.6$  Hz), 4.15 (t, 2H,  $J = 5.6$  Hz), 2.45 (s, 3H), 2.04 (dq<sup>5</sup>, 2H,  $J_{\text{H-F}}^3 = 25.6$  Hz,  $J = 5.6$  Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  145.0 [C], 132.6 [C], 129.9 [2CH], 127.8 [2CH], 79.4 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J_{\text{C-F}}^1 = 165$  Hz], 66.0 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J_{\text{C-F}}^3 = 4.8$  Hz], 29.9 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J_{\text{C-F}}^2 = 20$  Hz], 21.5 [ $\text{CH}_3$ ].

**(E)-But-2-ene-1,4-diyl bis(4-methylbenzenesulfonate (71)).**

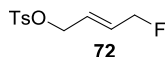


To a solution of dimethyl fumarate (2.0 g, 14.4 mmol) in toluene (25 mL), was added carefully diisobutylaluminium hydride (DIBAL-H) 1 M in toluene (57.6 mL, 57.6 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 16 h. Then, methanol (5 mL) was slowly added, followed by water (10 mL). The formed precipitate salts were filtered off and washed with methanol (10 mL). The filtrate was evaporated to dryness, and the residue redissolved in dioxane (20 mL). Benzyltrimethylammonium chloride (163 mg, 0.72 mmol) and a 50 % potassium hydroxide solution (20 mL) were added. The reaction mixture was cooled to 0 °C and tosylchloride (5.4 g, 28.8 mmol) in solution in dioxane (5 mL) was added. The reaction mixture was stirred 30 min at 0 °C and then 2 h at room temperature. The mixture was then extracted thrice with ethyl acetate (3 x 100 mL). The combined organic layers were washed with brine (150 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness to afford **71** (3.14 g, 55 %) as a white solid. Mp: 88 - 89 °C.  $R_f$ (heptane / ethyl acetate: 2 / 1): 0.19.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.77 (d, 4H,  $J = 8.0$  Hz), 7.36 (d, 4H,  $J = 8.0$  Hz), 5.75-5.73 (m, 2H), 4.47 (dd, 4H,  $J = 4.0, 1.6$  Hz), 2.45 (s, 6H).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  146.0 [2C], 132.5 [2C], 130.4 [4C], 128.3 [4C], 128.1 [2C], 68.7 [2C], 22.7 [2C].

**(E)-4-Fluorobut-2-en-1-yl 4-methylbenzenesulfonate (72).**

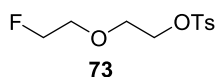


To a solution of **71** (400 mg, 1.01 mmol) in tetrahydrofuran (20 mL), was added a 1 M tetra-*n*-butylammonium fluoride in tetrahydrofuran (1.11 mL, 1.11 mmol). The reaction mixture was stirred at 60 °C for 1 h, then concentrated to dryness. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (heptane / ethyl acetate: 4 / 1) to afford **72** (96 mg, 39 %) as a colorless oil.  $R_f$ (heptane / ethyl acetate: 2 / 1): 0.34.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.79 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz), 7.35 (d, 2H,  $J = 0.84$  Hz), 5.92 - 5.87 (m, 1H), 5.83 - 5.80 (m, 1H), 4.81 (dd, 2H,  $J_{\text{H-F}}^2 = 46.8$  Hz,  $J = 4.8$  Hz), 4.56 (d, 2H), 2.45 (s, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  144.8 [C], 133.0 [C], 130.2 [CH, d,  $J_{\text{C-F}}^2 = 17$  Hz], 129.8 [2CH], 127.8 [2CH], 125.3 [CH, d,  $J_{\text{C-F}}^3 = 12$  Hz], 81.6 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J_{\text{C-F}}^1 = 165$  Hz], 69.1 [ $\text{CH}_2$ ], 21.5 [ $\text{CH}_3$ ].

**2-(2-Fluoroethoxy)ethyl 4-methylbenzenesulfonate (73).**



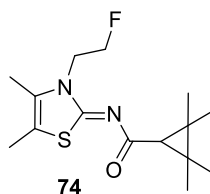
To a solution of diethyl glycol ditosylate (2.0 g, 5.20 mmol) in tetrahydrofuran (60 mL), was added a 1 M tetra-*n*-butylammonium fluoride in tetrahydrofuran (4.16 mL, 4.16 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 12 h. The volatiles were removed under vacuum. The residue was partitioned between water (50 mL) and ethyl acetate (50 mL). The aqueous layer was separated, and extracted thrice with ethyl acetate (3 x 150 mL). The combined organic layers were washed with brine (200 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness under vacuum. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane) to afford **73** (363 mg, 27 %) as a colorless oil.  $R_f$ (heptane / ethyl acetate: 1 / 1): 0.37.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.79 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz), 7.33 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz), 4.47(dt, 2H,  $J_{\text{H-F}}^2 = 44.4$  Hz,  $J = 4.4$  Hz), 4.16 (t, 2H,  $J = 4.8$  Hz), 3.71 (t, 2H,  $J = 4.8$  Hz), 3.66 (dt, 2H,  $J_{\text{H-F}}^3 = 24.4$  Hz,  $J = 4.4$  Hz), 2.43 (s, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  144.8 [C], 132.7 [C], 129.7 [2CH], 128.1 [2CH], 82.9 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J_{\text{C-F}}^1 = 168$  Hz], 70.3 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J_{\text{C-F}}^2 = 19$ Hz], 69.1 [ $\text{CH}_2$ ], 68.7 [ $\text{CH}_2$ ], 21.5 [ $\text{CH}_3$ ].

**General procedure for the preparation of compounds 74-79:** 4,5-dimethylthiazol-2-amine and the appropriate fluoroalkylating agent (1.3 eq) were mixed, and heated at 85 °C with stirring overnight. The reaction mixture was then cooled to room temperature, and diluted in dichloromethane (10 mL). To this solution were successively added triethylamine (3 eq), 2,2,3,3-tetramethylcyclopropane-1-carboxylic acid (1 eq) and benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino)phosphoniumhexafluorophosphate (BOP) (1.4 eq). The reaction mixture was stirred at room temperature for 12 h. Water (5 mL) was then added, and the organic layer separated. The remaining aqueous layer was extracted thrice with dichloromethane (3 x 100 mL). The combined organic layers were then washed with a 0.1 M hydrochloric acid aqueous solution (10 mL), a 1 M sodium bicarbonate aqueous solution (10 mL), brine (15 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness under vacuum. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (using a mixture of ethyl acetate and heptane, or pure dichloromethane) to afford the desired products **74-79**.

**(Z)-N-(3-(2-Fluoroethyl)-4,5-dimethylthiazol-2(3H)-ylidene)-2,2,3,3-tetramethylcyclopropane-1-carboxamide (74).**



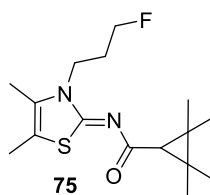
This derivative was prepared according to the general procedure described above using 200 mg of 4,5-dimethylthiazol-2-amine (1.56 mmol), 443 mg of 2-fluoroethyl 4-methylbenzenesulfonate (**69**, 2.03 mmol), 0.90 mL of triethylamine (6.37 mmol), 302 mg of 2,2,3,3-tetramethylcyclopropane-1-carboxylic acid (2.12 mmol), and 1.31 g of (benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate (BOP) (2.97 mmol). **74** (68 mg, 15 %) was obtained as a white solid after flash chromatography (heptane / ethyl acetate: 8 / 2). Mp: 123 - 125 °C.  $R_f$  (heptane / ethyl acetate: 7 / 3): 0.62.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  4.74 (dt, 2H,  $J_{\text{H-F}}^2 = 48.0$  Hz,  $J = 4.8$  Hz), 4.34 (dt, 2H,  $J_{\text{H-F}}^3 = 24.0$  Hz,  $J = 4.8$  Hz), 2.16 (s, 3H), 2.14 (s, 3H), 1.49 (s, 1H), 1.31 (s, 6H), 1.18 (s, 6H).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  181.3 [C], 164.3 [C], 127.8 [C], 112.8 [C], 81.4 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J_{\text{C-F}}^1 = 168$  Hz], 46.4 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J_{\text{C-F}}^2 = 20$  Hz], 42.2 [CH], 30.3 [2C], 23.9 [2 $\text{CH}_3$ ], 16.9 [2 $\text{CH}_3$ ], 11.5 [ $\text{CH}_3$ ], 11.2 [ $\text{CH}_3$ ].

HR-ESI (+)-MS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{FN}_2\text{OS}$ : 299.1588 [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ , found 299.1591.

**(Z)-N-(3-(3-Fluoropropyl)-4,5-dimethylthiazol-2(3H)-ylidene)-2,2,3,3-tetramethylcyclopropane-1-carboxamide (75).**



This derivative was prepared according to the general procedure described above using 200 mg of 4,5-dimethylthiazol-2-amine (1.56 mmol), 471 mg of 3-fluoropropyl 4-methylbenzenesulfonate (**70**, 2.03 mmol), 0.66

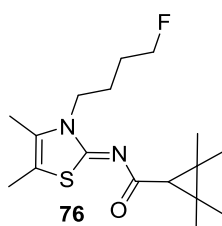
mL of triethylamine (4.69 mmol), 222 mg of 2,2,3,3-tetramethylcyclopropane-1-carboxylic acid (1.56 mmol), and 967 mg of (benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino)phosphoniumhexafluorophosphate (BOP) (2.19 mmol). **75** (134 mg, 27 %) was obtained as a white solid after flash chromatography (heptane / ethyl acetate: 9 / 1 to 8 / 2). Mp: 124 - 129 °C.  $R_f$  (heptane / ethyl acetate: 2 / 1): 0.39.

$^1\text{H-NMR}$  (DMF- $d_7$ , 400 MHz):  $\delta$  4.73 (dt, 2H,  $J_{\text{H-F}}^3 = 47.2$  Hz,  $J = 5.6$  Hz), 4.43 (t, 2H,  $J = 7.2$  Hz), 2.99 (d broad,  $J_{\text{H-F}}^2 = 68.0$  Hz), 2.36 (s, 3H), 2.30 (s, 3H), 1.67 (s, 1H), 1.45 (s, 6H), 1.36 (s, 6H).

$^{13}\text{C-NMR}$  (DMF- $d_7$ , 100 MHz):  $\delta$  180.2 [C], 164.1 [C], 128.6 [C], 112.7 [C], 81.9 [CH<sub>2</sub>, d,  $J_{\text{C-F}}^1 = 162$  Hz], 42.9 [CH<sub>2</sub>, d,  $J_{\text{C-F}}^3 = 6$  Hz], 42.1 [CH], 30.3 [2C], 29.4 [CH<sub>2</sub>, d,  $J_{\text{C-F}}^2 = 19$  Hz], 23.6 [2CH<sub>3</sub>], 16.6 [2CH<sub>3</sub>], 10.9 [CH<sub>3</sub>], 10.3 [CH<sub>3</sub>].

HR-ESI (+)-MS  $m/z$  calcd for C<sub>16</sub>H<sub>25</sub>FN<sub>2</sub>OS: 313.1744 [M+H]<sup>+</sup>, found 313.1738.

**(Z)-N-(3-(4-Fluorobutyl)-4,5-dimethylthiazol-2(3H)-ylidene)-2,2,3,3-tetramethylcyclopropane-1-carboxamide (76).**



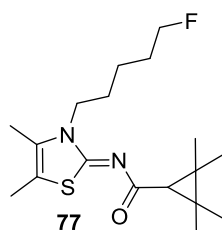
This derivative was prepared according to the general procedure described above using 200 mg of 4,5-dimethylthiazol-2-amine (1.56 mmol), 0.21 mL of commercially available 4-bromo-1-fluorobutane (2.03 mmol), 0.66 mL of triethylamine (4.69 mmol), 222 mg of 2,2,3,3-tetramethylcyclopropane-1-carboxylic acid (1.56 mmol), and 967 mg of (benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino)phosphoniumhexafluorophosphate (BOP) (2.19 mmol). **76** (115 mg, 22 %) was obtained as a white solid after flash chromatography (heptane / ethyl acetate: 9 / 1 to 8 / 2).  $R_f$  (heptane / ethyl acetate: 2 / 1): 0.41. Mp: 107 - 109 °C.

$^1\text{H-NMR}$  (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  4.51 (dt, 2H,  $J_{\text{H-F}}^2 = 48.0$  Hz,  $J = 5.6$  Hz), 4.14 (t, 2H,  $J = 5.6$  Hz), 2.17 (s, 3H), 2.14 (s, 3H), 1.87-1.72 (m, 4H), 1.51 (s, 1H), 1.33 (s, 6H), 1.20 (s, 6H).

$^{13}\text{C-NMR}$  (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  181.4 [C], 164.4 [C], 127 [C], 113.4 [C], 83.4 [CH<sub>2</sub>,  $J_{\text{C-F}}^1 = 164$  Hz], 45.4 [CH<sub>2</sub>], 42.2 [CH], 29.9 [2C], 27.5 [CH<sub>2</sub>,  $J_{\text{C-F}}^2 = 20$  Hz], 24.7 [CH<sub>2</sub>,  $J_{\text{C-F}}^3 = 4.5$  Hz], 23.4 [2CH<sub>3</sub>], 16.9 [2CH<sub>3</sub>], 11.5 [CH<sub>3</sub>], 11 [CH<sub>3</sub>].

HR-ESI (+)-MS  $m/z$  calcd for C<sub>17</sub>H<sub>27</sub>FN<sub>2</sub>OS: 327.1901 [M+H]<sup>+</sup>, found 327.1902.

**(Z)-N-(3-(5-Fluoropentyl)-4,5-dimethylthiazol-2(3H)-ylidene)-2,2,3,3-tetramethylcyclopropane-1-carboxamide (77).**



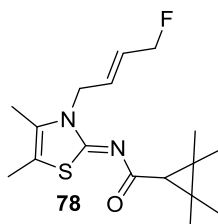
This derivative was prepared according to the general procedure described above using 400 mg of 4,5-dimethylthiazol-2-amine (3.12 mmol), 528 mg of commercially available 5-bromo-1-fluoropentane (4.05 mmol), 1.32 mL of triethylamine (9.36 mmol), 443 mg of 2,2,3,3-tetramethylcyclopropane-1-carboxylic acid (3.12 mmol), and 1.93 g of (benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate (BOP) (4.37 mmol). **77** (60 mg, 6 %) was obtained as a white solid after flash chromatography (heptane / ethyl acetate: 9 / 1 to 8 / 2). Mp: 139 - 140 °C.  $R_f$  (heptane / ethyl acetate: 2 / 1): 0.35.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  4.46 (dt, 2H,  $J^2_{\text{H-F}} = 47.6$  Hz,  $J = 5.6$  Hz), 4.08 (t, 2H,  $J = 7.6$  Hz), 2.16 (s, 3H), 2.14 (s, 3H), 1.83 - 1.71 (m, 4H), 1.60 (s, 1H), 1.51 - 1.48 (m, 2H), 1.33 (s, 6H), 1.20 (s, 6H).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  181.3 [C], 164.3 [C], 127.1 [C], 113.3 [C], 83.6 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J^1_{\text{C-F}} = 164$  Hz], 45.8 [ $\text{CH}_2$ ], 42.2 [CH], 29.9 [2C], 29.8 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J^2_{\text{C-F}} = 19$  Hz], 28.1 [ $\text{CH}_2$ ], 23.9 [2 $\text{CH}_3$ ], 22.4 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J^3_{\text{C-F}} = 5$  Hz], 16.9 [2 $\text{CH}_3$ ], 11.5 [CH<sub>3</sub>], 11 [CH<sub>3</sub>].

HR-ESI (+)-MS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{18}\text{H}_{29}\text{FN}_2\text{OS}$ : 341.2057 [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ , found 341.2072.

**(Z)-N-(3-((E)-4-Fluorobut-2-en-1-yl)-4,5-dimethylthiazol-2(3H)-ylidene)-2,2,3,3-tetramethylcyclopropane-1-carboxamide (78).**



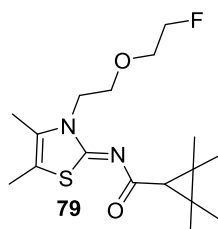
This derivative was prepared according to the general procedure described above using 120 mg of 4,5-dimethylthiazol-2-amine (0.94 mmol), 228 mg of 4-fluorobut-2-en-1-yl 4-methylbenzenesulfonate (**72**, 0.94 mmol), 0.40 mL of triethylamine (2.81 mmol), 133 mg of 2,2,3,3-tetramethylcyclopropane-1-carboxylic acid (0.94 mmol), and 580 mg of (benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate (BOP) (1.31 mmol). **78** (27 mg, 10 %) was obtained as a white solid after flash chromatography (heptane / ethyl acetate: 9 / 1). Mp: 115 - 116 °C.  $R_f$  (heptane / ethyl acetate: 2 / 1): 0.43.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  5.94 - 5.89 (m, 1H), 5.66 - 5.63 (m, 1H), 4.89 (dd, 2H,  $J^2_{\text{H-F}} = 46.0$  Hz,  $J = 5.2$  Hz), 4.80 (t, 2H, 4.4 Hz), 2.15 (s, 6H), 1.51 (s, 1H), 1.32 (s, 6H), 1.26 (s, 6H).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  180.3 [C], 164.3 [C], 128.5 [CH, d,  $J^3_{\text{C-F}} = 12$  Hz], 127.2 [C], 127.0 [CH, d,  $J^2_{\text{C-F}} = 17$  Hz], 113.4 [C], 82.2 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J^1_{\text{C-F}} = 163$  Hz], 46.7 [ $\text{CH}_2$ ], 42.1 [CH], 30.3 [C], 29.6 [C], 23.9 [2 $\text{CH}_3$ ], 16.8 [2 $\text{CH}_3$ ], 11.4 [CH<sub>3</sub>], 10.9 [CH<sub>3</sub>].

HR-ESI (+)-MS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{FN}_2\text{OS}$ : 325.1744 [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ , found 325.1759.

**(Z)-N-(3-(2-(2-Fluoroethoxy)ethyl)-4,5-dimethylthiazol-2(3H)-ylidene)-2,2,3,3-tetramethylcyclopropane-1-carboxamide (79).**



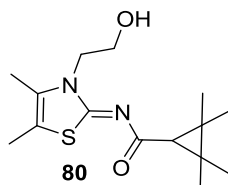
This derivative was prepared according to the general procedure described above using 100 mg of 4,5-dimethylthiazol-2-amine (0.78 mmol), 266 mg of 2-(2-fluoroethoxy)ethyl 4-methylbenzenesulfonate (**73**, 1.02 mmol), 0.33 mL of triethylamine (2.34 mmol), 110 mg of 2,2,3,3-tetramethylcyclopropane-1-carboxylic acid (0.78 mmol), and 482 mg of (benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate (BOP) (1.09 mmol). **79** (87 mg, 32 %) was obtained as a white solid after flash chromatography (dichloromethane). Mp: 118 - 119 °C.  $R_f$  (heptane / ethyl acetate: 2 / 1): 0.31.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  4.47 (dt, 2H,  $J^2_{\text{H-F}} = 48.0$  Hz,  $J = 4.0$  Hz), 4.25 (m, 2H), 3.81 (m, 2H), 3.64 (dt, 2H,  $J^3_{\text{H-F}} = 29.6$  Hz,  $J = 4.0$  Hz), 2.19 (s, 3H), 2.13 (s, 3H), 1.49 (s, 1H), 1.31 (s, 6H), 1.19 (s, 6H).

$^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  180.2 [C], 163.5 [C], 129.0 [C], 113.3 [C], 82.7 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J_{\text{C-F}}^1 = 168$  Hz], 70.2 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J_{\text{C-F}}^2 = 19$  Hz], 68.7 [ $\text{CH}_2$ ], 46.6 [ $\text{CH}_2$ ], 41.6 [CH], 30.7 [2C], 23.9 [2 $\text{CH}_3$ ], 16.8 [2 $\text{CH}_3$ ], 11.5 [ $\text{CH}_3$ ], 11.3 [ $\text{CH}_3$ ].

HR-ESI (+)-MS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{17}\text{H}_{27}\text{FN}_2\text{O}_2\text{S}$ : 343.1850 [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ , found 343.1855.

**(Z)-N-(3-(2-Hydroxyethyl)-4,5-dimethylthiazol-2(3H)-ylidene)-2,2,3,3-tetramethylcyclopropane-1-carboxamide (80).**

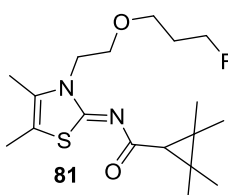


4,5-Dimethylthiazol-2-amine (2.0 g, 15.62 mmol) and commercially available 3-bromoethanol (2.5 g, 20.31 mmol) were mixed, and heated at 85 °C with stirring overnight. The reaction mixture was then cooled to room temperature, and dissolved in dichloromethane (40 mL). To this solution were successively added triethylamine (4.9 mL, 34.97 mmol), 2,2,3,3-tetramethylcyclopropane-1-carboxylic acid (1.6 g, 11.66 mmol), and (benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate (BOP) (7.2 g, 16.32 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 12 h. Water (5 mL) was then added. The aqueous layer was separated and extracted thrice with dichloromethane (3 x 50 mL). The combined organic layers were washed with a 0.1 M hydrochloric acid aqueous solution (10 mL), a 1 M sodium bicarbonate aqueous solution (10 mL), brine (15 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness under vacuum. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (heptane / ethyl acetate: 2 / 1 to 1 / 2) to afford **80** (1.62 g, 47 %) as a white solid. Mp: 143 - 145 °C  $R_f$  (heptane / ethyl acetate: 3 / 7): 0.32.

$^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  4.26 (t, 2H,  $J = 4.8$  Hz), 3.95 (t, 2H,  $J = 4.8$  Hz), 2.16 (s, 3H), 2.15 (s, 3H), 1.46 (s, 1H), 1.30 (s, 6H), 1.19 (s, 6H).

$^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  180.4 [C], 166.3 [C], 127.4 [C], 113.9 [C], 63.2 [ $\text{CH}_2$ ], 49.5 [ $\text{CH}_2$ ], 41.8 [CH], 30.5 [2C], 23.8 [2 $\text{CH}_3$ ], 16.7 [2 $\text{CH}_3$ ], 11.6 [ $\text{CH}_3$ ], 11.3 [ $\text{CH}_3$ ].

**(Z)-N-(3-(2-(3-Fluoropropoxy)ethyl)-4,5-dimethylthiazol-2(3H)-ylidene)-2,2,3,3-tetramethylcyclopropane-1-carboxamide (81).**



To a solution of **80** (536 mg, 1.81 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (10 mL) was added sodium hydride (1.2 eq, 52 mg, 2.17 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 30 min, then **70** (420 mg, 1.81 mmol) was added. The reaction mixture was heated at 50 °C overnight. After cooling to room temperature, water (50 mL) was added. The aqueous layer was separate and the mixture was extracted with ethyl acetate (3 x 150 mL). The combined organic phases were then washed with water (100 mL), brine (15 mL), dried over sodium sulfate, filtered, and concentrated to dryness under vacuum. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (heptane / ethyl acetate: 9 / 1 to 8 / 2) to afford **81** (60 mg, 10 %) as a white solid. Mp: 105 - 107 °C.  $R_f$  (heptane / ethyl acetate: 2 / 1): 0.41.

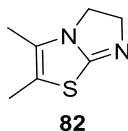
$^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  4.46 (dt, 2H,  $J_{\text{H-F}}^2 = 47.2$  Hz,  $J = 6.0$  Hz), 4.24 (t, 2H,  $J = 5.2$  Hz), 3.74 (t, 2H,  $J = 5.2$  Hz), 3.51 (t, 2H,  $J = 6.4$  Hz), 2.19 (s, 3H), 2.14 (s, 3H), 1.90 (dq $^5$ , 2H,  $J_{\text{H-F}}^3 = 25.6$  Hz,  $J = 6.0$  Hz), 1.15 (s, 1H), 1.33 (s, 6H), 1.20 (s, 6H).



$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  181.3 [C], 164.3 [C], 128.2 [C], 112.5 [C], 80.9 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J^1_{\text{C-F}} = 163$  Hz], 68.3 [ $\text{CH}_2$ ], 66.8 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J^3_{\text{C-F}} = 5$  Hz], 46.1 [ $\text{CH}_2$ ], 42.2 [CH], 30.6 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J^2_{\text{C-F}} = 20$  Hz], 30.0 [C], 23.9 [ $2\text{CH}_3$ ], 16.8 [ $2\text{CH}_3$ ], 11.5 [ $\text{CH}_3$ ], 11.2 [ $\text{CH}_3$ ].

HR-ESI (+)-MS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{18}\text{H}_{29}\text{FN}_2\text{O}_2\text{S}$ : 357.2007 [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ , found 357.2016.

**2,3-Dimethyl-5,6-dihydroimidazo[2,1-*b*]thiazole (82).**

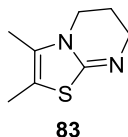


4,5-Dimethylthiazol-2-amine (500 mg, 3.91 mmol) and commercially available ethylene di(*p*-toluenesulfonate) (1.88 g, 5.08 mmol) were mixed, and heated at 85 °C with stirring overnight. The crude was directly purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane / methanol: 98 / 2 to 90 / 10) to afford **82** (216 mg, 35 %) as a white solid.  $R_f$  (dichloromethane / acetone: 9 / 1): 0.13.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  4.15 (t, 2H,  $J = 9.2$  Hz), 3.75 (t, 2H,  $J = 9.2$  Hz), 1.99 (s, 3H), 1.92 (s, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  155.3 [C], 126.1 [C], 107.4 [C], 49.5 [ $\text{CH}_2$ ], 48.6 [ $\text{CH}_2$ ], 12.2 [ $\text{CH}_3$ ], 11.2 [ $\text{CH}_3$ ].

**2,3-Dimethyl-6,7-dihydro-5*H*-thiazolo[3,2-*a*]pyrimidine (83).**

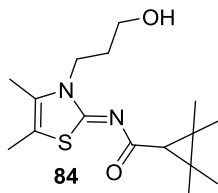


4,5-Dimethylthiazol-2-amine (500 mg, 3.91 mmol) and 1,3-propanediol di-*p*-tosylate (1.95 g, 5.08 mmol) were mixed, and heated at 85 °C with stirring overnight. The crude was directly purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane / methanol: 98 / 2 to 90 / 10) to afford **83** (197 mg, 30 %) as a yellow oil.  $R_f$  (dichloromethane / methanol: 90 / 10): 0.27.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  3.91 (t, 2H,  $J = 6.8$  Hz), 3.42 (t, 2H,  $J = 6.8$  Hz), 2.14 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 2.01 (q $^5$ , 2H,  $J = 6.8$  Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  162.4 [C], 133.0 [C], 109.3 [C], 43.3 [ $\text{CH}_2$ ], 40.9 [ $\text{CH}_2$ ], 19.0 [ $\text{CH}_2$ ], 11.2 [ $\text{CH}_3$ ], 10.7 [ $\text{CH}_3$ ].

**(*Z*)-*N*-(3-(3-Hydroxypropyl)-4,5-dimethylthiazol-2(3*H*)-ylidene)-2,2,3,3-tetramethylcyclopropane-1-carboxamide (84).**



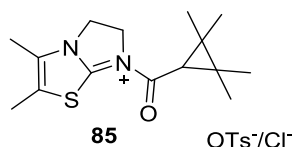
4,5-Dimethylthiazol-2-amine (1.0 g, 7.81 mmol) and commercially available 3-bromopropanol (0.92 mL, 10.15 mmol) were mixed, and heated at 85 °C with stirring overnight. The reaction mixture was then cooled to room temperature, and dissolved in dichloromethane (20 mL). To this solution were successively added triethylamine (3.31 mL, 23.43 mmol), 2,2,3,3-tetramethylcyclopropane-1-carboxylic acid (1.11 g, 7.84 mmol), and (benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate (BOP) (4.8 g, 10.98 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 12 h. Water (5 mL) was then added and the organic layer separated. The

remaining aqueous layer was extracted thrice with dichloromethane (3 x 100 mL). The combined organic layers were washed with a 0.1 M hydrochloric acid aqueous solution (10 mL), a 1 M sodium bicarbonate aqueous solution (10 mL), brine (15 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness under vacuum. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane / methanol: 99 / 1 to 95 / 5) to afford **84** (488 g, 20 %) as a white solid. Mp: 110 - 112 °C.  $R_f$  (heptane / ethyl acetate: 2 / 1): 0.26.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  4.30 (t, 2H,  $J = 4.0$  Hz), 3.43 (t, 2H,  $J = 4.0$  Hz), 2.20 (s, 3H), 2.16 (s, 3H), 1.84 (q<sup>5</sup>, 2H,  $J = 4.0$  Hz), 1.45 (s, 1H), 1.29 (s, 6H), 1.23 (s, 6H).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  180.4 [C], 165.3 [C], 127.6 [C], 114.5 [C], 56.5 [ $\text{CH}_2$ ], 42.3 [ $\text{CH}_2$ ], 41.7 [CH], 32.0 [ $\text{CH}_2$ ], 30.3 [2C], 23.7 [2 $\text{CH}_3$ ], 16.8 [2 $\text{CH}_3$ ], 11.4 [ $\text{CH}_3$ ], 10.8 [ $\text{CH}_3$ ].

**2,3-Dimethyl-7-(2,2,3,3-tetramethylcyclopropane-1-carbonyl)-5,6-dihydroimidazo[2,1-b]thiazol-7-ium (85).**



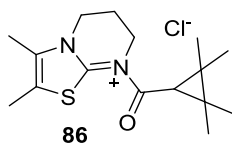
To a suspension of tosyl chloride (36.9 mg, 0.19 mmol) in pyridine (2 mL) at 0 °C, was added **80** (50 mg, 0.16 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h, then poured in ice and acidified to pH 3 with a 37 % hydrochloric acid aqueous solution. The resulting mixture was extracted with dichloromethane (3 x 50 mL). The combined organic layers were washed with brine (100 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness under vacuum to afford **85** (11 mg, 15 %) as a white solid. Mp: 182 - 184 °C.  $R_f$  (dichloromethane / methanol: 9 / 1): 0.30.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.66 (d, 1H,  $J = 8.0$  Hz, *tosylate*), 7.07 (d, 1H,  $J = 8.0$  Hz, *tosylate*), 5.22 (t, 2H,  $J = 8.4$  Hz), 5.04 (t, 2H,  $J = 8.4$  Hz), 2.35 (s, 3H), 2.29 (s, 1.5 H, *tosylate*), 2.28 (s, 3H), 1.41 (s, 1H), 1.32 (s, 6H), 1.31 (s, 6H).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  169.0 [C], 160.8 [C], 143.5 [C, *tosylate*], 139.0 [C, *tosylate*], 131.0 [C], 128.4 [2CH, *tosylate*], 125.7 [2CH, *tosylate*], 123.2 [C], 50.8 [ $\text{CH}_2$ ], 49.0 [ $\text{CH}_2$ ], 35.3 [CH], 23.5 [2 $\text{CH}_3$ ], 21.2 [ $\text{CH}_3$ , *tosylate*], 16.5 [2 $\text{CH}_3$ ], 11.9 [ $\text{CH}_3$ ], 10.6 [ $\text{CH}_3$ ].

HR-ESI (+)-MS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{OS}^+$ : 279.1526 [M+H]<sup>+</sup>, found 279.1526

**2,3-Dimethyl-8-(2,2,3,3-tetramethylcyclopropane-1-carbonyl)-6,7-dihydro-5H-thiazolo[3,2-a]pyrimidin-8-ium chloride (86).**

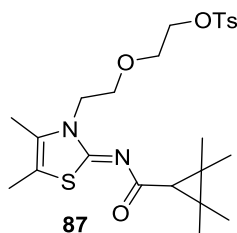


To a suspension of tosyl chloride (73.8 mg, 0.39 mmol) in pyridine (3 mL) at 0 °C, was added **84** (100 mg, 0.32 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h, then poured in ice and acidified to pH 3 with a 37 % hydrochloric acid aqueous solution. The resulting mixture was extracted with dichloromethane (3 x 50 mL). The combined organic layers were washed with brine (100 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness under vacuum to afford **86** (25 mg, 17 %) as an orange oil.  $R_f$  (dichloromethane / acetone: 9 / 1): 0.12.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  4.26 (t, 2H,  $J = 6.0$  Hz), 4.22 (t, 2H,  $J = 6.0$  Hz), 4.48 (q<sup>5</sup>, 2H,  $J = 6.0$  Hz), 2.32 (s, 3H), 2.30 (s, 3H), 1.53 (s, 1H), 1.31 (s, 6H), 1.21 (s, 6H).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  171.2 [C], 155.9 [C], 133.4 [C], 120.6 [C], 45.6 [ $\text{CH}_2$ ], 44.7 [ $\text{CH}_2$ ], 35.3 [CH], 32.8 [2C], 23.1 [2 $\text{CH}_3$ ], 19.8 [ $\text{CH}_2$ ], 17.1 [2 $\text{CH}_3$ ], 10.9 [ $\text{CH}_3$ ], 10.7 [ $\text{CH}_3$ ].

HR-ESI (+)-MS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{16}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{OS}^+$ : 293.1682 [M+H]<sup>+</sup>, found 293.1701.

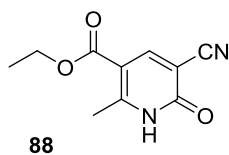
**(Z)-2-(2-(4,5-Dimethyl-2-((2,2,3,3-tetramethylcyclopropane-1-carbonyl)imino)thiazol-3(2H)-yl)ethoxy)ethyl 4-methylbenzenesulfonate (87).**

4,5-Dimethylthiazol-2-amine (250 mg, 1.92 mmol) and commercially available oxybis(ethane-2,1-diyl) bis(4-methylbenzenesulfonate) (955 mg, 2.31 mmol) were mixed and heated at 85 °C with stirring overnight. The reaction mixture was then cooled to room temperature, and dissolved in dichloromethane (15 mL). To this solution were successively added triethylamine (0.81 mL, 5.75 mmol), 2,2,3,3-tetramethylcyclopropane-1-carboxylic acid (272 mg, 1.92 mmol), and (benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino)phosphoniumhexafluorophosphate (BOP) (1.18 g, 2.68 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 12 h. Water (5 mL) was then added and the organic layer separated. The remaining aqueous layer was extracted with dichloromethane (3 x 50 mL). The combined organic layers were washed with a 0.1 M hydrochloric acid aqueous solution (10 mL), a 1 M sodium bicarbonate aqueous solution (10 mL), brine (15 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness under vacuum. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane / acetone: 100 / 0 to 98 / 2) to afford **87** (386 mg, 40 %) as colorless oil.  $R_f$  (dichloromethane): 0.27.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.75 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz), 7.33 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz), 4.18 (t, 2H,  $J = 4.4$  Hz), 4.08 (t, 2H,  $J = 4.4$  Hz), 3.73 (t, 2H,  $J = 4.8$  Hz), 3.56 (t, 2H,  $J = 4.8$  Hz), 2.44 (s, 3H), 2.14 (s, 3H), 2.13 (s, 3H), 1.19 (s, 1H), 1.31 (s, 6H), 1.18 (s, 6H).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  181.3 [C], 164.2 [C], 144.8 [C], 132.8 [C], 129.8 [2CH], 128.4 [C], 127.7 [2CH], 112.4 [C], 68.9 [ $\text{CH}_2$ ], 68.7 [ $\text{CH}_2$ ], 68.4 [ $\text{CH}_2$ ], 46.0 [ $\text{CH}_2$ ], 42.2 [CH], 30.1 [2C], 23.9 [2 $\text{CH}_3$ ], 21.5 [ $\text{CH}_3$ ], 16.8 [2 $\text{CH}_3$ ], 11.5 [ $\text{CH}_3$ ], 11.3 [ $\text{CH}_3$ ].

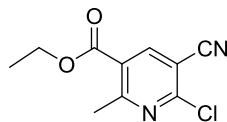
HR-ESI (+)-MS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}_2$ : 495.1982 [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ , found 495.1966.

**Ethyl 5-cyano-2-methyl-6-oxo-1,6-dihydropyridine-3-carboxylate (88).**

A mixture of ethyl acetoacetate (9.7 mL, 76.89 mmol) and 1,1-dimethoxy-*N,N*-dimethylmethanamine (12.7 mL, 96.11 mmol) was stirred at room temperature overnight. Then, the reaction mixture was co-evaporated with toluene (3 x 100 mL) to afford an enamine as an orange oil. To a suspension of 2-cyanoacetamide (6.4 g, 76.89 mmol) in tetrahydrofuran (100 mL), was added a suspension of sodium hydride (2.02 g, 84.58 mmol) in tetrahydrofuran (40 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h. Then, a solution of the previous enamine in tetrahydrofuran (50 mL) was added. The mixture was stirred overnight at room temperature. A 1 M hydrochloric acid aqueous solution (50 mL) was added. The precipitated was triturated, filtered off and washed with toluene (3 x 100 mL) and dried under vacuum overnight to afford **88** (9.72 g, 60 %) as a light pink solid. Mp: 295 - 297 °C.  $R_f$  (dichloromethane / methanol: 90 / 10): 0.52.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMF-}d_7$ , 400 MHz):  $\delta$  8.92 (s broad, 1H), 7.59 (s broad, 1H), 4.30 (q, 2H,  $J = 7.2$  Hz), 2.75 (s, 3H), 1.33 (t, 3H,  $J = 7.2$  Hz).

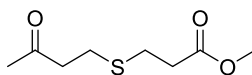
$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{DMF-}d_7$ , 100 MHz):  $\delta$  164.2 [C], 164.1 [C], 162.6 [C], 157.3 [C], 144.5 [CH], 117.8 [C], 107.8 [C], 60.6 [ $\text{CH}_2$ ], 18.6 [ $\text{CH}_3$ ], 13.7 [ $\text{CH}_3$ ].

**Ethyl 6-chloro-5-cyano-2-methylnicotinate (89).****89**

**88** (1 g, 4.85 mmol) was dissolved in toluene (40 mL). Thionyl chloride (1.40 mL, 19.4 mmol) was added and the reaction mixture was stirred at 70 °C for 2 h. After cooling to room temperature, the volatiles were evaporated under vacuum. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (heptane / ethyl acetate: 8 / 2) to afford **89** (325 mg, 28 %) as a pale yellow solid. Mp: 67 - 69 °C.  $R_f$  (heptane / ethyl acetate: 2 / 1): 0.42.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  8.40 (s, 1H), 4.41 (q, 2H,  $J = 7.2$  Hz), 2.89 (s, 3H), 1.42 (t, 3H,  $J = 7.2$  Hz).

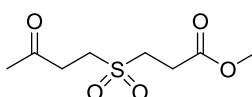
$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  165.1 [C], 163.6 [C], 153.6 [C], 144.5 [CH], 124.5 [C], 114.0 [C], 108.1 [C], 62.2 [ $\text{CH}_2$ ], 25.0 [ $\text{CH}_3$ ], 14.0 [ $\text{CH}_3$ ].

**Methyl 3-((3-oxobutyl)thio)propanoate (90).****90**

To a solution of methyl vinyl ketone (8.26 mL, 88.99 mmol) in tetrahydrofuran (110 mL), were added slowly methyl 3-mercaptopropanoate (100 mL, 80.90 mmol) and triethylamine (1.15 mL, 8.09 mmol). The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. The volatiles were then evaporated to dryness. The crude was purified by flash chromatography on silica gel (heptane / ethyl acetate: 9 / 1 to 1 / 1) to afford **90** (15.37 g, 100 %) as a colorless oil.  $R_f$  (heptane / ethyl acetate: 1 / 1): 0.36.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  3.69 (s, 3H), 2.78 (t, 2H,  $J = 7.2$  Hz), 2.74 - 2.72 (m, 4H), 2.60 (t, 2H,  $J = 7.2$  Hz), 2.16 (s, 3H).

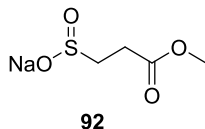
$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  206.6 [C], 172.2 [C], 51.7 [ $\text{CH}_3$ ], 43.4 [ $\text{CH}_2$ ], 34.4 [ $\text{CH}_2$ ], 29.9 [ $\text{CH}_3$ ], 27.1 [ $\text{CH}_2$ ], 25.5 [ $\text{CH}_2$ ].

**Methyl 3-((3-oxobutyl)sulfonyl)propanoate (91).****91**

**90** (15.3 g, 80.90 mmol) was dissolved in a mixture of heptane (22 mL), ethyl acetate (43 mL) and water (8.5 mL). Then, Aliquat<sup>®</sup> 336 (Starks' catalyst) (1.65 g, 4.05 mmol) was added, followed by sodium tungstate dihydrate ( $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) (1.33 g, 4.05 mmol). The reaction mixture was heated at 50 °C and a 30 % hydrogen peroxide aqueous solution (33.3 mL, 283.5 mmol) was added. The mixture was then heated overnight at 50 °C. After cooling to room temperature, a precipitate appeared. It was triturated in ethyl acetate, filtered off and washed with a 50 / 50 (v / v) mixture of heptane and ethyl acetate (100 mL) before being dried under vacuum to afford **91** (16.75 g, 93 %) as a white solid. Mp: 101 - 102 °C.  $R_f$  (heptane / ethyl acetate: 4 / 6): 0.23.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  3.61 (s, 3H), 3.37 (t, 2H,  $J = 7.2$  Hz), 3.29 (t, 2H,  $J = 7.6$  Hz), 2.90 (t, 2H,  $J = 7.6$  Hz), 2.74 (t, 2H,  $J = 7.2$  Hz), 2.13 (s, 3H).

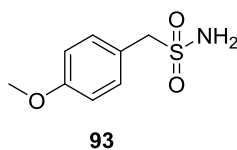
$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ , 100 MHz):  $\delta$  205.3 [C], 171.2 [C], 52.2 [ $\text{CH}_3$ ], 47.9 [ $\text{CH}_2$ ], 47.0 [ $\text{CH}_2$ ], 35.1 [ $\text{CH}_2$ ], 29.9 [ $\text{CH}_3$ ], 26.8 [ $\text{CH}_2$ ].

**Sodium (3-oxobutyl)sulfanolate (92).**

To a suspension of **91** (8.0 g, 36.0 mmol) in tetrahydrofuran (400 mL) and methanol (80 mL), was added sodium methoxide (1.94 g, 36.0 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 30 min. The volatiles were evaporated under vacuum and the residue was triturated in ethyl acetate. The precipitate was filtered off and dried under vacuum to afford **92** (5.51 g, 83 %) as a white powder. Mp: 206 - 208 °C.  $R_f$  (dichloromethane / methanol: 90 / 10): no migration.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  3.54 (s, 3H), 2.38 (t, 2H,  $J = 7.6$  Hz), 1.99 (t, 2H,  $J = 7.6$  Hz).

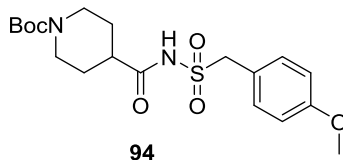
$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  174.2 [C], 56.3 [ $\text{CH}_2$ ], 51.6 [ $\text{CH}_3$ ], 26.3 [ $\text{CH}_2$ ].

**(4-Methoxyphenyl)methanesulfonamide (93).**

To a suspension of **92** (3.31 g, 14.92 mmol) in dimethyl sulfoxide (20 mL), was added 1-(bromomethyl)-4-methoxybenzene (2.5 g, 12.43 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 15 min. Then, a solution of sodium methoxide (671 mg, 12.43 mmol) in methanol (2 mL) was added. The mixture was stirred 15 min. The mixture was cold to 0 °C and a solution of sodium acetate (4.58 g, 55.95 mmol), and hydroxylamine-*O*-sulfonic acid (7.03 g, 62.17 mmol) in water (50 mL) was added and the reaction mixture was stirred overnight at room temperature. Then, the mixture was partitioned between water (50 mL) and ethyl acetate (50 mL). The aqueous layer was separated and extracted thrice with ethyl acetate (3 x 100 mL). The combined organic layers were washed with brine (150 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness under vacuum. The crude was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane / methanol: 99 / 1 to 96 / 4) to afford **93** (1.97 g, 78 %) compound as a white solid. Mp: 133 - 134 °C.  $R_f$  (dichloromethane / methanol: 95 / 5): 0.38.

$^1\text{H-NMR}$  (Acetone- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  7.34 (d, 2H,  $J = 8.8$  Hz), 6.90 (d, 2H,  $J = 8.8$  Hz), 6.00 (s broad, 2H), 4.23 (s, 2H), 3.76 (s, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$  (Acetone- $d_6$ , 100 MHz):  $\delta$  159.6 [C], 131.9 [2CH], 122.8 [C], 113.6 [2CH], 59.6 [ $\text{CH}_2$ ], 54.5 [ $\text{CH}_3$ ].

***tert*-Butyl 4-(((4-methoxybenzyl)sulfonyl)carbamoyl)piperidine-1-carboxylate (94).**

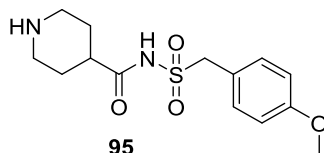
To a solution of *N*-Boc-piperidine-4-carboxylic acid (1 eq, 1 g, 4.65 mmol) in acetonitrile (15 mL), were added successively **93** (1.02 g, 5.11 mmol), *N,N,N',N'*-tetramethyl-*O*-(benzotriazol-1-yl)uroniumtetrafluoroborate (TBTU) (1.56 g, 4.88 mmol), lithium chloride (49.23 mg, 1.16 mmol) and triethylamine (2.9 mL, 20.91 mmol). The reaction mixture was stirred overnight at room temperature and the volatiles were then removed under vacuum. The residue was partitioned between an aqueous saturated solution of sodium hydrogenocarbonate (50 mL) and ethyl acetate (50 mL). The aqueous layer was separated and extracted thrice with ethyl acetate (3 x 50 mL). The combined organic layers were washed with brine (100 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness under vacuum. The crude was dissolved in ethanol (6 mL) and heated at 40 °C. Water was added until the apparition of crystals, and then the mixture was put in an ice bath. After the complete precipitation, the solid was filtered off,

washed with cold ethanol and dried under vacuum to afford **94** (555 mg, 57 %) as a beige solid. Mp: 171 - 174 °C.  $R_f$  (dichloromethane / methanol: 95 / 5): 0.41.

$^1\text{H-NMR}$  (MeOD- $d_4$ , 400 MHz):  $\delta$  7.26 (d, 2H,  $J = 8.8$  Hz), 6.92 (d, 2H,  $J = 8.8$  Hz), 4.57 (s, 2H), 4.05 (d broad, 2H,  $J = 13.6$  Hz), 3.79 (s, 3H), 2.89 - 2.76 (m, 2H), 2.36 - 2.29 (m, 1H), 1.73-1.69 (m, 2H), 1.59 - 1.52 (m, 2H), 1.51 (s, 9H).

$^{13}\text{C-NMR}$  (MeOD- $d_4$ , 100 MHz):  $\delta$  173.2 [C], 158.7 [C], 153.3 [C], 130.1 [2CH], 119.0 [C], 112.1 [2CH], 78.2 [C], 55.5 [CH<sub>2</sub>], 52.7 [CH<sub>3</sub>], 46.2 [2CH<sub>2</sub>], 40.7 [CH], 26.0 [2CH<sub>2</sub>], 25.6 [3CH<sub>3</sub>].

#### ***N*-(4-Methoxybenzyl)sulfonylpiperidine-4-carboxamide (**95**).**

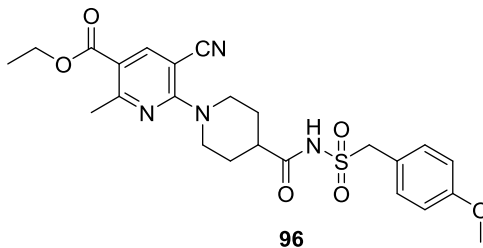


To a solution of **94** (750 mg, 1.82 mmol) in dichloromethane (10 mL) at 0 °C, was added trifluoroacetic acid (3 mL). The reaction mixture was stirred 1 h at 0 °C and then overnight at room temperature. Volatiles were then evaporated under vacuum. The product was crystallized from cold mixture, filtered off and washed with 2-methyltetrahydrofuran to afford **95** (346 mg, 61 %) as a white powder. Mp: 150 - 153 °C.  $R_f$  (dichloromethane / methanol: 90 / 10): 0.38.

$^1\text{H-NMR}$  (MeOD- $d_4$ , 400 MHz):  $\delta$  7.27 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz), 6.93 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz), 4.83 (s, 2H), 3.84 (s, 3H), 3.42 (dt, 2H,  $J = 12.4, 3.2$  Hz), 2.99 (td, 2H,  $J = 12.4, 3.2$  Hz), 2.54 - 2.47 (m, 1H), 2.00 - 1.90 (m, 4H).

$^{13}\text{C-NMR}$  (MeOD- $d_4$ , 100 MHz):  $\delta$  173.4 [C], 160.3 [C], 131.6 [2CH], 120.5 [C], 113.7 [2CH], 57.2 [CH<sub>2</sub>], 54.3 [CH<sub>3</sub>], 42.4 [2CH<sub>2</sub>], 38.3 [CH], 24.5 [2CH<sub>2</sub>].

#### **Ethyl 5-cyano-6-(4-(((4-methoxybenzyl)sulfonyl)carbamoyl)piperidin-1-yl)-2-methylnicotinate (**96**).**

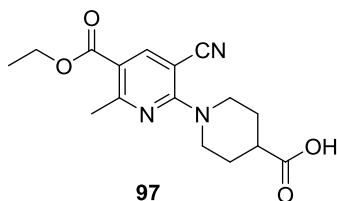


To a solution of **89** (60 mg, 0.27 mmol) and **95** (100 mg, 0.32 mmol) in ethanol (2 mL), was added triethylamine (0.17 mL, 1.20 mmol). The reaction mixture was heated at reflux for 5 h. After cooling to room temperature, 5 mL of an aqueous solution of phosphoric acid (9 g in 30 mL of water) were added. A precipitate appeared. It was filtered off, washed with cold ethanol and dried under vacuum to afford **96** (104 mg, 78 %) as white powder. Mp: 192 - 194 °C.  $R_f$  (dichloromethane / acetone: 90 / 10): 0.64.

$^1\text{H-NMR}$  (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  8.35 (s, 1H), 7.92 (s broad, 1H), 7.25 (d, 2H,  $J = 8.8$  Hz), 6.91 (d, 2H,  $J = 8.8$  Hz), 4.67 (d broad, 2H,  $J = 13.6$  Hz), 4.58 (s, 2H), 4.32 (q, 2H,  $J = 7.2$  Hz), 3.80 (s, 3H), 3.11 (td, 2H,  $J = 13.6, 2.4$  Hz), 2.72 (s, 3H), 2.45 (m, 1H), 1.92 - 1.77 (m, 4H), 1.39 (t, 3H,  $J = 7.2$  Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$  (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  173.8 [C], 164.7 [C], 164.3 [C], 160.1 [C], 158.2 [C], 147.6 [CH], 131.7 [2CH], 120.0 [C], 117.9 [C], 114.7 [C], 114.1 [2CH], 88.8 [C], 60.9 [CH<sub>2</sub>], 57.8 [CH<sub>2</sub>], 55.2 [CH<sub>3</sub>], 46.3 [2CH<sub>2</sub>], 42.4 [CH], 27.7 [2CH<sub>2</sub>], 25.5 [CH<sub>3</sub>], 14.1 [CH<sub>3</sub>].

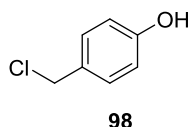
HR-ESI (+)-MS  $m/z$  calcd for C<sub>24</sub>H<sub>28</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>S: 501.1802 [M+H]<sup>+</sup>, found 501.1809.

**1-(3-Cyano-5-(ethoxycarbonyl)-6-methylpyridin-2-yl)piperidine-4-carboxylic acid (97).**

**89** (1.51 g, 6.74 mmol) and piperidine-4-carboxylic acid (957 mg, 7.41 mmol) were dissolved in tetrahydrofuran (5 mL). Triethylamine (1.89 mL, 13.48 mmol) was added and the mixture was heated overnight at reflux. After cooling to room temperature, the mixture was acidified to pH 3 with a 37 % hydrochloric acid aqueous solution. A precipitate appeared; it was filtered off, washed with diethyl ether and dried under vacuum to afford **97** (2.07 g, 94 %) as a beige solid. Mp: 168 - 169 °C.  $R_f$  (dichloromethane / methanol: 95 / 5): 0.36.

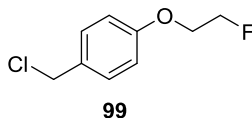
$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  8.34 (s, 1H), 4.58 (d broad, 2H,  $J = 13.6$  Hz), 4.31 (q, 2H,  $J = 6.8$  Hz), 3.33 - 3.27 (td, 2H,  $J = 13.6, 2.4$  Hz), 2.72 (s, 3H), 2.69 - 2.66 (m, 1H), 2.10 - 2.06 (m, 2H), 1.90 - 1.85 (m, 2H), 1.37 (t, 3H,  $J = 6.8$  Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  180.1 [C], 164.6 [C], 164.3 [C], 158.4 [C], 147.6 [CH], 117.9 [C], 114.7 [C], 89.0 [C], 60.8 [ $\text{CH}_2$ ], 46.5 [ $2\text{CH}_2$ ], 40.5 [CH], 27.7 [ $2\text{CH}_2$ ], 25.6 [ $\text{CH}_3$ ], 14.2 [ $\text{CH}_3$ ].

**4-(Chloromethyl)phenol (98).**

To a solution of 1-(benzyloxy)-4-(chloromethyl)benzene (500 mg, 2.15 mmol) in trifluoroacetic acid (5 mL) at 0 °C, were added bromotrimethylsilane (0.35 mL, 2.69 mmol) and thioanisol (1.26 mL, 10.74 mmol). The reaction mixture was stirred 30 min at 0 °C. Then, a saturated sodium bicarbonate aqueous solution was added until pH 9. The aqueous layer was extracted thrice with ethyl acetate (3 x 50 mL). The combined organic layers were washed brine (150 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness under vacuum. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (heptane / ethyl acetate: 8 / 2) to afford **98** (87 mg, 28 %) as a colorless oil.  $R_f$  (heptane / ethyl acetate 1 / 1): 0.43.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.04 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz), 6.75 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz), 4.51 (s, 2H).

**1-(Chloromethyl)-4-(2-fluoroethoxy)benzene (99).**

**Method A:** To a solution of **98** (80 mg, 0.56 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (5 mL), were added fluoroethyl tosylate (147 mg, 0.67 mmol) and potassium carbonate (155 mg, 1.12 mmol). The reaction mixture was stirred at 50 °C for 5 h. After cooling to room temperature, the mixture was partitioned between water (50 mL) and ethyl acetate (100 mL). The aqueous layer was separated and extracted thrice with ethyl acetate (3 x 50 mL). The combined organic layers were washed with water (100 mL), brine (100 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness under vacuum. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (heptane / ethyl acetate: 9 / 1 to 7 / 3) to afford **99** (54 mg, 51 %) as a colorless oil.  $R_f$  (heptane / ethyl acetate: 9 / 1): 0.68.

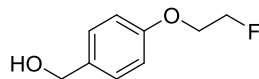
**Method B:** To a solution of **100** (100 mg, 0.59 mmol) in toluene (10 mL), was added thionyl chloride (60  $\mu\text{L}$ , 2.35 mmol). The reaction mixture was stirred at 70 °C for 1 h. After cooling to room temperature, the volatiles were

evaporated under vacuum. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (heptane / ethyl acetate: 9 / 1) to afford **99** (86 mg, 78 %) as a colorless oil.  $R_f$  (heptane / ethyl acetate: 9 / 1): 0.68.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.31 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz), 6.91 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz), 4.76 (dt, 2H,  $J_{\text{H-F}}^2 = 47.2$  Hz,  $J = 4.4$  Hz), 4.57 (s, 2H), 4.21 (dt, 2H,  $J_{\text{H-F}}^3 = 28.0$  Hz,  $J = 4.4$  Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  158.4 [C], 130.2 [C], 130.0 [2CH], 114.9 [2CH], 81.7 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J_{\text{C-F}}^1 = 169$  Hz], 67.0 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J_{\text{C-F}}^2 = 26$  Hz], 46.0 [ $\text{CH}_2$ ].

**(4-(2-Fluoroethoxy)phenyl)methanol (100).**



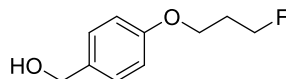
**100**

To a solution of 4-hydroxybenzyl alcohol (1.5 g, 10.52 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (20 mL), were added fluoroethyl tosylate (2.75 g, 12.62 mmol) and potassium carbonate (2.90 g, 21.04 mmol). The reaction mixture was stirred at 70 °C for 5 h. After cooling to room temperature, the mixture was partitioned between water (100 mL) and ethyl acetate (100 mL). The aqueous layer was separated and extracted thrice with ethyl acetate (3 x 100 mL). The combined organic layers were washed with water (150 mL), brine (150 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness under vacuum. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (heptane / ethyl acetate: 9 / 1 to 7 / 3) to afford **100** (1.10 g, 61 %) as a white sticky solid.  $R_f$  (heptane / ethyl acetate: 9 / 1): 0.32.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.28 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz), 6.91 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz), 4.75 (dt, 2H,  $J_{\text{H-F}}^2 = 47.2$  Hz,  $J = 4.0$  Hz), 4.60 (s, 2H), 4.20 (dt, 2H,  $J_{\text{H-F}}^3 = 28.0$  Hz,  $J = 4.0$  Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  157.9 [C], 133.6 [C], 128.6 [2CH], 114.6 [2CH], 81.8 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J_{\text{C-F}}^1 = 169$  Hz], 67.0 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J_{\text{C-F}}^2 = 20$  Hz], 64.8 [ $\text{CH}_2$ ].

**(4-(3-Fluoropropoxy)phenyl)methanol (101).**



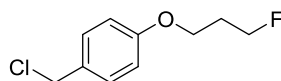
**101**

To a solution of 4-hydroxybenzyl alcohol (1.10 g, 7.71 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (20 mL), were added fluoropropyl tosylate (2.02 g, 9.26 mmol) and potassium carbonate (2.12 g, 15.43 mmol). The reaction mixture was stirred at 70 °C for 5 h. After cooling to room temperature, the mixture was partitioned between water (50 mL) and ethyl acetate (100 mL). The aqueous layer was separated and extracted thrice with ethyl acetate (3 x 100 mL). The combined organic layers were washed with water (150 mL), brine (150 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness under vacuum. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (heptane / ethyl acetate: 9 / 1 to 7 / 3) to afford **101** (1.31 g, 92 %) as a colorless oil.  $R_f$  (heptane / ethyl acetate: 9 / 1): 0.45.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.35 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz), 6.89 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz), 4.65 (dt, 2H,  $J_{\text{H-F}}^2 = 47.2$  Hz,  $J = 6.0$  Hz), 4.59 (s, 2H), 4.09 (t, 2H,  $J = 6.0$  Hz), 2.16 (dq<sup>5</sup>, 2H,  $J_{\text{H-F}}^3 = 25.6$  Hz,  $J = 6.0$  Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  158.2 [C], 133.2 [C], 129.1 [2CH], 114.8 [2CH], 80.6 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J_{\text{C-F}}^1 = 163$  Hz], 64.9 [ $\text{CH}_2$ ], 63.4 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J_{\text{C-F}}^3 = 5$  Hz], 30.3 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J_{\text{C-F}}^2 = 19$  Hz].

**1-(Chloromethyl)-4-(3-fluoropropoxy)benzene (102).**



**102**

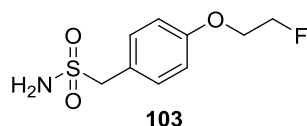


To a solution of **101** (350 mg, 1.90 mmol) in toluene (10 mL), was added thionyl chloride (0.18 mL, 7.60 mmol). The reaction mixture was stirred at 70 °C for 1 h. After cooling to room temperature, the volatiles were evaporated under vacuum. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (heptane / ethyl acetate: 10 / 0 to 9 / 1) to afford **102** (194 mg, 50 %) as a colorless oil.  $R_f$  (heptane / ethyl acetate: 9 / 1): 0.58.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.32 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz), 6.89 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz), 4.65 (dt, 2H,  $J_{\text{H-F}}^2 = 47.2$  Hz,  $J = 6.0$  Hz), 4.57 (s, 2H), 4.10 (t, 2H,  $J = 6.0$  Hz), 2.17 (dq<sup>5</sup>, 2H,  $J_{\text{H-F}}^3 = 26.0$  Hz,  $J = 6.0$  Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  158.7 [C], 129.8 [2CH], 129.6 [C], 114.5 [2CH], 80.5 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J_{\text{C-F}}^1 = 163$  Hz], 63.4 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J_{\text{C-F}}^3 = 5$  Hz], 46.1 [ $\text{CH}_2$ ], 30.2 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J_{\text{C-F}}^2 = 20$  Hz].

**(4-(2-Fluoroethoxy)phenyl)methanesulfonamide (103).**

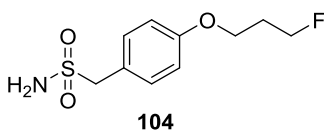


To a solution of **99** (80 mg, 0.42 mmol) in dimethylsulfoxide (0.3 mL), was added **92** (113 mg, 0.51 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 15 min and sodium methoxide (23 mg, 0.42 mmol) in methanol (0.1 mL) was added. The mixture was stirred 15 min more at room temperature. Then, the reaction mixture was cooled to 0 °C and a solution of hydroxylamine-*O*-sulfonic acid (215 mg, 1.91 mmol) and sodium acetate (156 mg, 1.91 mmol) in water (0.6 mL) was added. The mixture was stirred 1 h at 0 °C and overnight at room temperature before being partitioned between water (20 mL) and ethyl acetate (20 mL). The aqueous layer was separated and extracted with ethyl acetate (3 x 50 mL). The combined organic layers were washed with brine (150 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness under vacuum. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (heptane / ethyl acetate: 10 / 0 to 7 / 3) to afford **103** (17 mg, 18 %) as a colorless oil.  $R_f$  (heptane / ethyl acetate: 9 / 1): 0.42.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.29 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz), 6.91 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz), 4.75 (dt, 2H,  $J_{\text{H-F}}^2 = 47.6$  Hz,  $J = 4.4$  Hz), 4.61 (s, 2H), 4.21 (dt, 2H,  $J_{\text{H-F}}^3 = 28.0$  Hz,  $J = 4.4$  Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  157.9 [C], 133.6 [C], 128.6 [2CH], 114.6 [2CH], 81.8 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J_{\text{C-F}}^1 = 169$  Hz], 67.0 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J_{\text{C-F}}^2 = 20$  Hz], 64.8 [ $\text{CH}_2$ ].

**(4-(3-Fluoropropoxy)phenyl)methanesulfonamide (104).**

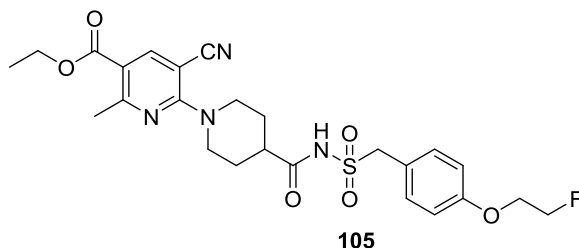


To a solution of **102** (400 mg, 1.97 mmol) in dimethylsulfoxide (1.2 mL), was added **92** (526 mg, 2.37 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 15 min and sodium methoxide (106 mg, 1.97 mmol) in methanol (0.2 mL) was added. The mixture was stirred for another 15 min at room temperature. Then, the reaction mixture was cooled to 0 °C and a solution of hydroxylamine-*O*-sulfonic acid (1.0 g, 8.88 mmol) and sodium acetate (728 mg, 8.88 mmol) in water (2.4 mL) was added. The mixture was stirred 1 h at 0 °C and overnight at room temperature before being partitioned between water (20 mL) and ethyl acetate (20 mL). The aqueous layer was separated and extracted thrice with ethyl acetate (3 x 50 mL). The combined organic layers were washed with brine (150 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness under vacuum. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (heptane / ethyl acetate: 9 / 1 to 7 / 3) to afford **104** (115 mg, 23 %) as a colorless oil.  $R_f$  (heptane / ethyl acetate: 7 / 3): 0.29.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.29 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz), 6.89 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz), 4.65 (dt, 2H,  $J_{\text{H-F}}^2 = 47.2$  Hz,  $J = 6.0$  Hz), 4.61 (s, 2H), 4.10 (t, 2H,  $J = 6.0$  Hz), 2.18 (dq<sup>5</sup>, 2H,  $J_{\text{H-F}}^3 = 25.6$  Hz,  $J = 6.0$  Hz).

$^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  158.3 [C], 133.2 [C], 128.6 [2CH], 114.4 [2CH], 80.6 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J^1_{\text{C-F}} = 163$  Hz], 64.9 [ $\text{CH}_2$ ], 63.3 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J^3_{\text{C-F}} = 5$  Hz], 30.3 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J^2_{\text{C-F}} = 20$  Hz].

**Ethyl 5-cyano-6-(4-(((4-(2-fluoroethoxy)benzyl)sulfonyl)carbamoyl)piperidin-1-yl)-2-methylnicotinate (105).**

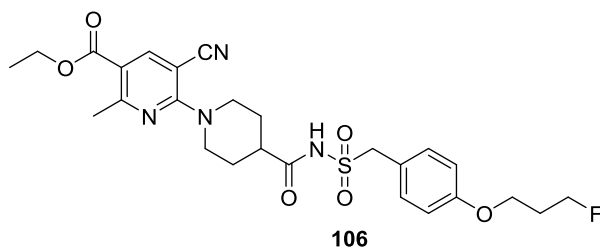


To a solution of **97** (21 mg, 0.066 mmol) and **103** (17 mg, 0.07 mmol) in dichloromethane (2 mL), were added *N,N*-diisopropylethylamine (DIPEA) (50  $\mu\text{L}$ , 0.3 mmol) and *N,N,N',N'*-tetramethyl-*O*-(benzotriazol-1-yl)uroniumtetrafluoroborate (TBTU) (25 mg, 0.08 mmol). The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. Water (10 mL) was then added. The aqueous layer was separated and extracted thrice with dichloromethane (3 x 50 mL). The combined organic layers were washed with a 0.1 M hydrochloric acid aqueous solution (20 mL), a saturated sodium hydrogenocarbonate aqueous solution (20 mL) and with brine (50 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness under vacuum. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (heptane / ethyl acetate: 9 / 1 to 7 / 3) to afford **105** (15 mg, 42 %) as a colorless oil.  $R_f$  (heptane / ethyl acetate: 9 / 1): 0.32.

$^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  8.33 (s, 1H), 7.29 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz), 6.91 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz), 5.07 (s, 2H), 4.75 (dt, 2H,  $J^2_{\text{H-F}} = 47.2$  Hz,  $J = 4.0$  Hz), 4.58 (d broad, 2H,  $J = 13.6$  Hz), 4.30 (q, 2H,  $J = 7.2$  Hz), 4.21 (dt, 2H,  $J^3_{\text{H-F}} = 28.0$  Hz,  $J = 4.0$  Hz), 3.28 - 3.21 (td, 2H,  $J = 13.6, 2.8$  Hz), 2.70 (s, 3H), 2.68 - 2.62 (m, 1H), 2.06 - 2.02 (m, 2H), 1.88 - 1.78 (m, 2H), 1.36 (t, 3H,  $J = 7.2$  Hz).

$^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  173.9 [C], 164.6 [C], 164.3 [C], 158.4 [C], 158.3 [C], 147.7 [CH], 130.0 [2CH], 128.5 [C], 118.0 [C], 114.6 [C], 114.5 [2CH], 88.8 [C], 81.7 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J^1_{\text{C-F}} = 169$  Hz], 67.0 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J^2_{\text{C-F}} = 20$  Hz], 66.1 [ $\text{CH}_2$ ], 60.8 [ $\text{CH}_2$ ], 46.6 [2 $\text{CH}_2$ ], 40.9 [CH], 27.9 [2 $\text{CH}_2$ ], 25.6 [ $\text{CH}_3$ ], 14.2 [ $\text{CH}_3$ ].

**Ethyl 5-cyano-6-(4-(((4-(3-fluoropropoxy)benzyl)sulfonyl)carbamoyl)piperidin-1-yl)-2-methylnicotinate (106).**



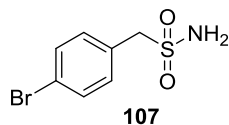
To a solution of **97** (60 mg, 0.19 mmol) and **104** (51.4 mg, 0.21 mmol) in dichloromethane (5 mL), were added *N,N*-diisopropylethylamine (DIPEA) (0.15 mL, 0.85 mmol) and *N,N,N',N'*-tetramethyl-*O*-(benzotriazol-1-yl)uronium tetrafluoroborate (TBTU) (72.8 mg, 0.23 mmol). The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. Water (10 mL) was then added. The aqueous layer was separated and extracted thrice with dichloromethane (3 x 50 mL). The combined organic layers were washed with a 0.1 M hydrochloric acid aqueous solution (20 mL), a saturated sodium hydrogenocarbonate aqueous solution (20 mL) and with brine (50 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness under vacuum. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (heptane / ethyl acetate: 9 / 1 to 7 / 3) to afford **106** (47 mg, 45 %) as a colorless oil.  $R_f$  (heptane / ethyl acetate: 7 / 3): 0.53.

$^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  8.33 (s, 1H), 7.27 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz), 6.89 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz), 5.07 (s, 2H), 4.64 (dt, 2H,  $J^2_{\text{H-F}} = 47.2$  Hz,  $J = 6.0$  Hz), 4.58 (d broad, 2H,  $J = 13.6$  Hz), 4.31 (q, 2H,  $J = 7.2$  Hz), 4.09 (t, 2H,  $J = 6.0$  Hz),

3.25 (td, 2H,  $J = 13.6, 2.8$  Hz), 2.70 (s, 3H), 2.68 - 2.62 (m, 1H), 2.19 (dq<sup>5</sup>, 2H,  $J_{\text{H-F}}^3 = 26.0$  Hz,  $J = 6.0$  Hz), 2.06 - 2.02 (m, 2H), 1.88 - 1.81 (m, 2H), 1.37 (t, 3H,  $J = 7.2$  Hz).

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  173.9 [C], 164.2 [C], 164.3 [C], 158.8 [C], 158.3 [C], 147.7 [CH], 130.0 [2CH], 128.0 [C], 118.0 [C], 114.6 [C], 114.4 [2CH], 88.8 [C], 80.6 [CH<sub>2</sub>, d,  $J_{\text{C-F}}^1 = 164$  Hz], 66.2 [CH<sub>2</sub>], 63.4 [CH<sub>2</sub>, d,  $J_{\text{C-F}}^3 = 5$  Hz], 60.8 [CH<sub>2</sub>], 46.6 [2CH<sub>2</sub>], 40.9 [CH], 30.2 [CH<sub>2</sub>, d,  $J_{\text{C-F}}^2 = 20$  Hz], 27.9 [2CH<sub>2</sub>], 25.6 [CH<sub>3</sub>], 14.2 [CH<sub>3</sub>].

**(4-Bromophenyl)methanesulfonamide (107).**

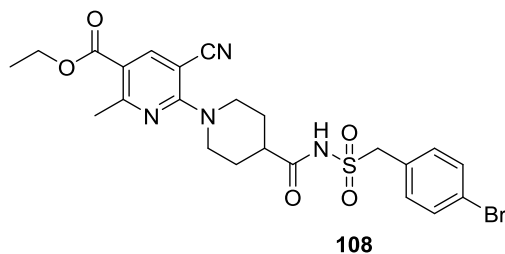


To a solution of **92** (480 mg, 2.16 mmol) in dimethyl sulfoxide (3 mL), was added 1-bromo-4-(bromomethyl)benzene (450 mg, 1.80 mmol). The mixture was stirred 15 min at room temperature and sodium methoxide (98 mg, 1.80 mmol) in methanol (1 mL) was added. The mixture was stirred 15 min more at room temperature. Then, then the reaction mixture was cooled to 0 °C and a solution of hydroxylamine-*O*-sulfonic acid (1.01 g, 9 mmol) and sodium acetate (664 mg, 8.10 mmol) in water (6 mL) was added. The mixture was stirred 1 h at 0 °C and overnight at room temperature before being partitioned between water (20 mL) and ethyl acetate (20 mL). The aqueous layer was extracted thrice with ethyl acetate (3 x 100 mL). The combined organic layers were washed with brine (150 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness under vacuum. The crude was triturated with a 1 / 1 mixture of diethyl ether and ethanol to afford **104** (215 mg, 47 %) as a white solid. Mp: 189 - 191 °C.  $R_f$  (dichloromethane / methanol: 95 / 5): 0.38.

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  7.44 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz), 7.22 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz), 4.18 (s, 2H).

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  135.6 [2CH], 135.0 [2CH], 132.0 [C], 126.1 [C], 63.2 [CH<sub>2</sub>].

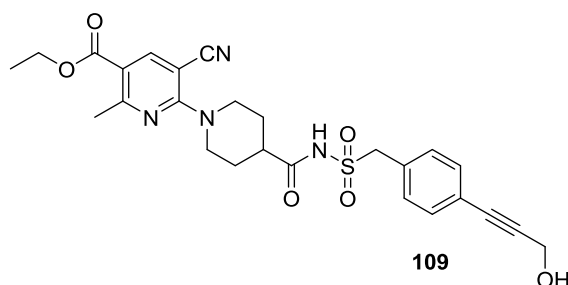
**Ethyl 6-(((4-bromobenzyl)sulfonyl)carbamoyl)piperidin-1-yl)-5-cyano-2-methylnicotinate (108).**



**97** (300 mg, 0.95 mmol) was dissolved in acetonitrile (2 mL). **107** (209 mg, 1.04 mmol), *N,N,N',N'*-tetramethyl-*O*-(benzotriazol-1-yl)uroniumtetrafluoroborate (TBTU) (333 mg, 1.04 mmol), lithium chloride (10 mg, 0.24 mmol) and triethylamine (0.6 mL, 4.25 mmol) were added successively. The reaction mixture was stirred 24 h at room temperature. Then, the mixture was partitioned between water (50 mL) and dichloromethane (50 mL). The aqueous layer was separated and extracted thrice with dichloromethane (3 x 100 mL). The combined organic layers were washed with brine (150 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness under vacuum. The crude was triturated with diethyl ether to afford **108** (223 mg, 47 %) as a beige powder. Mp: 207 - 208 °C.  $R_f$  (dichloromethane / methanol: 95 / 5): 0.58.

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  8.30 (s, 1H), 7.48 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz), 7.19 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz), 4.62 (d broad, 2H,  $J = 13.6$  Hz), 4.55 (s, 2H), 4.26 (q, 2H,  $J = 7.2$  Hz), 3.11 (td, 2H,  $J = 13.6, 3.2$  Hz), 2.78 (s, 3H), 2.42 (m, 1H), 1.84 - 1.72 (m, 4H), 1.33 (t, 3H,  $J = 7.2$  Hz).

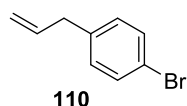
<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  174.0 [C], 164.7 [C], 164.3 [C], 158.3 [C], 147.6 [CH], 132.1 [2CH], 131.8 [2CH], 127.3 [C], 123.4 [C], 117.9 [C], 114.8 [C], 88.8 [C], 60.9 [CH<sub>2</sub>], 57.7 [CH<sub>2</sub>], 46.3 [2CH<sub>2</sub>], 42.4 [CH], 27.6 [2CH<sub>2</sub>], 25.5 [CH<sub>3</sub>], 14.1 [CH<sub>3</sub>].

**Ethyl 5-cyano-6-(4-(((4-(3-hydroxyprop-1-yn-1-yl)benzyl)sulfonyl)carbamoyl)piperidin-1-yl)-2-methyl nicotinate (109).**

To a solution of **108** (600 mg, 1.09 mmol) in dimethylsulfoxide (15 mL), were added propargyl alcohol (80  $\mu$ L, 1.31 mmol), palladium acetate (9 mg, 0.04 mmol), triphenylphosphine (45 mg, 0.17 mmol), and potassium tribasic ( $K_3PO_4$ ) (278 mg, 1.31 mmol). The reaction mixture was stirred at 80 °C for 6 h. After cooling to room temperature, the mixture filtered off on Celite<sup>®</sup> pad. The filtrate was partitioned between water (50 mL) and ethyl acetate (50 mL). The aqueous layer was separated and extracted thrice with ethyl acetate (3 x 50 mL). The combined organic layers were washed with a 1 M hydrochloric acid aqueous solution (20 mL), brine (50 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness under vacuum. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane / methanol: 99 / 1 to 97 / 3) to afford **109** (94 mg, 16 %) as a yellow solid. Mp: 204 - 207 °C.  $R_f$  (dichloromethane / methanol: 95 / 5): 0.48.

$^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz):  $\delta$  8.29 (s, 1H), 7.38 (d, 2H,  $J = 8.0$  Hz), 7.24 (d, 2H,  $J = 8.0$  Hz), 4.60 (d broad, 2H,  $J = 13.6$  Hz), 4.57 (s, 2H), 4.29 (s, 2H), 4.25 (q, 2H,  $J = 7.2$  Hz), 3.10 (td, 2H,  $J = 13.6$  Hz, 3.6 Hz), 2.67 (s, 3H), 2.42 - 2.35 (m, 1H), 1.81 - 1.73 (m, 4H), 1.32 (t, 3H,  $J = 7.2$  Hz).

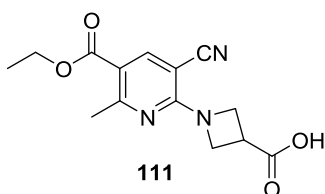
$^{13}C$ -NMR ( $CDCl_3$ , 100 MHz):  $\delta$  174.1 [C], 164.7 [C], 164.4 [C], 158.3 [C], 147.7 [CH], 131.8 [2CH], 130.5 [2CH], 128.4 [C], 123.7 [C], 117.9 [C], 114.7 [C], 89.0 [C], 88.7 [C], 83.9 [C], 60.9 [CH<sub>2</sub>], 58.0 [CH<sub>2</sub>], 50.7 [CH<sub>2</sub>], 46.3 [2CH<sub>2</sub>], 42.4 [CH], 27.7 [2CH<sub>2</sub>], 25.6 [CH<sub>3</sub>], 14.1 [CH<sub>3</sub>].

**1-Allyl-4-bromobenzene (110).**

To a solution of 4-bromobenzyle bromide (500 mg, 2.00 mmol) in toluene (10 mL), were added tributyl(vinyl)stannane (0.88 mL, 3.00 mmol), copper iodide (3 mg, 0.08 mmol) and palladium tetrakis(triphenylphosphine) ( $Pd(PPh_3)_4$ ) (56 mg, 0.08 mmol). The reaction mixture was stirred at 120 °C for 5 h. After cooling to room temperature, the mixture was partitioned between water (50 mL) and ethyl acetate (50 mL). The aqueous layer was separated and extracted thrice with ethyl acetate (3 x 50 mL). The combined organic layers were washed with brine (50 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness under vacuum. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (heptane / diethyl ether: 100 / 0 to 98 / 2) to afford **110** (78 mg, 19 %) as a colorless oil.  $R_f$  (heptane / diethyl ether: 90 / 10): 0.64.

$^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.35 (d, 2H,  $J = 8.0$  Hz), 7.06 (d, 2H,  $J = 8.0$  Hz), 6.00 - 5.88 (m, 1H), 5.21-5.05 (m, 2H) 3.34 (d, 2H,  $J = 6.4$  Hz).

$^{13}C$ -NMR ( $CDCl_3$ , 100 MHz):  $\delta$  138.9 [C], 136.7 [CH], 131.4 [2CH], 130.3 [2CH], 119.8 [C], 116.2 [CH<sub>2</sub>], 39.4 [CH<sub>2</sub>].

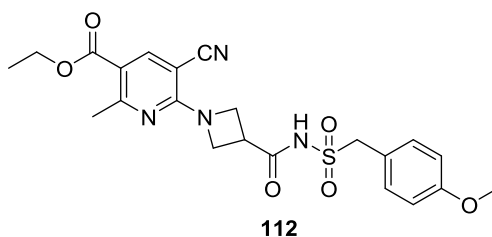
**1-(3-Cyano-5-(ethoxycarbonyl)-6-methylpyridin-2-yl)azetidine-3-carboxylic acid (111).**

To a solution of **89** (800 mg, 3.57 mmol) in ethanol (5 mL), were added azetidine carboxylic acid (397 mg, 3.93 mmol) and *N,N*-diisopropylethylamine (DIPEA) (1.87 mL, 10.71 mmol). The reaction mixture was heated at reflux for 3 h. After cooling to room temperature a 0.4 M potassium bisulfate aqueous solution was added. A precipitate appeared. It was filtered off, washed with water and ethanol and dried under vacuum to afford **111** (758 mg, 73 %) as a yellow solid. Mp: 190 - 191 °C.  $R_f$  (dichloromethane / methanol: 95 / 5): 0.23.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  8.20 (s, 1H), 4.52 - 4.50 (m, 4H), 4.23 (q, 2H,  $J = 7.2$  Hz), 3.49 (q<sup>5</sup>, 1H,  $J = 7.2$  Hz), 2.64 (s, 3H), 1.31 (t, 3H,  $J = 7.2$  Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  174.2 [C], 165.3 [C], 164.9 [C], 157.8 [C], 146.1 [CH], 116.9 [C], 113.9 [C], 86.2 [C], 60.8 [2CH<sub>2</sub>], 54.0 [CH<sub>2</sub>], 32.9 [CH], 25.4 [CH<sub>3</sub>], 14.0 [CH<sub>3</sub>].

**Ethyl 5-cyano-6-(3-(((4-methoxybenzyl)sulfonyl)carbamoyl)azetidin-1-yl)-2-methylnicotinate (112).**

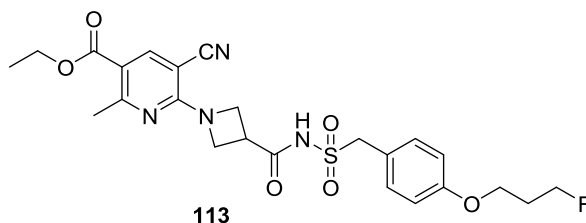


To a solution of **111** (150 mg, 0.52 mmol) and **93** (125 mg, 0.62 mmol) in acetonitrile (5 mL), were added trimethylamine (0.32 mL, 2.33 mmol), lithium chloride (5 mg, 0.13 mmol) and *N,N,N',N'*-tetramethyl-*O*-(benzotriazol-1-yl)uronium tetrafluoroborate (TBTU) (174 mg, 0.54 mmol). The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. Water (10 mL) was then added. The aqueous layer was separated and extracted thrice with dichloromethane (3 x 50 mL). The combined organic layers were washed with a 1 M hydrochloric acid aqueous solution (20 mL), a saturated sodium hydrogenocarbonate aqueous solution (20 mL) and with brine (50 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness under vacuum. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane / methanol: 98 / 2 to 97 / 3) to afford **112** (48 mg, 19 %) as a colorless oil. Mp: 195 - 196 °C.  $R_f$  (dichloromethane / methanol: 95 / 5): 0.26.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  8.22 (s, 1H), 7.23 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz), 6.84 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz), 4.53 (s, 2H), 4.45 - 4.37 (m, 4H), 4.26 (q, 2H,  $J = 7.2$  Hz), 3.75 (s, 3H), 3.40 - 3.32 (m, 1H), 2.66 (s, 3H), 1.32 (t, 3H,  $J = 7.2$  Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  171.2 [C], 165.3 [C], 164.8 [C], 160.2 [C], 157.8 [C], 146.1 [CH], 131.7 [2CH], 120.0 [C], 116.9 [C], 114.3 [C], 114.1 [2CH], 86.2 [C], 60.9 [CH<sub>2</sub>], 57.9 [CH<sub>2</sub>], 55.2 [CH<sub>3</sub>], 53.2 [2CH<sub>2</sub>], 34.1 [CH], 25.4 [CH<sub>3</sub>], 14.1 [CH<sub>3</sub>].

**Ethyl 5-cyano-6-(3-(((4-(3-fluoropropoxy)benzyl)sulfonyl)carbamoyl)azetidin-1-yl)-2-methylnicotinate (113).**



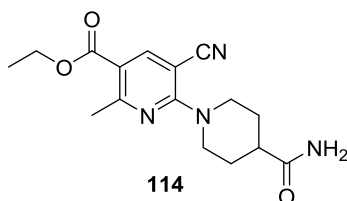
To a solution of **111** (30 mg, 0.10 mmol) and **104** (28.2 mg, 0.11 mmol) in dichloromethane (2 mL), were added *N,N*-diisopropylethylamine (DIPEA) (80  $\mu\text{L}$ , 0.47 mmol) and *N,N,N',N'*-tetramethyl-*O*-(benzotriazol-1-yl)uronium tetrafluoroborate (TBTU) (40 mg, 0.12 mmol). The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. Water (10 mL) was then added. The aqueous layer was separated and extracted thrice with dichloromethane (3 x 50 mL). The combined organic layers were washed with a 0.1 M hydrochloric acid aqueous solution (20 mL), an aqueous solution of sodium hydrogenocarbonate (20 mL) and with brine (50 mL), dried over sodium sulfate, filtered

and concentrated to dryness under vacuum. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (heptane / ethyl acetate: 9 / 1 to 7 / 3) to afford **113** (12 mg, 22 %) as a colorless oil.  $R_f$  (heptane / ethyl acetate: 7 / 3): 0.47.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  8.26 (s, 1H), 7.30 (d, 2H,  $J = 8.8$  Hz), 6.90 (d, 2H,  $J = 8.8$  Hz), 5.13 (s, 2H), 4.64 (dt, 2H,  $J_{\text{H-F}} = 47.2$  Hz,  $J = 6.0$  Hz), 4.60 - 4.54 (m, 4H), 4.30 (q, 2H,  $J = 7.2$  Hz), 4.10 (t, 2H,  $J = 6.0$  Hz), 3.61 - 3.54 (m, 1H), 2.70 (s, 3H), 2.17 (dq<sup>5</sup>, 2H,  $J_{\text{H-F}} = 26.0$  Hz,  $J = 6.0$  Hz), 1.37 (t, 3H,  $J = 7.2$  Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  171.9 [C], 165.3 [C], 164.8 [C], 159.0 [C], 157.8 [C], 146.0 [CH], 130.3 [2CH], 127.4 [C], 117.0 [C], 114.5 [2CH], 114.2 [C], 86.5 [C], 80.6 [CH<sub>2</sub>, d,  $J_{\text{C-F}} = 164$  Hz], 67.0 [CH<sub>2</sub>], 63.4 [CH<sub>2</sub>, d,  $J_{\text{C-F}} = 5$  Hz], 60.8 [CH<sub>2</sub>], 53.9 [2CH<sub>2</sub>], 33.1 [CH], 30.2 [CH<sub>2</sub>, d,  $J_{\text{C-F}} = 20$  Hz], 25.6 [CH<sub>3</sub>], 14.2 [CH<sub>3</sub>].

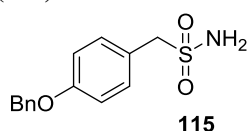
#### Ethyl 6-(4-carbamoylpiperidin-1-yl)-5-cyano-2-methylnicotinate (**114**).



To a solution of **96** (100 mg, 0.20 mmol) in toluene (5 mL), was added aluminum chloride ( $\text{AlCl}_3$ ) (80 mg, 0.60 mmol). The reaction mixture was stirred at 70 °C for 2 h and then overnight at 50 °C. After cooling to room temperature, methanol (2 mL) was added and the mixture was partitioned between water (25 mL) and ethyl acetate (25 mL). The aqueous layer was separated and extracted with ethyl acetate (3 x 50 mL). The combined organic layers were washed with a 1 M hydrochloric acid aqueous solution (100 mL), with brine (100 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness under vacuum. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane / methanol: 98 / 2 to 97 / 3) to afford **114** (23 mg, 23 %) as a white sticky solid.  $R_f$  (dichloromethane / methanol: 95 / 5): 0.65.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  8.34 (s, 1H), 5.51 (s broad, 2H), 4.76 - 4.72 (m, 2H), 4.31 (q, 2H,  $J = 7.2$  Hz), 3.18 (d broad, 2H,  $J = 13.6$  Hz), 2.71 (s, 3H), 2.76 - 2.46 (m, 1H), 2.01 (td, 2H,  $J = 13.6, 2.4$  Hz), 1.89 - 1.82 (m, 2H), 1.37 (t, 3H,  $J = 7.2$  Hz).

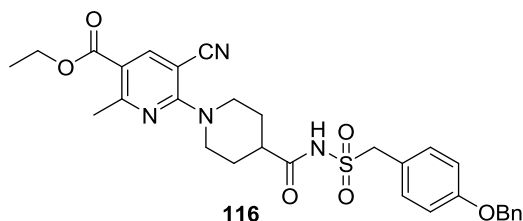
#### (4-(Benzyloxy)phenyl)methanesulfonamide (**115**).



To a suspension of **92** (573 mg, 2.58 mmol) in dimethyl sulfoxide (5 mL), was added 4-(benzyloxy)benzyl chloride (500 mg, 2.15 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 15 min. Then, a solution of sodium methoxide (116 mg, 2.15 mmol) in methanol (2 mL) was added. The mixture was stirred 15 min. The mixture was cold to 0 °C and a solution of sodium acetate (793 mg, 9.67 mmol), and hydroxylamine-*O*-sulfonic acid (1.09 g, 9.67 mmol) in water (10 mL) was added and the reaction mixture was stirred overnight at room temperature. The formed precipitated was filtered off, washed with water and dried under vacuum to afford **115** (581 mg, 97 %). Mp: 283 - 284 °C.  $R_f$  (dichloromethane / methanol: 95 / 5): 0.35.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.42 - 7.28 (m, 5H), 6.99 (d, 2H,  $J = 8.8$  Hz), 7.22 (d, 2H,  $J = 8.8$  Hz), 6.75 (s broad, 2H), 5.07 (s, 2H), 4.16 (s, 2H).

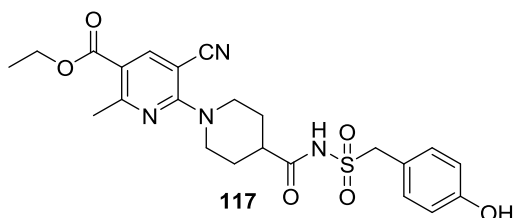
$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  158.5 [C], 137.4 [C], 132.2 [2CH], 129.5 [2CH], 128.8 [CH], 127.9 [2CH], 123.3 [C], 114.8 [2CH], 69.5 [CH<sub>2</sub>], 59.8 [CH<sub>2</sub>].

**Ethyl 6-(((4-bromobenzyl)sulfonyl)carbamoyl)piperidin-1-yl)-5-cyano-2-methylnicotinate (116).**

To a solution of **97** (500 mg, 1.58 mmol) in dichloromethane (15 mL), were added successively, **115** (348 mg, 1.73 mmol), *N,N,N',N'*-tetramethyl-*O*-(benzotriazol-1-yl)uroniumtetrafluoroborate (TBTU) (607 mg, 1.89 mmol), and *N,N*-diisopropylethylamine (DIPEA) (1.23 mL, 7.09 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 2 days. Then it was partitioned between water (50 mL) and ethyl acetate (50 mL). The aqueous layer was separated and extracted thrice with ethyl acetate (3 x 50 mL). The combined organic layers were washed with a 1 M hydrochloric acid aqueous solution (100 mL), with brine (100 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness under vacuum. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane / methanol: 98 / 2) to afford **116** (279 mg, 30 %) as a beige solid. Mp: 185 - 187 °C.  $R_f$  (dichloromethane / methanol: 95 / 5): 0.35.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  8.13 (s, 1H), 7.39 - 7.26 (m, 5H), 7.21 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz), 6.93 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz), 5.03 (s, 2H), 4.61 (d broad, 2H,  $J = 13.6$  Hz), 4.53 (s, 2H), 4.28 (q, 2H,  $J = 6.8$  Hz), 3.12 (td, 2H,  $J = 13.6, 3.6$  Hz), 2.85 (s, 3H), 2.43 - 2.36 (m, 1H), 1.80 - 1.72 (m, 4H), 1.34 (t, 3H,  $J = 6.8$  Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  173.9 [C], 164.7 [C], 164.3 [C], 159.2 [C], 158.3 [C], 147.6 [CH], 136.4 [C], 131.8 [2CH], 128.5 [2CH], 128.0 [CH], 127.3 [2CH], 120.4 [C], 117.9 [C], 115.0 [2CH], 114.8 [C], 88.8 [C], 69.8 [CH<sub>2</sub>], 60.9 [CH<sub>2</sub>], 57.7 [CH<sub>2</sub>], 46.3 [2CH<sub>2</sub>], 42.4 [CH], 27.7 [2CH<sub>2</sub>], 25.6 [CH<sub>3</sub>], 14.1 [CH<sub>3</sub>].

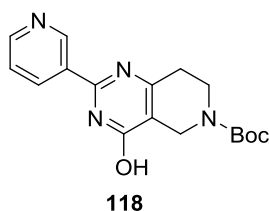
**Ethyl 5-cyano-6-(4-(((4-hydroxybenzyl)sulfonyl)carbamoyl)piperidin-1-yl)-2-methylnicotinate (117).**

To a solution of **116** (260 mg, 0.45 mmol) in trifluoroacetic acid (5 mL) at 0 °C, were added bromotrimethylsilane (70  $\mu\text{L}$ , 0.56 mmol) and thioanisole (0.26 mL, 2.25 mmol). The reaction mixture was stirred 1 h at 0 °C. Then, a saturated sodium bicarbonate aqueous solution was added until pH 9. A precipitate appeared. It was filtered off, washed with ethanol and dried under vacuum to afford **117** (83 mg, 38 %) as a white powder. Mp: 152 - 153 °C.  $R_f$  (dichloromethane / methanol: 95 / 5): 0.53.

$^1\text{H-NMR}$  (Acetone- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  8.56 (s broad, 1H), 8.35 (s, 1H), 7.17 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz), 6.84 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz), 4.68 (d broad, 2H,  $J = 13.6$  Hz), 4.57 (s, 3H), 4.28 (q, 2H,  $J = 7.2$  Hz), 3.20 (td, 2H,  $J = 13.6, 3.6$  Hz), 2.80 - 2.72 (m, 1H), 2.69 (s, 3H), 2.00 - 1.95 (m, 2H), 1.87 - 1.78 (m, 2H), 1.34 (t, 3H,  $J = 7.2$  Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$  (Acetone- $d_6$ , 100 MHz):  $\delta$  175.0 [C], 164.2 [C], 163.2 [C], 158.4 [C], 157.8 [C], 174.2 [CH], 131.9 [2CH], 120.1 [C], 117.5 [C], 115.1 [2CH], 114.4 [C], 89.0 [C], 61.4 [CH<sub>2</sub>], 57.1 [CH<sub>2</sub>], 46.4 [2CH<sub>2</sub>], 42.2 [CH], 28.00 [2CH<sub>2</sub>], 24.8 [CH<sub>3</sub>], 13.5 [CH<sub>3</sub>].

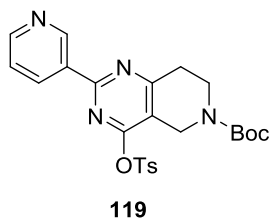
HR-ESI (+)-MS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}$ : 487.1646  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , found 487.1654.

***tert*-Butyl 4-hydroxy-2-(pyridin-3-yl)-7,8-dihydropyrido[4,3-*d*]pyrimidine-6(5*H*)-carboxylate (**118**).**

*N*-Boc-3-carboethoxy-4-piperidone (7.0 g, 25.80 mmol) and 3-amidinopyridinium chloride (4.06 g, 25.80 mmol) were dissolved in methanol (250 mL). Potassium carbonate (8.9 g, 64.50 mmol) was added and the reaction mixture was stirred at reflux for 4 h. After cooling to room temperature, the volatiles were removed under vacuum. The residue was partitioned between water (100 mL) and ethyl acetate (100 mL). The aqueous layer was separated and extracted thrice with ethyl acetate (3 x 150 mL). The combined organic layers were washed with brine (200 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness under vacuum. The residue was triturated in diethyl ether to afford **118** (7.35 g, 87 %) as a white solid. Mp: 250 - 253 °C. *R<sub>f</sub>* (dichloromethane / methanol: 90 / 10): 0.42.

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz): δ 9.16 (s, 1H), 8.68 (d, 1H, *J* = 4.8 Hz), 8.36 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz), 7.51 (dd, 1H, *J* = 7.6, 4.8 Hz), 4.19 (s, 2H), 3.58 (s broad, 2H), 2.65 (s broad, 2H), 1.41 (s, 9H).

<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz): δ 162.1 [C], 158.6 [C], 154.3 [C], 153.5 [C], 152.1 [CH], 148.9 [CH], 135.5 [CH], 128.9 [C], 123.8 [CH], 117.0 [C], 79.6 [C], 40.8 [CH<sub>2</sub>], 40.5 [CH<sub>2</sub>], 30.8 [CH<sub>2</sub>], 28.4 [3CH<sub>3</sub>].

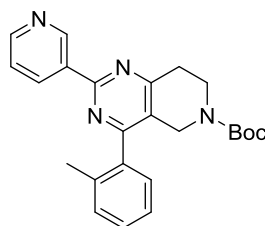
***tert*-Butyl 2-(pyridin-3-yl)-4-(tosyloxy)-7,8-dihydropyrido[4,3-*d*]pyrimidine-6(5*H*)-carboxylate (**119**).**

To a solution of **118** (7.35 g, 22.38 mmol) in dichloromethane (250 mL), were added tosyl chloride (5.12 g, 26.86 mmol) and triethylamine (9.44 mL, 67.15 mmol). The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. After cooling to room temperature, water (150 mL) was added. The aqueous layer was separated and extracted thrice with dichloromethane (3 x 150 mL). The combined organic layers were washed with brine (200 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness under vacuum. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (toluene / acetone: 91 / 10 to 70 / 30) to afford **119** (9.59 g, 88 %) as an orange foam. Mp: 149 - 152 °C. *R<sub>f</sub>* (toluene / acetone: 90 / 10): 0.46.

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 9.30 (s, 1H), 8.68 (d, 1H, *J* = 4.8 Hz), 8.44 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz), 8.03 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz), 7.41 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz), 7.36 (dd, 1H, *J* = 7.6, 4.8 Hz), 4.61 (s, 2H), 3.77 (t, 2H, *J* = 5.6 Hz), 2.99 (t, 2H, *J* = 5.6 Hz), 2.48 (s, 3H), 1.51 (s, 9H).

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): δ 161.1 [C], 160.0 [C], 154.3 [C], 151.2 [CH], 149.5 [CH], 145.9 [C], 135.6 [CH], 135.0 [C], 134.0 [C], 131.9 [C], 129.7 [2CH], 128.7 [2CH], 123.3 [CH], 115.3 [C], 80.8 [C], 41.7 [CH<sub>2</sub>], 40.6 [CH<sub>2</sub>], 31.8 [CH<sub>2</sub>], 28.3 [3CH<sub>3</sub>], 21.7 [CH<sub>3</sub>].

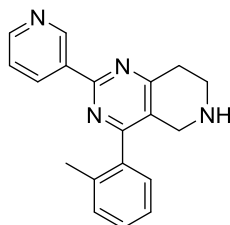


***tert*-Butyl 2-(pyridin-3-yl)-4-(*o*-tolyl)-7,8-dihydropyrido[4,3-*d*]pyrimidine-6(5*H*)-carboxylate (**120**)****120**

To a solution of **119** (4.79 g, 9.93 mmol) in dioxane (200 mL) and water (3 mL), were added successively potassium tribasic ( $K_3PO_4$ ) (9.48 g, 44.67 mmol), tolylboronic acid (4.04 g, 29.78 mmol), palladium acetate (490 mg, 2.18 mmol), and CyJohnPhos (1.04 g, 2.98 mmol). The reaction mixture was stirred at 90 °C for 6 h. After cooling to room temperature, the mixture was filtered off through a pad of Celite<sup>®</sup> and the filtrate was partitioned between an aqueous saturated solution of sodium hydrogenocarbonate (100 mL) and ethyl acetate (100 mL). The aqueous layer was separated and extracted thrice with ethyl acetate (3 x 150 mL). The combined organic layers were washed with brine (200 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness under vacuum. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (toluene / acetone: 90 / 10 to 85 / 15 to afford **120** (1.58 g, 40 %) an orange oil.  $R_f$  (toluene / acetone: 80 / 20): 0.31.

$^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz):  $\delta$  9.61 (d, 1H,  $J = 1.6$  Hz), 8.72 (dd, 1H,  $J = 8.0, 1.6$  Hz), 8.66 (dd, 1H,  $J = 4.8, 1.6$  Hz), 7.40 - 7.28 (m, 4H), 7.19 (d, 1H,  $J = 7.2$  Hz), 4.31 (s, 2H), 3.79 (t, 2H,  $J = 6.0$  Hz), 3.11 (t, 2H,  $J = 6.0$  Hz), 2.19 (s, 3H), 1.44 (s, 9H).

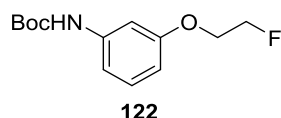
$^{13}C$ -NMR ( $CDCl_3$ , 100 MHz):  $\delta$  164.3 [C], 160.2 [C], 154.3 [C], 150.6 [CH], 149.5 [CH], 136.2 [C], 135.7 [CH], 135.0 [C], 133.2 [C], 132.9 [C], 130.8 [CH], 129.1 [CH], 127.5 [CH], 126.0 [CH], 124.0 [C], 123.3 [CH], 80.4 [C], 42.6 [ $CH_2$ ], 40.8 [ $CH_2$ ], 32.1 [ $CH_2$ ], 28.2 [ $3CH_3$ ], 19.4 [ $CH_3$ ].

**2-(Pyridin-3-yl)-4-(*o*-tolyl)-5,6,7,8-tetrahydropyrido[4,3-*d*]pyrimidine (**121**)****121**

To a solution of **120** (1.50 g, 3.73 mmol) in dichloromethane (150 mL), was added trifluoroacetic acid (5 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 4 h. The volatiles were removed under vacuum. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane / methanol: 95 / 5 to 91 / 10) to afford **121** (1.04 g, 93 %) as a pale yellow foam. Mp: 78 - 80 °C.  $R_f$  (dichloromethane / methanol: 90 / 10): 0.44.

$^1H$ -NMR ( $MeOD-d_4$ , 400 MHz):  $\delta$  9.65 (s, 1H), 9.17 (d, 1H,  $J = 8.4$  Hz), 8.82 (s broad, 1H), 7.89 (dd, 1H,  $J = 8.4, 5.6$  Hz), 7.48 - 7.46 (m, 2H), 7.38 (td, 1H,  $J = 7.6, 1.6$  Hz), 7.28 (d, 1H,  $J = 7.6$  Hz), 4.18 (s, 2H), 3.72 (t, 2H,  $J = 6.4$  Hz), 3.42 (t, 2H,  $J = 6.4$  Hz), 2.22 (s, 3H).

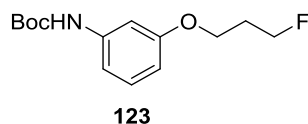
$^{13}C$ -NMR ( $MeOD-d_4$ , 100 MHz):  $\delta$  166.4 [C], 162.2 [C], 159.9 [C], 148.6 [CH], 146.8 [CH], 138.0 [CH], 135.3 [C], 135.2 [C], 133.9 [C], 130.7 [CH], 129.5 [CH], 127.4 [CH], 125.8 [CH], 124.6 [CH], 120.3 [C], 41.8 [ $CH_2$ ], 40.6 [ $CH_2$ ], 28.0 [ $CH_2$ ], 18.0 [ $CH_3$ ].

**tert-Butyl (3-(2-fluoroethoxy)phenyl)carbamate (122).**

To a solution of *N*-Boc-aminophenol (500 mg, 2.39 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (20 mL) were added potassium carbonate (659 mg, 4.77 mmol) and fluoroethyltosylate (625 mg, 2.86 mmol). The reaction mixture was stirred 2 days at 70 °C. After cooling to room temperature, the mixture was partitioned between water (50 mL) and ethyl acetate (50 mL). The aqueous layer was separated and extracted thrice with ethyl acetate (3 x 50 mL). The combined organic layers were washed with water (100 mL) and with brine (100 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness under vacuum. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (heptane / ethyl acetate: 9 / 1 to 8 / 2) to afford **122** (444 mg, 82 %) as white solid. Mp: 84 - 85 °C.  $R_f$  (heptane / ethyl acetate: 1 / 1): 0.52.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.19 - 7.15 (m, 2H), 6.82 (dd, 1H,  $J = 8.0, 0.8$  Hz), 6.60 (dd, H,  $J = 8.0, 1.6$  Hz), 6.51 (s broad, 1H), 4.73 (dt, 2H,  $J^2_{\text{H-F}} = 47.6$  Hz,  $J = 4.4$  Hz), 4.20 (dt, 2H,  $J^3_{\text{H-F}} = 28.0$  Hz,  $J = 4.4$  Hz), 1.51 (s, 9H).

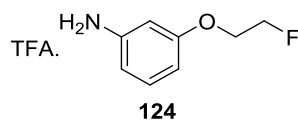
$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  158.9 [C], 152.5 [C], 139.6 [C], 129.6 [CH], 111.1 [CH], 109.6 [CH], 104.6 [CH], 81.8 [CH<sub>2</sub>, d,  $J^1_{\text{C-F}} = 169$  Hz], 80.5 [C], 67.0 [CH<sub>2</sub>, d,  $J^2_{\text{C-F}} = 20$  Hz], 28.3 [3CH<sub>3</sub>].

**tert-Butyl (3-(3-fluoropropoxy)phenyl)carbamate (123).**

To a solution of *N*-Boc-aminophenol (400 mg, 1.91 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (15 mL) were added potassium carbonate (527 mg, 3.82 mmol) and fluoroethyltosylate (532 mg, 2.29 mmol). The reaction mixture was stirred overnight at 70 °C. After cooling to room temperature, the mixture was partitioned between water (25 mL) and ethyl acetate (25 mL). The mixture was extracted thrice with ethyl acetate (3 x 50 mL). The combined organic layers were washed with water (100 mL) and with brine (100 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness under vacuum. The crude was purified on silica gel chromatography (heptane / ethyl acetate: 9 / 1 to 8 / 2) to afford **123** (492 mg, 95 %) as a white solid. Mp: 74 - 76 °C.  $R_f$  (heptane / ethyl acetate: 2 / 1): 0.55.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.18 - 7.14 (m, 2H), 6.79 (dd, 1H,  $J = 8.0, 1.2$  Hz), 6.58 (dd, 1H,  $J = 8.0, 1.8$  Hz), 6.49 (s broad, 1H), 4.63 (dt, 2H,  $J^2_{\text{H-F}} = 46.8$  Hz,  $J = 5.6$  Hz), 4.08 (t, 2H,  $J = 5.6$  Hz), 2.15 (dq<sup>5</sup>, 2H,  $J^3_{\text{H-F}} = 25.6$  Hz,  $J = 5.6$  Hz), 1.51 (s, 9H).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  159.4 [C], 152.5 [C], 139.5 [C], 129.5 [CH], 110.7 [CH], 109.1 [CH], 104.7 [CH], 80.7 [CH<sub>2</sub>, d,  $J^1_{\text{C-F}} = 163$  Hz], 80.4 [C], 63.3 [CH<sub>2</sub>, d,  $J^3_{\text{C-F}} = 5$  Hz], 30.3 [CH<sub>2</sub>, d,  $J^2_{\text{C-F}} = 20$  Hz], 28.5 [3CH<sub>3</sub>].

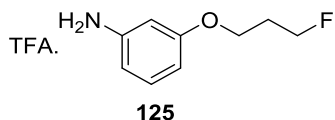
**3-(2-Fluoroethoxy)aniline.TFA (124).**

To a solution of **122** (400 mg, 1.49 mmol) in dichloromethane (10 mL), was added trifluoroacetic acid (1 mL). The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. The volatile were removed under vacuum. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane / methanol: 98 / 2 to 97 / 3) to afford **124** (251 mg, 48 %) as an orange oil.  $R_f$  (dichloromethane / methanol: 95 / 5): 0.56.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  9.04 (s broad, 1H, TFA), 7.36 (t, 1H,  $J = 8.0$  Hz), 7.02 (d, 1H,  $J = 8.0$  Hz), 6.94 - 6.92 (m, 2H), 4.70 (dt, 2H,  $J_{\text{H-F}}^2 = 47.2$  Hz,  $J = 3.6$  Hz), 4.15 (dt, 2H,  $J_{\text{H-F}}^3 = 28.0$  Hz,  $J = 3.6$  Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  159.3 [C], 158.8 [C, q,  $J_{\text{C-F}}^2 = 37$  Hz, TFA], 130.3 [CH], 120.1 [C, q,  $J_{\text{C-F}}^1 = 200$  Hz, TFA], 115.9 [C], 112.9 [CH], 110.1 [CH], 105.7 [CH], 81.7 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J_{\text{C-F}}^1 = 169$  Hz], 67.0 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J_{\text{C-F}}^2 = 20$  Hz].

### 3-(3-Fluoropropoxy)aniline.TFA (125).

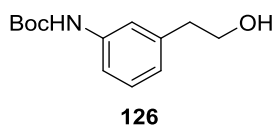


To a solution of **123** (400 mg, 1.49 mmol) in dichloromethane (10 mL), was added trifluoroacetic acid (0.5 mL). The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. The volatiles were removed under vacuum. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane / methanol: 98 / 2 to 97 / 3) to afford **125** (357 mg, 84 %) as a pale orange oil.  $R_f$  (dichloromethane / methanol: 95 / 5): 0.56.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  10.1 (s broad, 1H, TFA), 7.24 - 7.20 (m, 1H), 6.88 - 6.66 (m, 3H), 4.60 (dt, 2H,  $J_{\text{H-F}}^2 = 47.2$  Hz,  $J = 5.6$  Hz), 4.02 (t, 2H,  $J = 5.6$  Hz), 2.06 (dq<sup>5</sup>, 2H,  $J_{\text{H-F}}^3 = 25.6$  Hz,  $J = 5.6$  Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ , 100 MHz):  $\delta$  159.5 [C], 158.6 [C, q,  $J_{\text{C-F}}^2 = 34$  Hz, TFA], 138.6 [C], 130.8 [CH], 116.6 [C, q,  $J_{\text{C-F}}^1 = 293$  Hz, TFA], 115.2 [CH], 113.0 [CH], 106.9 [CH], 81.1 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J_{\text{C-F}}^1 = 161$  Hz], 63.9 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J_{\text{C-F}}^3 = 5$  Hz], 30.0 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J_{\text{C-F}}^2 = 19$  Hz].

### *tert*-Butyl (3-(2-hydroxyethyl)phenyl)carbamate (126).

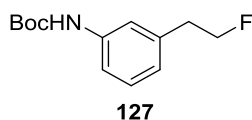


To a solution of 2-(3-aminophenyl)ethan-1-ol (1.0 g, 7.29 mmol) in dichloromethane (5 mL), was added di-*tert*-butyl dicarbonate (3.18 g, 14.58 mmol). The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. Water (100 mL) was added, then the aqueous layer was separated and extracted thrice with dichloromethane (3 x 100 mL). The combined organic layers were washed with brine (150 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness under vacuum. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (heptane / ethyl acetate: 8 / 2 to 7 / 3) to afford **126** (599 mg, 35 %) as a pale orange oil.  $R_f$  (heptane / ethyl acetate: 1 / 1): 0.50.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.30 (s, 1H), 7.23 - 7.15 (m, 2H), 6.89 (d, 1H,  $J = 7.2$  Hz), 6.55 (s broad, 1H), 3.84 (t, 2H,  $J = 6.0$  Hz), 2.83 (t, 2H,  $J = 6.0$  Hz), 1.51 (s, 9H).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  152.8 [C], 139.5 [C], 138.5 [C], 129.0 [CH], 123.7 [CH], 119.0 [CH], 116.6 [CH], 80.5 [C], 63.4 [ $\text{CH}_2$ ], 39.1 [ $\text{CH}_2$ ], 28.3 [3 $\text{CH}_3$ ].

### *tert*-Butyl (3-(2-fluoroethyl)phenyl)carbamate (127).

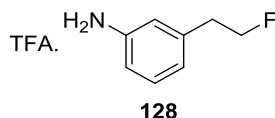


To a solution of **126** (60 mg, 0.25 mmol) in dichloromethane (5 mL), was added Deoxo-Fluor<sup>®</sup> (0.2 mL). The reaction mixture was stirred 30 min at 0 °C, then the volatiles were removed under vacuum. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (heptane / ethyl acetate: 8 / 2 to 7 / 3) to afford **127** (29 mg, 49 %) as a pale orange oil.  $R_f$  (heptane / ethyl acetate: 7 / 3): 0.76.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.33 (s, 1H), 7.23 (t, 1H,  $J = 7.6$  Hz), 7.16 (d, 1H,  $J = 7.6$  Hz), 6.91 (d, 1H,  $J = 7.6$  Hz), 6.46 (s broad, 1H), 4.62 (dt, 2H,  $J^2_{\text{H-F}} = 47.2$  Hz,  $J = 6.8$  Hz), 2.98 (dt, 2H,  $J^3_{\text{H-F}} = 22.8$  Hz,  $J = 6.8$  Hz), 1.51 (s, 9H).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  152.6 [C], 138.4 [C], 137.9 [C, d,  $J^3_{\text{C-F}} = 6$  Hz], 129.0 [CH], 123.5 [CH], 118.8 [CH], 116.7 [CH], 83.9 [CH<sub>2</sub>, d,  $J^1_{\text{C-F}} = 168$  Hz], 80.4 [C], 36.8 [CH<sub>2</sub>, d,  $J^2_{\text{C-F}} = 20$  Hz], 28.2 [3CH<sub>3</sub>].

### 3-(2-Fluoroethyl)aniline.TFA (128).

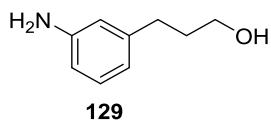


To a solution of **127** (270 mg, 1.13 mmol) in dichloromethane (5 mL) was added trifluoroacetic acid (1 mL). The reaction mixture was stirred overnight at room temperature, then the volatiles were removed under vacuum to afford **128** (180 mg, 64 %) as colorless oil.  $R_f$  (heptane / ethyl acetate: 1 / 1): 0.24.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  10.1 (s broad, 1H, TFA), 7.36 - 7.29 (m, 2H), 7.22 - 7.17 (m, 2H), 4.58 (dt, 2H,  $J^2_{\text{H-F}} = 47.2$  Hz,  $J = 6.0$  Hz), 2.97 (dt, 2H,  $J^3_{\text{H-F}} = 26.4$  Hz,  $J = 6.0$  Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  158.6 [C, q,  $J^2_{\text{C-F}} = 30$  Hz, TFA], 140.2 [C], 130.1 [CH], 130.0 [CH], 129.4 [C], 123.1 [CH], 120.9 [CH], 116.3 [C, q,  $J^1_{\text{C-F}} = 203$  Hz, TFA], 83.2 [CH<sub>2</sub>, d,  $J^1_{\text{C-F}} = 167$  Hz], 36.2 [CH<sub>2</sub>, d,  $J^2_{\text{C-F}} = 20$  Hz].

### 3-(3-Aminophenyl)propan-1-ol (129).

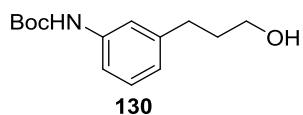


To a suspension of 3-(3-aminophenyl)propanoic acid (500 mg, 2.79 mmol) in diethyl ether (20 mL) at 0 °C, was added lithium aluminum hydride ( $\text{LiAlH}_4$ ) (127 mg, 3.35 mmol). The reaction mixture was stirred 1 h at 0 °C and then overnight at room temperature. The aluminum salts were filtered off and the filtrate was partitioned between water (50 mL) and ethyl acetate (50 mL). The aqueous layer was separated and extracted thrice with ethyl acetate (3 x 10 mL). The combined organic layers were then washed with brine (30 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness under vacuum. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (toluene / acetone: 90 / 10 to 50 / 50) to afford **129** (125 mg, 30 %) as a colorless oil.  $R_f$  (toluene / acetone: 50 / 50): 0.50.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.19 (t, 1H,  $J = 7.6$  Hz), 6.21 (d, 1H,  $J = 7.6$  Hz), 6.54 (s, 1H), 6.53 (d, 1H,  $J = 7.6$  Hz), 3.66 (t, 2H,  $J = 6.4$  Hz), 2.61 (t, 2H,  $J = 6.4$  Hz), 1.88 (q<sup>5</sup>, 2H,  $J = 6.4$  Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  146.3 [C], 143.0 [C], 129.2 [CH], 118.7 [CH], 115.2 [CH], 112.7 [CH], 62.3 [CH<sub>2</sub>], 34.0 [CH<sub>2</sub>], 32.0 [CH<sub>2</sub>].

### *tert*-Butyl 3-(3-(3-hydroxypropyl)phenyl)carbamate (130).



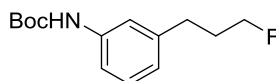
To a solution of **129** (250 mg, 1.65 mmol) in dichloromethane (5 mL), was added di-*tert*-butyl dicarbonate (721 mg, 3.31 mmol). The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. Water (10 mL) was added, then the aqueous layer was separated and extracted thrice with dichloromethane (3 x 10 mL). The combined organic layers were washed with brine (30 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness under vacuum. The

residue was purified by flash chromatography on silica gel (heptane / ethyl acetate: 8 / 2 to 7 / 3) to afford **130** (274 mg, 66 %) as a colorless oil.  $R_f$  (heptane / ethyl acetate: 1 / 1): 0.58.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.27 (s, 1H), 7.18 (t, 1H,  $J = 8.4$  Hz), 7.11 (d, 1H,  $J = 8.4$  Hz), 6.86 (d, 1H,  $J = 8.4$  Hz), 6.58 (s broad, 1H), 3.64 (t, 2H,  $J = 6.4$  Hz), 2.66 (t, 2H,  $J = 6.4$  Hz), 1.86 (q<sup>5</sup>, 2H,  $J = 6.4$  Hz), 1.51 (s, 9H).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  152.7 [C], 142.8 [C], 138.3 [C], 128.8 [CH], 123.0 [CH], 118.4 [CH], 116.0 [CH], 80.3 [C], 62.0 [CH<sub>2</sub>], 34.0 [CH<sub>2</sub>], 32.0 [CH<sub>2</sub>], 28.2 [3CH<sub>3</sub>].

***tert*-Butyl (3-(3-fluoropropyl)phenyl)carbamate (131).**



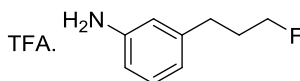
**131**

To a solution of **130** (260 mg, 1.03 mmol) in dichloromethane (5 mL), was added Deoxo-Fluor<sup>®</sup> (0.5 mL) at 0 °C. The reaction mixture was then stirred at 0 °C for 30 min, then the volatiles were removed under vacuum. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (pure heptane to heptane / ethyl acetate: 9 / 1) to afford **131** (144 mg, 55 %) as a pale yellow oil.  $R_f$  (heptane / ethyl acetate: 7 / 3): 0.58.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.28 (s, 1H), 7.20 (t, 1H,  $J = 7.6$  Hz), 7.13 (d, 1H,  $J = 7.6$  Hz), 6.87 (d, 1H,  $J = 7.6$  Hz), 6.49 (s broad, 1H), 4.44 (dt, 2H,  $J^2_{\text{H-F}} = 47.2$  Hz,  $J = 5.6$  Hz), 2.71 (t, 2H,  $J = 7.6$  Hz), 2.05 (dq<sup>5</sup>, 2H,  $J = 7.6$  Hz,  $J^3_{\text{H-F}} = 20$  Hz), 1.52 (s, 9H).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  152.6 [C], 142.0 [C], 138.3 [C], 128.9 [CH], 123.1 [CH], 118.4 [CH], 116.1 [CH], 83.0 [CH<sub>2</sub>, d,  $J^1_{\text{C-F}} = 163$  Hz], 80.4 [C], 31.8 [CH<sub>2</sub>, d,  $J^2_{\text{C-F}} = 19$  Hz], 31.2 [CH<sub>2</sub>, d,  $J^3_{\text{C-F}} = 5$  Hz], 28.2 [3CH<sub>3</sub>].

**3-(3-Fluoropropyl)aniline.TFA (132).**



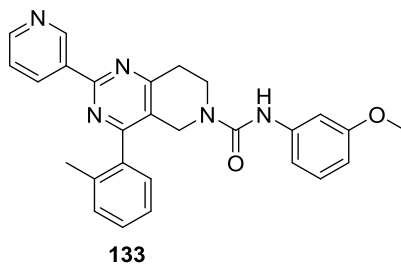
**132**

To a suspension of **131** (144 mg, 0.57 mmol) in dichloromethane (5 mL) was added trifluoroacetic acid (0.5 mL). The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. The volatiles were removed under vacuum to afford **132** (85 mg, 56 %) as colorless oil.  $R_f$  (heptane / ethyl acetate: 1 / 1): 0.23.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  10.04 (s broad, 1H, TFA), 7.32 (t, 1H,  $J = 7.6$  Hz), 7.25 (d, 1H,  $J = 7.6$  Hz), 7.16 - 7.13 (m, 2H), 4.40 (dt, 2H,  $J^2_{\text{H-F}} = 47.2$  Hz,  $J = 6.0$  Hz), 2.72 (t, 2H,  $J = 6.0$  Hz), 1.93 (dq<sup>5</sup>, 2H,  $J^3_{\text{H-F}} = 20$  Hz,  $J = 6.0$  Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  158.3 [C, q,  $J^2_{\text{C-F}} = 30$  Hz, TFA], 143.7 [C], 130.0 [CH], 129.7 [C], 129.4 [CH], 122.6 [CH], 120.3 [CH], 116.3 [C, q,  $J^1_{\text{C-F}} = 203$  Hz, TFA], 82.6 [CH<sub>2</sub>, d,  $J^1_{\text{C-F}} = 163$  Hz], 31.3 [CH<sub>2</sub>, d,  $J^2_{\text{C-F}} = 19$  Hz], 30.9 [CH<sub>2</sub>, d,  $J^3_{\text{C-F}} = 5$  Hz].

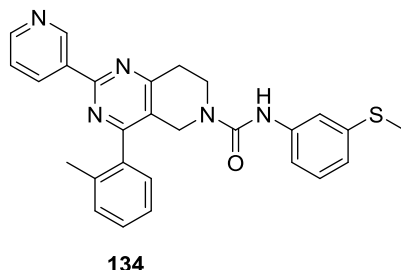
**General procedure for compounds 133-138.** To a solution of the appropriate aniline (1 eq) in dichloromethane (5 mL), were added triethylamine (0.3 mL) and triphosgen (1 eq). The reaction was stirred at room temperature for 2 h. Then, **121** (1 eq) in *N,N*-dimethylformamide (0.1 mL) was added and the mixture was stirred overnight at room temperature. Water (25 mL) was then added and the aqueous layer was separated and extracted with dichloromethane (3 x 50 mL). The combined organic layers were washed with a 1 M hydrochloric acid aqueous solution (50 mL), with brine (50 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness under vacuum. The residue was purified by flash chromatography on silica gel.

***N*-(3-Methoxyphenyl)-2-(pyridin-3-yl)-4-(*o*-tolyl)-7,8-dihydropyrido[4,3-*d*]pyrimidine-6(5*H*)-carboxamide (133).**

This derivative was prepared according to the general procedure described above using 20 mg of *m*-anisidine (0.17 mmol), 50 mg of triphosgen (0.17 mmol) and 25 mg of **121** (0.17 mmol). **133** (25 mg, 33 %) was obtained as a beige solid after flash chromatography on silica gel (dichloromethane / methanol: 98 / 2 to 97 / 3). Mp: 190 - 193 °C.  $R_f$  (dichloromethane / methanol: 95 / 5): 0.27.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  9.63 (s broad, 1H), 8.70 (d, 1H,  $J = 7.6$  Hz), 7.38 - 7.26 (m, 5H), 7.18 (d, 1H,  $J = 7.2$  Hz), 7.13 (t, 1H,  $J = 8.0$  Hz), 7.03 (s, 1H), 6.87 (s, 1H), 6.80 (d, 1H,  $J = 8.0$  Hz), 6.57 (dd, 1H,  $J = 8.0, 2.0$  Hz), 4.40 (s, 2H), 3.85 (t, 2H,  $J = 5.6$  Hz), 3.77 (s, 3H), 3.19 (t, 2H,  $J = 5.6$  Hz), 2.19 (s, 3H).

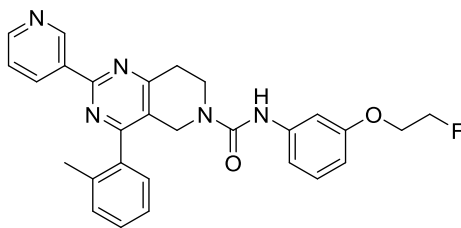
$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  165.4 [C], 164.4 [C], 160.4 [C], 160.0 [C], 154.8 [C], 150.9 [CH], 149.6 [CH], 139.9 [C], 136.1 [2C], 135.5 [CH], 135.2 [C], 130.9 [CH], 129.4 [2CH], 129.3 [CH], 127.6 [CH], 126.0 [CH], 123.5 [C], 112.3 [CH], 109.1 [CH], 105.9 [CH], 55.1 [ $\text{CH}_3$ ], 43.2 [ $\text{CH}_2$ ], 41.3 [ $\text{CH}_2$ ], 32.1 [ $\text{CH}_2$ ], 14.1 [ $\text{CH}_3$ ].

***N*-(3-(methylthio)phenyl)-2-(pyridin-3-yl)-4-(*o*-tolyl)-7,8-dihydropyrido[4,3-*d*]pyrimidine-6(5*H*)-carboxamide (134).**

This derivative was prepared according to the general procedure described above using 45 mg of 3-(methylthio)aniline (0.34 mmol), 100 mg of triphosgen (0.34 mmol) and 50 mg of **121** (0.34 mmol). **134** (30 mg, 20 %) was obtained as a pale orange solid after flash chromatography on silica gel (dichloromethane / methanol: 98 / 2 to 97 / 3). Mp: 186 - 187 °C.  $R_f$  (dichloromethane / methanol: 95 / 5): 0.30.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  9.62 (s, 1H), 8.70 (dd, 1H,  $J = 8.0, 2.0$  Hz), 8.66 (d, 1H,  $J = 4.0$  Hz), 7.40 - 7.25 (m, 5H), 7.19 (d, 1H,  $J = 7.6$  Hz), 7.16 (t, 1H,  $J = 8.0$  Hz), 7.03 (d, 1H,  $J = 8.0$  Hz), 6.90 (d, 1H,  $J = 7.6$  Hz), 6.87 (s, 1H), 4.41 (s, 2H), 3.86 (t, 2H,  $J = 5.6$  Hz), 3.19 (t, 2H,  $J = 5.6$  Hz), 2.41 (s, 3H), 2.19 (s, 3H).

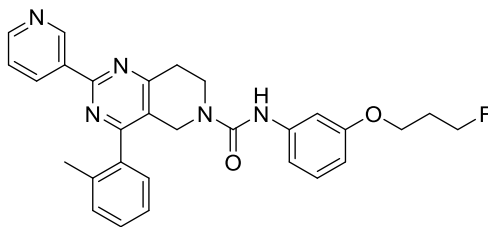
$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  165.5 [C], 164.3 [C], 160.5 [C], 154.7 [C], 151.0 [CH], 149.7 [CH], 139.2 [C], 139.1 [C], 136.1 [C], 135.5 [CH], 135.2 [C], 133.0 [C], 131.0 [CH], 129.3 [CH], 129.0 [CH], 127.6 [CH], 126.1 [CH], 123.4 [CH], 123.3 [C], 121.3 [CH], 117.8 [CH], 116.8 [CH], 43.1 [ $\text{CH}_2$ ], 41.4 [ $\text{CH}_2$ ], 32.1 [ $\text{CH}_2$ ], 19.5 [ $\text{CH}_3$ ], 15.5 [ $\text{CH}_3$ ].

***N*-(3-(2-Fluoroethoxy)phenyl)-2-(pyridin-3-yl)-4-(*o*-tolyl)-7,8-dihydropyrido[4,3-*d*]pyrimidine-6(5*H*)-carboxamide (135).****135**

This derivative was prepared according to the general procedure described above using 100 mg of **124** (0.37 mmol), 191 mg of triphosgen (0.64 mmol) and 155 mg of **121** (0.64 mmol). **135** (54 mg, 27 %) was obtained as a pale orange oil after flash chromatography on silica gel (heptane / ethyl acetate: 1 / 1 to 1 / 9 and then, ethyl acetate / methanol: 95 / 5).  $R_f$  (dichloromethane / methanol: 95 / 5): 0.35.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  9.63 (s, 1H), 8.71 - 8.67 (m, 2H), 7.40 - 7.29 (m, 4 H), 7.20 (d, 1H,  $J = 7.6$  Hz), 7.15 (t, 1H,  $J = 8.0$  Hz), 7.11 (s, 1H), 6.80 (dd, 1H,  $J = 8.0, 0.8$  Hz), 6.62 - 6.20 (m, 2H), 4.70 (dt, 2H,  $J^2_{\text{H-F}} = 47.2$  Hz,  $J = 4.0$  Hz), 4.41 (s, 2H), 4.17 (dt, 2H,  $J^3_{\text{H-F}} = 29.2$  Hz,  $J = 4.0$  Hz), 3.87 (t, 2H,  $J = 6.0$  Hz), 3.21 (t, 2H,  $J = 6.0$  Hz), 2.21 (s, 3H).

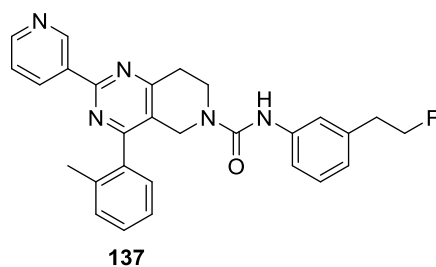
$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  165.5 [C], 164.3 [C], 160.6 [C], 158.9 [C], 154.6 [C], 151.1 [CH], 149.8 [CH], 139.9 [C], 136.1 [C], 135.6 [CH], 135.3 [C], 133.0 [C], 131.0 [CH], 129.6 [CH], 129.4 [CH], 127.6 [CH], 126.1 [CH], 123.4 [CH], 123.3 [C], 112.7 [CH], 109.9 [CH], 106.4 [CH], 81.8 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J^1_{\text{C-F}} = 169$  Hz], 67.0 [ $\text{CH}_2$ , d,  $J^2_{\text{C-F}} = 20$  Hz], 43.1 [ $\text{CH}_2$ ], 41.4 [ $\text{CH}_2$ ], 32.1 [ $\text{CH}_2$ ], 19.5 [ $\text{CH}_3$ ].

***N*-(3-(3-Fluoropropoxy)phenyl)-2-(pyridin-3-yl)-4-(*o*-tolyl)-7,8-dihydropyrido[4,3-*d*]pyrimidine-6(5*H*)-carboxamide (136).****136**

This derivative was prepared according to the general procedure described above using 60 mg of **125** (0.21 mmol), 110 mg of triphosgen (0.35 mmol) and 100 mg of **121** (0.35 mmol). **136** (22 mg, 19 %) was obtained as an orange sticky foam after flash chromatography on silica gel (dichloromethane / methanol: 99 / 1 to 95 / 5).  $R_f$  (dichloromethane / methanol: 95 / 5): 0.34.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  9.63 (s, 1H), 8.72 - 8.67 (m, 2H), 7.40 - 7.29 (m, 4H), 7.20 (d, 1H,  $J = 7.2$  Hz), 7.13 (t, 1H,  $J = 8.0$  Hz), 7.09 (s, 1H), 6.77 (d, 1H,  $J = 8.0$  Hz), 6.67 (s, 1H), 6.58 (dd, 1H,  $J = 8.0, 2.0$  Hz), 4.60 (dt, 2H,  $J^2_{\text{H-F}} = 47.2$  Hz,  $J = 5.6$  Hz), 4.41 (s, 2H), 4.04 (t, 2H,  $J = 6.0$  Hz), 3.87 (t, 2H,  $J = 5.6$  Hz), 3.21 (t, 2H,  $J = 6.0$  Hz), 2.20 (s, 3H), 2.11 ( $\text{dq}^5$ , 2H,  $J^3_{\text{H-F}} = 26.0$  Hz,  $J = 5.6$  Hz),

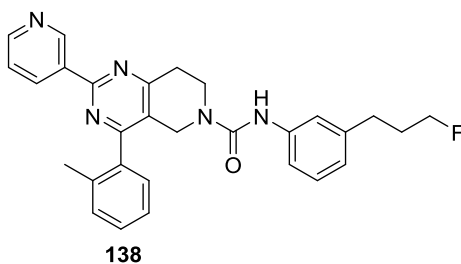
$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  165.5 [C], 164.3 [C], 160.5 [C], 159.2 [C], 154.7 [C], 151.0 [CH], 149.7 [CH], 139.8 [C], 136.1 [C], 135.6 [CH], 135.3 [C], 133.0 [C], 131.0 [CH], 129.5 [CH], 129.4 [CH], 127.6 [CH], 126.1 [CH], 123.5 [CH], 123.3 [C], 112.3 [CH], 109.7 [CH], 106.5 [CH], 80.6 [ $\text{CH}_2$ ,  $J^1_{\text{C-F}} = 163$  Hz], 63.4 [ $\text{CH}_2$ ,  $J^3_{\text{C-F}} = 5$  Hz], 43.1 [ $\text{CH}_2$ ], 41.4 [ $\text{CH}_2$ ], 32.1 [ $\text{CH}_2$ ], 30.2 [ $\text{CH}_2$ ,  $J^2_{\text{C-F}} = 20$  Hz], 19.5 [ $\text{CH}_3$ ].

***N*-(3-(2-Fluoroethyl)phenyl)-2-(pyridin-3-yl)-4-(*o*-tolyl)-7,8-dihydropyrido[4,3-*d*]pyrimidine-6(5*H*)-carboxamide (137).**

This derivative was prepared according to the general procedure described above using 50 mg of **128** (0.20 mmol), 106 mg of triphosgen (0.36 mmol) and 90 mg of **121** (0.36 mmol). **137** (37 mg, 35 %) was obtained as a pale yellow oil after flash chromatography on silica gel (heptane / ethyl acetate: 8 / 2 to 7 / 3 and then, dichloromethane / methanol: 95 / 5).  $R_f$  (dichloromethane / methanol: 95 / 5): 0.53.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  9.63 (s, 1H), 8.70 (dd, 1H,  $J = 8.0, 2.0$  Hz), 8.66 (d, 1H,  $J = 4.0$  Hz), 7.40 - 7.26 (m, 5H), 7.23 - 7.15 (m, 3H), 6.90 (d, 1H,  $J = 7.2$  Hz), 6.69 (s, 1H), 4.59 (dt, 2H,  $J^2_{\text{H-F}} = 46.8$  Hz,  $J = 6.0$  Hz), 4.42 (s, 2H), 3.87 (t, 2H,  $J = 6.0$  Hz), 3.21 (t, 2H,  $J = 6.0$  Hz), 2.93 (dt, 2H,  $J^3_{\text{H-F}} = 23.6$  Hz,  $J = 6.0$  Hz), 2.20 (s, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  165.5 [C], 164.3 [C], 160.5 [C], 154.8 [C], 151.1 [CH], 149.8 [CH], 138.7 [C], 138.0 [C, d,  $J^3_{\text{C-F}} = 5$  Hz], 136.1 [C], 135.6 [CH], 135.2 [C], 133.0 [C], 131.0 [CH], 129.4 [CH], 128.9 [CH], 127.6 [CH], 126.1 [CH], 124.0 [CH], 123.5 [C], 123.3 [CH], 120.8 [CH], 118.5 [CH], 83.9 [ $\text{CH}_2$ ,  $J^1_{\text{C-F}} = 168$  Hz], 43.1 [ $\text{CH}_2$ ], 41.4 [ $\text{CH}_2$ ], 36.7 [ $\text{CH}_2$ ,  $J^2_{\text{C-F}} = 20$  Hz], 32.1 [ $\text{CH}_2$ ], 19.5 [ $\text{CH}_3$ ].

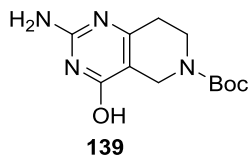
***N*-(3-(3-Fluoropropyl)phenyl)-2-(pyridin-3-yl)-4-(*o*-tolyl)-7,8-dihydropyrido[4,3-*d*]pyrimidine-6(5*H*)-carboxamide (138).**

This derivative was prepared according to the general procedure described above using 70 mg of **132** (0.26 mmol), 135 mg of triphosgen (0.46 mmol) and 135 mg of **121** (0.46 mmol). **138** (56 mg, 42 %) was obtained as a colorless oil after flash chromatography on silica gel (heptane / ethyl acetate: 1 / 1 to 0 / 10 and then, ethyl acetate / methanol: 99 / 1).  $R_f$  (dichloromethane / methanol: 95 / 5): 0.37.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  9.56 (d, 1H,  $J = 1.6$  Hz), 8.69 (d, 1H,  $J = 8.0$  Hz), 8.61 (dd, 1H,  $J = 4.8, 1.2$  Hz), 7.40 - 7.27 (m, 4H), 7.22 - 7.15 (m, 2H), 7.14 (d, 1H,  $J = 7.6$  Hz), 7.09 (d, 1H,  $J = 7.6$  Hz), 6.83 (d, 1H,  $J = 7.6$  Hz), 4.39 (dt, 2H,  $J^2_{\text{H-F}} = 47.2$  Hz,  $J = 6.0$  Hz), 4.38 (s, 2H), 3.85 (t, 2H,  $J = 5.6$  Hz), 3.18 (t, 2H,  $J = 5.6$  Hz), 2.65 (t, 2H,  $J = 7.6$  Hz), 2.17 (s, 3H), 1.94 ( $\text{dq}^5$ , 2H,  $J^3_{\text{H-F}} = 26.8$  Hz,  $J = 6.0$  Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  165.5 [C], 164.6 [C], 160.2 [C], 155.3 [C], 150.5 [CH], 149.3 [CH], 141.7 [C], 138.7 [C], 136.1 [C], 135.9 [CH], 135.3 [C], 133.3 [C], 130.9 [CH], 129.3 [CH], 128.7 [CH], 127.6 [CH], 126.1 [CH], 123.8 [CH], 123.5 [CH], 123.4 [C], 120.5 [CH], 118.1 [CH], 83.0 [ $\text{CH}_2$ ,  $J^1_{\text{C-F}} = 163$  Hz], 43.1 [ $\text{CH}_2$ ], 41.1 [ $\text{CH}_2$ ], 32.0 [ $\text{CH}_2$ ], 31.7 [ $\text{CH}_2$ ,  $J^2_{\text{C-F}} = 20$  Hz], 31.1 [ $\text{CH}_2$ ,  $J^3_{\text{C-F}} = 5$  Hz], 19.4 [ $\text{CH}_3$ ].

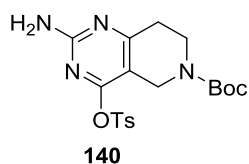


***tert*-Butyl 2-amino-4-hydroxy-7,8-dihydropyrido[4,3-*d*]pyrimidine-6(5*H*)-carboxylate (**139**).**

To a solution of *N*-Boc-3-carboethoxy-4-piperidone (5.0 g, 18.43 mmol) in methanol (200 mL), were added guanidine hydrochloride (1.7 g, 18.43 mmol) and potassium carbonate (6.4 g, 46.07 mmol). The reaction mixture was heated at reflux for 3 h. After cooling to room temperature, the volatiles were removed under vacuum. Water (50 mL) was added to the residue and a 37 % hydrochloric acid aqueous solution was added until pH 2. Then, the pH was adjusted to 7 with a 28 % ammonium hydroxide aqueous solution. The formed precipitate was filtered off, washed with diethyl ether and dried under vacuum to afford **139** (4.5 g, 92 %) as a white powder. Mp: 250 - 253 °C.  $R_f$  (dichloromethane / methanol: 90 / 10): 0.07.

$^1\text{H-NMR}$  (DMF- $d_7$ , 400 MHz):  $\delta$  6.91 (s broad, 2H), 4.11 (s, 2H), 3.57 (t, 2H,  $J = 5.2$  Hz), 3.50 (s broad, 1H), 2.41 (t, 2H,  $J = 5.2$  Hz), 1.43 (s, 9H).

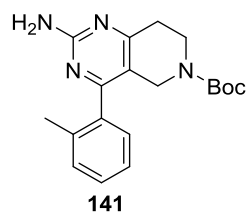
$^{13}\text{C-NMR}$  (DMF- $d_7$ , 100 MHz):  $\delta$  164.8 [C], 158.5 [C], 156.2 [C], 154.6 [C], 106.5 [C], 79.8 [C], 48.0 [CH<sub>2</sub>], 42.2 [CH<sub>2</sub>], 28.9 [CH<sub>2</sub>], 21.9 [3CH<sub>3</sub>].

***tert*-Butyl 2-amino-4-(tosyloxy)-7,8-dihydropyrido[4,3-*d*]pyrimidine-6(5*H*)-carboxylate (**140**).**

To a suspension of **139** (4.9 g, 18.40 mmol) in dichloromethane (150 mL), were added *p*-toluenesulfonic anhydride (7.2 g, 22.08 mmol) and triethylamine (12.9 mL, 92.00 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 5 h. Water (150 mL) was added, then the aqueous layer was separated and extracted with dichloromethane (3 x 150 mL). The combined organic layers were washed with a saturated ammonium chloride aqueous solution (150 mL), with brine (150 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness under vacuum. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane / methanol: 98 / 2 to 95 / 5) to afford **140** (4.86 g, 62 %) as a beige solid. Mp: 148 - 149 °C.  $R_f$  (dichloromethane / methanol: 95 / 5): 0.41.

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  8.24 (s broad, 2H), 7.48 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz), 7.11 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz), 4.33 (s, 2H), 3.65 (t, 2H,  $J = 5.6$  Hz), 2.69 (t, 2H,  $J = 5.6$  Hz), 2.27 (s, 3H), 1.40 (s, 9H).

$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 100 MHz): for solubility reasons this spectra could not be obtained.

***tert*-Butyl 2-amino-4-(*o*-tolyl)-7,8-dihydropyrido[4,3-*d*]pyrimidine-6(5*H*)-carboxylate (**141**).**

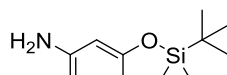
To a solution of **140** (500 mg, 1.19 mmol) in dioxane (15 mL) and water (0.3 mL), were added successively potassium tribasic (K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) (1.51 g, 7.14 mmol), tolylboronic acid (485 mg, 3.57 mmol), palladium acetate (59 mg, 0.26 mmol), and CyJohnPhos (125 mg, 0.36 mmol). The reaction mixture was stirred at 90 °C for 6 h. After cooling to room temperature, the mixture was filtered off through a pad of Celite®. The filtrate was partitioned between a

saturated aqueous solution of sodium hydrogenocarbonate (50 mL) and ethyl acetate (50 mL). The aqueous layer was separated and extracted thrice with ethyl acetate (3 x 50 mL). The combined organic layers were washed with brine (100 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness under vacuum. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane / methanol: 99 / 1 to 95 / 5) to afford **141** (187 mg, 46 %) as a dark green solid. Mp: 159 - 161 °C.  $R_f$  (dichloromethane / methanol: 95 / 5): 0.34.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.28 - 7.21 (m, 3H), 7.10 (d, 1H,  $J = 7.2$  Hz), 5.21 (s broad, 2H), 4.07 (s, 2H), 3.68 (t, 2H,  $J = 5.6$  Hz), 2.81 (t, 2H,  $J = 5.6$  Hz), 2.15 (s, 3H), 1.33 (s, 9H).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  166.2 [C], 164.5 [C], 161.1 [C], 154.4 [C], 136.6 [C], 134.5 [C], 130.5 [CH], 128.8 [CH], 127.1 [CH], 126.0 [CH], 115.1 [C], 80.0 [C], 42.3 [CH<sub>2</sub>], 40.7 [CH<sub>2</sub>], 31.8 [CH<sub>2</sub>], 28.3 [3CH<sub>3</sub>], 19.2 [CH<sub>3</sub>].

### 3-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)aniline (**142**).



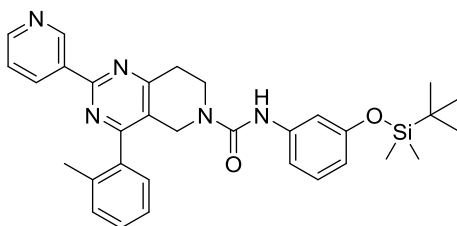
**142**

To a solution of 3-aminophenol (500 mg, 4.58 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (10 mL) were added *tert*-butyldimethylsilyl chloride (TBSCl) (829 mg, 5.50 mmol) and imidazole (374 mg, 5.50 mmol). The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. The mixture was then partitioned between water (50 mL) and ethyl acetate (50 mL). The aqueous layer was separated and extracted thrice with ethyl acetate (3 x 50 mL). The combined organic layers were washed with brine (100 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness under vacuum. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (heptane / ethyl acetate: 8 / 2 to 7 / 3) to afford **142** (494 mg, 48 %) as a pale yellow oil.  $R_f$  (heptane / ethyl acetate: 1 / 1): 0.63.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  6.99 (t, 1H,  $J = 8.0$  Hz), 6.30 (dd, 1H,  $J = 8.0, 2.0$  Hz), 6.26 (dd, 1H,  $J = 8.0, 2.0$  Hz), 6.20 (t, 1H,  $J = 2.0$  Hz), 0.98 (s, 9H), 0.19 (s, 6H).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  156.6 [C], 147.5 [C], 129.8 [CH], 110.3 [CH], 108.4 [CH], 107.0 [CH], 25.6 [3CH<sub>3</sub>], 118.1 [C], -4.46 [2CH<sub>3</sub>].

### *N*-(3-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)phenyl)-2-(pyridin-3-yl)-4-(*o*-tolyl)-7,8-dihydropyrido[4,3-*d*]pyrimidine-6(5*H*)-carboxamide (**143**).



**143**

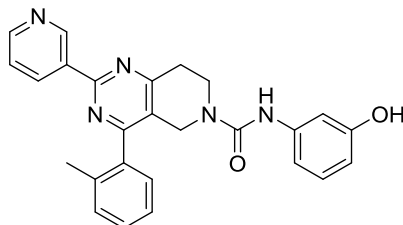
This derivative was prepared according to the general procedure described above using 300 mg of **142** (1.34 mmol), 398 mg of triphosgen (1.34 mmol) and 404 mg of **121** (1.34 mmol). **143** (175 mg, 23 %) was obtained as a pale yellow oil after flash chromatography on silica gel (heptane / ethyl acetate: 7 / 3 to 6 / 4).  $R_f$  (heptane / ethyl acetate: 1 / 1): 0.15.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  9.64 (s, 1H), 8.71 - 8.68 (m, 2H), 7.40 - 7.30 (m, 4H), 7.20 (d, 1H,  $J = 8.0$  Hz), 7.10 (t, 1H,  $J = 8.0$  Hz), 6.94 - 6.93 (m, 1H), 6.83 (dd, 1H,  $J = 8.0, 1.2$  Hz), 6.55 (s, 1H), 6.51 (dd, 1H,  $J = 8.0, 1.2$  Hz), 4.41 (s, 2H), 3.87 (t, 2H,  $J = 6.0$  Hz), 3.22 (t, 2H,  $J = 6.0$  Hz), 2.21 (s, 3H), 0.96 (s, 9H), 0.17 (s, 6H).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  165.5 [C], 164.4 [C], 160.5 [C], 156.1 [C], 154.6 [C], 151.0 [CH], 149.7 [CH], 139.6 [C], 136.1 [C], 135.5 [CH], 135.2 [C], 133.0 [C], 131.0 [CH], 129.3 [2CH], 127.6 [CH], 126.1 [CH], 123.5

[C], 123.2 [CH], 115.0 [CH], 112.9 [CH], 112.1 [CH], 43.2 [CH<sub>2</sub>], 41.0 [CH<sub>2</sub>], 32.1 [CH<sub>2</sub>], 30.8 [C], 25.6 [3CH<sub>3</sub>], 19.5 [CH<sub>3</sub>], - 4.5 [2CH<sub>3</sub>].

***N*-(3-Hydroxyphenyl)-2-(pyridin-3-yl)-4-(*o*-tolyl)-7,8-dihydropyrido[4,3-*d*]pyrimidine-6(5*H*)-carboxamide (144).**



**144**

To a solution of **143** (80 mg, 0.14 mmol) in tetrahydrofuran (5 mL), was added a 1 M tetra-*n*-butylammonium fluoride solution (TBAF) in tetrahydrofuran (0.3 mL). The reaction mixture was stirred overnight at room temperature, then the volatiles were removed under vacuum. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane / methanol: 99 / 1 to 95 / 5) to afford **144** (34 mg, 54 %) as a pale yellow solid. Mp: 139 - 142 °C. *R<sub>f</sub>* (dichloromethane / methanol: 95 / 5): 0.22.

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 9.48 (s, 1H), 8.66 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 8.55 (dd, 1H, *J* = 4.8, 1.2 Hz), 7.39 - 7.24 (m, 4H), 7.15 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz), 6.99 (t, 1H, *J* = 8.0 Hz), 6.82 (s, 1H), 6.62 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz), 6.44 (dd, 1H, *J* = 8.0, 2.0 Hz), 4.32 (s, 2H), 3.80 (t, 2H, *J* = 6.0 Hz), 3.13 (t, 2H, 6.0 Hz), 2.13 (s, 3H).

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): δ 165.5 [C], 164.5 [C], 160.2 [C], 157.1 [C], 155.4 [C], 150.4 [CH], 149.2 [CH], 139.5 [C], 136.1 [C], 136.0 [CH], 135.2 [C], 133.3 [C], 130.8 [CH], 129.4 [CH], 129.3 [CH], 127.6 [CH], 126.0 [CH], 123.7 [C], 123.5 [CH], 111.5 [CH], 110.7 [CH], 107.5 [CH], 43.0 [CH<sub>2</sub>], 41.1 [CH<sub>2</sub>], 31.9 [CH<sub>2</sub>], 19.4 [CH<sub>3</sub>].

# Chapter II: Radiochemistry.

## 1. Fluorine-18-labelling.

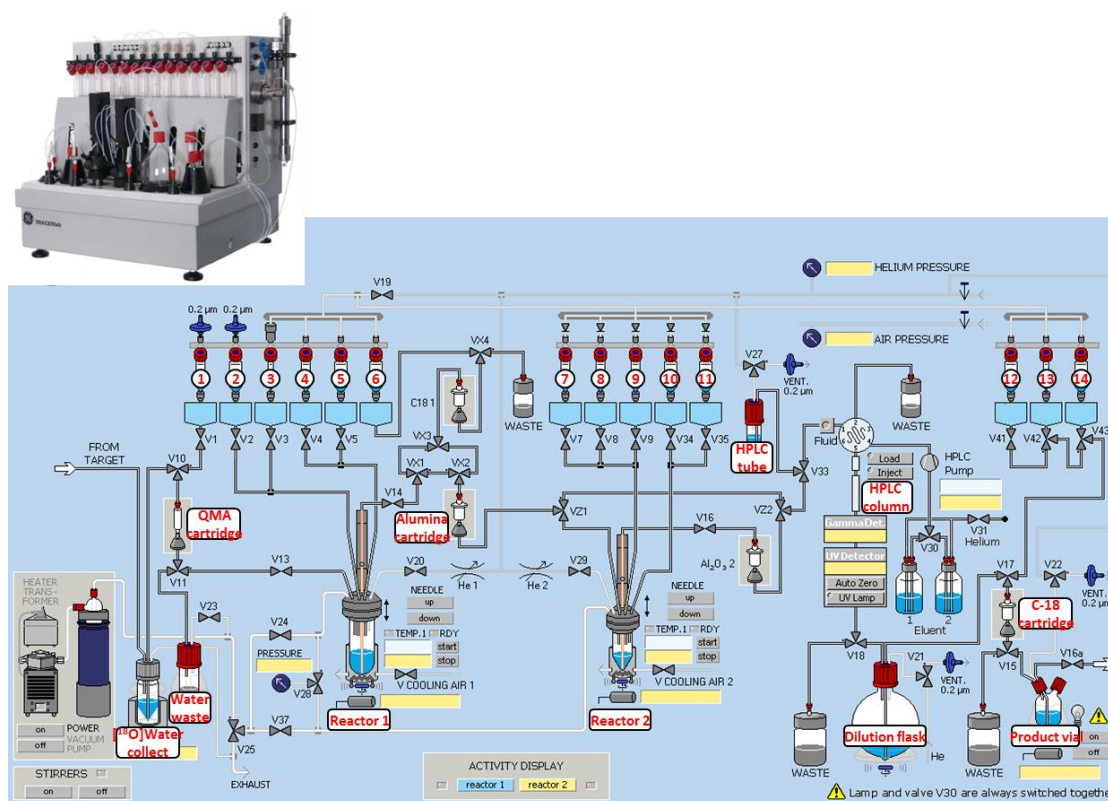
Fluorine-18-labelling, purification (HPLC) and formulation of the radiotracers as *i.v.* injectable solutions were performed in 5-cm-lead shielded cells and using commercially available synthesizers (GE TRACERLab™ FX N Pro and GE TRACERLab™ FX FN).

### 1.1. General procedure for fluorine-18-labelling.

#### 1.1.1. Radiosynthesizer descriptions and configurations.

##### 1.1.1.a. The TRACERLab FX N Pro.

The scheme of the TRACERLab FX N Pro radiosynthesizer is given below (**Figure 62**):



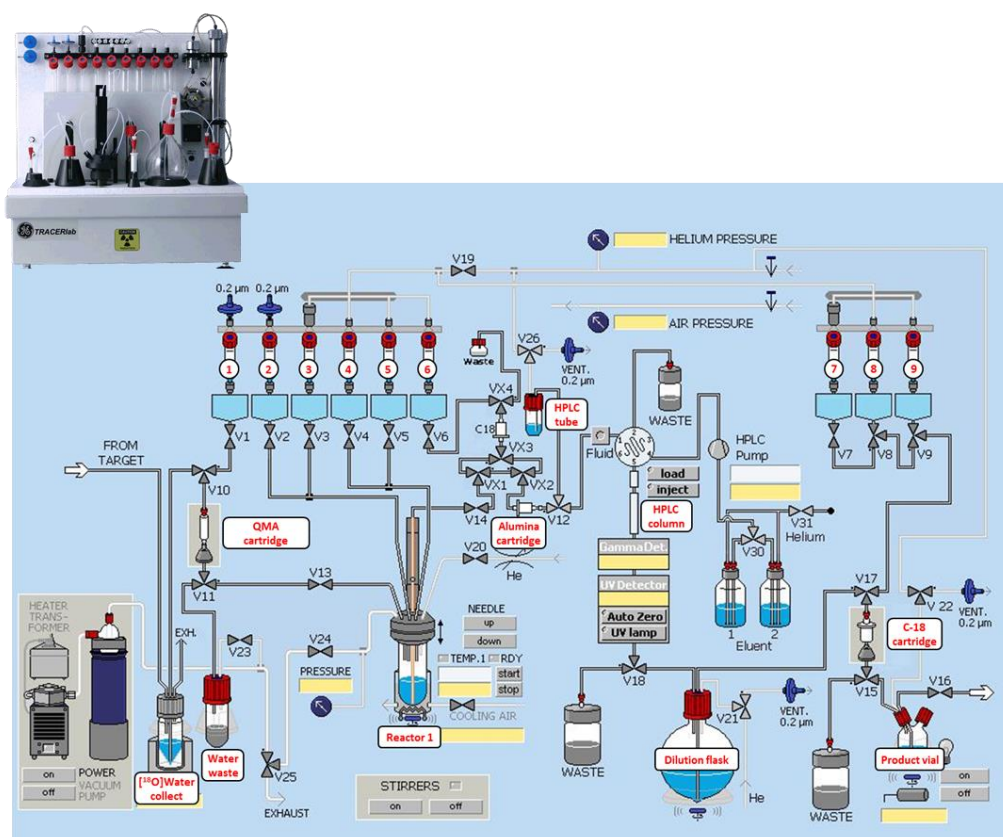
**Figure 62:** Description of the TRACERLab FX N Pro radiosynthesizer.

Note that using this synthesizer, the whole process of preparation of a radiotracer is fully automated and uses a dedicated method supported by three generic “time list”, written according to the programming mode of General Electric synthesis modules, and named respectively “Time list 1:  $K[^{18}\text{F}]\text{F} / K_{222}$  preparation”, “Time list 2: radiofluorination and pre-purification” and “Time list 3: purification and formulation”. Also, before each radiotracer batch production, the synthesizer was cleaned out (e.g. used-cartridge removal), purged from any residual chemicals or solvents left-over (reservoirs, reactors and tubings) from a previous radiotracer production and dried using another in-house programmed methods. Additional informations on the synthesizer description and preparation have been described by Médran-Navarrete *et al.*<sup>167</sup>.

Note also that for the radiolabelling reported in this manuscript, the synthesizer was used in his “simplest possible” configuration. Indeed, valves VZ1 and VZ2 were both turned in up-position, therefore by-passing most of the added functionalities of the TRACERLab FX N Pro synthesizer when compared to the TRACERLab FX FN one (e.g. the second reactor [Reactor 2, see **Figure 62**] and its connected reservoirs [Reservoir 7-11] and associated tubings). Note also that valves VX3 and VX4 as well as the associated option of using an additional cartridge purification unit were also not requested for the processes reported herein.

### 1.1.1.b. The TRACERLab FX FN.

The scheme of the TRACERLab FX FN radiosynthesizer is given below (**Figure 63**):



**Figure 63:** Description of the TRACERLab FX FN radiosynthesizer.

Again, the whole process of preparation of a radiotracer is fully automated and uses a dedicated method. Also, and as described above, the synthesizer is cleaned out and dried before each novel radiotracer batch production. Additional informations on the synthesizer description and preparation have been described by Kuhnast *et al.*<sup>168</sup>.

### 1.1.1.c. Preparation of both synthesizers.

To achieve the synthesis of the [<sup>18</sup>F]radiotracer, the reservoirs and vessels of the module used were filled with the solutions and products reported in **Table 1**. Reservoirs corresponding to both the TRACERLab FX F Pro and FX FN are described in black, whereas reservoirs corresponding to TRACERLab FX N Pro in red and reservoirs corresponding to TRACERLab FX FN in green.

Reservoirs	Products
<b>Reservoir 1</b>	1 mL of distilled water and acetonitrile (30 / 70) 2 mg of K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 12 to 15 mg of Kryptofix <sup>®</sup> 222
<b>Reservoir 3</b>	4 to 5 mg of <b>precursor</b> in 0.7 mL of organic solvent
<b>Reservoir 4</b>	2 mL of HPLC solvent
<b>Reservoir 5</b>	2 mL of HPLC solvent
<b>Reservoir 7 / Reservoir 12</b>	10 mL of distilled water
<b>Reservoir 8 / Reservoir 13</b>	2 mL of ethanol
<b>Reservoir 9 / Reservoir 14</b>	2 mL of physiological saline (0.9 % aqueous sodium chloride)
<b>Dilution flask</b>	20 mL of distilled water

**Table 1:** Preparation of the TRACERLab FX N Pro and TRACERLab FX FN (Reservoirs corresponding to both the TRACERLab FX N Pro and TRACERLab FX FN are described in black; reservoirs corresponding to TRACERLab FX N Pro are described **in red** and reservoirs corresponding to TRACERLab FX FN **in green**).

### 1.1.2. Radioisotope production.

No carrier added aqueous [<sup>18</sup>F]fluoride ion was produced *via* the [<sup>18</sup>O(p,n)<sup>18</sup>F] nuclear reaction by irradiation of a 2 mL [<sup>18</sup>O]water target (> 97 % enriched, CortecNet) on an Cyclone-18 / 9 cyclotron (18 MeV proton beam, IBA) and transferred to the appropriate hot cell, containing the appropriate synthesizer (TRACERLab FX N Pro or TRACERLab FX FN). *Target hardware:* 2 mL, stainless steel target holder equipped with a domed-end niobium cylinder insert (IBA). *Target to hot cell liquid-transfer system:* 60 m PTFE line (0.8 mm internal diameter ; 1 / 16 inch external diameter), 2.0 bar helium drive pressure, transfer time 3 to 6 min. Typical production of [<sup>18</sup>F]fluoride ion at the end of bombardment for a 25 µA, 30 min (12.5 µA.h) irradiation: 30 - 35 GBq.

### 1.1.3. K[<sup>18</sup>F]F / K<sub>222</sub> preparation.

Upon transfer of the aqueous solution of fluorine-18 anion to the synthesis module (synthesizer), the irradiated water is passed through an anion exchange resin QMA light (Waters) cartridge to remove the enriched water and fix the [<sup>18</sup>F]fluoride anions. The latter are then eluted to the reactor using a solution of potassium carbonate (2 mg) and Kryptofix<sup>®</sup> 222 (12 - 15 mg) in a mixture of acetonitrile and water (70 / 30, v / v, 1 mL). The K[<sup>18</sup>F]F / K<sub>222</sub> complex is prepared by evaporation of the solvents in two steps: (i) first at 60 °C for 7 min under reduced pressure and using a constant flow of helium (2 bars) and then (ii) at 120 °C for 5 min under reduced pressure.

### 1.1.4. Fluorine-18 incorporation and pre-purification.

The precursor for labelling (4 to 5 mg usually, unless otherwise stated) in solution in dimethylsulfoxide (0.7 mL) is then added to the dried K[<sup>18</sup>F]F / K<sub>222</sub> complex, and radiofluorination is then performed at high temperature for several min (conditions depending on the precursor used). After cooling to 50 °C, the crude is diluted with the HPLC solvent used for the purification step (2 mL) and passed through an alumina N (Waters) cartridge. The reactor is then rinsed once with the same HPLC solvent (2 mL) and the solution passed again through the alumina cartridge.

### 1.1.5. Semi-preparative HPLC purification and formulation.

The combined crude solution (4.7 mL) is transferred to the HPLC injection loop and injection is automatically performed using a fluid detector. Semi-preparative HPLC purification (conditions depending of the radiotracer synthesized) is then performed based on both UV (K2501, Knauer) and radioactivity (gamma detector integrated to the radiosynthesizer) detection. The fraction containing the desired labelled product at the highest possible purity is collected, diluted with water (20 mL) and this solution passed through a Sep-Pak<sup>®</sup>Plus C18 cartridge (Waters). The cartridge is then rinsed with water (10 mL) and the radiotracer eluted with ethanol (2 mL) and the solution further diluted with a solution of aqueous sodium chloride (0.9 %, 2 mL).

### 1.1.6. Quality controls.

Analytical HPLC (conditions depending on the radiotracer) was performed as quality control to confirm the chemical identity of the formulated labelled product, as well as its chemical and radiochemical purity. For this, a Waters Alliance 2960 or a Waters Alliance 2695 system, equipped with a UV spectrophotometer (photodiode array detector, Waters 996) and a Berthold radioactivity detector, was used. The chemical identity was determined with UV-spectrometric analysis, by comparing the recorded retention time and UV-spectrum with those observed for the corresponding reference compound in the same HPLC system and conditions. Chemical purity was also assessed on the UV-chromatogram based on the relative integration of the peak areas. Radiochemical purity was assessed on the radioactive chromatogram based on the relative integration of the peak area corresponding to the radiotracer.

### 1.1.7. Specific activity determination.

Specific activity of the radiotracer was calculated from three consecutive HPLC analyses and determined as follows: the molar quantity of the radiotracer was determined with the area of the UV peak using a calibration curve whereas the radioactivity was determined by collecting the fraction and measuring in an ionization chamber (Capintec, CRC-15R, France). The SA, as a mean of three independent experiments, was calculated by dividing the counted radioactivity by the found molar quantity.

## 1.2. Fluorine-18 labelling of [<sup>18</sup>F]-60 and [<sup>18</sup>F]-79.

### 1.2.1. <sup>18</sup>F-radiolabelling of [<sup>18</sup>F]-60.

[<sup>18</sup>F]-60 was produced on the TRACERLab FX FN synthesizer using 4 mg of **63** in 700 μL of dimethylsulfoxide at 160 °C for 10 min. Purification was performed on a reverse phase Zorbax<sup>®</sup> SB-C18 (250 x 9.4 mm, 5 μm) column (Agilent) using a mixture of water, acetonitrile and trifluoroacetic acid as eluent (45 / 55 / 0.1, v / v / v), and at a flowrate of 5 mL/min. UV detection was carried out at 254 nm. [<sup>18</sup>F]-60 was obtained with 4.8 % non decay-corrected yield (based on starting fluorine-18 radioactivity, within a total synthesis time of 60 minutes), a radiochemical purity > 98 % and an average specific activity of 52 GBq/μmol.

### 2.2.2. <sup>18</sup>F-radiolabelling of [<sup>18</sup>F]-79.

[<sup>18</sup>F]-79 was produced on the TRACERLab FX N Pro synthesizer using 4 mg of **87** in 700 μL of dimethylsulfoxide at 120 °C for 5 min. Purification was performed on a reverse phase Zorbax<sup>®</sup> SB-C18 (250 x 9.4 mm, 5 μm) column (Agilent) using a mixture of water, acetonitrile and trifluoroacetic acid as eluent (55 / 45 / 0.1 v / v / v), and at a flowrate of 5 mL/min. UV detection was carried out at 280 nm. [<sup>18</sup>F]-79 was obtained with 7.3 % non decay-corrected yield (based on starting fluorine-18 radioactivity, within a total synthesis time of 50 minutes), a radiochemical purity > 98 % and an average specific activity of 122 GBq/μmol.



## 2. Carbon-11-labelling.

Carbon-11-labelling, purification (HPLC) and formulation of the radiotracers as *i.v.* injectable solutions were performed in 5-cm-lead shielded cells and using a commercially available synthesizer: GE TRACERLab™ FC Pro.

### 2.1. General procedure carbon-11-labelling.

#### 2.1.1. Radiosynthesizer description and configuration.

##### 2.1.1.a. The TRACERLab FX C Pro.

The scheme of the TRACERLab FX C Pro radiosynthesizer is given below (Figure 64):

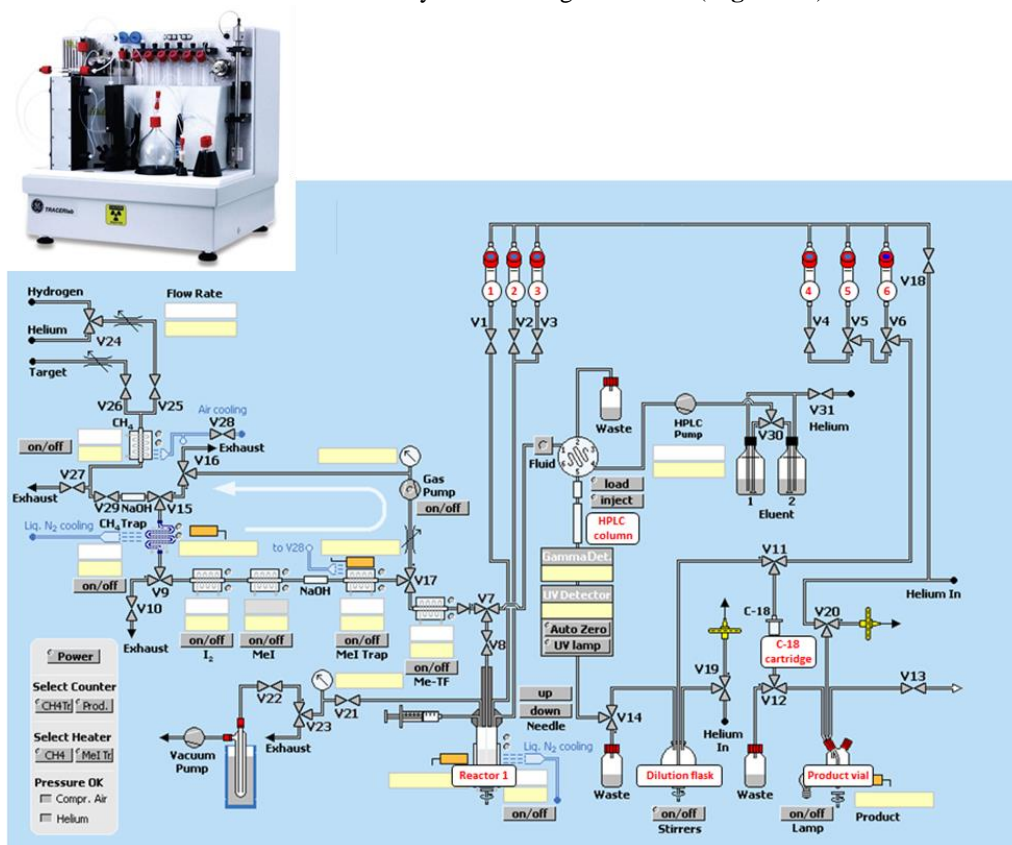


Figure 64: Description of the TRACERLab FX C Pro radiosynthesizer.

Analogously to what is reported in the fluorine-18 section above, the whole process of preparation of a radiotracer is fully automated, uses a dedicated method, and includes the preparation of the reagent  $[^{11}\text{C}]\text{MeOTf}$  from  $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ . The synthesizer is also cleaned out and dried before each novel radiotracer batch production. Additional informations on the TRACERLab FX C Pro synthesizer have been described by Le Helleix *et al.*<sup>169</sup>.

##### 2.1.1.b. Radiosynthesizer preparation.

To achieve the synthesis of the  $[^{11}\text{C}]\text{radiotracer}$ , the reservoirs and vessels of the module were filled with the solutions and products reported in the Table 2.



Reservoirs	Products
Reservoir 3	0.5 mL of HPLC solvent
Reservoir 4	10 mL of distilled water
Reservoir 5	2 mL of ethanol
Reservoir 6	2 mL of physiological saline (0.9 % aqueous sodium chloride)
Dilution flask	20 mL of distilled water

**Table 2:** Preparation of the TRACERLab FX C Pro radiosynthesizer.

### 2.1.2.a. Radioisotope production.

No carrier added [ $^{11}\text{C}$ ]CO<sub>2</sub> was produced *via* the [ $^{14}\text{N}(\text{p},\alpha)^{11}\text{C}$ ] nuclear reaction by irradiation of a [ $^{14}\text{N}$ ]N<sub>2</sub> target containing 0.15 - 0.5 % of O<sub>2</sub> on an Cyclone-18 / 9 cyclotron (18 MeV proton beam, IBA) and transferred to the appropriate hot cell, containing the TRACERLab FX C Pro radiosynthesizer. *Target hardware:* 50 mL, aluminum target holder (135 mm length, 64 mm diameter) (IBA). *Target to hot cell liquid-transfer system:* 60 m stainless steel line (1 / 8 inch external diameter), pressure let-down driven, transfer time 3 to 6 min. Typical production of [ $^{11}\text{C}$ ]CO<sub>2</sub> at the end of bombardment for a 25  $\mu\text{A}$ , 45 min (19  $\mu\text{A}\cdot\text{h}$ ) irradiation: 70 - 80 GBq.

### 2.1.2.b. [ $^{11}\text{C}$ ]MeOTf radiosynthesis.

The preparation of [ $^{11}\text{C}$ ]MeOTf from cyclotron produced [ $^{11}\text{C}$ ]CO<sub>2</sub> is based on a “recirculating” process (loop) first reported by Larsen *et al.*<sup>170</sup> and leading to [ $^{11}\text{C}$ ]MeI. The latter is then converted to [ $^{11}\text{C}$ ]MeOTf as described by Jewett *et al.*<sup>171</sup>. The whole process of preparation of [ $^{11}\text{C}$ ]MeOTf is part of the TRACER FX C Pro synthesizer and a brief description is summarized below.

Thus, upon transfer from the target to the synthesizer, the [ $^{11}\text{C}$ ]CO<sub>2</sub> is trapped at room temperature on molecular sieves 4 Å packed with Shimalite nickel loaded beforehand with hydrogen. Reduction into methane is realized at 380 °C for 1 min and the resulting [ $^{11}\text{C}$ ]CH<sub>4</sub> is released under hydrogen flow (100 mL / min), passed through sicapent<sup>®</sup> and ascarite<sup>®</sup> and trapped at -75 °C on Carbosphere<sup>™</sup> 60 / 80 mesh. Upon heating at 80 °C, [ $^{11}\text{C}$ ]CH<sub>4</sub> is released and converted into [ $^{11}\text{C}$ ]CH<sub>3</sub>I by reaction with gaseous iodine at 750 °C for 3 min using a recirculation process. [ $^{11}\text{C}$ ]CH<sub>3</sub>I is trapped at room temperature on a Porapak<sup>™</sup> phase and released at 190 °C under a flow of helium (30 mL/min) to pass through a preheated (200 °C) AgOTf / Carbopack<sup>™</sup> 60 / 80 mesh (1 / 2 w / w) to instantaneously afford [ $^{11}\text{C}$ ]CH<sub>3</sub>OTf.

### 2.1.2.c. General procedure for [ $^{11}\text{C}$ ]methylation.

[ $^{11}\text{C}$ ]CH<sub>3</sub>OTf (in carrier helium) is then slowly bubbled (30 mL/min) into a cooled (-20 °C) solution of the precursor for labelling (1 mg) in the appropriate solvent (conditions depending of the tracer) for 3 min. The mixture is usually heated at 110 °C for 2 min (unless otherwise stated) and concentrated at 110 °C for 1 min under reduced pressure and a continuous helium flow. After cooling to 60 °C, the crude is diluted with the HPLC solvent used for the purification step (1 mL).

### **2.1.2.d. Semi-preparative HPLC and formulation.**

The HPLC-diluted crude solution (1 mL) is transferred to the HPLC injection loop and injection is automatically performed using a fluid detector. Semi-preparative HPLC purification and formulation is performed using similar procedures that the ones described in the fluorine-18 section above (see paragraph 1.1.5)

### **2.1.2.e. Quality control.**

The same procedures as for fluorine-18 labelled radiotracers are applied (see paragraph 1.1.6)

## **2.2. Carbon-11-labelling of [<sup>11</sup>C]-96 and [<sup>11</sup>C]-133.**

### **2.2.1. <sup>11</sup>C-radiolabelling of [<sup>11</sup>C]-96.**

[<sup>11</sup>C]-**96** was produced (TRACERLab FX C Pro) using 1 mg of **117**, dissolved in *N,N*-dimethylformamide (300 µL) containing an aqueous solution of sodium hydroxide (3 M, 7 µL). Note that the concentration step was not performed for this compound to avoid any degradation. Purification was performed on a reverse phase Symmetry<sup>®</sup> C18 (300 x 7.8 mm, 7 µm) column (Waters) using a mixture of water, acetonitrile and trifluoroacetic acid as eluent (30 / 70 / 0.1 v / v / v), and at a flowrate of 5 mL/min. UV detection was carried out at 280 nm. [<sup>11</sup>C]-**96** was obtained with 8.2 % non decay-corrected yield (based on starting carbon-11 radioactivity, within a total synthesis time of 40 minutes), a radiochemical purity > 98 % and an average specific activity of 82 GBq/µmol.

### **2.2.2. <sup>11</sup>C-radiolabelling of [<sup>11</sup>C]-133.**

[<sup>11</sup>C]-**133** was produced (TRACERLab FX C Pro) using 1 mg of **144**, dissolved in acetone (400 µL) containing an aqueous solution of sodium hydroxide (3 M, 7 µL). Purification was performed on a reverse phase Symmetry<sup>®</sup> C18 (300 x 7.8 mm, 7 µm) column (Waters) using a mixture of mixture of water, acetonitrile and trifluoroacetic acid as eluent (45 / 55 / 0.1 v / v / v), and at a flowrate of 5 mL/min. UV detection was carried out at 220 nm. [<sup>11</sup>C]-**133** was obtained with 1.3 % non decay-corrected yield (based on starting carbon-11 radioactivity, within a total synthesis time of 40 minutes), a radiochemical purity > 98 % and an average specific activity of 133 GBq/µmol.



# Chapter III: *In vitro* and *in vivo* characterization.

## 1. Binding studies, lipophilicity and metabolic stability determination.

Binding studies and metabolic stability determination have been performed on all synthesized TSPO and CB<sub>2</sub>R ligands. Lipophilicity ( $\log D_{7.4}$ ) was also measured for all compounds targeting the TSPO. No such data have been recorded yet concerning the P2Y<sub>12</sub>R and P2Y<sub>14</sub>R ligands.

### 1.1. TSPO ligands.

*In vitro* data related to the TSPO were obtained through a collaborative CEA-Sanofi research contract (SANOFI 126013 / CEA C17074 - Sanofi, LGCR ChemBio, Chilly-Mazarin, France). Assays were performed at different Sanofi sites: LGCR Analytical Sciences at Chilly Mazarin ( $\log D_{7.4}$ ), DMPK at Montpellier (Biotransformation) and DSAR Drug Disposition at Vitry (Intrinsic clearance).

#### 1.1.1. Binding and selectivity.

Binding affinities for the TSPO ( $K_i$ ) were determined using membrane homogenates from rat heart and screened against [<sup>3</sup>H]PK11195 ( $K_d = 1.8$  nM,  $c = 0.2$  nM). Affinities for the CBR were determined at a unique concentration (1  $\mu$ M), using membrane homogenates from rat cerebral cortex and screened against [<sup>3</sup>H]flunitrazepam ( $K_d = 2.1$  nM,  $c = 0.4$  nM). This work was subcontracted by Sanofi to CEREP (<http://www.cerep.fr>).

#### 1.1.2. $\log D_{7.4}$ determination.

$\log D_{7.4}$  (*n*-octanol / buffer pH 7.4 partition coefficient) values were determined based on a validated and standardized HPLC method, by conversion of the recorded retention time for each compound (correlation between retention times and known  $\log D$  values of similar compounds). HPLC conditions: Alliance 2695 - PDA Waters, X-Terra MS C18 (4.6 x 20 mm, 3.5  $\mu$ m) column; mobile phase 5 mM MOPS / (CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>NOH pH 7.4 (A), 5 % MOPS / (CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>NOH (100 mM, pH 7.4) / 95 % CH<sub>3</sub>CN (B); gradient (A / B): 98:2 (0.5 min), 0:100 (4.8 min), 98:2 (1.6 min); 1.2 mL/min; 25 °C; detection at 254 nm.

#### 1.1.3. Microsomal metabolic stability evaluation.

Stability against human-, rat- and mouse-derived microsomes was assessed based on the following two tests: "Intrinsic clearance" and "Biotransformation".

##### 1.1.3.a. *Intrinsic clearance.*

In this test, compounds were incubated with hepatic microsomal fractions (male CD1 mouse, male Sprague-Dawley rat or humans (BD pool)) using the following experimental conditions throughout the study: microsomal proteins concentration = 0.25 mg/mL; substrate concentration = 0.5  $\mu$ M; cofactor = 1 mM NADPH. For each compound to be tested, 5 samples were prepared, and incubated respectively for 0, 5, 10, 20 and 30 min. Enzyme activity was stopped with 1 volume of acetonitrile, and proteins removed by centrifugation. The supernatant fluids were then analysed by UPLC / HRMS (UPLC: Agilent Polaris C18 (50 x 2.0 mm, 3  $\mu$ m) column; mobile phase: (A) H<sub>2</sub>O + 0.1 % formic

acid, (B) acetonitrile + 0.1 % formic acid; gradient (A / B): 90:10 to 10:90 (2.1 min), then 10:90 for 0.3 min and back to 90:10 (0.1 min); 0.5 mL/min; injection volume: 5  $\mu$ L. HRMS: Thermo Scientific Hybride Q Exactive™ quadripôle-Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Inc., NYSE:TMO, Waltham, MA, USA)).

The data were collected and processed using GMSU software (GUBBS, Alpharetta, GA, USA), leading to quantification of the unchanged tested compound. Intrinsic clearances were expressed as  $\mu$ L / min / mg protein, and calculated, for each compound, as follows. First, the percentage of unchanged compound (% stability) at T = 5, 10, 20 and 30 min was calculated by normalizing the data at these time points to the data recorded at T = 0 min for the analyte / internal standard peak area ratio. % stability = [peak area ratio at T / peak area ratio at T0] x 100. Then, the elimination slope (-k) (k is expressed in  $\text{min}^{-1}$ ) was determined using a linear regression of the neperian logarithm (ln) of the % stability versus the incubation time (T).

Intrinsic clearance (InC) was then determined as follows:  $\text{InC} = [k / \text{protein concentration}] \times 1000$  (protein concentration is expressed in mg / mL).

### 1.1.3.b. Biotransformation.

In this test, compounds were incubated with hepatic microsomal fractions (male CD1 mouse, male Sprague-Dawley rat or humans (BD pool)) using the following experimental conditions throughout the study: microsomal proteins concentration = 1 mg/mL; bovine serum albumin (BSA) concentration = 1 mg/mL; substrate concentration = 5 mM; cofactor (if used, see below): 1 mM aq. NADPH. For each compound to be tested, 2 samples were prepared: Sample A: microsomal incubation, 0 min, without cofactor; Sample B: microsomal incubation, 20 min, with cofactor. Enzyme activity was stopped with 1 volume of acetonitrile, and proteins removed by centrifugation. The supernatant fluids were then analysed by HPLC / ESI-MS / MS with the mass spectrometer set in selected ion recording (SIR) in positive mode (HPLC: Waters Symmetry C18 (125 x 2.1 mm, 3 mm) column; mobile phase: (A) water containing ammonium acetate (0.25 g/L) and formic acid (2 mL/L), (B) acetonitrile / methanol (80 / 20) containing ammonium acetate (0.15 g/L), formic acid (2 mL/L) and water (10 mL/L); gradient (A / B): 90:10 (0.75 min), 0:100 (3.25 min), 90:10 (2.0 min); 0.3 mL/min; injection volume: 10 mL).

The data were collected and processed using MassLynx 4.0 software from Waters-Micromass, leading to quantification of the unchanged tested compound. The percentages of biotransformation, consisting in oxidative reactions as well as non-co-factor-dependent reactions such as ester bond hydrolysis, were calculated using the following formula:

$$[\% \text{ biotransformation}] = \left[ 1 - \frac{\text{Peak Area corresponding to unchanged compound in Sample B}}{\text{Peak Area corresponding to unchanged compound in Sample A}} \times 100 \right].$$

## 1.2. CB<sub>2</sub>R ligands.

*In vitro* data related to the CB<sub>2</sub>R were obtained through the FP7 INMiND collaborative project and notably a privileged link of KU Leuven with Roche. All Assays were performed at Roche Innovation Center Basel, F. Hoffman-La Roche Ltd., Basel (Switzerland).

### 1.2.1. binding, efficacy and selectivity.

Binding affinities for the CB<sub>2</sub>R were determined using membranes prepared from cells expressing human or mouse CB<sub>2</sub>R and screened against [<sup>3</sup>H]CP55940. Binding affinities for the CB<sub>1</sub>R were determined analogously using membranes from cells expressing mouse CB<sub>1</sub>R. Ki values were calculated from a single experiment using triplicates of 10 different concentrations of compound. Efficacy (EC<sub>50</sub>) were obtained through cAMP assays, performed using CHO cells stably expressing either human CB<sub>2</sub>R, human CB<sub>1</sub>R or mouse CB<sub>2</sub>R, as previously described in Ullmer *et al.*<sup>172</sup>

### 1.2.2. Intrinsic clearance.

Intrinsic clearance was determined using a similar assay to the one reported above. Briefly, for human or mice, pooled commercially available microsome preparations from liver tissues were used (for human, ultra-pooled (150 mixed gender donors) liver microsomes were purchased to account for the biological variance *in vivo*). The following experimental conditions were used throughout the study: for the microsome incubations, 96 deep well plates were applied, which were incubated at 37 °C on a TECAN (Tecan Group Ltd, Switzerland) equipped with Te-Shake shakers and a warming device (Tecan Group Ltd, Switzerland). The incubation buffer was 0.1 M phosphate buffer at pH 7.4. The NADPH regenerating system consisted of 30 mM glucose-6-phosphate disodium salt hydrate; 10 mM NADP; 30 mM MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O and 5 mg/mL glucose-6-phosphate dehydrogenase (Roche Diagnostics) in 0.1 M potassium phosphate buffer pH 7.4. Each compound was tested at a concentration of 1 μM in microsome incubations of 0.5 mg/mL plus cofactor NADPH. After 1, 3, 6, 9, 15, 25, 35 and 45 min, 40 μL incubation solutions were transferred and quenched with 3 / 1 (v / v) acetonitrile containing internal standards. Samples were then cooled and centrifuged before analysis by LC-MS / MS.

Intrinsic clearance (InC, expressed as μL/min/mg protein) was calculated analogously to what is described above (1.1.3.a): the neperian logarithm peak area ratios (test compound peak area / internal standard peak area) were plotted first against incubation time using a linear fit. The calculated slope was extracted and used to determine the intrinsic clearance using the following formula  $\text{InC} = [-\text{slope (min}^{-1})/\text{protein concentration (mg/mL)}] \times 1000$ .

## 2. *In vitro* autoradiography and *in vivo* studies.

For the TSPO [<sup>18</sup>F]radiotracer ([<sup>18</sup>F]-**60**), *in vivo* μTEP imaging has been performed on rats (in-house-developed rat model of acute local neuroinflammation following AMPA unilateral injection). For the CB<sub>2</sub>R [<sup>18</sup>F]radiotracer ([<sup>18</sup>F]-**79**), *in vitro* autoradiographies have been performed on spleen of healthy rat and mouse. No such data have been recorded yet concerning the P2Y<sub>12</sub>R and P2Y<sub>14</sub>R [<sup>11</sup>C]radiotracers ([<sup>18</sup>F]-**96** and [<sup>18</sup>F]-**133**).

### 2.1. TSPO.

#### 2.1.1. Description of the neuroinflammatory animal model used.

Striatal AMPA-mediated excitotoxicity and acute local neuroinflammation in the brain of rats (Wistar) was induced according to reported in-house procedures<sup>76,81,173</sup>. The protocol used includes a stereotactic injection in the right striatum of 0.5 μL of AMPA ((*R,S*)- $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolopropionic acid, 15 mM in phosphate buffered saline (PBS) buffer) in anaesthetized and normothermically-controlled animals followed by a resting period of 7 days.

#### 2.1.2. *In vivo* μTEP imaging (general procedure).

Rats (Wistar, AMPA-model, see above, typically n = 4, 355 ± 22.5 g) were imaged with the radiotracer alone seven days after intrastriatal injection of AMPA using a small-animal-dedicated, INVEON PET / CT or PET only tomograph (Siemens, Germany). Anesthesia of animals was induced by a mixture of isoflurane and O<sub>2</sub> (3 % / 97 %). Animals were then placed in a home-made stereotaxic frame compatible with PET acquisition, maintained anesthetized by using only a 1.5 % - 2.5 % mixture of isoflurane in O<sub>2</sub> and maintained normothermic using a heating pad (Heater Pad Biovet<sup>®</sup>, m2m Imaging Corp., Cleveland, USA). Animals were injected with the radiotracer (e.g. [<sup>18</sup>F]-**60**, typically 0.90 to 1.1 mCi, 33 - 41 GBq) in the caudal lateral vein using a 24 gauge catheter. Imaging started at the time of injection of the radiotracer and lasted usually for 60 min. 3D-PET acquisitions were performed with the coincidence time window set to 3.432 nsec and the energy levels of discrimination set to 350 keV and 650 keV. The

list mode file of the emission scans was histogrammed into 24 dynamic frames (3 x 30 sec, 5 x 60 sec, 5 x 2 min, 3 x 3 min, 3 x 3 min, 4 x 5 min and 1 x 10 min) with a maximum ring difference of 79 and a span of 3. A 3D attenuation correction file was generated with correction factors either measured using an external cobalt-57 point source or using the CT X-ray source. The emission sinograms were then normalized and corrected for attenuation and radioactivity decay. 3D images were reconstructed with the Fourier rebinning (FORE) and ordered-subsets expectation-maximization, 2-dimensional (OSEM 2D) algorithms (16 subsets and 4 iterations). Image analysis and quantification of radioactivity uptake in volumes of interest (VOIs) were performed using Brain-Visa / Anatomist version 3.1 developed in-house<sup>174</sup>. On the ipsilateral side, delineation of the lesion area was made by manual segmentation on the summed-frame images spanning the last 30 min of the PET acquisition. A region of interest was drawn on each adjacent transaxial section containing the lesion and combined to define a volume of interest (VOI). On the contralateral side, an ovoid VOI (4 x 4 x 4 voxels, 22 mm<sup>3</sup>) was manually positioned in the center of the striatum. These VOIs were then projected onto all dynamic frames and the resulting time activity curves were then normalized for the percentage of injected dose per milliliter (% ID/mL) and corrected for fluorine-18 decay.

## 2.2. CB<sub>2</sub>R.

### 2.2.1 *In vitro* autoradiography.

Spleen slices of healthy rat (Sprague Dawley) or mouse (FVB and nude) were prepared according to the following protocol. It includes decapitation of the animals under terminal anaesthesia, quick brain and organ removal and freezing in cold (-80 °C, dry-ice) isopentane followed by coronally, 10 µm-thick slicing. Then, adjacent spleen slices were taken and incubated for 20 min in Tris Buffer (TRIZMA pre-set Crystals, Sigma<sup>®</sup>, adjusted at pH 7.4 at 4 °C, 50 mM with NaCl 120 mM) containing the radiotracer alone (e.g. [<sup>18</sup>F]-**79**, typically 90 - 120 MBq, < 10 nM), or with the non-radiolabelled reference compound (e.g. **79**, 20 µM). Spleen sections were then washed 2 times for 2 min and once for 10 sec with cold (4 °C) buffer, then exposed on a Phosphor-Imager screen overnight. Autoradiograms were scanned and then analysed using the Image J software (developed by the National Institutes of Health), by manually drawing selected regions of interest (ROIs). Binding in the ROI was then expressed as the number of counts per surface unit. The target-to-background ratio (TBR) was calculated as the ratio of the binding in selected regions versus the plate.

### 2.2.2. Biodistribution.

Healthy rats (Wistar, n = 8, 300 ± 15 g) were injected intravenously into the tail vein with a solution of sterile saline containing approximately 9.25 MBq of the radiotracer ([<sup>18</sup>F]-**79**). The animals were then sacrificed at dedicated times points (5, 15, 30 and 60 min after the radiotracer injection) by sampling the whole blood through the abdominal aorta (under gaseous isoflurane anesthesia). After sacrifice, all visceral organs and blood were collected from each animal. The organs were weighed, and γ-counting was performed to assess the amount of <sup>18</sup>F radioactivity in each organ. Data were expressed as percentage injected dose per gram (% ID/g) and corrected for fluorine-18 decay.

In pre-blocking studies, the non-labelled tracer (e.g. **79**) was injected to the animal (2 mg/kg) in solution in ethanol, 15 min before injection of the radiotracer ([<sup>18</sup>F]-**79**). The animals were then sacrificed 30 min later, analogously to the protocol reported above.

# Références





1. Joliot, F.; Curie, I. *Nature* **1934**, *133*, 201–205.
2. Friedlander, G.; Kennedy, J. W.; Macias, E. S.; Miller, J. M. *Nuclear and Radiochemistry*; 3 édition.; Wiley: New York, **1981**.
3. Rubinstein, M.; Laurent, E.; Stegen, M. *Médecine nucléaire: manuel pratique*; De Boeck Supérieur, **2000**.
4. Bida, G. T.; Ehrenkauf, R. L.; Wolf, A. P.; Fowler, J. S.; MacGregor, R. R.; Ruth, T. J. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **1980**, *21*, 758–762.
5. Nickles, R. J.; Daube, M. E.; Ruth, T. J. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **1984**, *35*, 117–122.
6. Solin, O.; Bergman, J.; Haaparanta, M.; Reissell, A. *Int. J. Rad. Appl. Instrum. [A]* **1988**, *39*, 1065–1071.
7. Dollé, F.; Helfenbein, J.; Hinnen, F.; Mavel, S.; Mincheva, Z.; Saba, W.; Schöllhorn-Peyronneau, M.-A.; Valette, H.; Garreau, L.; Chalon, S.; Halldin, C.; Madelmont, J.-C.; Deloye, J.-B.; Bottlaender, M.; Le Gailliard, J.; Guilloteau, D.; Emond, P. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2007**, *50*, 716–723.
8. Damont, A.; Hinnen, F.; Kuhnast, B.; Schöllhorn-Peyronneau, M.-A.; James, M.; Luus, C.; Tavitian, B.; Kassiou, M.; Dollé, F. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2008**, *51*, 286–292.
9. Hamacher, K. C. H.; Coenen, H. H.; Stöcklin, G. *J. Nucl. Med.* **1986**, *27*, 235–8.
10. Kuhnast, B.; Hinnen, F.; Tavitian, B.; Dollé, F. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2008**, *51*, 336–342.
11. Marion Alvarez; Didier Le Bars In *Radiochemical Syntheses vol. 1*; Scott, P. J. H. and Hockley, B. G. Eds; pp. 87–94.
12. Bars, D. L.; Lemaire, C.; Ginovart, N.; Plenevaux, A.; Aerts, J.; Brihaye, C.; Hassoun, W.; Leviel, V.; Mekhsian, P.; Weissmann, D.; Pujol, J. F.; Luxen, A.; Comar, D. *Nucl. Med. Biol.* **1998**, *25*, 343–350.
13. Dollé, F.; Dolci, L.; Valette, H.; Hinnen, F.; Vaufrey, F.; Guenther, I.; Fuseau, C.; Coulon, C.; Bottlaender, M.; Crouzel, C. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 2251–2259.
14. Moon, B. S.; Park, J. H.; Lee, H. J.; Lee, B. C.; Kim, S. E. *Mol. Imaging Biol.* **2014**, *16*, 619–625.
15. Ryzhikov, N. N.; Seneca, N.; Krasikova, R. N.; Gomzina, N. A.; Shchukin, E.; Fedorova, O. S.; Vassiliev, D. A.; Gulyás, B.; Hall, H.; Savic, I.; Halldin, C. *Nucl. Med. Biol.* **2005**, *32*, 109–116.
16. Carroll, M. A.; Nairne, J.; Smith, G.; Widdowson, D. A. *J. Fluor. Chem.* **2007**, *128*, 127–132.
17. Neumann, C. N.; Hooker, J. M.; Ritter, T. *Nature* **2016**, *534*, 369–373.
18. Tredwell, M.; Preshlock, S. M.; Taylor, N. J.; Gruber, S.; Huiban, M.; Passchier, J.; Mercier, J.; Génicot, C.; Gouverneur, V. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 7751–7755.
19. Mossine, A. V.; Brooks, A. F.; Makaravage, K. J.; Miller, J. M.; Ichiishi, N.; Sanford, M. S.; Scott, P. J. H. *Org. Lett.* **2015**, *17*, 5780–5783.
20. Wong, D. F.; Waterhouse, R.; Kuwabara, H.; Kim, J.; Brašić, J. R.; Chamroonrat, W.; Stabins, M.; Holt, D. P.; Dannals, R. F.; Hamill, T. G.; Mozley, P. D. *J. Nucl. Med.* **2013**, *54*, 388–396.
21. Lee, E.; Kamlet, A. S.; Powers, D. C.; Neumann, C. N.; Boursalian, G. B.; Furuya, T.; Choi, D. C.; Hooker, J. M.; Ritter, T. *Science* **2011**, *334*, 639–642.
22. Kamlet, A. S.; Neumann, C. N.; Lee, E.; Carlin, S. M.; Moseley, C. K.; Stephenson, N.; Hooker, J. M.; Ritter, T. *PLOS ONE* **2013**, *8*, e59187.
23. Lee, E.; Hooker, J. M.; Ritter, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 17456–17458.
24. Ido, T.; Wan, C.-N.; Casella, V.; Fowler, J. S.; Wolf, A. P.; Reivich, M.; Kuhl, D. E. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **1978**, *14*, 175–183.

25. Dollé, F.; Demphel, S.; Hinnen, F.; Fournier, D.; Vaufrey, F.; Crouzel, C. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **1998**, *41*, 105–114.
26. De Vries, E. F. J.; Luurtsema, G.; Brüssermann, M.; Elsinga, P. H.; Vaalburg, W. *Appl. Radiat. Isot.* **1999**, *51*, 389–394.
27. Buckingham, F.; Kirjavainen, A. K.; Forsback, S.; Krzyczmonik, A.; Keller, T.; Newington, I. M.; Glaser, M.; Luthra, S. K.; Solin, O.; Gouverneur, V. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 13366–13369.
28. Petroni, D.; Berton, A.; Bettini, B.; Salvadori, P. A. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **2013**, *299*, 2005–2011.
29. Doi, H.; Ban, I.; Nonoyama, A.; Sumi, K.; Kuang, C.; Hosoya, T.; Tsukada, H.; Suzuki, M. *Chem. – Eur. J.* **2009**, *15*, 4165–4171.
30. Långström, B.; Lundqvist, H. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **1976**, *27*, 357–363.
31. Larsen, P.; Ulin, J.; Dahlstrøm, K.; Jensen, M. *Appl. Radiat. Isot.* **1997**, *48*, 153–157.
32. Link, J. M.; Krohn, K. A.; Clark, J. C. *Nucl. Med. Biol.* **1997**, *24*, 93–97.
33. Någren, K.; Halldin, C. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **1998**, *41*, 831–841.
34. Mock, B. H.; Mulholland, G. K.; Vavrek, M. T. *Nucl. Med. Biol.* **1999**, *26*, 467–471.
35. Wilson, A. A.; Garcia, A.; Chestakova, A.; Kung, H.; Houle, S. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2004**, *47*, 679–682.
36. Philippe, C.; Haeusler, D.; Mitterhauser, M.; Ungersboeck, J.; Viernstein, H.; Dudczak, R.; Wadsak, W. *Appl. Radiat. Isot.* **2011**, *69*, 1212–1217.
37. Imaizumi, M.; Kim, H.-J.; Zoghbi, S. S.; Briard, E.; Hong, J.; Musachio, J. L.; Ruetzler, C.; Chuang, D.-M.; Pike, V. W.; Innis, R. B.; Fujita, M. *Neurosci. Lett.* **2007**, *411*, 200–205.
38. Zhang, M.-R.; Kida, T.; Noguchi, J.; Furutsuka, K.; Maeda, J.; Suhara, T.; Suzuki, K. *Nucl. Med. Biol.* **2003**, *30*, 513–519.
39. James, M. L.; Fulton, R. R.; Henderson, D. J.; Eberl, S.; Meikle, S. R.; Thomson, S.; Allan, R. D.; Dollé, F.; Fulham, M. J.; Kassiou, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 6188–6194.
40. Quincoces, G.; Peñuelas, I.; Valero, M.; Serra, P.; Collantes, M.; Martí-Climent, J.; Arbizu, J.; José García-Velloso, M.; Ángel Richter, J. *Appl. Radiat. Isot.* **2006**, *64*, 808–811.
41. Miller, P. W.; Long, N. J.; Vilar, R.; Gee, A. D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8998–9033.
42. Hamill, T. G.; Krause, S.; Ryan, C.; Bonnefous, C.; Govek, S.; Seiders, T. J.; Cosford, N. D. P.; Roppe, J.; Kamenecka, T.; Patel, S.; Gibson, R. E.; Sanabria, S.; Riffel, K.; Eng, W.; King, C.; Yang, X.; Green, M. D.; O'malley, S. S.; Hargreaves, R.; Burns, H. D. *Synapse* **2005**, *56*, 205–216.
43. Rotstein, B. H.; Liang, S. H.; Placzek, M. S.; Hooker, J. M.; Gee, A. D.; Dollé, F.; Wilson, A. A.; Vasdev, N. *Chem. Soc. Rev.* **2016**.
44. Wilson, A. A.; Garcia, A.; Houle, S.; Sadovski, O.; Vasdev, N. *Chem. – Eur. J.* **2011**, *17*, 259–264.
45. Långström, B.; Itsenko, O.; Rahman, O. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2007**, *50*, 794–810.
46. Miller, P. W.; Kato, K.; Långström, B. In *The Chemistry of Molecular Imaging*; Long, N.; Wong, W.-T., Eds.; John Wiley & Sons, Inc, **2014**; pp. 79–103.
47. Janssen, B.; Vugts, D.; Funke, U.; Molenaar, G. T.; Kruijer, P. S.; Dollé, F.; Bormans, G.; Lammertsma, A. A.; Windhorst, A. D. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2015**, *58*, S44.
48. Roeda, D.; Dollé, F. *Curr. Top. Med. Chem.* **2010**, *10*, 1680–1700.
49. Bramoullé, Y.; Roeda, D.; Dollé, F. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 313–316.

50. Bramoullé, Y.; Puech, F.; Saba, W.; Valette, H.; Bottlaender, M.; George, P.; Dollé, F. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2008**, *51*, 153–158.
51. Dollé, F.; Valette, H.; Bramoullé, Y.; Guenther, I.; Fuseau, C.; Coulon, C.; Lartzien, C.; Jegham, S.; George, P.; Curet, O.; Pinquier, J.-L.; Bottlaender, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 1771–1775.
52. Dollé, F.; Bramoullé, Y.; Hinnen, F.; Demphel, S.; George, P.; Bottlaender, M. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2003**, *46*, 783–792.
53. Vasdev, N.; Sadovski, O.; Garcia, A.; Dollé, F.; Meyer, J. H.; Houle, S.; Wilson, A. A. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2011**, *54*, 678–680.
54. Andersson, Y.; Tyrefors, N.; Sihver, S.; Onoe, H.; Watanabe, Y.; Tsukada, H.; Långström, B. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **1998**, *41*, 567–576.
55. Grassi, I.; Nanni, C.; Allegri, V.; Morigi, J. J.; Montini, G. C.; Castellucci, P.; Fanti, S. *Am. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2011**, *2*, 33–47.
56. Tang, X.; Tang, G.; Nie, D. *Appl. Radiat. Isot.* **2013**, *82*, 81–86.
57. Venneti, S.; Lopresti, B. J.; Wiley, C. A. *Prog. Neurobiol.* **2006**, *80*, 308–322.
58. Rupprecht, R.; Papadopoulos, V.; Rammes, G.; Baghai, T. C.; Fan, J.; Akula, N.; Groyer, G.; Adams, D.; Schumacher, M. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9*, 971–988.
59. Papadopoulos, V.; Baraldi, M.; Guilarte, T. R.; Knudsen, T. B.; Lacapère, J.-J.; Lindemann, P.; Norenberg, M. D.; Nutt, D.; Weizman, A.; Zhang, M.-R.; Gavish, M. *Trends Pharmacol. Sci.* **2006**, *27*, 402–409.
60. Casellas, P.; Galiegue, S.; Basile, A. S. *Neurochem. Int.* **2002**, *40*, 475–486.
61. Papadopoulos, V.; Amri, H.; Boujrad, N.; Cascio, C.; Culty, M.; Garnier, M.; Hardwick, M.; Li, H.; Vidic, B.; Brown, A. S.; Reversa, J. L.; Bernassau, J. M.; Drieu, K. *Steroids* **1997**, *62*, 21–28.
62. Scarf, A. M.; Ittner, L. M.; Kassiou, M. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 581–592.
63. Luus, C.; Hanani, R.; Reynolds, A.; Kassiou, M. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2010**, *53*, 501–510.
64. Scarf, A. M.; Luus, C.; Da Pozzo, E.; Selleri, S.; Guarino, C.; Martini, C.; Ittner, L. M.; Kassiou, M. *Curr. Mol. Med.* **2012**, *12*, 488–493.
65. Camsonne, R.; Crouzel, C.; Comar, D.; Mazière, M.; Prenant, C.; Sastre, J.; Moulin, M.; Syrota, A. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **1984**, *21*, 985–991.
66. Banati, R. B.; Newcombe, J.; Gunn, R. N.; Cagnin, A.; Turkheimer, F.; Heppner, F.; Price, G.; Wegner, F.; Giovannoni, G.; Miller, D. H.; Perkin, G. D.; Smith, T.; Hewson, A. K.; Bydder, G.; Kreutzberg, G. W.; Jones, T.; Cuzner, M. L.; Myers, R. *Brain J. Neurol.* **2000**, *123* ( Pt 11), 2321–2337.
67. Maeda, J.; Suhara, T.; Zhang, M.-R.; Okauchi, T.; Yasuno, F.; Ikoma, Y.; Inaji, M.; Nagai, Y.; Takano, A.; Obayashi, S.; Suzuki, K. *Synapse* **2004**, *52*, 283–291.
68. Wang, M.; Gao, M.; Hutchins, G. D.; Zheng, Q.-H. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 2748–2753.
69. Takano, A.; Gulyás, B.; Varrone, A.; Karlsson, P.; Sjöholm, N.; Larsson, S.; Jonsson, C.; Odh, R.; Sparks, R.; Tawil, N. A.; Hoffmann, A.; Zimmermann, T.; Thiele, A.; Halldin, C. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2011**, *38*, 2058–2065.
70. Zhang, M.-R.; Maeda, J.; Furutsuka, K.; Yoshida, Y.; Ogawa, M.; Suhara, T.; Suzuki, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 201–204.
71. Briard, E.; Zoghbi, S. S.; Imaizumi, M.; Gourley, J. P.; Shetty, H. U.; Hong, J.; Cropley, V.; Fujita, M.; Innis, R. B.; Pike, V. W. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 17–30.

72. Damont, A.; Boisgard, R.; Kuhnast, B.; Lemée, F.; Raggiri, G.; Scarf, A. M.; Da Pozzo, E.; Selleri, S.; Martini, C.; Tavitian, B.; Kassiou, M.; Dollé, F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 4819–4822.
73. Wilson, A. A.; Garcia, A.; Parkes, J.; McCormick, P.; Stephenson, K. A.; Houle, S.; Vasdev, N. *Nucl. Med. Biol.* **2008**, *35*, 305–314.
74. Romeo, E.; Auta, J.; Kozikowski, A. P.; Ma, D.; Papadopoulos, V.; Puia, G.; Costa, E.; Guidotti, A. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1992**, *262*, 971–978.
75. Kozikowski, A. P.; Ma, D.; Romeo, E.; Auta, J.; Papadopoulos, V.; Puia, G.; Costa, E.; Guidotti, A. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 1060–1062.
76. Boutin, H.; Chauveau, F.; Thominaux, C.; Kuhnast, B.; Grégoire, M.-C.; Jan, S.; Trebossen, R.; Dollé, F.; Tavitian, B.; Mattner, F.; Katsifis, A. *Glia* **2007**, *55*, 1459–1468.
77. Thominaux, C.; Mattner, F.; Greguric, I.; Boutin, H.; Chauveau, F.; Kuhnast, B.; Grégoire, M.-C.; Loc'h, C.; Valette, H.; Bottlaender, M.; Hantraye, P.; Tavitian, B.; Katsifis, A.; Dollé, F. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2007**, *50*, 229–236.
78. Dollé, F.; Hinnen, F.; Damont, A.; Kuhnast, B.; Fookes, C.; Pham, T.; Tavitian, B.; Katsifis, A. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2008**, *51*, 435–439.
79. Fookes, C. J. R.; Pham, T. Q.; Mattner, F.; Greguric, I.; Loc'h, C.; Liu, X.; Berghofer, P.; Shepherd, R.; Gregoire, M.-C.; Katsifis, A. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 3700–3712.
80. Selleri, S.; Bruni, F.; Costagli, C.; Costanzo, A.; Guerrini, G.; Ciciani, G.; Costa, B.; Martini, C. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 2661–2671.
81. Chauveau, F.; Camp, N. V.; Dollé, F.; Kuhnast, B.; Hinnen, F.; Damont, A.; Boutin, H.; James, M.; Kassiou, M.; Tavitian, B. *J. Nucl. Med.* **2009**, *50*, 468–476.
82. Lavisse, S.; García-Lorenzo, D.; Peyronneau, M.-A.; Bodini, B.; Thiriez, C.; Kuhnast, B.; Comtat, C.; Remy, P.; Stankoff, B.; Bottlaender, M. *J. Nucl. Med.* **2015**, *56*, 1048–1054.
83. Golla, S. S.; Boellaard, R.; Oikonen, V.; Hoffmann, A.; Berckel, B. N. M. van; Windhorst, A. D.; Virta, J.; Beek, E. T. te; Groeneveld, G. J.; Haaparanta-Solin, M.; Luoto, P.; Savisto, N.; Solin, O.; Valencia, R.; Thiele, A.; Eriksson, J.; Schuit, R. C.; Lammertsma, A. A.; Rinne, J. *J. Nucl. Med.* **2016**, jnumed.116.173013.
84. Peyronneau, M.-A.; Saba, W.; Goutal, S.; Damont, A.; Dollé, F.; Kassiou, M.; Bottlaender, M.; Valette, H. *Drug Metab. Dispos.* **2013**, *41*, 122–131.
85. Médran-Navarrete, V.; Damont, A.; Peyronneau, M.-A.; Kuhnast, B.; Bernards, N.; Pottier, G.; Marguet, F.; Puech, F.; Boisgard, R.; Dollé, F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 1550–1556.
86. Benavides, J.; Boutin, H.; Castel, M.-N.; Damont, A.; Dollé, F.; Hantraye, P.; Marguet, F.; Rooney, T.; Rivron, L.; Tavitian, B.; Thominaux, C. Use of 7-chloro-n,n,5-trimethyl-4-oxo-3-phenyl-3,5-dihydro-4h-pyridazino[4,5-b]indole-1-acetamide as a biomarker of peripheral benzodiazepine receptor levels **2010**, 40.
87. Thominaux, C.; Damont, A.; Kuhnast, B.; Demphel, S.; Le Helleix, S.; Boisnard, S.; Rivron, L.; Chauveau, F.; Boutin, H.; Van Camp, N.; Boisgard, R.; Roy, S.; Allen, J.; Rooney, T.; Benavides, J.; Hantraye, P.; Tavitian, B.; Dollé, F. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2010**, *53*, 767–773.
88. Ferzaz, B.; Brault, E.; Bourliaud, G.; Robert, J.-P.; Poughon, G.; Claustre, Y.; Marguet, F.; Liere, P.; Schumacher, M.; Nowicki, J.-P.; Fournier, J.; Marabout, B.; Sevrin, M.; George, P.; Soubrie, P.; Benavides, J.; Scatton, B. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2002**, *301*, 1067–1078.
89. Damont, A.; Marguet, F.; Puech, F.; Dollé, F. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *101*, 736–745.
90. Aghazadeh Tabrizi, M.; Baraldi, P. G.; Borea, P. A.; Varani, K. *Chem. Rev.* **2016**.

91. Malfitano, A. M.; Basu, S.; Maresz, K.; Bifulco, M.; Dittel, B. N. *Semin. Immunol.* **2014**, *26*, 369–379.
92. Carlisle, S. J.; Marciano-Cabral, F.; Staab, A.; Ludwick, C.; Cabral, G. A. *Int. Immunopharmacol.* **2002**, *2*, 69–82.
93. Pertwee, R. G. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2012**, *367*, 3353–3363.
94. Picone, R. P.; Kendall, D. A. *Mol. Endocrinol.* **2015**, *29*, 801–813.
95. Evens, N.; M. Bormans, G. *Curr. Top. Med. Chem.* **2010**, *10*, 1527–1543.
96. Rinaldi-Carmona, M.; Barth, F.; Héaulme, M.; Shire, D.; Calandra, B.; Congy, C.; Martinez, S.; Maruani, J.; Néliat, G.; Caput, D.; Ferrara, P.; Soubrié, P.; Brelière, J. C.; Le Fur, G. *FEBS Lett.* **1994**, *350*, 240–244.
97. Rinaldi-Carmona, M.; Barth, F.; Millan, J.; Derocq, J.-M.; Casellas, P.; Congy, C.; Oustric, D.; Sarran, M.; Bouaboula, M.; Calandra, B.; Portier, M.; Shire, D.; Brelière, J.-C.; Fur, G. L. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1998**, *284*, 644–650.
98. Frau, S.; Dall'Angelo, S.; Baillie, G. L.; Ross, R. A.; Pira, M.; Tseng, C.-C.; Lazzari, P.; Zanda, M. *J. Fluor. Chem.* **2013**, *152*, 166–172.
99. Gallant, M.; Dufresne, C.; Gareau, Y.; Guay, D.; Leblanc, Y.; Prasit, P.; Rochette, C.; Sawyer, N.; Slipetz, D. M.; Tremblay, N.; Metters, K. M.; Labelle, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 2263–2268.
100. Evens, N.; Bosier, B.; Laere, K. V.; Verbruggen, A.; Bormans, G. *J. Nucl. Med.* **2007**, *48*, 133P–133P.
101. Evens, N.; Vandeputte, C.; Muccioli, G. G.; Lambert, D. M.; Baekelandt, V.; Verbruggen, A. M.; Debyser, Z.; Van Laere, K.; Bormans, G. M. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 4499–4505.
102. Evens, N.; Vandeputte, C.; Toelen, J.; Baekelandt, V.; Debyser, Z.; Verbruggen, A.; Van Laere, K.; Bormans, G. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2009**, *36*, 147–150.
103. Inaba, T.; Kaya, T.; Iwamura, H. 2-oxoquinoline compounds and medicinal uses thereof **2000**.
104. Evens, N.; Vandeputte, C.; Coolen, C.; Janssen, P.; Sciot, R.; Baekelandt, V.; Verbruggen, A. M.; Debyser, Z.; Van Laere, K.; Bormans, G. M. *Nucl. Med. Biol.* **2012**, *39*, 389–399.
105. Evens, N.; Muccioli, G. G.; Houbrechts, N.; Lambert, D. M.; Verbruggen, A. M.; Van Laere, K.; Bormans, G. M. *Nucl. Med. Biol.* **2009**, *36*, 455–465.
106. Gao, M.; Wang, M.; Miller, K. D.; Hutchins, G. D.; Zheng, Q.-H. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 2099–2106.
107. Mu, L.; Bieri, D.; Slavik, R.; Drandarov, K.; Müller, A.; Čermak, S.; Weber, M.; Schibli, R.; Krämer, S. D.; Ametamey, S. M. *J. Neurochem.* **2013**, *126*, 616–624.
108. Cheng, Y.; Albrecht, B. K.; Brown, J.; Buchanan, J. L.; Buckner, W. H.; DiMauro, E. F.; Emkey, R.; Fremeau, R. T.; Harmange, J.-C.; Hoffman, B. J.; Huang, L.; Huang, M.; Lee, J. H.; Lin, F.-F.; Martin, M. W.; Nguyen, H. Q.; Patel, V. F.; Tomlinson, S. A.; White, R. D.; Xia, X.; Hitchcock, S. A. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 5019–5034.
109. Rühl, T.; Deuther-Conrad, W.; Fischer, S.; Günther, R.; Hennig, L.; Krautscheid, H.; Brust, P. *Org. Med. Chem. Lett.* **2012**, *2*, 32.
110. Ohta, H.; Ishizaka, T.; Tatsuzuki, M.; Yoshinaga, M.; Iida, I.; Tomishima, Y.; Toda, Y.; Saito, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 6299–6304.
111. Yao, B. B.; Hsieh, G.; Daza, A. V.; Fan, Y.; Grayson, G. K.; Garrison, T. R.; El Kouhen, O.; Hooker, B. A.; Pai, M.; Wensink, E. J.; Salyers, A. K.; Chandran, P.; Zhu, C. Z.; Zhong, C.; Ryther, K.; Gallagher, M. E.; Chin, C.-L.; Tovcimak, A. E.; Hradil, V. P.; Fox, G. B.; Dart, M. J.; Honore, P.; Meyer, M. D. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2009**, *328*, 141–151.

112. Horti, A. G.; Gao, Y.; Ravert, H. T.; Finley, P.; Valentine, H.; Wong, D. F.; Endres, C. J.; Savonenko, A. V.; Dannals, R. F. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 5202–5207.
113. Hechler, B.; Gachet, C. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2015**, *35*, 2307–2315.
114. Hollopeter, G.; Jantzen, H.-M.; Vincent, D.; Li, G.; England, L.; Ramakrishnan, V.; Yang, R.-B.; Nurden, P.; Nurden, A.; Julius, D.; Conley, P. B. *Nature* **2001**, *409*, 202–207.
115. Foster, C. J.; Prosser, D. M.; Agans, J. M.; Zhai, Y.; Smith, M. D.; Lachowicz, J. E.; Zhang, F. L.; Gustafson, E.; Monsma, F. J.; Wiekowski, M. T.; Abbondanzo, S. J.; Cook, D. N.; Bayne, M. L.; Lira, S. A.; Chintala, M. S. *J. Clin. Invest.* **2001**, *107*, 1591–1598.
116. Sasaki, Y.; Hoshi, M.; Akazawa, C.; Nakamura, Y.; Tsuzuki, H.; Inoue, K.; Kohsaka, S. *Glia* **2003**, *44*, 242–250.
117. Swiatkowski, P.; Murugan, M.; Eyo, U. B.; Wang, Y.; Rangaraju, S.; Oh, S. B.; Wu, L.-J. *Neuroscience* **2016**, *318*, 22–33.
118. Kortum, S. W.; Lachance, R. M.; Schweitzer, B. A.; Yalamanchili, G.; Rahman, H.; Ennis, M. D.; Huff, R. M.; TenBrink, R. E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 5919–5923.
119. Tu, W.; Fan, J.; Zhang, H.; Xu, G.; Liu, Z.; Qu, J.; Yang, F.; Zhang, L.; Luan, T.; Yuan, J.; Gong, A.; Feng, J.; Sun, P.; Dong, Q. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 141–146.
120. Parlow, J. J.; Burney, M. W.; Case, B. L.; Girard, T. J.; Hall, K. A.; Hiebsch, R. R.; Huff, R. M.; Lachance, R. M.; Mischke, D. A.; Rapp, S. R.; Woerndle, R. S.; Ennis, M. D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 6148–6156.
121. Bach, P.; Boström, J.; Brickmann, K.; van Giezen, J. J. J.; Hovland, R.; Petersson, A. U.; Ray, A.; Zetterberg, F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 2877–2881.
122. Caroff, E.; Hubler, F.; Meyer, E.; Renneberg, D.; Gnerre, C.; Treiber, A.; Rey, M.; Hess, P.; Steiner, B.; Hilpert, K.; Riederer, M. A. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 9133–9153.
123. Caroff, E.; Meyer, E. *2-phenyl-4-cyclopropyl-pyrimidine derivatives*; Google Patents, **2013**.
124. Bach, P.; Boström, J.; Brickmann, K.; van Giezen, J. J. J.; Groneberg, R. D.; Harvey, D. M.; O’Sullivan, M.; Zetterberg, F. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *65*, 360–375.
125. Bach, P.; Antonsson, T.; Bylund, R.; Björkman, J.-A.; Österlund, K.; Giordanetto, F.; van Giezen, J. J. J.; Andersen, S. M.; Zachrisson, H.; Zetterberg, F. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 7015–7024.
126. Andersen, S. M.; Aurell, C.-J.; Zetterberg, F.; Bollmark, M.; Ehrl, R.; Schuisky, P.; Witt, A. *Org. Process Res. Dev.* **2013**, *17*, 1543–1551.
127. Trujillo, K.; Paoletta, S.; Kiselev, E.; Jacobson, K. A. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 4056–4064.
128. Gao, Z.-G.; Wei, Q.; Jayasekara, M. P. S.; Jacobson, K. A. *Purinergic Signal.* **2012**, *9*, 31–40.
129. Lazarowski, E. R.; Harden, T. K. *Mol. Pharmacol.* **2015**, *88*, 151–160.
130. Chambers, J. K.; Macdonald, L. E.; Sarau, H. M.; Ames, R. S.; Freeman, K.; Foley, J. J.; Zhu, Y.; McLaughlin, M. M.; Murdock, P.; McMillan, L.; Trill, J.; Swift, A.; Aiyar, N.; Taylor, P.; Vawter, L.; Naheed, S.; Szekeres, P.; Hervieu, G.; Scott, C.; Watson, J. M.; Murphy, A. J.; Duzic, E.; Klein, C.; Bergsma, D. J.; Wilson, S.; Livi, G. P. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 10767–10771.
131. Ko, H.; Fricks, I.; Ivanov, A. A.; Harden, T. K.; Jacobson, K. A. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 2030–2039.
132. Ko, H.; Das, A.; Carter, R. L.; Fricks, I. P.; Zhou, Y.; Ivanov, A. A.; Melman, A.; Joshi, B. V.; Kováč, P.; Hajduch, J.; Kirk, K. L.; Harden, T. K.; Jacobson, K. A. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 5298–5311.

133. Barrett, M. O.; Sesma, J. I.; Ball, C. B.; Jayasekara, P. S.; Jacobson, K. A.; Lazarowski, E. R.; Harden, T. K. *Mol. Pharmacol.* **2013**, *84*, 41–49.
134. Kiselev, E.; Barrett, M. O.; Katritch, V.; Paoletta, S.; Weitzer, C. D.; Brown, K. A.; Hammes, E.; Yin, A. L.; Zhao, Q.; Stevens, R. C.; Harden, T. K.; Jacobson, K. A. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 2833–2842.
135. Zhang, J.; Zhang, K.; Gao, Z.-G.; Paoletta, S.; Zhang, D.; Han, G. W.; Li, T.; Ma, L.; Zhang, W.; Müller, C. E.; Yang, H.; Jiang, H.; Cherezov, V.; Katritch, V.; Jacobson, K. A.; Stevens, R. C.; Wu, B.; Zhao, Q. *Nature* **2014**, *509*, 119–122.
136. Guay, D.; Beaulieu, C.; Belley, M.; Crane, S. N.; DeLuca, J.; Gareau, Y.; Hamel, M.; Henault, M.; Hyjazie, H.; Kargman, S.; Chan, C. C.; Xu, L.; Gordon, R.; Li, L.; Mamane, Y.; Morin, N.; Mancini, J.; Thérien, M.; Tranmer, G.; Truong, V. L.; Wang, Z.; Black, W. C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 2832–2835.
137. Guay, D.; Beaulieu, C.; Belley, M.; Crane, S.; De, L.; Fortin, R.; Gareau, Y.; Li, L.; Therien, M.; Tranmer, G.; Truong, V.; Wang, Z. Substituted Fused Pyrimidines as Antagonists of Gpr105 Activity **2008**.
138. James, M. L.; Fulton, R. R.; Henderson, D. J.; Eberl, S.; Meikle, S. R.; Thomson, S.; Allan, R. D.; Dollé, F.; Fulham, M. J.; Kassiou, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 6188–6194.
139. Damont, A.; Ching, S. A.; Médran-Navarrete, V.; Kuhnast, B.; Gaudy, H.; Dollé, F. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2011**, *54*, S461.
140. Keller, T.; Krzyczmonik, A.; Forback, S.; Kirjavainen, A.; Lopez-Picon, F.; Cacheux, F.; Damont, A.; Dollé, F.; Haaparanta-Solin, M.; Solin, O. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2015**, *58*, S153.
141. Haaparanta-Solin, M.; Lopez-Picon, F.; Almajidi, R.; Takkinen, J.; Keller, T.; Krzyczmonik, A.; Forback, S.; Kirjavainen, A.; Cacheux, F.; Damont, A.; O.Rinne, J.; Dollé, F.; Solin, O. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2015**, *58*, S272.
142. Damont, A.; Caillé, F.; Médran-Navarrete, V.; Cacheux, F.; Kuhnast, B.; Dollé, F. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2015**, *58*, S180.
143. Dollé, F. *Curr. Pharm. Des.* **2005**, *11*, 3221–3235.
144. Dollé, F. In *PET Chemistry: The driving Force in Molecular Imaging*; Ernst Schering Research Foundation Ed., **2007**; Vol. 62, pp. 113–157.
145. Thominaux, C.; Damont, A.; Kuhnast, B.; Demphel, S.; Le Helleix, S.; Boisnard, S.; Rivron, L.; Chauveau, F.; Boutin, H.; Van Camp, N.; Boisgard, R.; Roy, S.; Allen, J.; Rooney, T.; Benavides, J.; Hantraye, P.; Tavitian, B.; Dollé, F. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2010**, *53*, 767–773.
146. Sonogashira, K.; Tohda, Y.; Hagihara, N. *Tetrahedron Lett.* **1975**, *16*, 4467–4470.
147. James, M. L.; Fulton, R. R.; Henderson, D. J.; Eberl, S.; Meikle, S. R.; Thomson, S.; Allan, R. D.; Dollé, F.; Fulham, M. J.; Kassiou, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 6188–6194.
148. Sidler, D. R.; Lovelace, T. C.; McNamara, J. M.; Reider, P. J. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 1231–1233.
149. Basha, A.; Lipton, M.; Weinreb, S. M. *Tetrahedron Lett.* **1977**, *18*, 4171–4172.
150. Levin, J. I.; Turos, E.; Weinreb, S. M. *Synth. Commun.* **1982**, *12*, 989–993.
151. Yoshida, K.; Nakayama, K.; Yokomizo, Y.; Ohtsuka, M.; Takemura, M.; Hoshino, K.; Kanda, H.; Namba, K.; Nitani, H.; Zhang, J. Z.; Lee, V. J.; Watkins, W. J. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 8506–8518.
152. Miyaura, N.; Suzuki, A. *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2457–2483.
153. Suzuki, A. *J. Organomet. Chem.* **1999**, *576*, 147–168.



154. Weinberg, K.; Stoit, A.; Kruse, C. G.; Haddow, M. F.; Gallagher, T. *Tetrahedron* **2013**, *69*, 4694–4707.
155. Drummond, J. T.; Johnson, G. *J. Heterocycl. Chem.* **1988**, *25*, 1123–1127.
156. Baerfacker, L.; Scott, W.; Haegebarth, A.; Rehwinkel, H.; Politz, O.; Neuhaus, R.; Boemer, U. Substituted Pyrazolopyrimidines as Akt Kinase Inhibitors **2013**.
157. Chemler, S. R.; Trauner, D.; Danishefsky, S. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 4544–4568.
158. Arbačiauskienė, E.; Vilkauskaitė, G.; Eller, G. A.; Holzer, W.; Šačkus, A. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 7817–7824.
159. Barluenga, J.; Bayón, A. M.; Asensio, G. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1984**, 1334–1335.
160. Jimonet, P.; Audiau, F.; Barreau, M.; Blanchard, J.-C.; Boireau, A.; Bour, Y.; Coléno, M.-A.; Doble, A.; Doerflinger, G.; Do Huu, C.; Donat, M.-H.; Duchesne, J. M.; Ganil, P.; Guérémy, C.; Honoré, Eliane; Just, B.; Kerphirique, R.; Gontier, S.; Hubert, P.; Laduron, P. M.; Le Blevec, J.; Meunier, M.; Miquet, J.-M.; Nemecek, C.; Pasquet, M.; Piot, O.; Pratt, J.; Rataud, J.; Reibaud, M.; Stutzmann, J.-M.; Mignani, S. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 2828–2843.
161. Baskin, J. M.; Wang, Z. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 8479–8483.
162. Kuttner, J. R.; Hilt, G. *Macromolecules* **2014**, *47*, 5532–5541.
163. Farina, V.; Krishnan, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 9585–9595.
164. Fujii, N.; Otaka, A.; Sugiyama, N.; Hatano, M.; Yajima, H. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1987**, *35*, 3880–3883.
165. Trusova, M.; Krasnokutskaya, E.; Postnikov, P.; Choi, Y.; Chi, K.-W.; Filimonov, V. *Synthesis* **2011**, *2011*, 2154–2158.
166. Qian, M.; Glaser, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 880–887.
167. Médran-Navarrete, V.; Bernards, N.; Kuhnast, B.; Damont, A.; Pottier, G.; Peyronneau, M.-A.; Kassiou, M.; Marguet, F.; Puech, F.; Boisgard, R.; Dollé, F. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2014**, *57*, 410–418.
168. Kuhnast, B.; Damont, A.; Hinnen, F.; Catarina, T.; Demphel, S.; Le Helleix, S.; Coulon, C.; Goutal, S.; Gervais, P.; Dollé, F. *Appl. Radiat. Isot.* **2012**, *70*, 489–497.
169. Le Helleix, S.; Dollé, F.; Kuhnast, B. *Appl. Radiat. Isot.* **2013**, *82*, 7–11.
170. Larsen, P.; Ulin, J.; Dahlstrøm, K. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **1995**, *37*, 1–102.
171. Jewett, D. M. *Int. J. Rad. Appl. Instrum. [A]* **1992**, *43*, 1383–1385.
172. Ullmer, C.; Zoffmann, S.; Bohrmann, B.; Matile, H.; Lindemann, L.; Flor, P.; Malherbe, P. *Br. J. Pharmacol.* **2012**, *167*, 1448–1466.
173. Boutin, H.; Chauveau, F.; Thominiaux, C.; Grégoire, M.-C.; James, M. L.; Trebossen, R.; Hantraye, P.; Dollé, F.; Tavitian, B.; Kassiou, M. *J. Nucl. Med.* **2007**, *48*, 573–581.
174. Cointepas, Y.; Mangin, J.-F.; Garnerio, L.; Poline, J.-B.; Benali, H. *NeuroImage* **2001**, *13*, 98.

# Annexes



Novel Pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidines as Translocator Protein 18 kDa (TSPO) Ligands: Synthesis, *in Vitro* Biological Evaluation, [<sup>18</sup>F]-Labeling, and *in Vivo* Neuroinflammation PET Images

Annelaure Damont,<sup>\*,†,‡</sup> Vincent Médran-Navarrete,<sup>†,‡</sup> Fanny Cacheux,<sup>†,‡</sup> Bertrand Kuhnast,<sup>†,‡</sup> Géraldine Pottier,<sup>†,‡</sup> Nicholas Bernards,<sup>†,‡</sup> Frank Marguet,<sup>§</sup> Frédéric Puech,<sup>§</sup> Raphaël Boisgard,<sup>†,‡</sup> and Frédéric Dollé<sup>†,‡</sup>

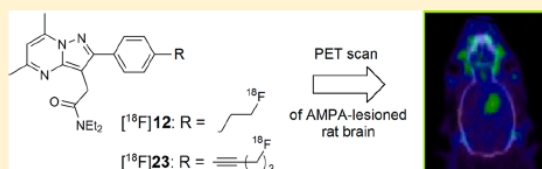
<sup>†</sup>CEA, I2BM, Service Hospitalier Frédéric Joliot, Orsay, France

<sup>‡</sup>Inserm/CEA/Université Paris Sud, UMR 1023–ERL 9218 CNRS, IMIV, Orsay, France

<sup>§</sup>LGCR, Sanofi, Chilly-Mazarin, France

**S** Supporting Information

**ABSTRACT:** A series of novel pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidines, closely related to *N,N*-diethyl-2-(2-(4-(2-fluoroethoxy)-phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (2, DPA-714), were synthesized and biologically *in vitro* evaluated for their potential to bind the translocator protein 18 kDa (TSPO), a protein today recognized as an early biomarker of neuroinflammatory processes. This series is composed of fluoroalkyl- and fluoroalkynyl- analogues, prepared from a common iodinated intermediate via Sonogashira coupling reactions. All derivatives displayed subnanomolar affinity for the TSPO (0.37 to 0.86 nM), comparable to that of 2 (0.91 nM). Two of them were radiolabeled with fluorine-18, and their biodistribution was investigated by *in vitro* autoradiography and positron emission tomography (PET) imaging on a rodent model of neuroinflammation. Brain uptake and local accumulation of both compounds in the AMPA-mediated lesion confirm their potential as *in vivo* PET-radiotracers. In particular, [<sup>18</sup>F]23 exhibited a significantly higher ipsi- to contralateral ratio at 60 min than the parent molecule [<sup>18</sup>F]2 *in vivo*.



**INTRODUCTION**

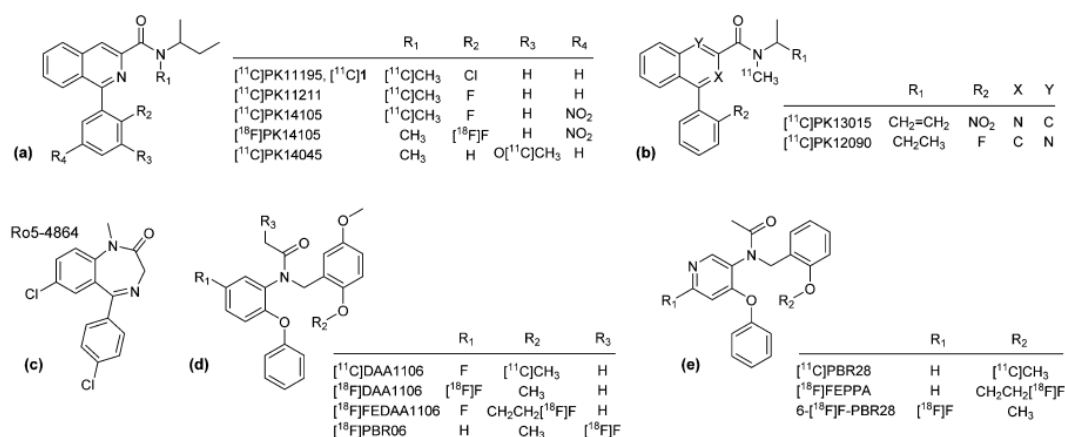
Nearly all brain diseases reveal pronounced changes in the functional states of glial cells and most prominent is the presence of activated microglia in areas of progressive disease or tissue destruction. Microglia activation is characterized by the overexpression of the translocator protein 18 kDa (TSPO) on the outer mitochondrial membranes, supporting for over two decades considerable efforts in the design of radioligands for the *in vivo* imaging of this pharmacological target by Positron Emission Tomography (PET).<sup>1</sup>

Today, the isoquinoline carboxamide [<sup>11</sup>C]1 ([<sup>11</sup>C]-PK11195<sup>1</sup>) is still the most widely used PET-radioligand to localize TSPO and visualize its expression level changes *in vivo*. Nevertheless, the nonoptimal profile of this radioligand, especially with regard to the high level of nonspecific binding resulting in a poor signal-to-noise ratio obtained *in vivo* during PET studies, encourage the search for more adequate radioligands. Few analogues of 1 labeled with a short-lived isotope have been described so far, among which are [<sup>11</sup>C]PK11211,<sup>2</sup> [<sup>11</sup>C]PK14105,<sup>2</sup> and [<sup>18</sup>F]PK14105<sup>2</sup> or more recently [<sup>11</sup>C]-PK13015,<sup>3</sup> [<sup>11</sup>C]PK12090,<sup>3</sup> and [<sup>11</sup>C]PK14045<sup>3</sup> (Figure 1). SAR studies are still ongoing to identify new lead TSPO ligands derived from 1 such as 4-phenylquinazoline-2-carboxamides<sup>4,5</sup> or derivatives featuring a 2-arylquinoline scaffold.<sup>6</sup> Besides these

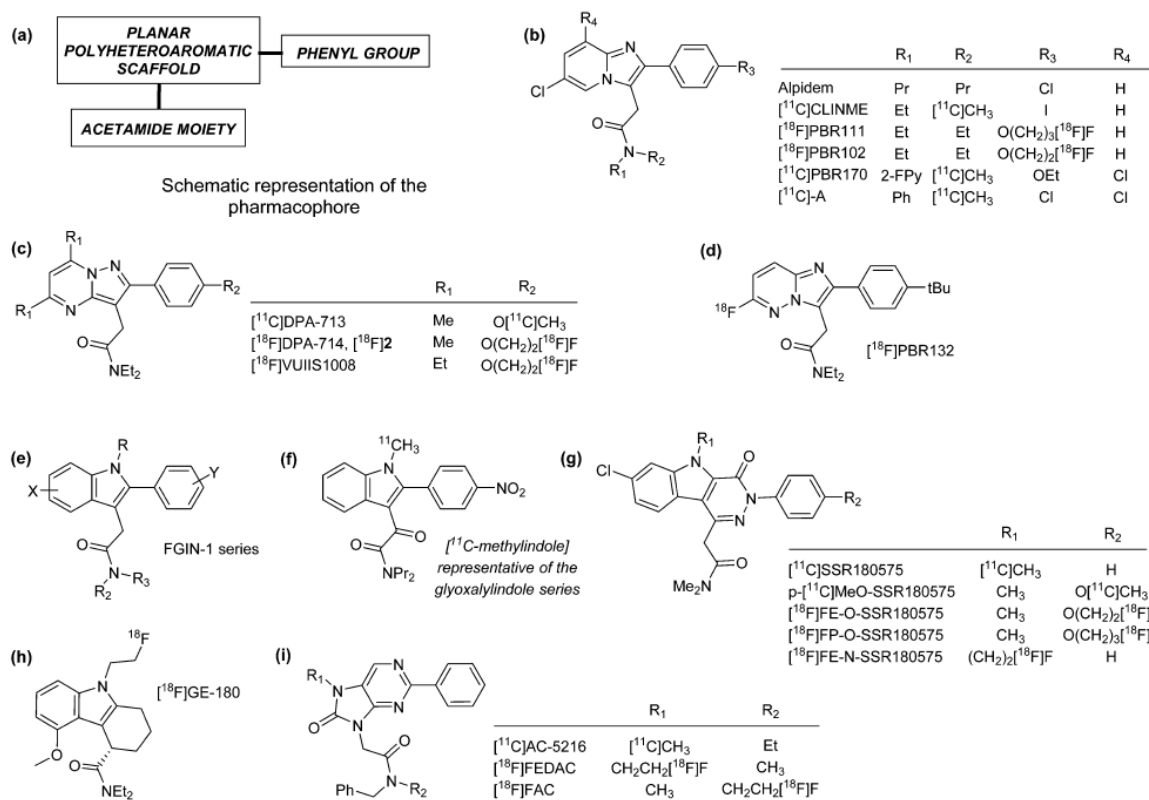
analogues of 1, a number of new compounds, belonging to various chemical families, have also been prepared and investigated as TSPO ligands. Among them, some have been labeled (usually on the basis of their promising *in vitro* profiles) either with carbon-11 ( $T_{1/2} = 20.4$  min) or with the longer half-life isotope fluorine-18 ( $T_{1/2} = 109.8$  min) and *in vivo* evaluated. The early discovery of the benzodiazepine Ro5-4864,<sup>7,8</sup> a chlorinated analogue of diazepam, as high affinity TSPO ligand and its carbon-11-labeling in 1984,<sup>9</sup> have encouraged the development of a series of compounds whose structures result from the cleavage of the diazepam ring, giving rise to the phenoxyarylacetamides family. [<sup>11</sup>C]DAA1106<sup>10–12</sup> was the first carbon-11-labeled representative of this series to emerge because of its subnanomolar binding affinity and selectivity for TSPO. Its initial development was concomitant with the synthesis of two fluorine-18-analogues, [<sup>18</sup>F]FMDAA1106<sup>13</sup> and [<sup>18</sup>F]-FEDAA1106,<sup>13</sup> which was rapidly followed by the preparation of [<sup>18</sup>F]PBR06<sup>14,15</sup> in 2005 and [<sup>18</sup>F]DAA1106<sup>16</sup> in 2007. So far, other closely related compounds have appeared in the literature for their high potential to *in vivo* PET-image the TSPO. For example, [<sup>11</sup>C]PBR28,<sup>17,18</sup> a carbon-11-labeled phenoxypridin-

Received: June 17, 2015

Published: August 17, 2015



**Figure 1.** Representative examples of TSPO ligands belonging to the following families: (a) isoquinolines, including [<sup>11</sup>C]1, (b) other analogues of 1, (c) a benzodiazepine, (d) phenoxyphenylacetamides, and (e) phenoxyphenylacetamides.



**Figure 2.** (a) Schematic representation of a number of TSPO ligands and some representative examples belonging to the following families: (b) 2-aryl-imidazo[1,2-a]pyridine-3-acetamides, (c) 2-aryl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidine-3-acetamides, (d) 2-aryl-imidazo[1,2-b]pyridazine-3-acetamides, (e) 2-aryl-indole-3-acetamides, (f) 2-aryl-indole-3-glyoxylamides, (g) 3-aryl-pyridazino[4,5-b]indole-5-acetamides, (h)  $\alpha$ -branched-indole acetamides, and (i) 2-(8-oxo-2-aryl-dihydropyridine) acetamides.

yl acetamide, was proposed by Briard et al., followed by two radiofluorinated analogues: [<sup>18</sup>F]FEPPA<sup>19</sup> and more recently 6-[<sup>18</sup>F]F-PBR28.<sup>20</sup>

Besides these derivatives inspired from 1 or benzodiazepines, TSPO PET imaging has encouraged the design of many other

radioligands that share a number of common structural characteristics and can be grouped together around the schematic architectural representation proposed in Figure 2a. Indeed, they exhibit a multicyclic heteroaromatic planar skeleton as the central molecular core and have the particularity to

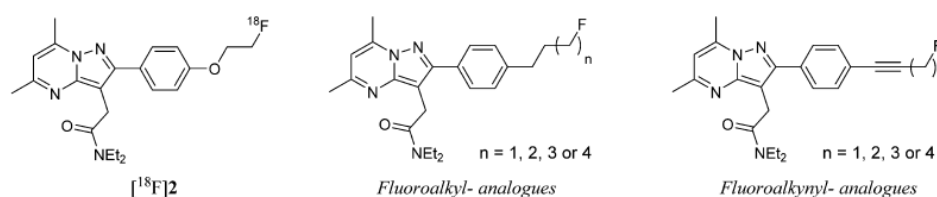
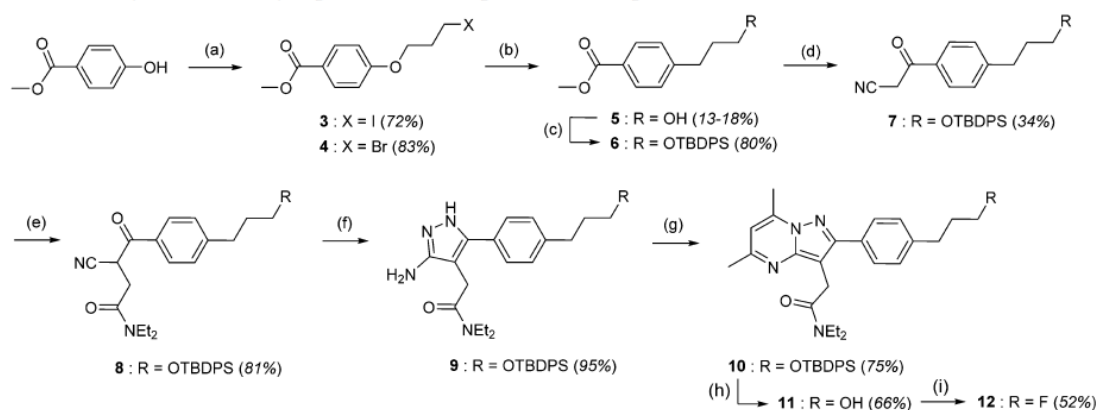


Figure 3. Structures of  $[^{18}\text{F}]2$  and the investigated new fluoroalkyl- and fluoroalkynyl- analogues.

Scheme 1. First Synthetic Pathway Explored for the Preparation of Compound  $12^a$



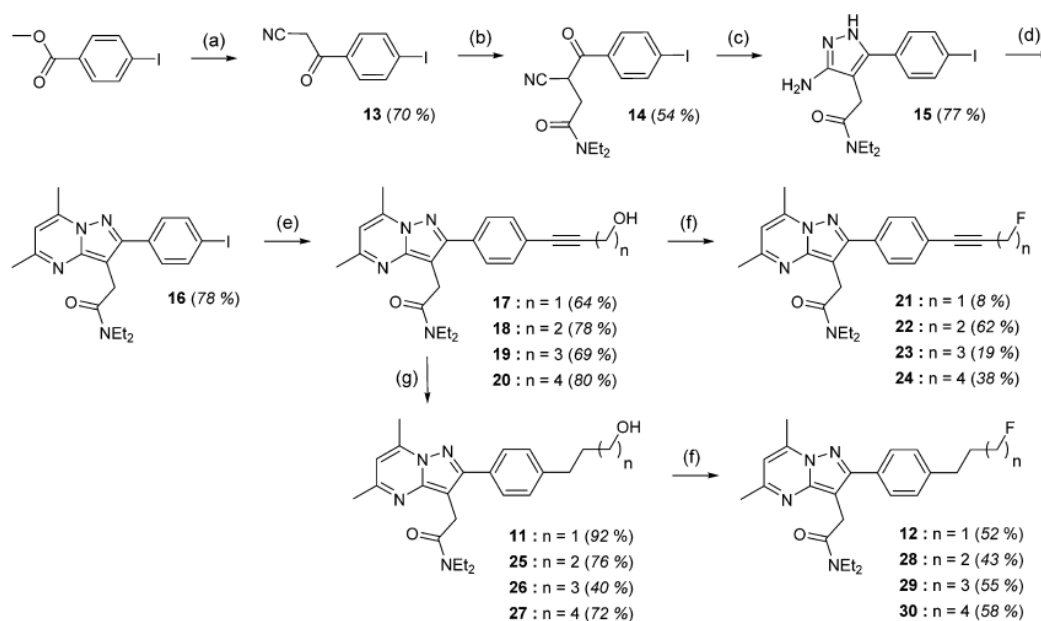
<sup>a</sup>Reaction conditions: (a) 1,3-diiodopropane or 1,3-dibromopropane,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , acetone,  $50^\circ\text{C}$ , 16 h; (b)  $\text{Bu}_3\text{SnH}$ , AIBN, toluene, reflux, 12 h; (c) TBDPSCl, pyridine, r.t., 4 h; (d) NaOMe,  $\text{CH}_3\text{CN}$ , reflux, 4 h; (e) *N,N*-diethyl-chloroacetamide, NaOH, EtOH,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $75^\circ\text{C}$ , 12 h; (f)  $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , AcOH, EtOH,  $60^\circ\text{C}$ , 3 h; (g) pentan-2,4-dione, EtOH,  $60^\circ\text{C}$ , 16 h; (h) TBAF, THF, r.t., 8 h; (i) bis(2-methoxyethyl) aminosulfur trifluoride, toluene, r.t., 6 h.

commonly feature an acetamide function, linked to the heteroaromatic backbone, whose presence seems to be a requirement for efficient binding with the protein.<sup>21</sup> It is also interesting to note that most of these molecules display an aromatic ring directly attached to their planar scaffold. The first radiolabeled molecules of this kind were inspired from the structure of the imidazopyridine alpidem that binds both peripheral (TSPO) and central (CBR) benzodiazepine receptors. Within this series,  $[^{11}\text{C}]$ CLINME,<sup>22</sup>  $[^{11}\text{C}]$ PBR170,<sup>23–26</sup> and  $[^{11}\text{C}]$ -A<sup>27</sup> are carbon-11-labeled representative examples, while  $[^{18}\text{F}]$ PBR111<sup>28,29</sup> and  $[^{18}\text{F}]$ PBR102<sup>28,29</sup> are fluorine-18-labeled specimens. Beside imidazopyridine acetamides, a number of bioisosteric structures have also been explored as potential scaffolds allowing specific and efficient binding to the TSPO, such as pyrazolopyrimidine or imidazopyridazine acetamides. The carbon-11-labeled compound  $[^{11}\text{C}]$ DPA-713<sup>30–35</sup> and the fluorine-18 close analogues  $[^{18}\text{F}]2$  ( $[^{18}\text{F}]$ DPA-714)<sup>36–39</sup> and  $[^{18}\text{F}]$ VUIIS1008<sup>40,41</sup> are illustrations of TSPO imaging agents belonging to the pyrazolopyrimidine acetamides family, whereas  $[^{18}\text{F}]$ PBR132<sup>42</sup> is an example of an imidazopyridazine acetamide radioligand. A number of 2-aryl-indole-3-acetamide derivatives, also known as FGIN-1 class compounds,<sup>43</sup> were screened against TSPO and were shown to display high affinity and selectivity. Recently, conformationally constrained versions of this series of molecules have been explored as novel TSPO ligands, and one of them has been labeled at its methylindole moiety (Figure 2).<sup>44</sup> In this series, compounds feature a glyoxylamide moiety in replacement of the acetamide motif rendering the structures less flexible in hopes of increased affinity and selectivity toward the TSPO. Other closely related structures, resulting from the

fusion of the indole moiety with a pyridazine ring, have been proposed as potential probes to image TSPO expression.  $[^{11}\text{C}]$ SSR180575<sup>45</sup> is a carbon-11-labeled illustration of this phenyl-pyridazinoindole acetamide family. Another indoleacetamide,  $[^{18}\text{F}]$ GE-180,<sup>46</sup> bearing a label at the *N*-indole position has recently been reported. Unlike the other previously mentioned radioligands, it does not share the particularity of featuring a freely rotating aryl group linked to the main heteroaromatic core of the molecule and was conformationally constrained by cyclization via an  $\alpha$ -branching of the acetamide part. Finally, a number of 2-aryl-8-oxodihydropurine acetamides have also been radiolabeled and evaluated for their potential to selectively image the TSPO expression.  $[^{11}\text{C}]$ AC-5216,<sup>47</sup>  $[^{18}\text{F}]$ FEDAC,<sup>48</sup> and  $[^{18}\text{F}]$ FAC<sup>48</sup> are representative examples belonging to the latter series.

Among all these series of compounds, we have been particularly interested in the design of novel 3,5-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-ylacetamide (DPA) specimens, leading to the discovery of the fluoroethoxy derivative  $[^{18}\text{F}]2$ ,<sup>38,39</sup> today considered as a serious challenger of  $[^{11}\text{C}]1$ . However, recent studies clearly demonstrate that this compound is rapidly and extensively *in vivo* metabolized in both rodents (rats) and nonhuman primates (baboons).<sup>49</sup> The major radiometabolites generated have been identified: they mainly result from oxidation at the sensitive methyl groups of the DPA scaffold or oxidation at the  $\alpha$ -position of the nitrogen atom of the acetamide moiety leading to *N*-deethylated metabolites. These metabolites have been proved not to cross the human blood–brain barrier (BBB). Nevertheless and to a lesser extent, the brain-penetrant radiometabolite  $[^{18}\text{F}]$ fluoroacetate has also been



Scheme 2. Synthetic Preparation of Fluoroalkynyl (21–24)- and Fluoroalkyl (12 and 28–30)-Analogues<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Reaction conditions: (a) *n*-BuLi, CH<sub>3</sub>CN, THF, −65 °C, 30 min then methyl 4-iodobenzoate, −65 °C to −45 °C, 2 h; (b) NaOH, EtOH, r.t., 15 min then *N,N*-diethyl-chloroacetamide, NaI, r.t., 4 d; (c) N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, AcOH, EtOH, 80 °C, 5–8 h; (d) acetylacetone, EtOH, 80 °C, 5 h; (e) alkynyl alcohol, CuI, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, Et<sub>2</sub>NH, r.t., 24 h; (f) bis(2-methoxyethyl) aminosulfur trifluoride, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, r.t., 2–4 d.; (g) H<sub>2</sub>, Pd/C 10%, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, r.t., 48 h.

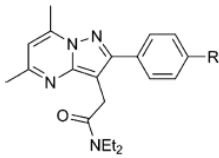
shown to be liberated.<sup>49</sup> Indeed, [<sup>18</sup>F]2 is also subjected to oxidation at the  $\alpha$ -position of the oxygen bridging the fluorine-18 atom to the DPA scaffold (ether linkage). The presence of [<sup>18</sup>F]fluoroacetate as well as its further *in vivo* conversion to [<sup>18</sup>F]fluoride may reduce the PET image quality. Thus, within the present work, novel DPA analogues were designed by replacing the ether linkage of 2 with fragments preventing metabolic fluoroacetate release. Two subseries of compounds were prepared: four fluoroalkyl- and four fluoroalkynyl-derivatives of 2 (Figure 3). Their TSPO binding and selectivity versus the CBR were evaluated *in vitro* as well as their lipophilicity. *In vitro* metabolism studies were also performed, using human, rat, and mouse microsomes. On the basis of the *in vitro* data obtained, two representatives, one in each subclass of analogues, were selected for radiolabeling with fluorine-18 to evaluate their potency as TSPO radiotracers in animal models.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Chemistry.** Compound 12, the structurally closest analogue of 2 in the fluoroalkyl series, featuring a methylene group as a replacement of the oxygen atom, was the first candidate of the new series to be prepared. The initial synthetic route employed for its preparation is depicted in Scheme 1. From commercially available methyl 4-hydroxybenzoate, the iodopropoxy or bromopropoxy derivatives 3 and 4 were obtained in good yields (72 and 83%, respectively) by *O*-alkylation with the appropriate 1,3-dihalopropane in the presence of a base in acetone. They were subsequently converted to methyl 4-(3-hydroxypropyl)-benzoate (5) via aryl translocation from oxygen to carbon using standard radical generating conditions (13–18%).<sup>50</sup> The resulting alcohol 5 was subsequently protected with *tert*-butyldiphenylsilyl chloride (TBDPSCl) to give compound 6

(80% yield). Reaction of 6 with sodium methoxide in refluxing acetonitrile yielded nitrile 7, which was alkylated with *N,N*-diethylchloroacetamide to afford amide 8 in sufficient amounts (28% over 2 steps). A first condensation reaction was conducted between 8 and hydrazine hydrochloride to afford the aminopyrazole 9 in excellent yield (95%). The latter compound was subsequently submitted to a second condensation step using pentan-2,4-dione to achieve the construction of the DPA scaffold and generate the pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine 10 (75% yield) to which the hydroxyl group was subsequently unprotected with tetrabutylammonium fluoride in THF to afford 11 (66% yield). Finally, alcohol 11 was treated with the deoxofluorinating agent bis(2-methoxyethyl) aminosulfur trifluoride in toluene at room temperature to afford compound 12 in 52% yield.

Afterward, a more general synthetic method was developed for the preparation of the fluoroalkyl- and fluoroalkynyl- analogues of 2, via a common iodophenyl intermediate (compound 16), as depicted in Scheme 2. This alternative pathway was also reused for the preparation of 12 at a higher scale stimulated by the need to increase its global yield of production due to the very low yield of the translocation reaction (13 to 18%). Thus, obtaining of cyanoketone 13 was achieved via the formation of the lithium salt of acetonitrile by treatment with *n*-BuLi in THF at −60 °C followed by reaction with commercial methyl 4-iodobenzoate at −45 °C (70% yield). Subsequent alkylation of 13 with *N,N*-diethylchloroacetamide in the presence of sodium hydroxide and sodium iodide in ethanol yielded amide 14 (54% yield), which, upon reaction with hydrazine monohydrate in refluxing ethanol with a catalytic amount of acetic acid, afforded aminopyrazole 15 in 77% yield. Pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine 16 was efficiently obtained (78% yield) by reacting 15 with pentan-2,4-dione in refluxing ethanol. Sonogashira coupling of 16 with the appropriate alkynol using Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and CuI in triethyl-

Table 1. *In Vitro* Competitive Binding Assays, Lipophilicity Determination, and LipE Calculation


Series	Ligand	R	TSPO $K_i$ (nM) <sup>a,b</sup>	CBR % inhib. at 1 $\mu$ M <sup>c</sup>	LogD <sub>7.4</sub> <sup>d</sup>	TSPO pIC <sub>50</sub>	LipE <sup>e</sup>
Alkyl-	2	O-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -F	0.91 ± 0.08	0 %	2.89	9.00	6.11
	12	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -F	0.37 ± 0.02	0 %	3.51	9.39	5.88
	28	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -F	0.86 ± 0.06	0 %	3.90	9.02	5.12
	29	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -F	0.54 ± 0.03	3 %	4.31	9.22	4.91
	30	(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> -F	0.45 ± 0.03	12 %	4.70	9.30	4.60
Alkynyl-	21	C≡C-CH <sub>2</sub> -F	0.54 ± 0.04	0 %	3.61	9.22	5.61
	22	C≡C-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -F	0.74 ± 0.06	0 %	3.67	9.09	5.42
	23	C≡C-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -F	0.35 ± 0.04	0 %	4.06	9.41	5.35
	24	C≡C-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -F	0.79 ± 0.09	0 %	4.35	9.06	4.71

<sup>a</sup>TSPO  $K_i$  values were determined using membrane homogenates of rat heart and screened against [<sup>3</sup>H]1 ( $K_d = 1.8$  nM,  $C = 0.2$  nM). <sup>b</sup>*In vitro* binding affinity values are the mean ± SE of duplicate measurements. <sup>c</sup>CBR binding affinity was evaluated using homogenates of rat cerebral cortex and expressed as % of inhibition at 1  $\mu$ M against [<sup>3</sup>H]flunitrazepam. <sup>d</sup>Retention time recorded for the tested compounds were converted into their logD<sub>7.4</sub> values using a validated, standardized HPLC method. <sup>e</sup>LipE values were calculated as follows: LipE = pIC<sub>50</sub> - LogD<sub>7.4</sub>.

amine afforded the expected hydroxyalkynylphenyl compounds 17, 18, 19, and 20 in good yields (64%, 78%, 69%, and 80% respectively). Alcohols 17, 18, 19, and 20 were then reacted with bis(2-methoxyethyl) aminosulfur trifluoride in dichloromethane to generate the corresponding fluorine derivatives 21, 22, 23, and 24 (8 to 62% yields). They were also hydrogenated in methanol in the presence of Pd/C for reduction of the triple bond to lead to their hydroxyalkylphenyl counterparts 11, 25, 26, and 27, respectively (40 to 92% yields). It is worth noting that compound 21 was not easily accessible using this strategy since reaction of bis(2-methoxyethyl) aminosulfur trifluoride with the propargylic alcohol 17 led to side products difficult to separate from the expected fluoropropynyl analogue 21. Finally, in the alkyl-series, alcohols 11, 25, 26, and 27 were converted to their fluorinated counterparts by deoxyfluorination in dichloromethane to give fluoropropyl-compound 12, fluorobutyl-compound 28, fluoropentyl-compound 29, and fluorohexyl-compound 30 in moderate yields (43 to 58%).

**In Vitro Binding Assays.** The binding affinity for the TSPO of these novel analogues of 2 were measured by competition experiments against [<sup>3</sup>H]1 in membrane homogenates of rat heart. The binding affinity of the newly synthesized compounds were also evaluated for the CBR by competitive binding assays against [<sup>3</sup>H]flunitrazepam using membrane homogenates of rat cerebral cortex. The inhibition constants ( $K_{ITSP0}$ ) and percentage of inhibition at 1  $\mu$ M (CBR) were determined for each ligand and are reported in Table 1. The lipophilicity parameter LogD<sub>7.4</sub> was also evaluated for this new series of compounds on the basis of their HPLC retention times and the corresponding lipophilic efficiencies (LipE) were calculated.<sup>51</sup> Data are summarized in Table 1.

All analogues displayed subnanomolar affinity for the TSPO (0.37 to 0.86 nM), comparable to 2 (0.91 nM). In the fluoroalkyl series, the lowest  $K_i$  value was obtained for compound 12 (0.37 nM), whereas in the alkynyl series, it was found for compound 23 (0.35 nM). Additionally, all compounds showed excellent selectivity toward TSPO, except compounds 29 and 30, both of which exhibited a slight binding affinity for the CBR (3 and 12% at 1  $\mu$ M, respectively). The LogD<sub>7.4</sub> values were all higher

(3.51–4.70) than that of 2 (2.89), most likely due to the replacement of the oxygen atom attached to the phenyl ring with alkyl- or alkynyl-fragments leading to less hydrophilic structures. These LogD<sub>7.4</sub> values followed the expected trend of increase with the length of the carbonated side-chain in both series. Nevertheless, most of the LogD<sub>7.4</sub> values keep in the range for expected good passive cerebral penetration of the ligands. Calculated LipE scores ranged from 4.60 (compound 30) to 6.11 (compound 2). The highest LipE score was obtained with 2 and is due to the combination of a subnanomolar affinity for the TSPO and a rather low logD<sub>7.4</sub> value slightly inferior to 3. Compound 12 also displays a high LipE score of 5.88, while the lengthening of the side chain, especially in the fluoroalkyl-series, resulted in a drop of LipE values below 5 for compounds 29, 30, and 24. In the fluoroalkynyl-series, except for compound 24, LipE values were all comparable (5.35 to 5.61). In particular, despite a LogD<sub>7.4</sub> value above 4 (4.06), compound 23 exhibited a rather good LipE score (5.35) due to a high TSPO binding affinity. A LipE plot of the binding and lipophilicity data of the compounds is presented in Figure 4.

**In Vitro Metabolism.** Oxidative metabolism of 2 and the newly synthesized compounds (12, 21–24, and 28–30) was investigated using hepatic microsomes from humans, rats, and mice. The results, expressed as the percentage of biotransformation obtained after 20 min of microsomal incubation, are summarized in Table 2. All compounds are rapidly and extensively metabolized in the presence of rat and mouse microsomes, and more than 90% of biotransformation is generally observed after 20 min. Biotransformation using human microsomes is more variable, with percentages ranging from 31% for 2 to 91% for compound 29. It can be noted that alkynyl derivatives are less metabolized compared to their alkyl counterparts. These rather pronounced rates of biotransformation are in line with what has already been observed with the parent molecule [<sup>18</sup>F]2.<sup>49</sup> indeed, it has been shown that it is rapidly and extensively metabolized *in vitro* but also *in vivo* in both rodents (rats) and nonhuman primates (baboons). Identification of the metabolites of 2 and [<sup>18</sup>F]2<sup>49</sup> notably revealed that oxidation reactions occurred mainly (i) at the



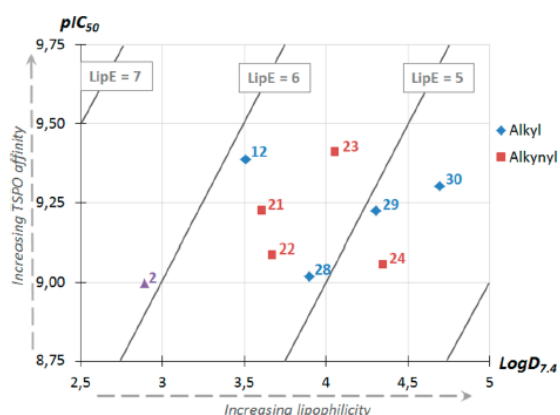


Figure 4. LipE plot of the newly synthesized compounds (12, 21–24, and 28–30) and 2:  $pIC_{50}$  vs  $LogD_{7,4}$ .

Table 2. *In Vitro* Oxidative Metabolism

Series	Ligand	% biotransformation at 20 min <sup>a</sup>		
		Human	Rat	Mouse
Alkyl-	2	31 %	100 %	90 %
	12	79 %	100 %	99 %
	28	89 %	99 %	100 %
	29	91 %	99 %	100 %
	30	89 %	97 %	96 %
Alkynyl-	21	55 %	99 %	100 %
	22	60 %	98 %	100 %
	23	47 %	91 %	98 %
	24	39 %	96 %	78 %

<sup>a</sup>Hepatic microsomal (male CD1 mouse, male Sprague–Dawley rat, or humans (BD pool)) incubation, followed by analysis of the supernatant using HPLC/ESI-MS/MS.

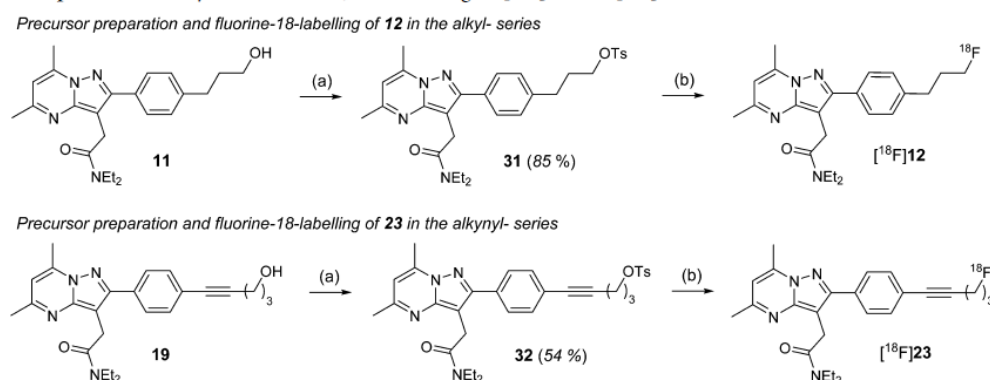
sensitive methyl positions of the pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine core, (ii) at the  $\alpha$ -position of the nitrogen atom of the acetamide function leading to *N*-dealkylation, and, to a lesser extent, (iii) at the  $\alpha$ -position of the oxygen atom of the fluoroethoxy moiety of 2 leading to the release of fluoroacetate. These oxidative

pathways generated hydrophilic species, mainly nonbrain penetrant except for [<sup>18</sup>F]fluoroacetate that cross the BBB and might alter the PET image quality. Contrary to 2, the newly synthesized compounds (12, 21–24, and 28–30) do not feature the sensitive ether linkage bridging the fluorine atom to the DPA scaffold and therefore their metabolism may not lead to the unwanted liberation of fluoroacetate. Nevertheless, they still feature the same DPA scaffold and may thus be subjected to a similar oxidative metabolic pathway with regard to oxidation at the methyl positions and *N*-deethylation (or a combination of both). Overall, this *in vitro* study suggests that 2, 23, and 24 are the less sensitive compounds to microsomal metabolism, especially with the human subcellular fractions (biotransformation at 20 min <50%). More specifically, in the fluoroalkyl series, 12 is the less metabolized compound using human microsomes with 79% biotransformation at 20 min compared to  $90 \pm 1\%$  for 28, 29, and 30.

On the basis of the *in vitro* preliminary results (affinity, lipophilicity, and metabolism) of the newly synthesized compounds, 12, in the fluoroalkyl series, and 23, in the fluoroalkynyl series, were chosen for radiolabeling with fluorine-18 to further investigate their *in vivo* PET properties as TSPO radiotracers.

**Radiochemistry.** Fluorine-18-labeling of compounds 12 and 23 was performed using a TRACERLab FX-FN synthesizer (GEMS) by nucleophilic aliphatic substitution on their corresponding tosylates 31 and 32 (precursors for labeling) with [<sup>18</sup>F]fluoride (Scheme 3). Compounds 31 and 32 were synthesized from the corresponding alcohols 11 and 19 by reaction of *p*-toluenesulfonyl chloride or *p*-toluenesulfonylhydride in dichloromethane in the presence of triethylamine as depicted in Scheme 3 (85 and 45% yield, respectively). The efficiency of incorporation of fluorine-18 was first investigated with compound 12 in various reaction conditions, and the optimized conditions were then used for the labeling of compound 23 (Table 2). Briefly, the no-carrier-added dried  $K[^{18}F]F\text{-}[2.2.2]\text{-cryptand}$  complex was first prepared from cyclotron-produced [<sup>18</sup>F]fluoride, potassium carbonate, and [2.2.2]-cryptand. An acetonitrile or DMSO solution of the tosylate 31 (or 32) was then added to the reaction vessel containing  $K[^{18}F]F\text{-}[2.2.2]\text{-cryptand}$ , and the resulting mixture was heated at various temperatures and for variable duration. The

Scheme 3. Preparation of Tosylates 31 and 32, and Labeling of [<sup>18</sup>F]12 and [<sup>18</sup>F]23<sup>a</sup>



<sup>a</sup>Reaction conditions: (a) TsCl or Ts<sub>2</sub>O, TEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C to r.t., 5 to 16 h; (b)  $K[^{18}F]F\text{-}[2.2.2]\text{-cryptand}$ , K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, solvent, T (°C), time (min) [see Table 3 for details].

Table 3. Labeling Conditions and Results of Radiosynthesis Trials for [<sup>18</sup>F]12 and [<sup>18</sup>F]23 Preparation

precursor	solvent	temperature (°C)	reaction time (min)	RCY <sup>a</sup> (d.c.)	SRA <sup>a</sup> (GBq/μmol)	product
31	DMSO	165	5	38 ± 6	110 ± 5	[ <sup>18</sup> F]12
31	CH <sub>3</sub> CN	100	10	50 ± 11	75 ± 15	[ <sup>18</sup> F]12
31	CH <sub>3</sub> CN	100	5	37 ± 10	78 ± 14	[ <sup>18</sup> F]12
32	CH <sub>3</sub> CN	100	10	24 ± 7	83 ± 9	[ <sup>18</sup> F]23

<sup>a</sup>Values are the mean ± SD of at least 3 independent radiosyntheses.

resulting mixture was then diluted with the HPLC mobile phase, prepurified on a SepPak Alumina N cartridge, and purified on an HPLC semipreparative X-Terra RP18 column. Identity of the collected radioactive product was confirmed by coelution with reference compound 12 (or 23, respectively) on an analytical HPLC system. Formulated solutions of [<sup>18</sup>F]12 (or [<sup>18</sup>F]23), ready for use, were typically obtained after a synthesis time of 50 ± 5 min from end of bombardment (EOB). Average batch product activities, radiochemical yields (RCY), and specific radioactivities (SRA) obtained from the various [<sup>18</sup>F]12 radiosynthesis trials are compiled in Table 3.

Typically, starting from 33–52 GBq of [<sup>18</sup>F]fluoride, 9–17 GBq of [<sup>18</sup>F]12 were obtained, within 50 ± 5 min, with moderate SRA ranging from 60 to 115 GBq/μmol at end of synthesis (EOS). [<sup>18</sup>F]Fluorination of 12 proved to be the most efficient in acetonitrile when heating the reaction mixture at 100 °C for 10 min with an average decay-corrected (d.c.) RCY of 50 ± 11%. Attempts to reduce reaction time to 5 min or increase reaction temperature to 165 °C in DMSO led to a lower labeling efficacy with d.c. RCY below 40%. [<sup>18</sup>F]Fluoride incorporation for the preparation of [<sup>18</sup>F]23 was satisfactory using acetonitrile as solvent at 100 °C for 10 min, and these labeling conditions were used for the preparation of ready-to-inject [<sup>18</sup>F]23 batches for *in vivo* studies. Quality controls were performed on aliquots of formulated radioligands [<sup>18</sup>F]12 and [<sup>18</sup>F]23. The radiotracer preparations were clear solutions with a measured pH between 5 and 7. As demonstrated by analytical HPLC analysis, radiochemical and chemical purities were greater than 95%, and the preparations were chemically and radiochemically stable for 4 h at ambient temperature on shelves.

**Autoradiography.** The high binding affinity and selectivity for TSPO of 12 and 23 were confirmed by *in vitro* autoradiography studies of their corresponding radiofluorinated versions in sections of rat brain with acute local neuroinflammation. Rat brain slices were generated from our in-house model, 7 days after an excitotoxic AMPA injection in the right striatum of Wistar rats.<sup>23,34,52</sup> In a first set of experiments, the radioligand was incubated alone, and accumulation of the tracer was observed in the lesioned area (right-hand side) when compared to the control side (left-hand side) as seen in Figure 5A for [<sup>18</sup>F]12. In a second and third set of experiments, the radioligand was incubated together with an excess of either its

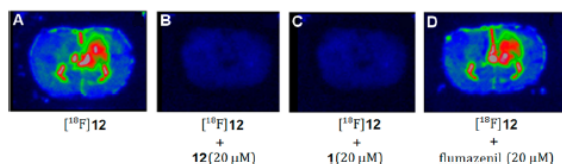


Figure 5. Autoradiography *in vitro* of [<sup>18</sup>F]12 (5–10 nM) on rat AMPA-lesioned brain sections: (A) alone, (B) with nonlabeled 12 (20 μM), (C) with 1 (20 μM), and (D) with flumazenil (20 μM).

nonlabeled version (12 or 23) or the TSPO ligand of reference 1. Images obtained either with [<sup>18</sup>F]12 (Figure 5B and C) or [<sup>18</sup>F]23 (not shown here) proved the absence of nonspecific binding of the ligands and the specificity for the TSPO target, the binding being fully inhibited in the lesioned area in both cases. Finally, in a fourth set of experiments, the evaluated radioligand was incubated with an excess of flumazenil, a CBR-specific ligand, to confirm its absence of affinity for this target. As shown in Figure 5D and as expected from the previous *in vitro* competition assays with [<sup>3</sup>H]flunitrazepam (another CBR-specific ligand), the binding of [<sup>18</sup>F]12 was not affected by the presence of an excess of flumazenil, proving again its selectivity for the TSPO.

Autoradiographic images, obtained with [<sup>18</sup>F]23 as radioligand, were comparable to the one presented for [<sup>18</sup>F]12: [<sup>18</sup>F]23 accumulates in the lesioned area, and the use of 1 or nonlabeled 23 fully inhibited the binding of [<sup>18</sup>F]23, while flumazenil did not. The target to background ratio (TBR), calculated as the bound radiotracer in the lesion versus the bound radiotracer in the contralateral side, was determined after incubation of the radiotracer alone, and the values obtained for [<sup>18</sup>F]12 and [<sup>18</sup>F]23 are presented in Table 4 for comparison to [<sup>18</sup>F]2. The TBR of [<sup>18</sup>F]12 (2.4 ± 0.3) and [<sup>18</sup>F]23 (1.9 ± 0.3) were surprisingly more than 50% lower than the one of [<sup>18</sup>F]2 (5.4 ± 2.0).

Table 4. TBR Calculated from *in Vitro* Autoradiographies of [<sup>18</sup>F]2, [<sup>18</sup>F]12, and [<sup>18</sup>F]23

[ <sup>18</sup> F]-tracer	TBR <sup>a</sup>
[ <sup>18</sup> F]12	2.4 ± 0.3
[ <sup>18</sup> F]23	1.9 ± 0.3
[ <sup>18</sup> F]2	5.4 ± 2.0

<sup>a</sup>TBR values are the mean ± SD of at least 3 independent experiments.

**Small Animal PET Studies.** PET imaging was performed with [<sup>18</sup>F]12 and [<sup>18</sup>F]23 on anesthetized Wistar rats 7 days after AMPA-induced brain lesion in the right striatum.<sup>23,34,52</sup> As representative examples, Figure 6 shows summed coronal, sagittal, and axial images of rat brain from 5 to 60 min after injection of [<sup>18</sup>F]12. Similar images were obtained after injection of [<sup>18</sup>F]23.

Data reported in Table 5 show that both [<sup>18</sup>F]12 and [<sup>18</sup>F]23 rapidly enter the brain with initial uptake values, 2 min p.i., in the lesioned striatum of 0.43 and 0.39 percentages of injected dose per milliliter (% ID/mL), respectively. These uptakes were lower 60 min p.i. but still relatively high (0.33% for [<sup>18</sup>F]12 and 0.24% for [<sup>18</sup>F]23), suggesting that the radiotracers still bound their target. In contrast, uptake in the contralateral side decreased along the study and was rather low 60 min p.i. with values of 0.09 and 0.05% ID/mL for [<sup>18</sup>F]12 and [<sup>18</sup>F]23, respectively. A marked contrast between the lesioned area and the corresponding area in the intact contralateral hemisphere of the rat brain was thus obtained for [<sup>18</sup>F]12 after 60 min, with a calculated



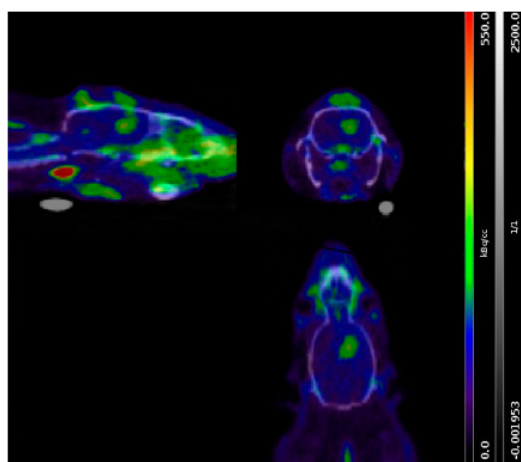


Figure 6. microPET images acquired as summed data from 5 to 60 min after intravenous injection of  $[^{18}\text{F}]12$  to an AMPA-induced brain lesioned rat.

ipsilateral-to-contralateral ratio of  $3.57 \pm 0.48$  ( $n = 4$ ) that reflects a high *in vivo* specific binding for the TSPO and is comparable to that measured for  $[^{18}\text{F}]2$  ( $3.71 \pm 0.39$ ). Analogously, the calculated ratio for  $[^{18}\text{F}]23$  reached a value of  $4.62 \pm 0.44$  ( $n = 4$ ) which is greater than that of  $[^{18}\text{F}]2$ . Noteworthy, these ratios increased along the study and may even be higher using extended imaging protocols. The better contrast obtained with  $[^{18}\text{F}]23$  mainly results from the quicker wash out of the radiotracer in the nonlesioned area. Table 5 compiles the uptake values obtained in the lesioned and nonlesioned areas over a period of 60 min, as well as the corresponding calculated ipsi/contraratio for radioligands  $[^{18}\text{F}]12$ ,  $[^{18}\text{F}]23$  and  $[^{18}\text{F}]2$ .

## CONCLUSIONS

A novel series of 5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-ylacetamides modified at the 4-position of the phenyl ring were synthesized and *in vitro* evaluated for their potential to bind the TSPO. All newly synthesized compounds showed comparable or higher affinity for the TSPO than the parent molecule **2**, with  $K_i$  values in the subnanomolar range. The TSPO/CBR selectivity was also assessed for all compounds and was proved to be conserved. Determination of their  $\text{LogD}_{7.4}$  demonstrated moderately increased lipophilicity compared to that of **2**; however, most of the values were in the range for suitable BBB passive penetration. Preliminary metabolism studies were also conducted for the title compounds. Among them, two candidates were radiolabeled with fluorine-18 and evaluated *in vitro* and *in vivo* for their specific binding to the TSPO and their potential as

PET probes on a rat model of acute neuroinflammation. The data obtained revealed that the newly developed radioligands,  $[^{18}\text{F}]12$  and  $[^{18}\text{F}]23$ , are well suited for imaging neuroinflammation *in vivo*. The potential of these promising PET radiotracers will be further investigated, in particular with regard to their metabolic profiling *in vivo*.

## EXPERIMENTAL SECTION

**General.** Chemicals were purchased from Aldrich France and were used without further purification. Flash chromatographies were conducted on silica gel or alumina gel (0.63–0.200 mm, VWR) columns. TLCs were run on precoated plates of silica gel 60F<sub>254</sub> (VWR, France). The compounds were localized at 254 nm using a UV-lamp and by dipping the TLC-plates in a 1% ethanolic ninhydrin solution or a basic potassium permanganate aqueous solution and heating on a hot plate.

$^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were recorded on a Bruker (Wissembourg, France) Avance 400 MHz apparatus, and chemical shifts were referenced to the hydrogenated residue of the deuterated solvent ( $\delta[\text{CD}_2\text{H}_2\text{CN}] = 1.94$  ppm,  $\delta[\text{CD}_2\text{HOD}] = 3.31$  ppm,  $\delta[\text{CDHCl}_2] = 5.32$  ppm, and  $\delta[\text{CHCl}_3] = 7.24$  ppm) for  $^1\text{H}$  NMR and to the deuterated solvent ( $\delta[\text{CD}_3\text{CN}] = 118.7$  ppm,  $\delta[\text{CD}_3\text{OD}] = 49.2$  ppm,  $\delta[\text{CD}_2\text{Cl}_2] = 54.0$  ppm, and  $\delta[\text{CDCl}_3] = 77.2$  ppm) for  $^{13}\text{C}$  NMR experiments. The standard concentration of the analyzed samples was 20 mg/mL. The chemical shifts are reported in ppm, downfield from TMS (s, d, t, q, m, and b for singlet, doublet, triplet, quadruplet, multiplet, and broad, respectively). The low-resolution mass spectra (MS) were measured on a Thermo Electron (Les Ulis, France) Ion Trap LCQ Deca XP1 spectrometer (positive electrospray ionization (ESI)). The high-resolution mass spectrometry (HRMS) analyses were performed by Imagif (ICSN-CNRS, Gif-sur-Yvette, France) by electrospray with positive (ESI+) or negative (ESI-) ionization mode. Purity of the synthesized compounds was determined using analytical HPLC (HPLC A) and was found to be more than 95%. HPLC A: UPLC/SQD Acquity Waters, Acquity BEH C18 ( $2.1 \times 50$  mm) column, 1.7  $\mu\text{m}$ , mobile phase,  $\text{H}_2\text{O}$  (A),  $\text{CH}_3\text{CN} + 0.1\%$  formic acid (B), and linear gradient from 2 to 100% (B) in 3 min with a flow rate of 1.0 mL/min.  $\text{LogD}_{7.4}$  values were determined based on a validated and standardized HPLC method (HPLC B): Alliance 2695-PDA Waters, X-Terra MS C18 ( $4.6 \times 20$  mm, 3.5  $\mu\text{m}$ ) column, mobile phase, 5 mM MOPS/ $(\text{CH}_3)_4\text{NOH}$  pH 7.4 (A), 5% MOPS/ $(\text{CH}_3)_4\text{NOH}$  (100 mM, pH 7.4)/95%  $\text{CH}_3\text{CN}$  (B); gradient (A/B), 98:2 (0.5 min), 0:100 (4.8 min), 98:2 (1.6 min), with a flow rate of 1.2 mL/min, 25 °C, and detection at 254 nm.

**Chemistry.** *Methyl 4-(3-iodopropoxy)benzoate (3)*. To a suspension of 18.7 g of potassium carbonate (136 mmol) in acetone (1 L) was added diiodopropane (22.4 mL, 195 mmol). The mixture was stirred at ambient temperature under argon before the addition of a solution of 10.0 g of methyl 4-hydroxybenzoate (65.8 mmol) in acetone (100 mL). The reaction mixture was then heated to 50 °C, and stirring was prolonged for 16 h. The resulting mixture was filtered to remove insoluble potassium carbonate, and the filtrate was evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel column chromatography using heptane/EtOAc (5/1, v/v) as eluent to yield compound **3** (15.2 g, 47.6 mmol, 72% yield) as light yellow crystals.  $R_f$  (heptane/EtOAc: 2/1 v/v): 0.48.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.97 (d,  $J = 8.8$

Table 5.  $[^{18}\text{F}]12$ ,  $[^{18}\text{F}]23$ , and  $[^{18}\text{F}]2$  Uptake Values in the Lesioned and Nonlesioned Rat Brain Areas over a Period of 60 min Post-injection and the Corresponding Calculated Ipsi/Contraratio

time (min)	ipsiuptake (% ID/mL)			contrauptake (% ID/mL)			ipsi/contraratio		
	$[^{18}\text{F}]12$	$[^{18}\text{F}]23$	$[^{18}\text{F}]2$	$[^{18}\text{F}]12$	$[^{18}\text{F}]23$	$[^{18}\text{F}]2$	$[^{18}\text{F}]12$	$[^{18}\text{F}]23$	$[^{18}\text{F}]2$
2	$0.43 \pm 0.20$	$0.39 \pm 0.07$	$0.40 \pm 0.02$	$0.28 \pm 0.13$	$0.23 \pm 0.04$	$0.24 \pm 0.02$	$1.53 \pm 0.16$	$1.70 \pm 0.12$	$1.63 \pm 0.12$
5	$0.40 \pm 0.17$	$0.38 \pm 0.05$	$0.36 \pm 0.01$	$0.23 \pm 0.11$	$0.16 \pm 0.03$	$0.19 \pm 0.01$	$1.72 \pm 0.35$	$2.43 \pm 0.32$	$1.91 \pm 0.20$
15	$0.37 \pm 0.16$	$0.30 \pm 0.05$	$0.34 \pm 0.03$	$0.16 \pm 0.08$	$0.09 \pm 0.02$	$0.12 \pm 0.02$	$2.15 \pm 0.33$	$3.38 \pm 0.31$	$2.76 \pm 0.14$
40	$0.32 \pm 0.14$	$0.25 \pm 0.06$	$0.31 \pm 0.05$	$0.10 \pm 0.05$	$0.06 \pm 0.01$	$0.08 \pm 0.02$	$3.05 \pm 0.51$	$4.01 \pm 1.05$	$3.71 \pm 0.49$
60	$0.33 \pm 0.15$	$0.24 \pm 0.04$	$0.30 \pm 0.05$	$0.09 \pm 0.04$	$0.05 \pm 0.01$	$0.08 \pm 0.01$	$3.57 \pm 0.48$	$4.62 \pm 0.44$	$3.71 \pm 0.39$

H<sub>2</sub>, 2H), 6.91 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 4.07 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 3.87 (s, 3H), 3.36 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 2.28 (q, *J* = 6.2 Hz, 2H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 166.9 [C], 162.4 [C], 131.7 [2 × CH], 122.8 [C], 114.1 [2 × CH], 67.4 [CH<sub>2</sub>], 51.9 [CH<sub>3</sub>], 32.8 [CH<sub>2</sub>], 2.2 [CH<sub>3</sub>I]. Mp: 47–48 °C. ESI(+)-MS: *m/z* 321 [M + H]<sup>+</sup>.

**Methyl 4-(3-Bromopropoxy)benzoate (4).** For the preparation of methyl 4-(3-bromopropoxy)benzoate 4, the procedure described above with methyl 4-hydroxybenzoate 2 was reproduced with dibromopropane instead of diiodopropane as alkylating agent. Starting from 10.0 g of 2 (65.8 mmol), 14.9 g of compound 4 (54.7 mmol, 83% yield) could be obtained as a white solid after silica gel column chromatography using pure toluene as eluent. *R<sub>f</sub>* (toluene 100%): 0.32. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 7.98 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.92 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 4.16 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.88 (s, 3H), 3.60 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.34 (m, 2H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 166.9 [C], 162.5 [C], 131.7 [2 × CH], 122.9 [C], 114.2 [2 × CH], 65.6 [CH<sub>2</sub>], 51.9 [CH<sub>3</sub>], 32.2 [CH<sub>2</sub>], 29.7 [CH<sub>2</sub>]. ESI(+)-MS: *m/z*, not seen.

**Methyl 4-(3-Hydroxypropyl)benzoate (5).** Starting from Methyl 4-(3-Bromopropoxy)benzoate (4). Compound 4 (12.73 g) (46.6 mmol) were dissolved in dry toluene (1 L), and the solution was stirred under argon and heated to 100 °C. A solution containing azobis(isobutyronitrile) (AIBN, 1.54 g, 9.4 mmol) and tributyltin hydride (15 mL, 55.9 mmol) in dry toluene (100 mL) was slowly added to the solution of 4 over a period of 1 h, and stirring was prolonged at 100 °C overnight. Full conversion of the starting material was confirmed by TLC, and the reaction mixture was then concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography using heptane/EtOAc (2/1, v/v) as eluent to yield compound 5 (1.61 g, 8.30 mmol, 18% yield) as a light yellow oil.

**Starting from Methyl 4-(3-iodopropoxy)benzoate (3).** Compound 3 (15.2 g) was subjected to the procedure described above. Purification of the crude product afforded compound 5 (1.13 g, 5.82 mmol, 13% yield). *R<sub>f</sub>* (heptane/EtOAc: 2/1 v/v): 0.14. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 7.95 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.26 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.67 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.76 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 1.90 (m, 2H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 167.4 [C], 147.6 [C], 129.9 [2 × CH], 128.7 [2 × CH], 128.1 [C], 62.2 [CH<sub>2</sub>], 52.2 [CH<sub>3</sub>], 34.0 [CH<sub>2</sub>], 32.3 [CH<sub>2</sub>]. ESI(+)-MS: *m/z*, not seen.

**Methyl 4-(3-((tert-Butyldiphenylsilyloxy)propyl)benzoate (6).** To 1.31 g of 5 (6.75 mmol) dissolved in dry pyridine (25 mL) was added *tert*-butyl-diphenylsilyl chloride (2.11 mL, 8.10 mmol), and the reaction mixture was stirred for 4 h at ambient temperature. After the addition of ethyl acetate (200 mL), the solution was washed twice with a 1.0 M aqueous hydrochloric acid solution (2 × 300 mL) and once with brine (250 mL). The organic layer was then dried over sodium sulfate before being filtered and evaporated to dryness. The resulting residue was purified by silica gel column chromatography using toluene/heptane (2/1, v/v) as eluent to yield compound 6 (2.34 g, 5.40 mmol, 80% yield) as a colorless oil. *R<sub>f</sub>* (toluene 100%): 0.36. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 7.93 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.66 (d, *J* = 6.4 Hz, 4H), 7.43–7.38 (m, 6H), 7.22 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 3.91 (s, 3H), 3.68 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.79 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 1.88 (m, 2H), 1.07 (s, 9H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 167.2 [C], 147.8 [C], 135.6 [4 × CH], 133.9 [2 × C], 129.7 [2 × CH], 129.6 [2 × CH], 128.5 [2 × CH], 127.7 [C], 127.6 [4 × CH], 62.9 [CH<sub>2</sub>], 52.0 [CH<sub>3</sub>], 33.8 [CH<sub>2</sub>], 32.2 [CH<sub>2</sub>], 26.9 [3 × CH<sub>3</sub>], 19.3 [C]. ESI(+)-MS: *m/z* 433 [M + H]<sup>+</sup>.

**3-(4-(3-((tert-Butyldiphenylsilyloxy)propyl)phenyl)-3-oxopropenenitrile (7).** Sodium methoxide (250 mg, 4.62 mmol), 6 (2.00 g, 4.62 mmol), and dry acetonitrile (25 mL) were mixed at ambient temperature, and the resulting reaction mixture was stirred, and heated to reflux until the reaction was complete (1–2 days, TLC monitoring). Addition of water (5 mL) and diethyl ether (5 mL) to the mixture allowed extraction in the organic layer of unreacted starting material. The aqueous phase was collected and acidified to pH 6 with 20% aqueous sulfuric acid solution to precipitate the desired compound 7 that was filtered off and dried under vacuum. Compound 7 (695 mg, 1.57 mmol, 34% yield) was obtained as a white powder in a sufficiently pure form to be used in the next step without further purification. *R<sub>f</sub>* (toluene/AcOEt 95/5, v/v): 0.33. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 7.81 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.65 (m, 4H), 7.46–7.36 (m, 6H), 7.30 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 4.05 (s, 2H), 3.68 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 2.81 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 1.88 (m,

2H), 1.07 (s, 9H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 186.5 [C], 150.2 [C], 135.5 [4 × CH], 133.7 [2 × C], 132.0 [C], 129.6 [2 × CH], 129.2 [2 × CH], 128.5 [2 × CH], 127.6 [4 × CH], 113.8 [C], 62.6 [CH<sub>2</sub>], 33.5 [CH<sub>2</sub>], 32.2 [CH<sub>2</sub>], 29.2 [CH<sub>2</sub>], 26.8 [3 × CH<sub>3</sub>], 19.2 [C]. ESI(–)-MS: *m/z* 440 [M – H]<sup>–</sup>. HR-ESI(+)-MS *m/z* calcd for C<sub>28</sub>H<sub>30</sub>NO<sub>2</sub>Si: 440.2046 [M + H]<sup>+</sup>, found 440.2042.

**4-(4-(3-((tert-Butyldiphenylsilyloxy)propyl)phenyl)-3-cyano-N,N-diethyl-4-oxobutanamide (8).** To 16.3 mL of a 0.125 M solution (2.04 mmol) of sodium hydroxide in a 8/2 mixture of ethanol and water were successively added 7 (750 mg, 1.70 mmol), sodium iodide (765 mg, 5.10 mmol), and *N,N*-diethylchloroacetamide (256 μL, 1.87 mmol). The resulting mixture was stirred at 75 °C for 12 h, then diluted with a 0.1 M aqueous hydrochloric acid solution (100 mL), and extracted with ethyl acetate (100 mL). The organic layer was separated, washed with brine, and dried over sodium sulfate before being filtered and evaporated to dryness. The resulting residue was purified by silica gel column chromatography using toluene/EtOAc (95/5, v/v) as eluent to yield compound 8 (764 mg, 1.38 mmol, 81% yield) as an orange oil. *R<sub>f</sub>* (toluene/AcOEt 9/1, v/v): 0.29. <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ 7.97 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.70 (m, 4H), 7.45–7.35 (m, 8H), 7.25 (m, 1H), 7.19 (m, 1H), 5.00 (dd, *J* = 8.8, *J* = 4.8 Hz, 1H), 3.73 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.40–3.23 (m, 5H), 2.93 (dd, *J* = 16.0, *J* = 4.8 Hz, 1H), 2.86 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 1.92 (m, 2H), 1.25 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.08 (m, 12H). <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ 189.5 [C], 166.8 [C], 149.9 [C], 135.4 [4 × CH], 133.8 [2 × C], 132.0 [C], 129.5 [2 × CH], 129.1 [2 × CH], 128.9 [2 × CH], 127.6 [4 × CH], 117.4 [C], 62.7 [CH<sub>2</sub>], 41.8 [CH<sub>2</sub>], 40.4 [CH<sub>2</sub>], 34.0 [CH], 33.6 [CH<sub>2</sub>], 32.9 [CH<sub>2</sub>], 32.1 [CH<sub>2</sub>], 26.5 [3 × CH<sub>3</sub>], 19.0 [C], 13.8 [CH<sub>3</sub>], 12.6 [CH<sub>3</sub>]. ESI(+)-MS: *m/z* 555 [M + H]<sup>+</sup>, 577 [M + Na]<sup>+</sup>, 593 [M + K]<sup>+</sup>. HR-ESI(+)-MS *m/z* calcd for C<sub>34</sub>H<sub>43</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>Si: 555.3043 [M + H]<sup>+</sup>, found 555.3036.

**2-(3-Amino-5-(4-(3-((tert-Butyldiphenylsilyloxy)propyl)phenyl)-1H-pyrazol-4-yl)-N,N-diethylacetamide (9).** To 750 mg of 8 (1.35 mmol) dissolved in ethanol (6.8 mL) were added glacial acetic acid (140 μL) and hydrazine monohydrate (100 μL, 2.03 mmol). The resulting reaction mixture was stirred at 60 °C for 3 h, cooled down to room temperature, and diluted with ethyl acetate (100 mL). The organic layer was successively washed with a saturated aqueous ammonium chloride solution, brine, and dried over sodium sulfate before being filtered and evaporated to dryness. The resulting residue was purified by silica gel column chromatography using CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (9/1, v/v) as eluent to yield compound 9 (734 mg, 1.29 mmol, 95% yield) as a light pink oil. *R<sub>f</sub>* (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 95/5, v/v): 0.15. <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ 7.68 (m, 4H), 7.46–7.38 (m, 6H), 7.32–7.26 (m, 4H), 3.72 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.49 (s, 2H), 3.32 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.07 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.80 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 1.91 (m, 2H), 1.09 (m, 12H), 0.90 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ 170.0 [C], 153.5 [C], 142.9 [C], 142.8 [C], 135.4 [4 × CH], 134.0 [C], 133.9 [2 × C], 129.5 [2 × CH], 129.0 [2 × CH], 127.6 [4 × CH], 127.5 [2 × CH], 98.0 [C], 62.9 [CH<sub>2</sub>], 42.2 [CH<sub>2</sub>], 40.3 [CH<sub>2</sub>], 34.0 [CH<sub>2</sub>], 31.7 [CH<sub>2</sub>], 28.2 [CH<sub>2</sub>], 26.5 [3 × CH<sub>3</sub>], 19.0 [C], 13.8 [CH<sub>3</sub>], 12.7 [CH<sub>3</sub>]. ESI(+)-MS: *m/z* 569 [M + H]<sup>+</sup>, 591 [M + Na]<sup>+</sup>, 607 [M + K]<sup>+</sup>.

**2-(2-(4-(3-((tert-Butyldiphenylsilyloxy)propyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)-N,N-diethylacetamide (10).** To 720 mg of 9 (1.27 mmol) dissolved in ethanol (16 mL) was added pentan-2,4-dione (143 μL, 1.39 mmol), and the resulting mixture was stirred overnight at 60 °C. Evaporation of the reaction solvent afforded a crude product that was purified by silica gel column chromatography using pure ethyl acetate as eluent to yield compound 10 (600 mg, 0.95 mmol, 75% yield) as a beige powder. *R<sub>f</sub>* (EtOAc 100%): 0.18. <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ 7.70 (m, 6H), 7.46–7.38 (m, 6H), 7.29 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.58 (s, 1H), 3.91 (s, 2H), 3.75 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.50 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.40 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.80 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.76 (s, 3H), 2.57 (s, 3H), 1.94 (m, 2H), 1.23 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.12 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.09 (s, 9H). <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ 169.6 [C], 157.6 [C], 154.5 [C], 147.6 [C], 144.8 [C], 142.5 [C], 135.5 [4 × CH], 133.9 [2 × C], 131.3 [C], 129.5 [2 × CH], 128.5 [2 × CH], 128.2 [2 × CH], 127.5 [4 × CH], 108.2 [CH], 100.9 [C], 63.0 [CH<sub>2</sub>], 42.1 [CH<sub>2</sub>], 40.4 [CH<sub>2</sub>], 34.1 [CH<sub>2</sub>], 31.7 [CH<sub>2</sub>], 27.9 [CH<sub>2</sub>], 26.6 [3 × CH<sub>3</sub>], 24.3 [CH<sub>3</sub>], 19.0 [C], 16.6 [CH<sub>3</sub>], 13.9 [CH<sub>3</sub>], 12.8 [CH<sub>3</sub>]. ESI(+)-MS: *m/z* 633 [M + H]<sup>+</sup>,



655 [M + Na]<sup>+</sup>, 671 [M + K]<sup>+</sup>. HR-ESI(+)-MS *m/z* calcd for C<sub>39</sub>H<sub>49</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>Si: 633.3625 [M + H]<sup>+</sup>, found 633.3607.

*N,N*-Diethyl-2-(2-(4-(3-hydroxypropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (11). From 10. To 585 mg of 10 (0.93 mmol) dissolved in tetrahydrofuran (5 mL) was added tetrabutylammonium fluoride (TBAF, 1.0 M in tetrahydrofuran, 1.85 mL, 1.85 mmol), and the resulting reaction mixture was stirred at ambient temperature overnight. The mixture was then diluted with ethyl acetate and successively washed with a saturated aqueous ammonium chloride solution and brine. The organic layer was dried over sodium sulfate, filtered, and evaporated to dryness. The resulting residue was purified by silica gel column chromatography using CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (97/3, v/v) as eluent to yield compound 11 (240 mg, 0.61 mmol, 66% yield) as a white powder.

**From 17.** To a solution of 209 mg of *N,N*-diethyl-2-(2-(4-(4-hydroxyprop-1-yn-1-yl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide 17 (0.536 mmol) in dichloromethane (4–5 mL) was added 10% palladium on charcoal (5 mol %). The reaction flask was degassed under vacuum and filled with hydrogen at 1 atm, and the reaction mixture was stirred at ambient temperature for 24 h. The mixture was then filtered on a silica pad and washed with a mixture of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (8/2, v/v). The filtrate was concentrated to dryness, and the residue was purified by silica gel column chromatography using CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (99/1 to 95/5, v/v) as eluent to afford compound 11 (194 mg, 0.492 mmol, 92% yield) as a white solid. *R*<sub>f</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 95/5, v/v): 0.17. <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ 7.70 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.29 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.56 (s, 1H), 3.89 (s, 2H), 3.63 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.49 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.39 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.73 (m, 5H), 2.53 (s, 3H), 1.87 (m, 2H), 1.70 (bs, 1H), 1.22 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.10 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ 169.6 [C], 157.6 [C], 154.5 [C], 147.6 [C], 144.8 [C], 142.3 [C], 131.4 [C], 128.5 [2 × CH], 128.3 [2 × CH], 108.2 [CH], 100.9 [C], 61.9 [CH<sub>2</sub>], 42.1 [CH<sub>2</sub>], 40.4 [CH<sub>2</sub>], 34.3 [CH<sub>2</sub>], 31.8 [CH<sub>2</sub>], 27.9 [CH<sub>2</sub>], 24.3 [CH<sub>3</sub>], 16.6 [CH<sub>3</sub>], 14.0 [CH<sub>3</sub>], 12.8 [CH<sub>3</sub>]. ESI(+)-MS: *m/z* 395 [M + H]<sup>+</sup>, 417 [M + Na]<sup>+</sup>, 433 [M + K]<sup>+</sup>. HR-ESI(+)-MS *m/z* calcd for C<sub>23</sub>H<sub>31</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>: 395.2447 [M + H]<sup>+</sup>, found 395.2447.

*N,N*-Diethyl-2-(2-(4-(3-fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (12). *N,N*-diethyl-2-(2-(4-(3-hydroxypropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide 11 (168 mg (0.43 mmol)) was reacted with bis(2-methoxyethyl) aminosulfur trifluoride (Deoxo-Fluor, 50% solution in toluene, 0.28 mL, 1.07 mmol) in toluene (2.5 mL) at room temperature for 6 h. The reaction mixture was then evaporated to dryness, and the residue purified by silica gel column chromatography using CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (99/1, v/v) as eluent to give compound 12 (88 mg, 0.22 mmol, 52% yield) as a beige solid. *R*<sub>f</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 98/2, v/v): 0.50. *t*<sub>R</sub> (HPLC A) = 1.18 min. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 7.74 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.28 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.52 (s, 1H), 4.46 (dt, *J*<sub>H-F</sub> = 46.8 Hz, *J*<sub>H-H</sub> = 6.0 Hz, 2H), 3.93 (s, 2H), 3.49 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.40 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.79 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.74 (s, 3H), 2.54 (s, 3H), 2.10–1.96 (m, 2H), 1.20 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.10 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ 169.6 [C], 157.6 [C], 154.4 [C], 147.6 [C], 144.8 [C], 141.4 [C], 131.7 [C], 128.5 [2 × CH], 128.4 [2 × CH], 108.2 [CH], 101.0 [C], 83.2 [d, *J*<sub>C-F</sub> = 163.0 Hz, CH<sub>2</sub>F], 42.1 [CH<sub>2</sub>], 40.4 [CH<sub>2</sub>], 31.9 [d, *J*<sub>C-F</sub> = 20.0 Hz, CH<sub>2</sub>], 31.0 [d, *J*<sub>C-F</sub> = 6.0 Hz, CH<sub>2</sub>], 27.9 [CH<sub>2</sub>], 24.3 [CH<sub>3</sub>], 16.5 [CH<sub>3</sub>], 14.0 [CH<sub>3</sub>], 12.8 [CH<sub>3</sub>]. ESI(+)-MS: *m/z* 397 [M + H]<sup>+</sup>, 419 [M + Na]<sup>+</sup>. HR-ESI(+)-MS *m/z* calcd for C<sub>23</sub>H<sub>30</sub>FN<sub>4</sub>O: 397.2404 [M + H]<sup>+</sup>, found 397.2411.

**3-(4-Iodophenyl)-3-oxopropanenitrile (13).** To 50 mL of anhydrous tetrahydrofuran cooled at –60 °C was added first a 1.6 M *n*-butyllithium solution in hexanes (62.5 mL, 100 mmol) and then, cautiously, a solution of acetonitrile (5.2 mL, 100 mmol) in anhydrous tetrahydrofuran (50 mL) over a period of 15–20 min while maintaining the temperature below –50 °C. The mixture was then stirred for 30 min at –60 °C. Then, 12.0 g of methyl 4-iodobenzoate (45.8 mmol) dissolved in anhydrous tetrahydrofuran (70 mL) was then cautiously channeled to the mixture over 20 min while maintaining the temperature below –50 °C. Once the addition finished, the reaction mixture was stirred for 1 h at –60 °C and 2 h at –45 °C. Once completed (TLC-monitoring), the reaction was quenched at –40 °C with the addition of water (200 mL)

under vigorous stirring. Then, a 37% aqueous hydrochloric acid solution was added to acidify the aqueous layer to pH 2. A white inorganic precipitate was filtered off, and the filtrate was extracted twice with ethyl acetate (2 × 200 mL). The combined organic layers were washed with water (2 × 100 mL) and brine (100 mL), dried over sodium sulfate, filtered, and concentrated to dryness to afford pure compound 13 (8.64 g, 31.9 mmol, 70% yield) as a beige solid. *R*<sub>f</sub> (heptane/acetone 3/1, v/v): 0.28. <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>CN) δ 7.95 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.64 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 4.29 (s, 2H). <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>CN) δ 188.5 [C], 138.2 [2 × CH], 134.1 [C], 129.7 [2 × CH], 114.6 [C], 101.8 [C], 29.7 [CH<sub>2</sub>]. ESI(–)-MS: *m/z* 270 [M – H]<sup>–</sup>. HR-ESI(–)-MS *m/z* calcd for C<sub>9</sub>H<sub>5</sub>NOI: 269.9416 [M – H]<sup>–</sup>, found 269.9421.

**3-Cyano-*N,N*-diethyl-4-(4-iodophenyl)-4-oxobutanamide (14).** To a solution containing 8.64 g of 13 (31.9 mmol) in a mixture of ethanol (170 mL) and water (30 mL) was added portionwise and under vigorous stirring sodium hydroxide (1.40 g, 35.0 mmol). The reaction mixture was stirred for 15 min at ambient temperature, and then sodium iodide (9.60 g, 64.0 mmol) was added in one portion, followed by the dropwise addition of *N,N*-diethylchloroacetamide (4.40 mL, 32.1 mmol). The reaction mixture was stirred for 4 days at ambient temperature. Once the reaction was completed (TLC-monitoring), the suspension was filtered to remove inorganic salt, and the filtrate was concentrated to dryness. The residue was purified by silica gel column chromatography using CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (100/0 to 98/2, v/v) as eluent to yield compound 14 (6.61 g, 17.2 mmol, 54% yield) as a beige powder. *R*<sub>f</sub> (heptane/EtOAc 2/1, v/v): 0.26. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 7.76 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.60 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 4.95 (dd, *J* = 9.6 Hz, *J* = 4.0 Hz, 1H), 3.50–3.25 (m, 5H), 2.88 (dd, *J* = 12.0 Hz, *J* = 4.0 Hz, 1H), 1.27 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H), 1.10 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 189.1 [C], 166.8 [C], 138.4 [2 × CH], 133.6 [C], 130.1 [2 × CH], 116.7 [C], 102.8 [C], 42.0 [CH<sub>2</sub>], 40.6 [CH<sub>2</sub>], 33.7 [CH<sub>2</sub>], 14.0 [CH<sub>3</sub>], 12.9 [CH<sub>3</sub>]. ESI(–)-MS: *m/z* 383 [M – H]<sup>–</sup>. HR-ESI(+)-MS *m/z* calcd for C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>IN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 385.0413 [M + H]<sup>+</sup>, found 385.0428.

**2-(3-Amino-5-(4-iodophenyl)-1H-pyrazol-4-yl)-*N,N*-diethylacetamide (15).** To 2.25 g of 14 (5.86 mmol) dissolved in ethanol (30 mL) was added monohydrated hydrazine (802 μL, 16.4 mmol) and glacial acetic acid (586 μL, 10.2 mmol). The reaction mixture was heated at 80 °C for 3 h and then concentrated to dryness. The residue was partitioned between water (50 mL), which was basified at pH 10 with a 3.0 M sodium hydroxide aqueous solution, and ethyl acetate (50 mL). The organic layer was separated, washed with water (2 × 50 mL) and brine (50 mL), dried over sodium sulfate, filtered, and concentrated to dryness. The residue was triturated in cold diethyl ether (10 mL) to give a solid which was collected, washed with cold diethyl ether (2 × 5 mL), and vacuum-dried to afford pure compound 15 (1.80 g, 4.52 mmol, 77% yield) as a beige powder. *R*<sub>f</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 93/7, v/v): 0.20. <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ 7.78 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.22 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 3.54 (s, 2H), 3.31 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.24 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.06 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.00 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ 170.9 [C], 152.5 [C], 143.0 [C], 137.6 [2 × CH], 131.0 [C], 129.2 [2 × CH], 97.0 [C], 93.0 [C], 42.1 [CH<sub>2</sub>], 40.4 [CH<sub>2</sub>], 27.8 [CH<sub>2</sub>], 12.7 [CH<sub>3</sub>], 11.7 [CH<sub>3</sub>]. ESI(+)-MS: *m/z* 399 [M + H]<sup>+</sup>. HR-ESI(+)-MS *m/z* calcd for C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>IN<sub>2</sub>O: 399.0682 [M + H]<sup>+</sup>, found 399.0674.

***N,N*-Diethyl-2-(2-(4-iodophenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (16).** To a solution of 7.0 g of 15 (17.6 mmol) in ethanol (140 mL) was added acetylacetone (2.9 mL, 28.2 mmol). The reaction mixture was heated to reflux for 5 h and was left to cool down to ambient temperature without stirring overnight allowing the product to crystallize spontaneously. The crystals were filtered, washed with cold ethanol (2 × 20 mL), and vacuum-dried to afford pure compound 16 (6.4 g, 13.8 mmol, 78% yield) as white needles. *R*<sub>f</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/acetone 8/2, v/v): 0.48. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 7.77 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.60 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.54 (s, 1H), 3.95 (s, 2H), 3.52 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.40 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.74 (s, 3H), 2.57 (s, 3H), 1.23 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.11 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 169.8 [C], 157.7 [C], 154.0 [C], 147.6 [C], 144.7 [C], 137.5 [2 × CH], 133.3 [C], 130.4 [2 × CH], 108.5 [CH], 101.2 [C], 94.4 [C], 42.3 [CH<sub>2</sub>], 40.6 [CH<sub>2</sub>], 27.9 [CH<sub>2</sub>], 24.6 [CH<sub>3</sub>], 16.8 [CH<sub>3</sub>], 14.3 [CH<sub>3</sub>], 13.0 [CH<sub>3</sub>]. HR-ESI(+)-MS *m/z* calcd for C<sub>20</sub>H<sub>24</sub>IN<sub>4</sub>O: 463.0995 [M + H]<sup>+</sup>, found 463.1011.



**General Procedure for the Synthesis of *N,N*-Diethyl-2-(2-(4-(*n*-hydroxyalk-1-yn-1-yl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (17–20).** To 200 mg of 16 (0.432 mmol) dissolved in triethylamine (4 mL) was added, under argon, the appropriate alkynol (1.2 equiv), followed by palladium bis-(triphenylphosphine)dichloride (2 mg, 0.5 mol %) and copper iodide (1 mg, 0.01 equiv). The reaction mixture was stirred at ambient temperature for 48 h and concentrated to dryness. The resulting residue was partitioned between ethyl acetate (20 mL) and water (20 mL). The organic layer was collected, and the aqueous layer was extracted once again with ethyl acetate (20 mL). The organic layers were combined, washed with brine (30 mL), dried over sodium sulfate, filtered, and concentrated to dryness. The residue was purified by silica gel column chromatography using CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (99/1 to 95/5, v/v) as eluent to afford the title compounds.

***N,N*-Diethyl-2-(2-(4-(4-hydroxyprop-1-yn-1-yl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (17).** The procedure described above was used with prop-2-yn-1-ol (29 mg, 518 mmol) to give compound 17 (108 mg, 0.277 mmol, 64% yield) as a beige powder. *R*<sub>f</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 93/7, v/v): 0.29. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 7.79 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.50 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.55 (s, 1H), 4.48 (s, 2H), 3.98 (s, 2H), 3.52 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.40 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.76 (s, 3H), 2.59 (s, 3H), 1.23 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.11 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 169.9 [C], 157.7 [C], 154.2 [C], 147.5 [C], 144.8 [C], 133.8 [C], 131.7 [2 × CH], 128.4 [2 × CH], 122.4 [C], 108.5 [CH], 101.3 [C], 88.1 [C], 85.4 [C], 51.4 [CH<sub>2</sub>], 42.3 [CH<sub>2</sub>], 40.6 [CH<sub>2</sub>], 27.9 [CH<sub>2</sub>], 24.5 [CH<sub>3</sub>], 16.8 [CH<sub>3</sub>], 14.3 [CH<sub>3</sub>], 13.0 [CH<sub>3</sub>]. HR-(ESI<sup>+</sup>)-MS *m/z* calcd for C<sub>23</sub>H<sub>25</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>: 391.2134 [M + H]<sup>+</sup>, found 391.2137.

***N,N*-Diethyl-2-(2-(4-(4-hydroxybut-1-yn-1-yl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (18).** The procedure described above was used with but-3-yn-1-ol (36 mg, 518 mmol) to give compound 18 (136 mg, 0.336 mmol, 78% yield) as beige crystals. *R*<sub>f</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 95/5, v/v): 0.22. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 7.77 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.48 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.53 (s, 1H), 3.91 (s, 2H), 3.80 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.50 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.40 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.73 (s, 3H), 2.69 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.54 (s, 3H), 1.20 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.10 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 169.9 [C], 157.7 [C], 154.3 [C], 147.7 [C], 144.7 [C], 133.3 [C], 131.7 [2 × CH], 128.4 [2 × CH], 123.2 [C], 108.5 [CH], 101.2 [C], 87.2 [C], 82.3 [C], 61.0 [CH<sub>2</sub>], 42.3 [CH<sub>2</sub>], 40.6 [CH<sub>2</sub>], 27.9 [CH<sub>2</sub>], 24.6 [CH<sub>3</sub>], 23.8 [CH<sub>2</sub>], 16.8 [CH<sub>3</sub>], 14.3 [CH<sub>3</sub>], 13.0 [CH<sub>3</sub>]. HR-(ESI<sup>+</sup>)-MS *m/z* calcd for C<sub>24</sub>H<sub>29</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>: 405.2291 [M + H]<sup>+</sup>, found 405.2303.

***N,N*-Diethyl-2-(2-(4-(4-hydroxypent-1-yn-1-yl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (19).** The procedure described above was used with pent-4-yn-1-ol (44 mg, 518 mmol) to give compound 19 (125 mg, 0.298 mmol, 69% yield) as a white solid. *R*<sub>f</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 94/6, v/v): 0.39. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 7.74 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.46 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.54 (s, 1H), 3.93 (s, 2H), 3.81 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.49 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.40 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.74 (s, 3H), 2.56 (s, 3H), 2.55 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 1.86 (q<sup>s</sup>, *J* = 6.4 Hz, 2H), 1.22 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.10 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 169.8 [C], 157.6 [C], 154.5 [C], 147.5 [C], 145.0 [C], 133.0 [C], 131.6 [2 × CH], 128.4 [2 × CH], 123.6 [C], 108.4 [CH], 101.3 [C], 90.2 [C], 81.1 [C], 61.7 [CH<sub>2</sub>], 42.2 [CH<sub>2</sub>], 40.6 [CH<sub>2</sub>], 31.3 [CH<sub>2</sub>], 28.0 [CH<sub>2</sub>], 24.5 [CH<sub>3</sub>], 16.8 [CH<sub>3</sub>], 16.0 [CH<sub>2</sub>], 14.3 [CH<sub>3</sub>], 13.0 [CH<sub>3</sub>]. HR-(ESI<sup>+</sup>)-MS *m/z* calcd for C<sub>25</sub>H<sub>31</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>: 419.2447 [M + H]<sup>+</sup>, found 419.2460.

***N,N*-Diethyl-2-(2-(4-(4-hydroxyhex-1-yn-1-yl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (20).** The procedure described above was used with hex-5-yn-1-ol (51 mg, 518 mmol) to give compound 20 (149 mg, 0.346 mmol, 80% yield) as beige crystals. *R*<sub>f</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 95/5, v/v): 0.23. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 7.75 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.46 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.52 (s, 1H), 3.94 (s, 2H), 3.69 (t, *J* = 4.0 Hz, 2H), 3.49 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.40 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.74 (s, 3H), 2.55 (s, 3H), 2.46 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 1.81–1.65 (m, 4H), 1.23 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.10 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 169.7 [C], 157.6 [C], 154.5 [C], 147.5 [C], 145.0 [C], 132.8 [C], 131.6 [2 × CH], 128.4 [2 × CH], 123.8 [C], 108.4 [CH], 101.3 [C], 90.7 [C], 80.9 [C], 62.3 [CH<sub>2</sub>], 42.2 [CH<sub>2</sub>], 40.6 [CH<sub>2</sub>], 31.8 [CH<sub>2</sub>], 28.0 [CH<sub>2</sub>], 24.9 [CH<sub>3</sub>], 24.3 [CH<sub>3</sub>], 19.2 [CH<sub>2</sub>], 16.9 [CH<sub>3</sub>], 14.3 [CH<sub>3</sub>], 13.0 [CH<sub>3</sub>].

HR-(ESI<sup>+</sup>)-MS *m/z* calcd for C<sub>26</sub>H<sub>33</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>: 433.2604 [M + H]<sup>+</sup>, found 433.2612.

**General Procedure for the Synthesis of *N,N*-Diethyl-2-(2-(4-(*n*-fluoroalk-1-yn-1-yl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (21–24).** To the appropriate *N,N*-diethyl-2-(2-(4-(*n*-hydroxyalk-1-yn-1-yl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide dissolved in toluene (2–4 mL) and dichloromethane (1.0–2.5 mL) was added 2–3 equivs of a 50% Deoxo-Fluor solution in toluene. The reaction mixture was stirred for 24 to 72 h at ambient temperature, and additional Deoxo-Fluor solution was added if required (TLC monitoring) to complete the conversion of the starting alcohol. The solvent was removed under vacuum, and the resulting residue was dissolved in ethyl acetate (20 mL) and successively washed with water (20 mL) and brine (20 mL) before being dried over sodium sulfate, filtered, and evaporated to dryness. The crude material was purified by silica gel column chromatography using CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (99/1 to 95/5, v/v) as eluent to yield the title compounds.

***N,N*-Diethyl-2-(2-(4-(3-fluoroprop-1-yn-1-yl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (21).** Starting from 210 mg (0.538 mmol) of 17 and using the general procedure described above, compound 21 (17 mg, 0.043 mmol, 8% yield) was isolated as a white powder. *R*<sub>f</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 95/5, v/v): 0.42. *t*<sub>R</sub> (HPLC A) = 1.19 min. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 7.83 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.55 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.55 (s, 1H), 5.20 (d, *J*<sub>HF</sub> = 47.6 Hz, 2H), 3.95 (s, 2H), 3.52 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.40 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.75 (s, 3H), 2.56 (s, 3H), 1.23 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.11 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 169.7 [C], 157.7 [C], 154.2 [C], 147.5 [C], 145.0 [C], 134.4 [C], 131.9 [2 × CH], 128.5 [2 × CH], 121.5 [d, *J*<sub>CF</sub> = 4 Hz, C], 108.5 [CH], 101.4 [C], 89.5 [d, *J*<sub>CF</sub> = 12 Hz, C], 83.2 [d, *J*<sub>CF</sub> = 22 Hz, C], 71.1 [d, *J*<sub>CF</sub> = 164 Hz, CH<sub>2</sub>], 42.3 [CH<sub>2</sub>], 40.6 [CH<sub>2</sub>], 27.9 [CH<sub>2</sub>], 24.4 [CH<sub>3</sub>], 16.8 [CH<sub>3</sub>], 14.3 [CH<sub>3</sub>], 13.0 [CH<sub>3</sub>]. (ESI<sup>+</sup>)-MS: *m/z* 393 [M + H]<sup>+</sup>. HR-(ESI<sup>+</sup>)-MS *m/z* calcd for C<sub>23</sub>H<sub>26</sub>FN<sub>4</sub>O: 393.2090 [M + H]<sup>+</sup>, found 393.2084.

***N,N*-Diethyl-2-(2-(4-(4-fluorobut-1-yn-1-yl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (22).** Starting from 260 mg (0.643 mmol) of 18 and using the general procedure described above, compound 22 (162 mg, 0.399 mmol, 62% yield) was isolated as a colorless oil. *R*<sub>f</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 93/7, v/v): 0.48. *t*<sub>R</sub> (HPLC A) = 1.20 min. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 7.77 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.48 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.52 (s, 1H), 4.60 (dt, *J*<sub>HF</sub> = 46.8 Hz, *J*<sub>HH</sub> = 6.8 Hz, 2H), 3.94 (s, 2H), 3.50 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.40 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.86 (dt, *J*<sub>HF</sub> = 19.2 Hz, *J*<sub>HH</sub> = 6.8 Hz, 2H), 2.73 (s, 3H), 2.55 (s, 3H), 1.24 (t, *J* = 7.2 Hz), 1.11 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 169.6 [C], 157.6 [C], 154.0 [C], 147.5 [C], 145.1 [C], 133.2 [C], 131.7 [2 × CH], 128.2 [2 × CH], 123.1 [C], 108.3 [CH], 101.3 [C], 89.4 [C], 85.1 [d, *J*<sub>CF</sub> = 6 Hz, C], 81.3 [d, *J*<sub>CF</sub> = 171 Hz, CH<sub>2</sub>], 42.2 [CH<sub>2</sub>], 40.6 [CH<sub>2</sub>], 28.0 [CH<sub>2</sub>], 24.1 [CH<sub>3</sub>], 21.6 [d, *J*<sub>CF</sub> = 24 Hz, CH<sub>2</sub>], 16.9 [CH<sub>3</sub>], 14.3 [CH<sub>3</sub>], 13.0 [CH<sub>3</sub>]. (ESI<sup>+</sup>)-MS: *m/z* 407 [M + H]<sup>+</sup>. HR-(ESI<sup>+</sup>)-MS *m/z* calcd for C<sub>24</sub>H<sub>28</sub>FN<sub>4</sub>O: 407.2247 [M + H]<sup>+</sup>, found 407.2248.

***N,N*-Diethyl-2-(2-(4-(5-fluoropent-1-yn-1-yl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (23).** Starting from 260 mg (0.622 mmol) of 19 and using the general procedure described above, compound 23 (50 mg, 0.118 mmol, 19% yield) was isolated as a light yellow powder. *R*<sub>f</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 93/7, v/v): 0.54. *t*<sub>R</sub> (HPLC A) = 1.30 min. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 7.76 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.47 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.54 (s, 1H), 4.62 (dt, *J*<sub>HF</sub> = 47.2 Hz, *J*<sub>HH</sub> = 6.0 Hz, 2H), 3.97 (s, 2H), 3.50 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.41 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.76 (s, 3H), 2.59 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.58 (s, 3H), 2.01 (dt, 2H, *J*<sub>HF</sub> = 25.6 Hz, *J*<sub>HH</sub> = 7.2 and 6.0 Hz, 2H), 1.23 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.12 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 169.7 [C], 157.6 [C], 154.5 [C], 147.4 [C], 145.2 [C], 133.0 [C], 131.6 [2 × CH], 128.4 [2 × CH], 123.5 [C], 108.4 [CH], 101.3 [C], 89.3 [C], 82.5 [d, *J*<sub>CF</sub> = 164 Hz, CH<sub>2</sub>], 81.2 [C], 42.2 [CH<sub>2</sub>], 40.6 [CH<sub>2</sub>], 29.5 [d, *J*<sub>CF</sub> = 20 Hz, CH<sub>2</sub>], 28.0 [CH<sub>2</sub>], 24.3 [CH<sub>3</sub>], 16.9 [CH<sub>3</sub>], 15.4 [d, *J*<sub>CF</sub> = 4 Hz, CH<sub>2</sub>], 14.3 [CH<sub>3</sub>], 13.0 [CH<sub>3</sub>]. (ESI<sup>+</sup>)-MS: *m/z* 421 [M + H]<sup>+</sup>. HR-(ESI<sup>+</sup>)-MS *m/z* calcd for C<sub>25</sub>H<sub>30</sub>FN<sub>4</sub>O: 421.2404 [M + H]<sup>+</sup>, found 421.2404.

***N,N*-Diethyl-2-(2-(4-(6-fluorohex-1-yn-1-yl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (24).** Starting from 86 mg (0.199 mmol) of 20 and using the general procedure described above, compound 24 (33 mg, 0.076 mmol, 38% yield) was isolated as a



colorless oil.  $R_f$  (toluene/acetone 60/40, v/v): 0.52.  $t_R$  (HPLC A) = 1.33 min.  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.76 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 7.46 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 6.54 (s, 1H), 4.52 (dt,  $J_{\text{HF}}^2 = 47.2$  Hz,  $J_{\text{HH}}^3 = 6.0$  Hz, 2H), 3.96 (s, 2H), 3.50 (q,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 3.42 (q,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 2.75 (s, 3H), 2.58 (s, 3H), 2.50 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 1.89 (dt,  $J_{\text{HF}}^2 = 25.6$  Hz,  $J_{\text{HH}}^3 = 7.2$  and 6.0 Hz, 2H), 1.75 (q<sup>5</sup>,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 1.20 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H), 1.10 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  169.6 [C], 157.6 [C], 154.9 [C], 147.5 [C], 146.0 [C], 132.7 [C], 131.6 [2  $\times$  CH], 128.4 [2  $\times$  CH], 123.8 [C], 108.3 [CH], 101.3 [C], 90.3 [C], 83.6 [d,  $J_{\text{CF}}^1 = 164$  Hz,  $\text{CH}_2$ ], 81.1 [C], 42.2 [CH<sub>2</sub>], 40.6 [CH<sub>2</sub>], 29.5 [d,  $J_{\text{CF}}^2 = 20$  Hz,  $\text{CH}_2$ ], 28.0 [CH<sub>2</sub>], 24.4 [d,  $J_{\text{CF}}^3 = 5$  Hz,  $\text{CH}_2$ ], 23.9 [CH<sub>3</sub>], 19.1 [CH<sub>2</sub>], 16.9 [CH<sub>3</sub>], 14.2 [CH<sub>3</sub>], 13.0 [CH<sub>3</sub>]. (ESI+)-MS:  $m/z$  435 [M + H]<sup>+</sup>. HR-(ESI+)-MS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{FN}_4\text{O}$ : 435.2560 [M + H]<sup>+</sup>, found 435.2560.

**General Procedure for the Synthesis of *N,N*-Diethyl-2-(2-(4-(*n*-hydroxyalkyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (25–27).** To a solution of the appropriate *N,N*-diethyl-2-(2-(4-(4-hydroxyalk-1-yn-1-yl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (18–20) in dichloromethane (4–5 mL) was added 10% palladium on charcoal (5 mol %). The reaction flask was degassed under vacuum and filled with hydrogen at 1 atm, and the reaction mixture was stirred at ambient temperature for 24 h. The mixture was then filtered on a silica pad and washed with a mixture of  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (8/2, v/v). The filtrate was concentrated to dryness, and the residue was purified by silica gel column chromatography using  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (99/1 to 95/5 v/v) as eluent to afford the title compounds.

***N,N*-Diethyl-2-(2-(4-(4-hydroxybutyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (25).** Starting from 136 mg (0.302 mmol) of 18 and using the general procedure described above, compound 25 (94 mg, 0.230 mmol, 76% yield) was isolated as a light yellow oil.  $R_f$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  93/7, v/v): 0.26.  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.71 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 7.25 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 6.50 (s, 1H), 3.91 (s, 2H), 3.63 (t,  $J = 6.4$  Hz, 2H), 3.48 (q,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 3.40 (q,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 2.73 (s, 3H), 2.67 (t,  $J = 6.4$  Hz, 2H), 2.62 (s, 3H), 1.72 (q<sup>5</sup>,  $J = 6.4$  Hz, 2H), 1.60 (q<sup>5</sup>,  $J = 6.4$  Hz, 2H), 1.19 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H), 1.09 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  170.0 [C], 157.5 [C], 155.1 [C], 147.6 [C], 144.7 [C], 142.5 [C], 131.1 [C], 128.6 [2  $\times$  CH], 128.5 [2  $\times$  CH], 108.2 [CH], 100.9 [C], 62.6 [CH<sub>2</sub>], 42.2 [CH<sub>2</sub>], 40.5 [CH<sub>2</sub>], 35.4 [CH<sub>2</sub>], 32.2 [CH<sub>2</sub>], 28.0 [CH<sub>2</sub>], 27.4 [CH<sub>2</sub>], 24.6 [CH<sub>3</sub>], 16.9 [CH<sub>3</sub>], 14.2 [CH<sub>3</sub>], 13.0 [CH<sub>3</sub>]. HR-(ESI+)-MS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{24}\text{H}_{33}\text{N}_4\text{O}_2$ : 409.2604 [M + H]<sup>+</sup>, found 409.2620.

***N,N*-Diethyl-2-(2-(4-(4-hydroxypentyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (26).** Starting from 200 mg (0.478 mmol) of 19 and using the general procedure described above, compound 26 (80 mg, 0.189 mmol, 40% yield) was isolated as a yellow oil.  $R_f$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  9/1, v/v): 0.45.  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.71 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 7.26 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 6.54 (s, 1H), 4.00 (s, 2H), 3.64 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 3.50 (q,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 3.41 (q,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 2.77 (s, 3H), 2.67 (t,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 2.61 (s, 3H), 1.67 (q<sup>5</sup>,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 1.60 (q<sup>5</sup>,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 1.43 (m, 2H), 1.20 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H), 1.10 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  169.9 [C], 157.4 [C], 154.8 [C], 147.8 [C], 145.0 [C], 142.7 [C], 131.0 [C], 128.6 [4  $\times$  CH], 108.1 [CH], 101.0 [C], 62.9 [CH<sub>2</sub>], 42.2 [CH<sub>2</sub>], 40.5 [CH<sub>2</sub>], 35.6 [CH<sub>2</sub>], 32.6 [CH<sub>2</sub>], 31.1 [CH<sub>2</sub>], 28.1 [CH<sub>2</sub>], 25.2 [CH<sub>2</sub>], 24.5 [CH<sub>3</sub>], 16.9 [CH<sub>3</sub>], 14.2 [CH<sub>3</sub>], 13.0 [CH<sub>3</sub>]. HR-(ESI+)-MS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{25}\text{H}_{35}\text{N}_4\text{O}_2$ : 423.2760 [M + H]<sup>+</sup>, found 423.2751.

***N,N*-Diethyl-2-(2-(4-(4-hydroxyhexyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (27).** Starting from 136 mg (0.314 mmol) of 20 and using the general procedure described above, compound 27 (99 mg, 0.226 mmol, 72% yield) was isolated as a light yellow gum.  $R_f$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  93/7, v/v): 0.30.  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.71 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 7.24 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 6.51 (s, 1H), 3.92 (s, 2H), 3.61 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 3.48 (q,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 3.40 (q,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 2.74 (s, 3H), 2.64 (t,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 2.54 (s, 3H), 1.64 (q<sup>5</sup>,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 1.54 (q<sup>5</sup>,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 1.34 (m, 4H), 1.18 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H), 1.11 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  170.0 [C], 157.4 [C], 155.2 [C], 147.6 [C], 144.5 [C], 142.9 [C], 131.0 [C], 128.5 [4  $\times$  CH], 108.2 [CH], 100.9 [C], 62.8 [CH<sub>2</sub>], 42.2 [CH<sub>2</sub>], 40.5 [CH<sub>2</sub>], 35.6 [CH<sub>2</sub>], 32.6 [CH<sub>2</sub>], 31.3 [CH<sub>2</sub>], 28.9 [CH<sub>2</sub>], 28.0 [CH<sub>2</sub>], 25.5

[CH<sub>2</sub>], 24.5 [CH<sub>3</sub>], 16.9 [CH<sub>3</sub>], 14.2 [CH<sub>3</sub>], 13.0 [CH<sub>3</sub>]. HR-(ESI+)-MS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{26}\text{H}_{33}\text{N}_4\text{O}_2$ : 437.2917 [M + H]<sup>+</sup>, found 437.2914.

**General Procedure for the Synthesis of *N,N*-Diethyl-2-(2-(4-(*n*-fluoroalkyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (28–30).** To the appropriate *N,N*-diethyl-2-(2-(4-(*n*-hydroxyalkyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (25–27) dissolved in toluene (2–4 mL) and dichloromethane (1.0–2.5 mL) was added 2–3 equivs of a 50% Deoxo-Fluor solution in toluene. The reaction mixture was stirred for 24 to 72 h at ambient temperature, and additional Deoxo-Fluor solution was added if required (TLC monitoring) to complete the conversion of the starting alcohol. The solvent was removed under vacuum, and the resulting residue was dissolved in ethyl acetate (20 mL) and successively washed with water (20 mL) and brine (20 mL) before being dried over sodium sulfate, filtered, and evaporated to dryness. The crude material was purified by silica gel column chromatography using  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (99/1 to 95/5, v/v) as eluent to yield the title compounds.

***N,N*-Diethyl-2-(2-(4-(4-fluorobutyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (28).** Starting from 140 mg (0.342 mmol) of 25 and using the general procedure described above, compound 28 (60 mg, 0.146 mmol, 43% yield) was isolated as a yellow oil.  $R_f$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  93/7, v/v): 0.59.  $t_R$  (HPLC A) = 1.25 min.  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.73 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 7.26 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 6.52 (s, 1H), 4.46 (dt,  $J_{\text{HF}}^2 = 47.2$  Hz,  $J_{\text{HH}}^3 = 5.6$  Hz, 2H), 3.96 (s, 2H), 3.50 (q,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 3.41 (d,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 2.75 (s, 3H), 2.70 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 2.57 (s, 3H), 1.80–1.70 (m, 4H), 1.23 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H), 1.10 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  169.8 [C], 157.4 [C], 155.0 [C], 147.5 [C], 144.8 [C], 142.2 [C], 131.1 [C], 128.6 [2  $\times$  CH], 128.5 [2  $\times$  CH], 108.1 [CH], 101.0 [C], 83.9 [d,  $J_{\text{CF}}^1 = 163$  Hz,  $\text{CH}_2$ ], 42.2 [CH<sub>2</sub>], 40.6 [CH<sub>2</sub>], 35.1 [CH<sub>2</sub>], 29.8 [d,  $J_{\text{CF}}^2 = 19$  Hz,  $\text{CH}_2$ ], 28.1 [CH<sub>2</sub>], 26.8 [d,  $J_{\text{CF}}^3 = 5$  Hz,  $\text{CH}_2$ ], 24.1 [CH<sub>3</sub>], 16.9 [CH<sub>3</sub>], 14.2 [CH<sub>3</sub>], 13.0 [CH<sub>3</sub>]. HR-(ESI+)-MS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{FN}_4\text{O}$ : 411.2560 [M + H]<sup>+</sup>, found 411.2578.

***N,N*-Diethyl-2-(2-(4-(5-fluoropentyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (29).** Starting from 160 mg (0.378 mmol) of 26 and using the general procedure described above, compound 29 (88 mg, 0.208 mmol, 55% yield) was isolated as colorless oil.  $R_f$  (heptane/acetone 50/50, v/v): 0.39.  $t_R$  (HPLC A) = 1.35 min.  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.72 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 7.25 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 6.51 (s, 1H), 4.43 (dt,  $J_{\text{HF}}^2 = 47.6$  Hz,  $J_{\text{HH}}^3 = 6.0$  Hz, 2H), 3.95 (s, 2H), 3.49 (q,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 3.41 (q,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 2.74 (s, 3H), 2.67 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 2.56 (s, 3H), 1.80–1.65 (m, 4H), 1.46 (m, 2H), 1.20 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H), 1.10 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  169.8 [C], 157.4 [C], 155.0 [C], 147.8 [C], 145.1 [C], 142.6 [C], 131.0 [C], 128.6 [2  $\times$  CH], 128.5 [2  $\times$  CH], 108.1 [CH], 101.0 [C], 84.0 [d,  $J_{\text{CF}}^1 = 163$  Hz,  $\text{CH}_2$ ], 42.2 [CH<sub>2</sub>], 40.5 [CH<sub>2</sub>], 35.5 [CH<sub>2</sub>], 30.9 [CH<sub>2</sub>], 30.2 [d,  $J_{\text{CF}}^2 = 19$  Hz,  $\text{CH}_2$ ], 28.1 [CH<sub>2</sub>], 24.7 [d,  $J_{\text{CF}}^3 = 6$  Hz,  $\text{CH}_2$ ], 24.2 [CH<sub>3</sub>], 16.9 [CH<sub>3</sub>], 14.2 [CH<sub>3</sub>], 13.0 [CH<sub>3</sub>]. HR-(ESI+)-MS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{25}\text{H}_{34}\text{FN}_4\text{O}$ : 425.2717 [M + H]<sup>+</sup>, found 425.2718.

***N,N*-Diethyl-2-(2-(4-(6-fluorohexyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (30).** Starting from 140 mg (0.320 mmol) of 27 and using the general procedure described above, compound 30 (82 mg, 0.186 mmol, 58% yield) was isolated as an orange oil.  $R_f$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  93/7, v/v): 0.63.  $t_R$  (HPLC A) = 1.43 min.  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.72 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 7.25 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 6.51 (s, 1H), 4.43 (dt,  $J_{\text{HF}}^2 = 47.6$  Hz,  $J_{\text{HH}}^3 = 6.0$  Hz, 2H), 3.94 (s, 2H), 3.49 (q,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 3.41 (q,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 2.74 (s, 3H), 2.65 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 2.55 (s, 3H), 1.75–1.62 (m, 4H), 1.45–1.30 (m, 4H), 1.20 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H), 1.10 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  169.9 [C], 157.4 [C], 155.5 [C], 147.3 [C], 145.0 [C], 142.8 [C], 130.9 [C], 128.5 [4  $\times$  CH], 108.1 [CH], 101.0 [C], 84.1 [d,  $J_{\text{CF}}^1 = 163$  Hz,  $\text{CH}_2$ ], 42.2 [CH<sub>2</sub>], 40.5 [CH<sub>2</sub>], 35.6 [CH<sub>2</sub>], 31.2 [CH<sub>2</sub>], 30.3 [d,  $J_{\text{CF}}^2 = 19$  Hz,  $\text{CH}_2$ ], 28.7 [CH<sub>2</sub>], 28.1 [CH<sub>2</sub>], 25.0 [d,  $J_{\text{CF}}^3 = 5$  Hz,  $\text{CH}_2$ ], 24.2 [CH<sub>3</sub>], 16.9 [CH<sub>3</sub>], 14.2 [CH<sub>3</sub>], 13.0 [CH<sub>3</sub>]. HR-(ESI+)-MS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{26}\text{H}_{36}\text{FN}_4\text{O}$ : 439.2873 [M + H]<sup>+</sup>, found 439.2889.

**3-(4-(3-(2-(Diethylamino)-2-oxoethyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-2-yl)phenyl)propyl 4-methylbenzenesulfonate (31).** To 150 mg of *N,N*-diethyl-2-(2-(4-(3-hydroxypropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide 11 (0.381 mmol) dissolved in dichloromethane (5 mL) were added *p*-toluenesulfonyl



chloride (87 mg, 0.457 mmol) and triethylamine (106  $\mu$ L, 0.761 mmol). The reaction mixture was stirred at ambient temperature for 16 h and quenched with the addition of a 1.0 M aqueous hydrochloric acid solution (30 mL). The product was extracted with ethyl acetate (20 mL) and the resulting organic layer washed with brine before being dried over sodium sulfate, filtered, and evaporated to dryness. The resulting residue was purified by silica gel column chromatography using  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (98/2, v/v) as eluent to yield compound 31 (178 mg, 0.325 mmol, 85% yield) as a light yellow oil.  $R_f$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  92/8, v/v): 0.35.  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  7.78 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 2H), 7.67 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 2H), 7.38 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 2H), 7.17 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 2H), 6.56 (s, 1H), 4.03 (t,  $J$  = 6.4 Hz, 2H), 3.88 (s, 2H), 3.49 (q,  $J$  = 7.2 Hz, 2H), 3.37 (q,  $J$  = 7.2 Hz, 2H), 2.73 (s, 3H), 2.69 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 2H), 2.53 (s, 3H), 2.45 (s, 3H), 1.98 (m, 2H), 1.22 (t,  $J$  = 7.2 Hz, 3H), 1.09 (t,  $J$  = 7.2 Hz, 3H).  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  169.6 [C], 157.6 [C], 154.3 [C], 147.6 [C], 145.0 [C], 144.8 [C], 140.7 [C], 133.0 [C], 131.8 [C], 129.8 [2  $\times$  CH], 128.5 [2  $\times$  CH], 128.4 [2  $\times$  CH], 127.7 [2  $\times$  CH], 108.2 [CH], 101.0 [C], 69.7 [CH<sub>2</sub>], 42.1 [CH<sub>2</sub>], 40.4 [CH<sub>2</sub>], 31.1 [CH<sub>2</sub>], 30.3 [CH<sub>2</sub>], 27.9 [CH<sub>2</sub>], 24.3 [CH<sub>3</sub>], 21.3 [CH<sub>3</sub>], 16.5 [CH<sub>3</sub>], 14.0 [CH<sub>3</sub>], 12.8 [CH<sub>3</sub>]. ESI(+)-MS ( $m/z$ ): 549 [M + H]<sup>+</sup>, 571 [M + Na]<sup>+</sup>, 587 [M + K]<sup>+</sup>. HR-ESI(+)-MS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{30}\text{H}_{37}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$ : 549.2536 [M + H]<sup>+</sup>, found 549.2541.

5-(4-(3-(2-(Diethylamino)-2-oxoethyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-2-yl)phenyl)pent-4-yn-1-yl 4-methylbenzenesulfonate (32). To 200 mg of *N,N*-diethyl-2-(2-(4-(5-hydroxypent-1-yn-1-yl)-phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide 19 (0.478 mmol) dissolved in dichloromethane (8 mL) were added 0 °C *p*-toluenesulfonic anhydride (170 mg, 0.520 mmol) and triethylamine (166  $\mu$ L, 1.20 mmol). The reaction mixture was stirred at ambient temperature for 5 h and quenched with the addition of a 1.0 M aqueous hydrochloric acid solution (50 mL). The product was extracted with ethyl acetate (50 mL) and the resulting organic layer washed with brine before being dried over sodium sulfate, filtered, and evaporated to dryness. The resulting residue was purified by silica gel column chromatography using  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (98/2, v/v) as eluent to yield compound 32 (150 mg, 0.263 mmol, 55% yield) as a white solid.  $R_f$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  95/5, v/v): 0.45.  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.80 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 2H), 7.76 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 2H), 7.36 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 2H), 7.31 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 2H), 6.53 (s, 1H), 4.21 (t,  $J$  = 5.6 Hz, 2H), 3.94 (s, 2H), 3.51 (q,  $J$  = 7.2 Hz, 2H), 3.40 (q,  $J$  = 7.2 Hz, 2H), 2.74 (s, 3H), 2.55 (s, 3H), 2.49 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 2H), 2.39 (s, 3H), 1.94 (m, 2H), 1.23 (t,  $J$  = 7.2 Hz, 3H), 1.11 (t,  $J$  = 7.2 Hz, 3H).  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  169.7 [C], 157.6 [C], 154.4 [C], 147.0 [C], 145.0 [C], 144.8 [C], 133.1 [C], 132.8 [C], 131.6 [2  $\times$  CH], 129.8 [2  $\times$  CH], 128.4 [2  $\times$  CH], 127.8 [2  $\times$  CH], 123.3 [C], 108.4 [CH], 101.3 [C], 88.4 [C], 81.7 [C], 68.9 [CH<sub>2</sub>], 42.2 [CH<sub>2</sub>], 40.6 [CH<sub>2</sub>], 28.0 [CH<sub>2</sub>], 27.9 [CH<sub>2</sub>], 24.3 [CH<sub>3</sub>], 21.6 [CH<sub>3</sub>], 16.8 [CH<sub>3</sub>], 15.7 [CH<sub>2</sub>], 14.3 [CH<sub>3</sub>], 13.0 [CH<sub>3</sub>]. ESI(+)-MS ( $m/z$ ): 573 [M + H]<sup>+</sup>. HR-ESI(+)-MS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{32}\text{H}_{37}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$ : 573.2536 [M + H]<sup>+</sup>, found 573.2524.

**Radiochemistry. Radioisotope Production.** No-carrier-added fluorine-18 (half-life: 109.8 min) was produced via the  $^{18}\text{O}(\text{p,n})^{18}\text{F}$  nuclear reaction by irradiation of a 2 mL  $^{18}\text{O}$  water (>97% enriched, Rotem, CortecNet, Paris, France) target on an IBA Cyclone-18/9 (IBA, Belgium) cyclotron (18 MeV proton beam), and the aqueous radioactive solution was then transferred to the appropriate hot cell. Target hardware: commercial, 2 mL, two-port, stainless steel target holder equipped with a domed-end niobium cylinder insert.

**Target to Hot Cell Liquid-Transfer System.** A 50 m PTFE line (0.8 mm internal diameter; 1/16 in. external diameter), 2.0 bar helium drive pressure, and transfer time 2–3 min were used. Typical production of  $^{18}\text{F}$  fluoride at the end of bombardment for a 30–61 min (14.0–25.7  $\mu\text{A}\cdot\text{h}$ ) irradiation: 26.6–48.0 GBq (720–1.30 mCi).

**Radiosynthesis.** Radiofluorination was performed on a slightly modified TRACERLab FX-FN synthesizer<sup>53</sup> (GE Medical Systems, Germany), and the data were collected and processed by the TRACERLab FX software (GE Healthcare). HPLC purification at the semipreparative scale was performed with the following equipment and conditions: system equipped with a Waters S15 pump, a UV detector K-2501 (Knauer, Germany), and a radioactivity gamma detector (integrated in the synthesizer); column, semipreparative X-Terra

RP18, 300  $\times$  7.8 mm, 7  $\mu\text{m}$  (Waters); eluent 0.1 M aqueous  $\text{NH}_4\text{OAc}$  (pH 10)/ $\text{CH}_3\text{CN}$ : 60/40 (v/v); flow rate, 6 mL/min; temperature, rt; absorbance detection at  $\lambda$  = 254 nm. The radiotracer is finally automatically formulated in a saline/ethanol 80:20 (v/v) solution.

**Quality Control.** The radiotracer preparations were visually inspected for clarity, absence of color, and particulates. An aliquot of the preparation was removed for the determination of pH using standard pH-paper (Duotest, Macherey-Nagel, pH 1–12, Hoerd, France). Chemical and radiochemical purities were also assessed on this aliquot by HPLC (analytical HPLC), with an authentic sample of tracer (1 or 23). The following equipment and conditions were used: equipment, Waters (Guyancourt, France) Alliance 2965 equipped with a UV spectrophotometer (Photodiode Array Detector, Waters 2996) and a Berthold LB509 radioactivity detector; column, analytical symmetry C18, 50  $\times$  4.6 mm, 3.5  $\mu\text{m}$  (Waters); conditions, isocratic elution with solvA/solvB, 35/65 (v/v) (solvent A,  $\text{H}_2\text{O}$  containing low-UV PIC B7 reagent (20 mL for 1 L); solvent B,  $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ , 30:70 (v/v) containing low-UV PIC B7 reagent (20 mL for 1 L)); flow rate, 2.0 mL/min; temperature, rt; and absorbance detection at  $\lambda$  = 254 nm. Particular attention was paid to the absence of nonradioactive precursors for labeling (31 or 32). Chemical and radiochemical stabilities of the entire preparation were tested by HPLC (analytical HPLC) at regular 15 min intervals during 150 min. Specific radioactivity of the radiotracer was calculated from three consecutive HPLC (analytical HPLC) analyses (average) and determined as follows: the area of the UV absorbance peak corresponding to the radiolabeled product was measured (integrated) on the HPLC-chromatogram and compared with a standard curve relating mass to UV absorbance.

***N,N*-Diethyl-2-(2-(4-(3- $^{18}\text{F}$ fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide ( $^{18}\text{F}$ 12).** The cyclotron produced irradiated water, once transferred to the module, was aspirated through a Sep-Pak Light Accell Plus QMA-cartridge (Waters) to fix  $^{18}\text{F}$  fluoride anions and remove the  $^{18}\text{O}$  enriched water.  $^{18}\text{F}$  fluoride (33–52 GBq) was then eluted with a solution of  $\text{K}_2^{222}$  (12–15 mg) and  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (1.5 mg) in water/acetonitrile (30/70 v/v, 1 mL) into the reaction vessel. The dried, no-carrier-added,  $\text{K}^{18}\text{F}$ – $\text{K}_2^{222}$  complex was prepared by evaporation of the solution with heating under vacuum (60 °C for 7 min followed by 120 °C for 5 min).  $^{18}\text{F}$ 12 was obtained by addition of a solution of the precursor for labeling 31 (4.0 to 4.5 mg) in the appropriate solvent ( $\text{CH}_3\text{CN}$  or DMSO, 700  $\mu\text{L}$ ) to the dried  $\text{K}^{18}\text{F}$ – $\text{K}_2^{222}$  complex, and fluorine-18 incorporation was evaluated in  $\text{CH}_3\text{CN}$  by heating the reaction mixture at 100 °C either for 5 or 10 min, or in DMSO by heating the reaction mixture for 5 min at 165 °C. After this period of heating, the reaction mixture was cooled to 50 °C and diluted with HPLC solvent (2 mL) before being transferred under pressure to a Sep-Pak Alumina N cartridge (Waters) and finally collected in a HPLC tube. The reaction vessel was rinsed with HPLC solvent (2 mL) and the resulting solution transferred to the HPLC tube via the Sep-Pak Alumina N cartridge. The crude solution (4.7 mL) collected in the HPLC tube was injected onto a reverse phase HPLC column (semipreparative HPLC), and the product fraction of  $^{18}\text{F}$ 12 was collected, diluted with water (10 mL), and passed through a Sep-PakPlus C18 cartridge (Waters) to fix the radiotracer and remove residual acetonitrile or salts by washing the cartridge with additional water (5 mL) before elution of the cartridge with ethanol (2 mL) and dilution of the ethanolic solution of  $^{18}\text{F}$ 12 with 0.9% aq. NaCl solution (8 mL) for *i.v.* injection.

***N,N*-Diethyl-2-(2-(4-(5- $^{18}\text{F}$ fluoropent-1-yn-1-yl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide ( $^{18}\text{F}$ 23).** The preparation of  $^{18}\text{F}$ 23 was achieved using the same procedure as that described above for the preparation of  $^{18}\text{F}$ 12, starting from the precursor for labeling 32 and using a heating period of 10 min at 100 °C in  $\text{CH}_3\text{CN}$ .

**In Vitro Competition Assays (Table 1).** Binding affinities for the TSPO ( $K_i$ ) were determined using membrane homogenates from rat heart and screened against  $^3\text{H}$ PK11195 ( $K_d$  = 1.8 nM,  $C$  = 0.2 nM). Affinities for the CBR were determined at a unique concentration (1  $\mu\text{M}$ ), using membrane homogenates from rat cerebral cortex and screened against  $^3\text{H}$ flunitrazepam ( $K_d$  = 2.1 nM,  $C$  = 0.4 nM).



**Partition Coefficient (LogD<sub>7.4</sub>) and LipE Calculations (Table 1).** LogD<sub>7.4</sub> (*n*-octanol/buffer pH 7.4 partition coefficient) values were determined based on a validated and standardized HPLC method, by conversion of the recorded retention time for each compound (correlation between retention times and known logD values of similar compounds). HPLC conditions: Alliance 2695-PDA Waters, X-Terra MS C18 (4.6 × 20 mm, 3.5 μm) column; mobile phase 5 mM MOPS/(CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>NOH pH 7.4 (A), 5% MOPS/(CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>NOH (100 mM, pH 7.4)/95% CH<sub>3</sub>CN (B); gradient (A/B), 98:2 (0.5 min), 0:100 (4.8 min), 98:2 (1.6 min); 1.2 mL/min; 25 °C; detection at 254 nm. LipE was calculated as follows: LipE = pIC<sub>50</sub> - logD<sub>7.4</sub>.

**In Vitro Metabolism (Table 2).** Compounds were incubated with hepatic microsomal fractions (male CD1 mouse, male Sprague–Dawley rat, or humans (BD pool)) using the following experimental conditions throughout the study: microsomal proteins concentration = 1 mg/mL; bovine serum albumin (BSA) concentration = 1 mg/mL; substrate concentration = 5 μM; cofactor (if used, see below), 1 mM aq. NADPH.

$$[\% \text{biotransformation}] = \left[ 1 - \left( \frac{\text{peak area corresponding to unchanged compound in sample B}}{\text{peak area corresponding to unchanged compound in sample A}} \right) \right] \times 100$$

**In Vitro Autoradiographies and in Vivo Small Animal PET Studies: Acute Neuroinflammatory Animal Model.** Striatal AMPA-mediated excitotoxicity and acute local neuroinflammation in the brain of Wistar rats was induced according to reported procedures.<sup>23,34,52</sup> The protocol used includes a stereotaxic injection in the right striatum of 0.5 μL of AMPA ((*R,S*)- $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolopropionic acid, 15 mM in phosphate buffered saline (PBS) buffer) in anesthetized and normothermally controlled animals followed by a resting period of 7 days.

**In Vitro Brain Autoradiographies.** Brain slices of unilaterally AMPA-lesioned animals were prepared according to reported procedures.<sup>23,34,52</sup> The protocol used includes decapitation of the animals under terminal anesthesia, quick brain removal, and freezing in cold (-80 °C, dry ice) isopentane followed by coronal 10 μm-thick slicing of the brain at the level of the lesion. Then, adjacent brain slices (36 slices from the center of the lesioned area) were taken and incubated for 20 min in Tris buffer (TRIZMA preset Crystals, Sigma, adjusted at pH 7.4 at 4 °C, 50 mM with NaCl 120 mM) containing the radiotracer alone [<sup>18</sup>F]12 or [<sup>18</sup>F]-23 (90–111 MBq, 500–600 MBq/L, 5–10 nM), or the radiotracer and PK11195 (20 μM), the radiotracer and its nonlabeled version (20 μM), as well as the radiotracer and flumazenil (20 μM). Brain sections were then washed 2 times for 2 min and once for 10 s with cold (4 °C) buffer, then exposed on a Phosphor-Imager screen overnight. Autoradiograms were scanned and then analyzed using the ImageJ software (developed by the National Institutes of Health). A region of interest (ROI) was manually drawn around the core of the lesion, and an identical area was copied–pasted symmetrically into the contralateral hemisphere. Binding in the ROI was then expressed as the number of counts per surface unit. The target-to-background ratio (TBR) was calculated as the ratio of the binding in the lesioned versus the contralateral hemisphere.

**Small Animal PET Studies.** Rats (*n* = 4, 355 ± 22.5 g) were imaged with the radiotracer ([<sup>18</sup>F]12 or [<sup>18</sup>F]23) 7 days after intrastriatal injection of AMPA (see above) using a commercially available, small-animal-dedicated, INVEON PET/CT or PET only tomograph (Siemens, Munich, Germany). Anaesthesia of animals was induced by a mixture of isoflurane and O<sub>2</sub> (3%/97%). Animals were then placed in a homemade stereotaxic frame compatible with PET acquisition, anesthesia maintained by using only a 1.5%–2.5% mixture of isoflurane in O<sub>2</sub> and maintained normothermic using a heating pad (Heater Pad Biovet, m2m Imaging Corp., Cleveland, OH, USA). Animals were injected with the radiotracer (0.9–1.1 mCi, 3 to 20 nmoles, 350 to 500 μL) in the caudal lateral vein using a 24 gauge catheter. Imaging started at the time of injection of the radiotracer and lasted for 60 min. 3D-PET acquisitions were performed with the coincidence time window set to 3.432 ns and the energy levels of discrimination set to 350 and 650 keV. The list mode file of the emission scans was histogrammed into 24

For each compound to be tested, 2 samples were prepared: sample A, microsomal incubation, 0 min, without cofactor; sample B, microsomal incubation, 20 min, with cofactor. Enzyme activity was stopped with 1 volume of ACN and proteins removed by centrifugation. The supernatant fluids were then analyzed by HPLC/ESI-MS/MS with the mass spectrometer set in selected ion recording (SIR) in positive mode. The data were collected and processed using MassLynx 4.0 software from Waters-Micromass, leading to quantification of the unchanged tested compound. Analytical HPLC conditions: C18 (125 × 2.1 mm, 3 μm) column; mobile phase, (A) H<sub>2</sub>O containing NH<sub>4</sub>OAc (0.25 g/L) and HCO<sub>2</sub>H (2 mL/L), (B) ACN/MeOH (80/20) containing NH<sub>4</sub>OAc (0.15 g/L), HCO<sub>2</sub>H (2 mL/L) and H<sub>2</sub>O (10 mL/L); gradient (A/B), 90:10 (0.75 min), 0:100 (3.25 min), 90:10 (2.0 min); 0.3 mL/min; injection volume, 10 μL. The percentages of biotransformation, consisting of oxidative reactions as well as noncofactor-dependent reactions such as ester bond hydrolysis, were calculated using the following formula and are reported in Table 2:

dynamic frames (3 × 30 s, 5 × 60 s, 5 × 2 min, 3 × 3 min, 3 × 3 min, 4 × 5 min, and 1 × 10 min) with a maximum ring difference of 79 and a span of 3. A 3D attenuation correction file was generated with correction factors either measured using an external cobalt-57 point source (PET only tomograph) or using the CT X-ray source (PET/CT tomograph). The emission sinograms (i.e., each frame) were then normalized and corrected for attenuation and radioactivity decay. 3D images were finally reconstructed with the Fourier rebinning (FORE) and ordered-subsets expectation–maximization, 2-dimensional (OSEM 2D) algorithms (16 subsets and 4 iterations). Image analysis and quantification of radioactivity uptake in volumes of interest (VOIs) were performed using Brain-Visa/Anatomist version 3.1 (developed in-house<sup>54</sup>). On the ipsilateral side, delineation of the lesion area was made by manual segmentation on the summed-frame images spanning the last 30 min of the PET acquisition. A ROI was drawn on each adjacent transaxial section containing the lesion and combined to define a volume of interest (VOI). On the contralateral side, an ovoid VOI (4 × 4 × 4 voxels, 22 mm<sup>3</sup>) was manually positioned in the center of the striatum. These VOIs were then projected onto all dynamic frames, and the resulting time–activity curves were then normalized for the percentage of injected dose per milliliter (% ID/mL).

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b00932.

<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra as well as HRMS data of synthesized and tested compounds 12, 21–24 and 28–32 (PDF)

SMILES data (CSV)

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*Phone: +33 0-1 69 08 13 18. E-mail: annelaure.damont@cea.fr.

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by CEA-I<sup>2</sup>BM intramural programs, as well as the European Union's Seventh Framework Programme [FP7/2007-2013] INMiND (Grant agreement no. HEALTH-F2-2011-278850). We thank former students Helene Gaudy and

Alex Ching; radiochemists Fabien Caillé, Stéphane Demphel, and Stéphane Le Helleix; cyclotron operators Daniel Gouel, Christophe Lechêne, and Tony Catarina for their participation in this work. We also thank LGCR Analytical Sciences (Sanofi, Chilly Mazarin) for logD<sub>7.4</sub> measurements and DMPK (Sanofi, Montpellier) for preliminary metabolism studies. HRMS determination has benefited from the facilities and expertise of the Small Molecule Mass Spectrometry platform of IMAGIF, Gif-sur-Yvette, France ([www.imagif.cnrs.fr](http://www.imagif.cnrs.fr)).

## ■ ABBREVIATIONS USED

CBR, central benzodiazepine receptor; d.c., decay-corrected; DPA, 3,5-dimethylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl acetamide; EOB, end of bombardment; EOS, end of synthesis; LipE, lipophilic efficiency; PTFE, polytetrafluoroethylene; RCY, radiochemical yield; ROI, region of interest; SRA, specific radioactivity; TBR, target-to-background ratio; TSPO, translocator protein 18 kDa (formerly known as peripheral benzodiazepine receptor, PBR); VOI, volume of interest

## ■ REFERENCES

- (1) Dollé, F.; Luus, C.; Reynolds, A.; Kassiou, M. Radiolabelled molecules for imaging the translocator protein (18 kDa) using positron emission tomography. *Curr. Med. Chem.* 2009, 16, 2899–2923.
- (2) Shah, F.; Pike, V. W.; Turton, D. R. Syntheses of homochiral <sup>11</sup>C-labelled radioligands for peripheral benzodiazepine binding sites. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* 1993, 32, S166–168.
- (3) Thominaux, C.; Demphel, S.; Damont, A.; Boutin, H.; Rooney, T.; Tavitian, B.; Dollé, F. Carbon-11-labelling of three PK11195 analogues: [<sup>11</sup>C]PK13015, [<sup>11</sup>C]PK12090 and [<sup>11</sup>C]PK14045. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* 2013, 56, S291.
- (4) Castellano, S.; Taliani, S.; Milite, C.; Pugliesi, I.; Da Pozzo, E.; Rizzetto, E.; Bendinelli, S.; Costa, B.; Cosconati, S.; Greco, G.; Novellino, E.; Sbardella, G.; Stefancich, G.; Martini, C.; Da Settimo, F. Synthesis and biological evaluation of 4-Phenylquinazoline-2-carboxamides designed as a novel class of potent ligands of the translocator protein. *J. Med. Chem.* 2012, 55, 4506–4510.
- (5) Castellano, S.; Taliani, S.; Viviano, M.; Milite, C.; Da Pozzo, E.; Costa, B.; Barresi, E.; Bruno, A.; Cosconati, S.; Marinelli, L.; Greco, G.; Novellino, E.; Sbardella, G.; Da Settimo, F.; Martini, C. Structure–activity relationship refinement and further assessment of 4-Phenylquinazoline-2-carboxamide translocator protein ligands as antiproliferative agents in human glioblastoma tumors. *J. Med. Chem.* 2014, 57, 2413–2428.
- (6) Brouwer, C.; Jenko, K.; Zoghbi, S. S.; Innis, R. B.; Pike, V. W. Development of N-Methyl-(2-arylquinolin-4-yl)oxypropanamides as leads to PET radioligands for translocator protein (18 kDa). *J. Med. Chem.* 2014, 57, 6240–6251.
- (7) Marangos, P. J.; Patel, J.; Boulenger, J. P.; Clark-Rosenberg, R. Characterization of peripheral-type benzodiazepine binding sites in brain using [<sup>3</sup>H]Ro 5–4864. *Mol. Pharmacol.* 1982, 22, 26–32.
- (8) Schoemaker, H.; Boles, R. G.; Horst, W. D.; Yamamura, H. I. Specific high-affinity binding sites for [<sup>3</sup>H]Ro 5–4864 in rat brain and kidney. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1983, 225, 61–69.
- (9) Turton, D. R.; Pike, V. W.; Cartoon, M.; Widdowson, D. A. Preparation of a potential marker for glial cells – (N-methyl-<sup>11</sup>C) Ro5–4864. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* 1984, 21, 1209–1210.
- (10) Zhang, M. R.; Kida, T.; Noguchi, J.; Furutsuka, K.; Maeda, J.; Sahara, T.; Suzuki, K. [<sup>11</sup>C]DAA1106: radiosynthesis and *in vivo* binding to peripheral benzodiazepine receptors in mouse brain. *Nucl. Med. Biol.* 2003, 30, 513–519.
- (11) Probst, K. C.; Izquierdo, D.; Bird, J. L.; Brichard, L.; Franck, D.; Davies, J. R.; Fryer, T. D.; Richards, H. K.; Clark, J. C.; Davenport, A. P.; Weissberg, P. L.; Warburton, E. A. Strategy for improved [<sup>11</sup>C]-DAA1106 radiosynthesis and *in vivo* peripheral benzodiazepine receptor imaging using microPET, evaluation of [<sup>11</sup>C]DAA1106. *Nucl. Med. Biol.* 2007, 34, 439–446.
- (12) Takano, A.; Arakawa, R.; Ito, H.; Tateno, A.; Takahashi, H.; Matsumoto, R.; Okubo, Y.; Sahara, T. Peripheral benzodiazepine receptors in patients with chronic schizophrenia: a PET study with [<sup>11</sup>C]DAA1106. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2010, 13, 943–950.
- (13) Zhang, M. R.; Maeda, J.; Furutsuka, K.; Yoshida, Y.; Ogawa, M.; Sahara, T.; Suzuki, K. [<sup>18</sup>F]FMDAA1106 and [<sup>18</sup>F]FEDAA1106: two positron-emitter labeled ligands for peripheral benzodiazepine receptor (PBR). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2003, 13, 201–204.
- (14) Briard, E.; Shah, J.; Musachio, J. L.; Zoghbi, S. S.; Fujita, M.; Imaizumi, M.; Cropley, V.; Innis, R. B.; Pike, V. W. Synthesis and evaluation of a new <sup>18</sup>F-labeled ligand for PET imaging of brain peripheral benzodiazepine receptors. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* 2005, 48, S4.
- (15) Wang, M.; Gao, M.; Miller, K. D.; Zheng, Q. H. Synthesis of [<sup>11</sup>C]PBR06 and [<sup>18</sup>F]PBR06 as agents for positron emission tomographic (PET) imaging of the translocator protein (TSPO). *Steroids* 2011, 76, 1331–1340.
- (16) Zhang, M. R.; Kumata, K.; Suzuki, K. A practical route for synthesizing a PET ligand containing [<sup>18</sup>F]fluorobenzene using reaction of diphenyliodonium salt with [<sup>18</sup>F]F<sup>-</sup>. *Tetrahedron Lett.* 2007, 48, 8632–8635.
- (17) Briard, E.; Hong, J.; Musachio, J. L.; Zoghbi, S. S.; Fujita, M.; Imaizumi, M.; Cropley, V.; Innis, R. B.; Pike, V. W. Synthesis and evaluation of two candidate <sup>11</sup>C-labeled radioligands for brain peripheral benzodiazepine receptors. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* 2005, 48, S71.
- (18) Briard, E.; Zoghbi, S. S.; Imaizumi, M.; Gourley, J. P.; Hong, J.; Cropley, V.; Fujita, M.; Innis, R. B.; Pike, V. W. Synthesis and evaluation in monkey of two sensitive <sup>11</sup>C-labeled aryloxyanilide ligands for imaging brain peripheral benzodiazepine receptors *in vivo*. *J. Med. Chem.* 2008, 51, 17–30.
- (19) Wilson, A. A.; Garcia, A.; Parkes, J.; McCormick, P.; Stephenson, K. A.; Houle, S.; Vasdev, N. Radiosynthesis and initial evaluation of [<sup>18</sup>F]-FEPPA for PET imaging of peripheral benzodiazepine receptors. *Nucl. Med. Biol.* 2008, 35, 305–314.
- (20) Damont, A.; Boisgard, R.; Kuhnast, B.; Lemée, F.; Raggiri, G.; Scarf, A. M.; Da Pozzo, E.; Selleri, S.; Martini, C.; Tavitian, B.; Kassiou, M.; Dollé, F. Synthesis of 6-[<sup>18</sup>F]fluoro-PBR28, a novel radiotracer for imaging the TSPO 18 kDa with PET. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2011, 21, 4819–4822.
- (21) Taliani, S.; Pugliesi, I.; Da Settimo, F. Structural requirements to obtain highly potent and selective 18 kDa Translocator Protein (TSPO) Ligands. *Curr. Top. Med. Chem.* 2011, 11, 860–886.
- (22) Thominaux, C.; Mattner, F.; Greguric, I.; Boutin, H.; Chauveau, F.; Kuhnast, B.; Grégoire, M.-C.; Loc'h, C.; Valette, H.; Bottlaender, M.; Hantraye, P.; Tavitian, B.; Katsifis, A.; Dollé, F. Radiosynthesis of 2-[6-chloro-2-(4-iodophenyl)imidazo[1,2-a]pyridin-3-yl]-N-ethyl-N-[<sup>11</sup>C]-methyl-acetamide, [<sup>11</sup>C]CLINME, a novel radioligand for imaging the peripheral benzodiazepine receptors with PET. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* 2007, 50, 229–236.
- (23) Boutin, H.; Chauveau, F.; Thominaux, C.; Kuhnast, B.; Grégoire, M. C.; Jan, S.; Trebossen, R.; Dollé, F.; Tavitian, B.; Mattner, F.; Katsifis, A. *In vivo* imaging of brain lesions with [<sup>11</sup>C]CLINME, a new PET radioligand of peripheral benzodiazepine receptors. *Glia* 2007, 55, 1459–1468.
- (24) Bourdier, T.; Henderson, D.; Fookes, C. J.; Lam, P.; Mattner, F.; Fulham, M.; Katsifis, A. Synthesis of [<sup>11</sup>C]PBR170, a novel imidazopyridine, for imaging the translocator protein with PET. *Appl. Radiat. Isot.* 2014, 90, 46–52.
- (25) Bourdier, T.; Mattner, F.; Fookes, C.; Pham, T.; Loc'h, C.; Katsifis, A. *In vivo* evaluation of a [<sup>18</sup>F]-labelled imidazopyridine (PBR170), for the study of the translocator protein using PET. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* 2011, 54, S274.
- (26) Bourdier, T.; Henderson, D.; Lam, P.; Fookes, C.; Mattner, F.; Greguric, I.; Pham, T.; Eberl, S.; Wen, L.; Katsifis, A. Labelling and *in vivo* evaluation in baboons of a novel [<sup>11</sup>C]-carbon labelled imidazopyridine, for the study of the peripheral benzodiazepine receptors using PET. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* 2009, 52, S347.



- (27) Sekimata, K.; Hatano, K.; Ogawa, M.; Abe, J.; Magata, Y.; Biggio, G.; Serra, M.; Laquintana, V.; Denora, N.; Latrofa, A.; Trapani, G.; Liso, G.; Ito, K. Radiosynthesis and *in vivo* evaluation of  $N$ - $^{11}\text{C}$  methylated imidazopyridineacetamides as PET tracers for peripheral benzodiazepine receptors. *Nucl. Med. Biol.* 2008, 35, 327–334.
- (28) Pham, T.; Mattner, F.; Fookes, I.; Greguric, I.; Berghofer, P.; Ballantyne, P.; Liu, X.; Shepherd, R.; Jackson, T.; Katsifis, A. Synthesis and evaluation of ( $^{18}\text{F}$ ) labelled imidazopyridines, for the study of peripheral benzodiazepine binding sites using PET. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* 2007, 50, S377.
- (29) Fookes, C.; Pham, T.; Mattner, F.; Greguric, I.; Loc'h, C.; Liu, X.; Berghofer, P.; Shepherd, R.; Grégoire, M.-C.; Katsifis, A. Synthesis and biological evaluation of substituted [ $^{18}\text{F}$ ]imidazo[1,2-*a*]pyridines and [ $^{18}\text{F}$ ]pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidines for the study of the peripheral benzodiazepine receptor using positron emission tomography. *J. Med. Chem.* 2008, 51, 3700–3712.
- (30) Chauveau, F.; Boutin, H.; Thominaux, C.; Dollé, F.; Trebossen, R.; Kassiou, M.; Katsifis, A.; Tavitian, B. MicroPET evaluation of new tracers for neuroinflammation imaging. *Mol. Imaging* 2006, 5, 433–434.
- (31) James, M.; Fulton, R.; Henderson, D.; Eberl, S.; Fulham, M.; Allan, R.; Thompson, S.; Dollé, F.; Kassiou, M. Synthesis and *in vivo* evaluation of a novel PET radioligand for imaging the peripheral benzodiazepine receptor. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* 2005, 48, S3.
- (32) James, M. L.; Fulton, R. R.; Henderson, D. J.; Eberl, S.; Meikle, S. R.; Thomson, S.; Allan, R. D.; Dollé, F.; Fulham, M. J.; Kassiou, M. Synthesis and *in vivo* evaluation of a novel peripheral benzodiazepine receptor PET radioligand. *Bioorg. Med. Chem.* 2005, 13, 6188–6194.
- (33) Thominaux, C.; Dollé, F.; James, M. L.; Bramoullé, Y.; Boutin, H.; Besret, L.; Grégoire, M. C.; Valette, H.; Bottlaender, M.; Tavitian, B.; Hantraye, P.; Selli, S.; Kassiou, M. Improved synthesis of the peripheral benzodiazepine receptor ligand [ $^{11}\text{C}$ ]DPA-713 using [ $^{11}\text{C}$ ]methyl triflate. *Appl. Radiat. Isot.* 2006, 64, 570–573.
- (34) Boutin, H.; Chauveau, F.; Thominaux, C.; Grégoire, M.-C.; James Michelle, L.; Trebossen, R.; Hantraye, P.; Dollé, F.; Tavitian, B.; Kassiou, M.  $^{11}\text{C}$ -DPA-713: A novel peripheral benzodiazepine receptor PET ligand for *in vivo* imaging of neuroinflammation. *J. Nucl. Med.* 2007, 48, 573–581.
- (35) Bennacef, I.; Salinas, C. A.; Jensen, S. B.; Cunningham, V. J.; Bonasera, T. A.; Gee, A. D. [ $^{11}\text{C}$ ]DPA713: Radiosynthesis and evaluation for cerebral peripheral benzodiazepine receptor imaging. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* 2007, 50, S341.
- (36) James, M. L.; Fulton, R.; Vercouillie, J.; Henderson, D.; Garreau, L.; Eberl, S.; Chalou, S.; Selli, S.; Dollé, F.; Guilloteau, D.; Kassiou, M. DPA-714, a new translocator protein (18 kDa) ligand: Synthesis, radiofluorination and pharmacological characterisation. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* 2007, 50, S25.
- (37) Doorduyn, J.; Klein, H. C.; James, M. L.; Kassiou, M.; Dierckx, R. A.; De Vries, E. F. J. [ $^{18}\text{F}$ ]DPA-714 as a novel PET tracer for PBR: A comparison with [ $^{11}\text{C}$ ]PK11195 in a rat model of HSV encephalitis. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* 2007, 50, S333.
- (38) James, M. L.; Fulton, R. R.; Vercouillie, J.; Henderson, D. J.; Garreau, L.; Chalou, S.; Dollé, F.; Selli, S.; Guilloteau, D.; Kassiou, M. DPA-714, a new translocator protein-specific ligand: Synthesis, radiofluorination, and pharmacologic characterization. *J. Nucl. Med.* 2008, 49, 814–822.
- (39) Damont, A.; Hinnen, F.; Kuhnast, B.; Schollhorn-Peyronneau, M.-A.; James, M. L.; Luus, C.; Tavitian, B.; Kassiou, M.; Dollé, F. Radiosynthesis of [ $^{18}\text{F}$ ]DPA-714, a selective radioligand for imaging the translocator protein (18 kDa) with PET. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* 2008, 51, 286–292.
- (40) Tang, D.; McKinley, E. T.; Hight, M. R.; Uddin, Md. I.; Harp, J. M.; Fu, A.; Nickels, M. L.; Buck, J. R.; Manning, H. C. Synthesis and structure–activity relationships of 5,6,7-substituted pyrazolopyrimidines: discovery of a novel TSPO PET ligand for cancer imaging. *J. Med. Chem.* 2013, 56, 3429–3433.
- (41) Tang, D.; Nickels, M. L.; Tantawy, M. N.; Buck, J. R.; Manning, H. C. Preclinical imaging evaluation of novel TSPO-PET ligand 2-(5,7-diethyl-2-(4-(2- $^{18}\text{F}$ fluoroethoxy)phenyl)pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)-*N,N*-diethylacetamide ([ $^{18}\text{F}$ ]VUIIS1008) in glioma. *Mol. Imaging Biol.* 2014, 16, 813–820.
- (42) Pham, T.; Fookes, C.; Liu, X.; Greguric, I.; Bourdier, T.; Katsifis, A. Synthesis of [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorine labelled imidazo[1,2*b*]pyridazine as potential probes for the study of peripheral benzodiazepine binding sites using PET. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* 2007, 50, S204.
- (43) Romeo, E.; Auta, J.; Kozikowski, A. P.; Ma, D.; Papadopoulos, V.; Puia, G.; Costa, E.; Guidotti, A. 2-Aryl-3-Indoleacetamides (FGIN-1): A new class of potent and specific ligands for the mitochondrial DBI receptor (MDR). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1992, 262, 971–978.
- (44) Pike, V. W.; Taliani, S.; Lohith, T. G.; Owen, D. R. J.; Pugliesi, I.; Da Pozzo, E.; Hong, J.; Zoghbi, S. S.; Gunn, R. N.; Parker, C. A.; Rabiner, E. A.; Fujita, M.; Innis, R. B.; Martini, C.; Da Settimo, F. Evaluation of novel  $N^1$ -Methyl-2-phenylindol-3-ylglyoxyamides as a new chemotype of 18 kDa translocator protein-selective ligand suitable for the development of positron emission tomography radioligands. *J. Med. Chem.* 2011, 54, 366–373.
- (45) Thominaux, C.; Damont, A.; Kuhnast, B.; Demphel, S.; Le Helleix, S.; Boisnard, S.; Rivron, L.; Chauveau, F.; Boutin, H.; Van Camp, N.; Boisgard, R.; Roy, S.; Allen, J.; Rooney, T.; Benavides, J.; Hantraye, P.; Tavitian, B.; Dollé, F. Radiosynthesis of 7-chloro-*N,N*-dimethyl-5-[ $^{11}\text{C}$ ]methyl-4-oxo-3-phenyl-3,5-dihydro-4*H*-pyridazino-[4,5-*b*]indole-1-acetamide, [ $^{11}\text{C}$ ]SSR180575, a novel radioligand for imaging the TSPO (peripheral benzodiazepine receptor) with PET. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* 2010, 53, 767–773.
- (46) Wadsworth, H.; Jones, P. A.; Chau, W. F.; Durrant, C.; Fouladi, N.; Passmore, J.; O'Shea, D.; Wynn, D.; Morisson-Iveson, V.; Ewan, A.; Thaning, M.; Mantzilas, D.; Gausemel, I.; Khan, I.; Black, A.; Avory, M.; Trigg, W. [ $^{18}\text{F}$ ]GE-180: a novel fluorine-18 labelled PET tracer for imaging Translocator protein 18 kDa (TSPO). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2012, 22, 1308–1313.
- (47) Zhang, M. R.; Kumata, K.; Maeda, J.; Yanamoto, K.; Hatori, A.; Okada, M.; Higuchi, M.; Obayashi, S.; Suhara, T.; Suzuki, K. 11C-AC-5216: a novel PET ligand for peripheral benzodiazepine receptors in the primate brain. *J. Nucl. Med.* 2007, 48, 1853–1861.
- (48) Yanamoto, K.; Kumata, K.; Yamasaki, T.; Odawara, C.; Kawamura, K.; Yui, J.; Hatori, A.; Suzuki, K.; Zhang, M.-R. [ $^{18}\text{F}$ ]FEAC and [ $^{18}\text{F}$ ]FEDAC: Two novel positron emission tomography ligands for peripheral-type benzodiazepine receptor in the brain. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2009, 19, 1707–1710.
- (49) Peyronneau, M.-A.; Saba, W.; Goutal, S.; Damont, A.; Dollé, F.; Kassiou, M.; Bottlaender, M.; Valette, H. Metabolism and quantification of [ $^{18}\text{F}$ ]DPA-714, a new TSPO positron emission tomography radioligand. *Drug Metab. Dispos.* 2013, 41, 122–131.
- (50) Eun, L.; Chulbom, L.; Jin, S. T.; Ho, S. W.; Kap, S. L. Radical isomerization via intramolecular ipso substitution of aryl ethers: Aryl translocation from oxygen to carbon. *Tetrahedron Lett.* 1993, 34, 2343–2346.
- (51) Leeson, P. D.; Springthorpe, B. The influence of drug-like concepts on decision making in medicinal chemistry. *Nat. Rev. Drug Discovery* 2007, 6, 881–890.
- (52) Chauveau, F.; Van Camp, N.; Dollé, F.; Kuhnast, B.; Hinnen, F.; Damont, A.; Boutin, H.; James, M. L.; Kassiou, M.; Tavitian, B. Comparative evaluation of the translocator protein radioligands  $^{11}\text{C}$ -DPA-713,  $^{18}\text{F}$ -DPA-714, and  $^{11}\text{C}$ -PK11195 in a rat model of acute neuroinflammation. *J. Nucl. Med.* 2009, 50, 468–476.
- (53) Kuhnast, B.; Damont, A.; Hinnen, F.; Catarina, T.; Demphel, S.; Le Helleix, S.; Coulon, C.; Goutal, S.; Gervais, P.; Dollé, F. [ $^{18}\text{F}$ ]DPA-714, [ $^{18}\text{F}$ ]PBR111 and [ $^{18}\text{F}$ ]FEDAA1106 - Selective radioligands for imaging TSPO 18 kDa with PET: Automated radiosynthesis on a TRACERLab FX-FN synthesizer and quality controls. *Appl. Radiat. Isot.* 2012, 70, 489–497.
- (54) Cointepas, Y.; Mangin, J.-F.; Garner, L.; Poline, J.-B.; Benali, H. BrainVISA: Software platform for visualization and analysis of multimodality brain data. *NeuroImage* 2001, 13, S98.



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Medicinal Chemistry

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ejmech>



Short communication

## Synthesis and *in vitro* characterization of novel fluorinated derivatives of the translocator protein 18 kDa ligand CfO-DPA-714



Fanny Cacheux<sup>a, b, 1</sup>, Vincent Médran-Navarrete<sup>a, b, 1</sup>, Frédéric Dollé<sup>a, b</sup>, Frank Marguet<sup>c</sup>, Frédéric Puech<sup>c</sup>, Annelaure Damont<sup>a, b, \*</sup>

<sup>a</sup> CEA, I2BM, Service Hospitalier Frédéric Joliot, Orsay, France

<sup>b</sup> Inserm/CEA/Université Paris Sud, UMR 1023, ERL 9218 CNRS, IMIV, Université Paris-Saclay, Orsay, France

<sup>c</sup> Sanofi, LGCR ChemBio, Chilly-Mazarin, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 9 June 2016

Received in revised form

7 September 2016

Accepted 8 September 2016

Available online 9 September 2016

#### Keywords:

TSPO 18 kDa

Pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine acetamides

CfO-DPA-714

Positron Emission Tomography

Neuroinflammation

### ABSTRACT

The translocator protein 18 kDa (TSPO) is today a validated target for a number of therapeutic applications, but also a well-recognized diagnostic/imaging biomarker for the evaluation of inflammatory related-disease state and progression, prompting the development of specific and dedicated TSPO ligands worldwide. For this purpose, pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine acetamides constitute a unique class of high affinity and selectivity TSPO ligands; it includes DPA-714, a fluorine-containing derivative that has also been labelled with the positron-emitter fluorine-18, and is nowadays widely used as a Positron Emission Tomography imaging probe. Recently, to prevent defluorination issues encountered *in vivo* with this tracer, a first series of analogues was reported where the oxygen atom bridging the phenyl ring of the core structure and the fluorinated moiety was replaced with a more robust linkage. Among this new series, CfO-DPA-714 was discovered as a highly promising TSPO ligand. Herein, a novel series of fluorinated analogues of the latter molecule were synthesized and *in vitro* characterized, where the pharmacomodulation at the amide position of the molecule was explored. Thirteen compounds were thus prepared from a common key-ester intermediate (synthesized in 7 steps from 4-iodobenzoate – 11% overall yield) and a set of commercially available amines and obtained with moderate to good yields (23–81%) and high purities (>95%). With one exception, all derivatives displayed nanomolar to sub-nanomolar affinity for the TSPO and also high selectivity versus the CBR ( $K_i(\text{CBR})/K_i(\text{TSPO}) > 10^3$ ). Within this series, three compounds showed better  $K_i$  values (0.25, 0.26 and 0.30 nM) than that of DPA-714 (0.91 nM) and CfO-DPA-714 (0.37 nM), and favorable lipophilicity for brain penetration ( $3.6 < \log D_{7.4} < 4.4$ ). Among these three compounds, the *N*-methyl-*N*-propyl amide analogue (9) exhibited similar metabolic stability when compared to CfO-DPA-714 in mouse, rat and human microsomes. Therefore, the latter compound stands out as a promising candidate for drug development or for use as a PET probe, once fluorine-18-labelled, for *in vivo* neuroinflammation imaging.

© 2016 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

### 1. Introduction

The translocator protein (TSPO) 18 kDa, formerly known as the peripheral benzodiazepine receptor (PBR), is a highly lipophilic tryptophan-rich protein (169 amino acids) with five trans-membrane  $\alpha$ -helices domain and whose sequence is highly

conserved among organisms [1]. Combined with a 32 kDa voltage dependent anion channel (VDAC) and a 30 kDa adenine nucleoside carrier (ANC), TSPO forms the mitochondrial permeability transition pore (MPTP), a complex primary located on the outer mitochondrial membrane [2]. TSPO is expressed predominantly in steroid-synthesizing tissues, including the brain, and the most characterized function of this protein is the translocation of cholesterol from the outer to the inner mitochondrial membrane, which is the rate-limiting step in the synthesis of steroids and neurosteroids [3]. TSPO is also implicated in other biochemical processes including cell proliferation and apoptosis. In the healthy brain, baseline TSPO expression levels remain low, but increased TSPO expression has

\* Corresponding author. CEA, I2BM, Service Hospitalier Frédéric Joliot, 4 Place du Général Leclerc, 91400, Orsay, France.

E-mail address: [annelaure.damont@cea.fr](mailto:annelaure.damont@cea.fr) (A. Damont).

<sup>1</sup> Contributed equally to this work.



been associated with activated states of microglia and especially in areas damaged by neurodegenerative diseases (Alzheimer's disease and other dementias, Parkinson's disease, multiple sclerosis, stroke) [4]. TSPO is also overexpressed in certain cancers, such as glioma, where the protein levels directly correlate with aggressive metastatic behaviours [5,6], and in activated macrophages, involved for example in peripheral inflammatory diseases (inflammatory bowel disease and rheumatoid arthritis) [1].

As such, the TSPO is today a validated target for a number of therapeutic applications for neurological but also psychiatric disorders (neuronal viability, regenerative processes and neuro-inflammatory responses) [4,7]. It is also becoming an attractive target for cancer chemotherapy, where the altered regulation of numerous cellular processes and especially those associated with mitochondria and cholesterol transport, are partially responsible for the unrestrained growth of tumourigenic tissues [5,6]. Moreover, TSPO is a well-recognized imaging biomarker for the evaluation of inflammatory related-disease state and progression [8,9], further prompting the development of specific and dedicated ligands worldwide, for dual therapeutic/diagnostic issues, but with today a strong emphasis towards imaging probes [10–14].

Several classes of TSPO ligands have been reported to date, leading to an impressive list of compounds that starts with the isoquinoline carboxamide PK11195 (Fig. 1) [11]. This compound is not only the first non-benzodiazepine reported and developed (Pharmuka laboratories) TSPO ligand, showing a high affinity and selectivity in all species, but evermore the radioligand of reference for binding and autoradiographic studies worldwide once labelled with tritium ( $^3\text{H}$ ]PK11195). Additionally, labelled with the positron-emitter carbon-11, [ $^{11}\text{C}$ ]PK11195 has been and is still widely used in (non-invasive) Positron Emission Tomography (PET) imaging studies, both at preclinical and clinical stages, despite the short-half-life of the radioisotope used ( $T_{1/2}$  20.38 min) [15]. TSPO ligands also include pyridazino[4,5-*b*]indole acetamides, and notably SSR180575 (Sanofi-Synthelabo) as neuroprotective drug with particular mitochondria-rescuing properties [16,17]. Labelled with carbon-11 [18], [ $^{11}\text{C}$ ]SSR180575 has recently demonstrated its potential to image neuroinflammatory processes with PET in both rodent [19] and non-human-primate [20] models of neurodegenerative diseases. Furthermore, derivatives of this class, featuring a fluorine atom in their structure that could be easily labelled by the longer half-life positron-emitter fluorine-18 ( $T_{1/2}$  109.8 min), have recently been reported [21,22].

Another class of particularly interesting TSPO ligands gathers imidazo[1,2-*a*]pyridine acetamides, a series that includes two well-known drugs: Zolpidem (Stilnox<sup>®</sup>- Sanofi, for the treatment of

insomnia) and Alpidem (Anaxyl<sup>®</sup> - Synthelabo, as anxiolytic). This series also contains, as PET-imaging probes, [ $^{11}\text{C}$ ]CLINME [23,24] and [ $^{18}\text{F}$ ]PBR111 [25–29], and as Single Photon Emission Tomography (SPET) probe, the iodine-123-labelled derivative [ $^{123}\text{I}$ ]CLINDE [30–33]. [ $^{123}\text{I}$ ]CLINDE and [ $^{18}\text{F}$ ]PBR111 are today both engaged in humans studies [34,35], respectively with indications for multiform glioblastoma [36] and microglial activation imaging in patients with multiple sclerosis [37].

Pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine acetamides are azaisotesters of the previous series, originally reported by the universities of Firenze and Pisa [38] with, as first developed lead compound, the *para*-tolyl derivative Me-DPA (Fig. 1). Today, numerous alkoxy derivatives showing subnanomolar to picomolar affinities for the TSPO have been reported [39,40], with several compounds also demonstrating potent steroidogenic activities [41]. Of particular interest for diagnostic purposes, is the *para*-methoxy phenyl derivative DPA-713 and especially its fluorinated analogue, DPA-714. Labelled respectively with carbon-11 [42,43] and fluorine-18 [44–46], both radioligands showed improved PET imaging properties in rodent models of acute neuroinflammation, compared to [ $^{11}\text{C}$ ]PK11195 [47–49]. [ $^{11}\text{C}$ ]DPA-713 has also been recently engaged in clinical trials [50,51], and especially one with patients suffering from temporal lobe epilepsy [52]. On the other hand, [ $^{18}\text{F}$ ]DPA-714 is slowly but surely becoming “the” probe for microglia/macrophage activation imaging, thus dethroning the ligand of reference [ $^{11}\text{C}$ ]PK11195. It has been validated in numerous rodent models of diseases such as acute focal or diffuse neuroinflammation [53,54], amyotrophic lateral sclerosis [55], subarachnoid hemorrhage [56], cerebral ischemia [57,58], peripheral and central cancers [59] including glioma [60], rheumatoid arthritis [61,62], and inflammatory bowel disease [63]. [ $^{18}\text{F}$ ]DPA-714 has also recently been characterized in a primate model of neuroinflammation [64] and engaged in a few first-in-man clinical trials [65–67]. It is also currently used in patients suffering from Alzheimer's disease [68,69] and cerebral stroke [70].

However, issues related to metabolism limit today the full potential of these series. Indeed, as first reported for imidazo[1,2-*a*]pyridine acetamide analogues, biotransformations that are mainly linked to cytochromes P450 3A4 and 2D6 expression and activity, lead to rapid *in vivo* elimination of the drug candidate or radiotracer. Metabolism includes hydroxylation at the methylaryl positions (e.g. for Zolpidem, the tolyl and methyl at position 2 and 4 respectively of the imidazo[1,2-*a*]pyridine moiety) and hydroxylation at the heterocycle itself, *ortho* to the methyl substituent (position 7 for Zolpidem), with products that may then be further oxidized and/or conjugated [71]. It also includes hydroxylation of

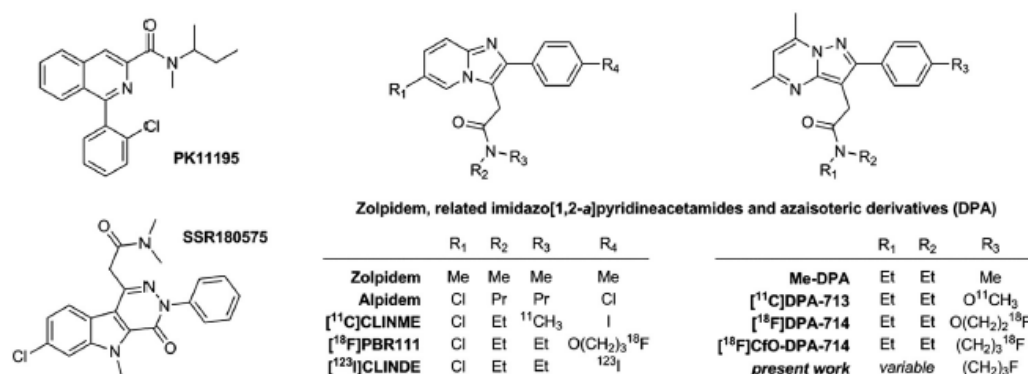


Fig. 1. Representative examples of TSPO ligands: the isoquinoline carboxamide PK11195, the pyridazino[4,5-*b*]indole acetamide SSR180575, and selected imidazo[1,2-*a*]pyridine acetamides and pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine acetamides.



the *N*-alkyl substituents at the amide function (e.g. for Zolpidem and Alpidem, the *N*-methyl and *N*-propyl substituents), ultimately leading to the cleavage of the *N*-alkyl linkage [72]. Metabolites resulting from these biotransformations are more hydrophilic than the parent compound, resulting thus in poor brain penetration of these molecules if any. However, when the phenyl moiety is substituted at the *para* position by an alkoxy group (propoxy or ethoxy in the PET-radiotracers PBR111 and PBR102) [25], additional metabolites resulting from the cleavage of the ether bond have been reported. Besides to the liberation of the corresponding phenolic imidazo[1,2-*a*]pyridine acetamide, small molecules - e.g. fluoropropionate and fluoroacetate - are produced. The latter are known for penetrating the blood brain barrier (BBB) at various levels, and although lacking any affinity for the target TSPO, accumulate within the brain. When the parent compound is labelled with fluorine-18 (e.g. [<sup>18</sup>F]PBR111, [<sup>18</sup>F]PBR102), these radiometabolites confound the radioligand concentration measurement and its absolute quantification [73]. Analogous biotransformation pathways have been reported for the pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine acetamide [<sup>18</sup>F]DPA-714 [74], where hydroxylations of both methylaryl positions (5 and 7) as well as hydroxylation directly on the pyrazolopyrimidine moiety (position 6, *ortho* to the two previously cited methyl groups) have notably been demonstrated. Cleavage of the fluoroethoxy chain has also been proven, leading to formation and rapid accumulation within the brain of [<sup>18</sup>F]fluoroacetate [74].

With the objective of proposing alternative ligands based on the DPA scaffold that would suffer less metabolism particularly regarding the fluoroacetate liberation, we recently synthesized a first series of fluorinated derivatives, in which the oxygen atom bridging the phenyl group and the fluoroalkyl side chain was replaced by, at least, one carbon atom leading to more stable compounds *in vivo* [75]. Among them, the fluoropropyl analogue (CfO-DPA-714) was selected, and labelled with fluorine-18 as a challenger to [<sup>18</sup>F]DPA-714 [76]. Herein, we describe the synthesis of a second series of analogues, where the *N,N*-diethylamide part of the structure was pharmaco-modulated, keeping the rest of the scaffold of CfO-DPA-714 unchanged, to investigate the impact of such modifications toward the TSPO affinity and selectivity, lipophilicity for adequate brain entry, and metabolic stability of the molecules. Thus, the replacement of the *N,N*-diethyl substitution at the acetamide part of CfO-DPA-714 was explored with alternative alkyl chains, rigidified motifs, hydrophilic groups or aromatic and more hindered *N*-substituents. For all newly synthesized compounds, TSPO binding affinity and selectivity versus central benzodiazepine receptor (CBR) were evaluated *in vitro*, as well as selected physicochemical parameters such as lipophilicity, topological polar surface area and hydrogen bond donor number. *In vitro* metabolic studies were also conducted using mouse, rat and human microsomes. All data were compared to that of the parent molecules CfO-DPA-714 and DPA-714.

## 2. Chemistry

Ligands were all developed by modifying the *N,N*-substituents of the acetamide part of CfO-DPA-714. In the pyrazolo[1,2-*a*]pyrimidines series of TSPO ligands, this part of the molecule binds a lipophilic pocket of the protein [13]. Introduction of various alkyl groups to generate asymmetric amides was investigated. Rigidification of the amide substituents was also explored by introducing more or less lipophilic cyclic motifs. Finally, the introduction of more hindered aromatic substituents to the amide nitrogen was also planned as it appears beneficial for the TSPO binding efficiency of other class of ligands featuring acetamides or glyoxylamides moieties [11,13].

This novel series of pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine acetamides were synthesized in eight chemical steps as depicted in Scheme 1. Note

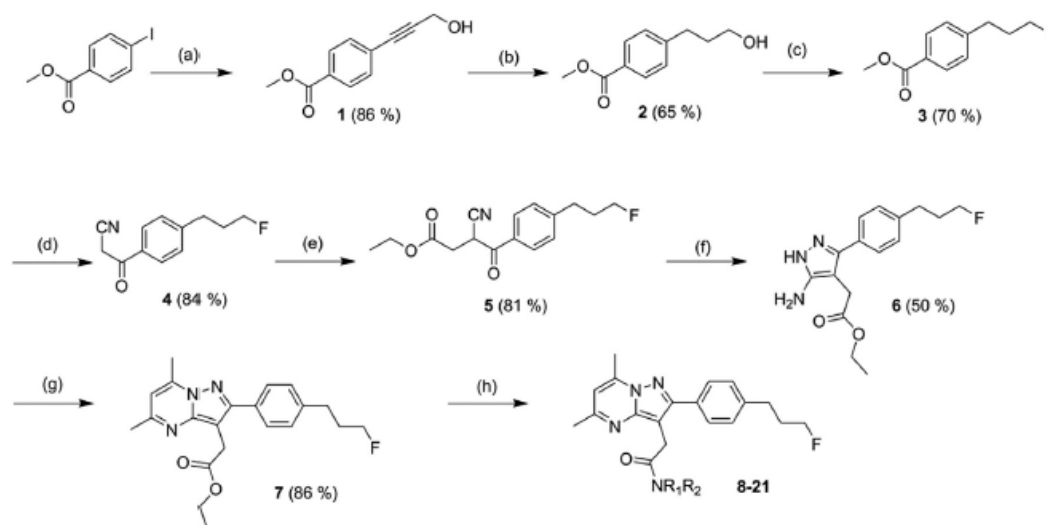
that the synthetic pathway followed for the preparation of this series is quite different from those originally reported for the synthesis of CfO-DPA-714 [75,76], since it is based on the synthesis of a common key ester intermediate (7) from which all desired amides could be obtained in one single step.

A Sonogashira coupling reaction of commercially available prop-2-yn-1-ol and methyl 4-iodobenzoate, was first carried out in the presence of Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and CuI in triethylamine to yield to the propargylic alcohol 1 in 86% yield. 1 was then treated with hydrogen gas in methanol in the presence of Pd/C for reduction of the triple bond to afford the propanol derivative 2 in 65% yield. Then, 2 was subjected to a fluorodeoxygenation reaction using Deoxo-Fluor<sup>®</sup> in dichloromethane at room temperature, affording 3 in 70% yield. The ester function was then converted to the corresponding  $\alpha$ -ketonitrile via nucleophilic addition of acetonitrile carbanion, generated with *n*-BuLi as base, at low temperature. These conditions afforded 4 in 84% yield. Alternatively, the use of sodium methoxide as a base in refluxing acetonitrile was also attempted but proved to be less reproducible with yields ranging from 29 to 76%. C-alkylation using ethyl 2-bromoacetate in the presence of sodium iodide and sodium hydroxide in ethanol at room temperature afforded the ethyl ester 5 in 81% yield. The latter was then subjected to a first condensation step with hydrazine monohydrate in refluxing acetic acid/ethanol to give the aminopyrazole 6 in 50% yield. 6 was then subsequently converted into the pyrazolopyrimidine 7 via a second condensation step with acetylacetone in refluxing ethanol (86% yield). Compound 7, as a key ester intermediate, was then reacted with various amines, all commercially available with the exception of the *N*-methyl-*N*-cyclopropylamine (24) that was prepared as described below (Scheme 2). Reaction was performed in presence of trimethylaluminum in toluene at 110 °C, except for compounds 10 and 16 (100 °C) and compound 13 (70 °C) [77–79]. With the exception of 12, all the corresponding amides 8–11, 13–21 were obtained in moderate to good yields (23–81%) and high purities (>95%), as summarized in Table 1.

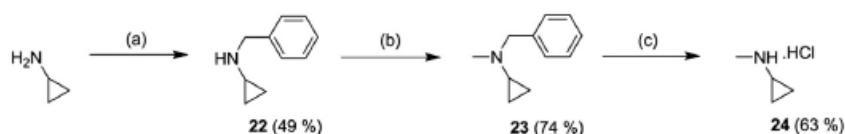
The preparation of the hydrochloride amine salt of *N*-methyl-*N*-cyclopropylamine (24) was conducted in three chemical steps according to the procedure described by Yoshida et al. [80] (Scheme 2). Briefly, commercially available *N*-cyclopropylamine was protected with a benzyl group using benzyl bromide and triethylamine in THF at room temperature to afford the *N*-benzyl-*N*-cyclopropylamine 22 with 49% yield. Compound 22 was subsequently *N*-methylated by reductive amination in presence of paraformaldehyde and sodium borohydride at 0 °C to give 23 in 74% yield. Cleavage of the benzyl group (performed using hydrogen gas in methanol in presence of 10% Pd/C) followed by treatment with an excess of a 10 M methanolic solution of hydrochloric acid afforded the desired hydrochloride salt 24 with 63% yield.

Finally, the preparation of the *N*-methyl-*N*-cyclopropylamide derivative 12, which is a disubstituted amide with expected steric and lipophilic properties in between the cycloalkyl-substituted amides 13 (azetidine) or 14 (pyrrolidine) and the dialkyl compounds 8 (*N,N*-dimethyl), 9 (*N*-methyl-*N*-propyl) or CfO-DPA-714 (*N,N*-diethyl), was also attempted following two alternative pathways. The first one was a direct *N*-methylation of its analogue 11, using sodium hydride and iodomethane in DMF at room temperature. However, due to the poor selectivity of these reaction conditions, the formation of several by-products was observed, preventing isolation of 12 in acceptable amount and purity. The second one was a peptide-like coupling reaction involving the previously described amine 24, and the carboxylic acid 25 resulting from hydrolysis of ester 7 as depicted in Scheme 3.

Thus, 7 was hydrolysed using potassium hydroxide in methanol at 40 °C to give 25 in 64% yield, that was subsequently coupled with



**Scheme 1.** Synthesis of new Cfo-DPA-714 amide derivatives (**8–21**). **Reagents and conditions:** (a) prop-2-yn-1-ol, CuI, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, Et<sub>3</sub>N, r.t., overnight; (b) H<sub>2</sub>, Pd/C 10%, MeOH, r.t., overnight; (c) Deoxo-Fluor<sup>®</sup> 50% in THF, DCM, 0 °C to r.t., overnight; (d) i) 2.5 M *n*-BuLi in hexanes, CH<sub>3</sub>CN, THF anhydrous, –60 °C, 1 h, then ii) **3**, THF anhydrous, –50 °C to –30 °C, 2 h; (e) NaOH, NaI, BrCH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>Et, EtOH, r.t., 24 h; (f) NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O, AcOH, EtOH, reflux, 2 h; (g) acetylacetone, EtOH, reflux, 5 h; (h) i) appropriate amine, AlMe<sub>3</sub>, toluene anhydrous, r.t., 1 h, then ii) **7**, toluene anhydrous, heating (70–110 °C), 30 min to 5 h.



**Scheme 2.** Synthesis of *N*-methyl-*N*-cyclopropylamine hydrochloride **24**. **Reagents and conditions:** (a) BnBr, Et<sub>3</sub>N, THF, r.t., overnight; (b) 37% wt. CH<sub>2</sub>O, NaBH<sub>4</sub>, 0 °C, 30 min; (c) i) H<sub>2</sub>, Pd/C 10%, MeOH, r.t., overnight, ii) 10 M HCl in MeOH.

amine **24** in presence of TBTU as catalyst agent and triethylamine as base, in dichloromethane at room temperature. Using these conditions, the *N*-methyl-*N*-cyclopropylamide **12** could be synthesized in up to 15% yield, but with a maximum purity of 70% (based on HPLC analyses). None of the alternative synthetic pathways led to satisfactory production of **12** and determination of its binding affinity for the TSPO was not considered then.

### 3. Results and discussion

The binding affinity for the TSPO of all newly synthesized derivatives were measured by competition experiments against [<sup>3</sup>H] PK11195 in membrane homogenates of rat heart. Binding affinities were also evaluated for the CBR by competitive assays against [<sup>3</sup>H] flunitrazepam using membrane homogenates of rat cerebral cortex. The inhibition constant (TSPO K<sub>i</sub>) and percentage of inhibition at 1 μM (CBR), determined for each compound, are reported in Table 2. The lipophilicity parameter logD<sub>7.4</sub> was also evaluated for each new compound of this series, based on their HPLC retention time. Additionally, cLogP, topological polar surface area (TPSA), number of hydrogen bond donors (HBD) and molecular size (as molecular weight (MW)) were also calculated for all derivatives. Data, including those belonging to the lead compound DPA-714 and its analogue (Cfo-DPA-714) for comparison, are summarized in Table 2.

As shown in Table 2, and with the exception of the piperazinamide **17** (260 nM), all synthesized compounds displayed nanomolar to subnanomolar binding affinity for the TSPO, with K<sub>i</sub> values ranging from 0.25 nM to 32 nM. Within this series, the *N*-methyl-*N*-phenethylamide **21** and both *N*-methyl-*N*-

pyridinylmethanilamides **19** and **20** showed values (1.1, 2.8 and 1.2 nM respectively) comparable to that of DPA-714 (0.91 nM). Three compounds - i.e. the *N*-methyl-*N*-propylamide **9**, the *N,N*-dipropylamide **10** and the *N*-methyl-*N*-benzylamide **18** - displayed subnanomolar affinities with K<sub>i</sub> values even slightly lower to that of Cfo-DPA-714 (0.37 nM): 0.25, 0.26 and 0.30 nM respectively. It can be seen that shortening of the *N,N*-alkyl substituents (compound **8**) or rigidification of the groups at the amide nitrogen are not beneficial to TSPO binding (compounds **11**, **13**, **14**, **16** and **17**) especially when the substituent features a heteroatom (compounds **16** and **17**). Interestingly, the introduction of a bulky aromatic substituent (compounds **18–21**) does not dramatically affect the TSPO binding efficiency and seems to be rather favorable in the case of compound **18**. As a general trend, the more lipophilic the *N*-substituents are, the best the TSPO binding affinity of the corresponding molecule is: i) compounds with logD<sub>7.4</sub> values above 3.1 exhibited the lowest TSPO K<sub>i</sub> constants (see compounds **9**, **10**, **15**, **18**, **20** and **21**); ii) the introduction of a heteroatom on the benzyl moiety - leading to an increase of the hydrophilic character of the structure - led to a decrease of the TSPO binding affinity: compare **19** and **20** to **18**. Interestingly, the replacement of an *N*-benzyl with an *N*-phenethyl substituent (compare compounds **18** and **21**) led to a one log decrease of affinity, probably due to an unfavourable steric interaction with a lipophilic binding pocket of the protein [81]. All compounds showed no (or negligible, i.e. 2% for the *N,N*-dimethylamide **8**) inhibition of [<sup>3</sup>H]flunitrazepam binding to the CBR at 1 μM, attesting the excellent selectivity toward the TSPO.

These findings are also in accordance with previous quantitative structure-activity relationship (QSAR) studies performed on



**Table 1**  
CfO-DPA-714 amide analogues (**8–21**) obtained from the common key ester **7**.

Compound	NR <sub>1</sub> R <sub>2</sub>	Reaction			Purity (HPLC <sup>b</sup> )
		T (°C)	t (min)	Yield	
<b>8</b>		110	30	66%	97.1%
<b>9</b>		110	240	53%	97.0%
<b>10</b>		100	60	61%	95.4%
<b>11</b>		110	45	81%	100.0%
<b>12</b>		110	60	<5% <sup>a</sup>	70.0%
<b>13</b>		70	60	49%	100.0%
<b>14</b>		110	60	67%	100.0%
<b>15</b>		110	120	61%	100.0%
<b>16</b>		100	60	80%	95.6%
<b>17</b>		110	60	46%	98.5%
<b>18</b>		110	60	62%	100.0%
<b>19</b>		110	60	78%	97.5%
<b>20</b>		110	300	30%	96.0%
<b>21</b>		110	240	23%	96.4%

<sup>a</sup> Conversion rate of **7** to **12** was <5%, whatever the temperature and reaction time, with notable formation of by-products that did not allow isolation of the desired product with an acceptable purity.

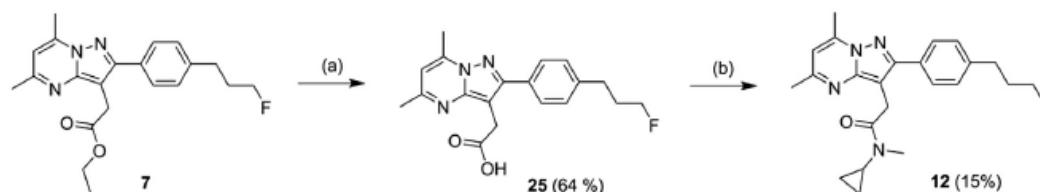
<sup>b</sup> Purity was determined using analytical HPLC (HPLC A, see experimental section).

imidazo[1,2-*a*]pyridine acetamides [82–84], for which in terms of both the affinity to the TSPO (previously named PBR for peripheral benzodiazepine receptor) and the selectivity toward the CBR, i) a di-substituted amide pattern was preferred to a single substitution of the nitrogen; ii) an optimal combination and the length of the

linear or conformationally restricted alkyl substituents is of fundamental importance; iii) the presence of an aromatic moiety may be advantageous due to a potential hydrophobic  $\pi$ - $\pi$  interaction with a tryptophan residue in the binding pocket and iv) a substitution at the *para* position of the phenyl moiety carried by the heterocycle is well tolerated and even beneficial.

Lipophilicity, TPSA, number of HBD and molecular size (MW) are the admitted four key-parameters influencing passive BBB diffusion. As such, compounds targeting the CNS are usually associated with lipophilicity values (cLogP, LogD) in the range of 2–5, small TPSAs (<90 Å<sup>2</sup>, even preferably <70 Å<sup>2</sup>), absence (or not more than one) HBD and a MW below 500 Da [85]. As shown in Table 2, all synthesized compounds showed calculated LogP and measured LogD<sub>7.4</sub> values below 5. Good correlation between these values was found, with LogD<sub>7.4</sub> generally 15–25% lower than the corresponding cLogP with one exception, the piperazinamide **17**. Among the compounds displaying good binding affinity for the TSPO (K<sub>i</sub> < 3.0 nM), **9** and **15** exhibited very similar logD<sub>7.4</sub> values to CfO-DPA-714 (3.64 and 3.56 versus 3.51). Compounds **19** and **20** are less lipophilic molecules, due to the presence of a heteroatom at the *N*-substituted position of the amide, with logD<sub>7.4</sub> values in the range of that of DPA-714 (2.61 and 3.16 versus 2.89), while compounds **10**, **18** and **21** are more lipophilic structures with logD<sub>7.4</sub> greater than that of CfO-DPA-714 (4.39, 3.98 and 4.08 respectively). TPSA values are also all well below the given cut-off values for optimal brain penetration (48.3 Å<sup>2</sup> to 60.6 Å<sup>2</sup>). Moreover, MW of all synthesized compounds range between 369 and 459 g/mol. Absence of HBD is also demonstrated for almost all compounds, only the *N*-cyclopropylamine **11** and the piperazinamide **17** showing a HBD number of 1.

The synthesized analogues with TSPO K<sub>i</sub> values below 3.0 nM (e.g. **9**, **10**, **15**, **18–21**) were evaluated for their *in vitro* microsomal metabolic stability using three different species: human, rat and mouse, as presented in Table 3. The results, expressed as the intrinsic clearance (InC,  $\mu$ L/min/mg protein, see experimental section for calculation), reflect the *in vivo* metabolic biotransformation of the compounds: the more the value is elevated, the more the compound is metabolized. DPA-714 and CfO-DPA-714 were also tested as references. As shown in Table 3, all compounds (including DPA-714 and CfO-DPA-714) were rapidly metabolized in presence of rat microsomes, with InC values above 1000, excepted for compound **20** that seemed slightly more stable (610  $\mu$ L/min/mg protein). All newly synthesized compounds, as well as CfO-DPA-714, were also rapidly biotransformed in the presence of mouse microsomes (InC values above 750  $\mu$ L/min/mg protein). However, in the presence of human microsomes, biotransformation rates were more variable, with InC values ranging from 270 (compound **20**) to more than 1000  $\mu$ L/min/mg protein (compounds, **10**, **18** and **21**). Compounds **9** and **20** stand out as the less metabolized ones with InC values of 321 and 270  $\mu$ L/min/mg protein, respectively. This rate of metabolization is in the range of what has been observed with CfO-DPA-714 (241  $\mu$ L/min/mg protein). Interestingly, DPA-714 remained the most stable compound in both mouse and human microsomal incubations.



**Scheme 3.** Synthesis of the *N*-methyl-*N*-cyclopropylamide derivative **12**. **Reagents and conditions:** (a) KOH, MeOH, 40 °C, 3 h; (b) **24**, Et<sub>3</sub>N, TBUT, DCM, r.t., 12 h.



**Table 2***In vitro* competitive binding assays, lipophilicity, topological polar surface area, HBD and MW of DPA-714, Cfo-DPA-714 and the fluorinated analogues **8–11**, **13–21**.

Ligand	TSPO <sup>a</sup> K <sub>i</sub> (nM)	CBR % inhib <sup>b</sup> at 1 μM	LogD <sub>7.4</sub> <sup>c</sup>	clogP <sup>d</sup>	TPSA <sup>d</sup> (Å <sup>2</sup> )	HBD	MW
<b>DPA-714</b>	0.91 ± 0.08	0%	2.89	3.33	57.5	0	398
<b>Cfo-DPA-714</b>	0.37 ± 0.02	0%	3.51	3.99	48.3	0	396
<b>8</b>	15 ± 1	2%	2.68	2.93	48.3	0	368
<b>9</b>	0.25 ± 0.01	0%	3.65	3.99	48.3	0	396
<b>10</b>	0.26 ± 0.01	0%	4.39	4.99	48.3	0	424
<b>11</b>	17 ± 2	0%	2.69	3.23	57.1	1	380
<b>13</b>	32 ± 2	0%	2.73	3.10	48.3	0	380
<b>14</b>	26 ± 3	0%	3.04	3.65	48.3	0	394
<b>15</b>	2.2 ± 0.3	0%	3.56	4.21	48.3	0	408
<b>16</b>	27 ± 1	0%	2.56	3.21	57.5	0	410
<b>17</b>	260 ± 11	0%	0.87	3.20	60.3	1	409
<b>18</b>	0.30 ± 0.02	0%	3.98	4.62	48.3	0	444
<b>19</b>	2.8 ± 0.1	0%	2.61	3.12	60.6	0	445
<b>20</b>	1.2 ± 0.1	0%	3.16	3.12	60.6	0	445
<b>21</b>	1.1 ± 0.2	0%	4.08	5.03	48.3	0	458

<sup>a</sup> TSPO K<sub>i</sub> values (mean ± SD, duplicate) were determined using membrane homogenates of rat heart and screened against [<sup>3</sup>H]PK11195 (K<sub>d</sub> = 1.8 nM, c = 0.2 nM).<sup>b</sup> CBR binding affinity was evaluated using homogenates of rat cerebral cortex and expressed as % of inhibition at 1 μM against [<sup>3</sup>H]flunitrazepam (K<sub>d</sub> = 2.1 nM, c = 0.4 nM).<sup>c</sup> LogD<sub>7.4</sub> were determined by converting the retention time recorded for the tested compounds using a validated, standardized HPLC method.<sup>d</sup> cLogP and TPSA were both determined using ChemDraw 15.0 software.**Table 3***In vitro* microsomal stability of DPA-714, Cfo-DPA-714 and compounds **9**, **10**, **15**, **18–21**.

Compound	Intrinsic clearance (InC, μL/min/mg protein) <sup>a</sup>		
	Human	Rat	Mouse
<b>DPA-714</b>	68	>1000	408
<b>Cfo-DPA-714</b>	241	>1000	865
<b>9</b>	321	>1000	781
<b>10</b>	>1000	>1000	>1000
<b>15</b>	424	>1000	931
<b>18</b>	>1000	>1000	>1000
<b>19</b>	862	>1000	>1000
<b>20</b>	270	610	947
<b>21</b>	>1000	>1000	>1000

<sup>a</sup> Intrinsic clearance, expressed as μL/min/mg protein, reflects the rate of biotransformation of a compound. Its calculation is detailed in the experimental section.

#### 4. Conclusion

A novel series of analogues of Cfo-DPA-714, modified at the amide part, were synthesized and *in vitro* evaluated for their potential to bind the TSPO. Their TSPO/CBR binding selectivity, their lipophilicity (LogD<sub>7.4</sub>) and a few selected physicochemical parameters (cLogP, TPSA and HBD number), as well as their stability in the presence of mouse, rat and human microsomes were also assessed. Among these new analogues, compounds **9**, **10** and **18** (TSPO K<sub>i</sub>: 0.25, 0.26 and 0.30 nM respectively) stand out as promising candidates for drug development, with a preference for compound **9** based on its *in vitro* metabolic stability. The present work, without claiming to solve all metabolic issues related to the pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine scaffold, confirms the interest of the carbon-for-oxygen substitution in the fluorine-bearing moiety already demonstrated for Cfo-DPA-714, and provides novel opportunities for fluorine-18-labelling as well as for the development of *in vivo* PET-probes for neuroinflammation imaging.

#### 5. Experimental section

##### 5.1. Chemistry

###### 5.1.1. General

Chemicals were purchased from Aldrich France and were used without further purification. Flash chromatographies were

conducted on silica gel (0.63–0.200 mm, VWR France) columns. TLCs were run on aluminium pre-coated plates of silica gel 60F<sub>254</sub> (VWR France). The compounds were localized at 254 nm using a UV-lamp and by dipping the TLC-plates in a basic potassium permanganate aqueous solution and heating on a hot plate. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded on a Bruker (Wissembourg, France) Avance 400 MHz apparatus and chemical shifts were referenced to the hydrogenated residue of the deuterated solvent (δ [CHCl<sub>3</sub>] = 7.23 ppm and δ [CD<sub>2</sub>HOD] = 3.31 ppm) for <sup>1</sup>H NMR and to the deuterated solvent (δ [CDCl<sub>3</sub>] = 77.0 ppm and δ [CD<sub>3</sub>OD] = 49.2 ppm) for <sup>13</sup>C NMR experiments. The typical standard concentration of the analysed samples was 20 mg/mL. The chemical shifts are reported in ppm, downfield from TMS (s, d, t, q, q<sup>5</sup>, sex, m and b for singlet, doublet, triplet, quadruplet, quintuplet, sextuplet, multiplet and broad, respectively). High resolution mass spectrometry (HRMS) determination has benefited from the facilities and expertise of scientific service, HPLC-Mass spectrometry of ICSN, CNRS, Gif sur Yvette, France ([www.icsn.cnrs-gif.fr](http://www.icsn.cnrs-gif.fr)); analyses were performed by electrospray with positive (ESI+) or negative (ESI-) ionization mode. Purity of the synthesized compounds was determined using analytical HPLC (HPLC A): UPLC/SQD Acquity Waters, Acquity BEH C18 (2.1 × 50 mm, 1.7 μm) column, mobile phase: H<sub>2</sub>O (A), CH<sub>3</sub>CN + 0.1% formic acid (B), gradient: 2–100% (B) in 3 min, 1.0 mL/min, and was found to be greater than 95% in all cases. LogD<sub>7.4</sub> values were determined based on a validated and standardized HPLC method (HPLC B): Alliance 2695 - PDA Waters, X-Terra MS C18 (4.6 × 20 mm, 3.5 μm) column, mobile phase: 5 mM MOPS/(CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>NOH pH 7.4 (A), 5% MOPS/(CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>NOH (100 mM, pH 7.4)/95% CH<sub>3</sub>CN (B), gradient (A/B): 98:2 (0.5 min), 0:100 (4.8 min), 98:2 (1.6 min), 1.2 mL/min, 25 °C, detection at 254 nm.

###### 5.1.2. Methyl 4-(3-hydroxyprop-1-yn-1-yl)benzoate (**1**)

To a solution of methyl 4-iodobenzoate (25 g, 95.4 mmol) in triethylamine (500 mL) was added prop-2-yn-1-ol (6.7 mL, 115 mmol, 1.2 eq.). The reaction mixture was degassed under vacuum and filled with argon (2 cycles). Then, palladium bis(triphenylphosphine)dichloride (670 mg, 0.95 mmol, 1 mol %) and copper iodide (182 mg, 0.95 mmol, 1 mol %) were added to the suspension and the reaction mixture was stirred at room temperature overnight. Then, it was concentrated to dryness and the residue was dissolved in ethyl acetate (400 mL). The resulting solution was washed successively with a 1.0 M aqueous hydrochloric

acid solution (100 mL), water (2 × 200 mL), brine (200 mL), then dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (heptane/ethyl acetate 60/40) to afford **1** (15.6 g, 86%) as a yellow crystalline powder.  $R_f$  (heptane/ethyl acetate 60/40): 0.24. Mp: 85–86 °C.  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.98 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 7.48 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 4.52 (d,  $J = 4.4$  Hz, 2H), 3.90 (s, 3H), 1.93 (bt,  $w_{1/2} = 13$  Hz, 1H, OH).  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  166.5 [C], 131.5 [2 × CH], 129.7 [C], 129.4 [2 × CH], 127.2 [C], 90.1 [C], 84.8 [C], 52.2 [CH<sub>3</sub>], 51.5 [CH<sub>2</sub>].

#### 5.1.3. Methyl 4-(3-hydroxypropyl)benzoate (**2**)

To a solution of **1** (10.0 g, 52.6 mmol) in methanol (250 mL) was cautiously added 10% palladium on charcoal in one portion to each reaction mixture (400 mg, 3.7 mmol, 40 mg/g). Then, each reaction flask was degassed and filled with hydrogen at 1 atm. The reaction mixture was stirred at ambient temperature overnight and the balloon was refilled when necessary. Once completed (NMR monitoring), the reaction mixture was cautiously filtered on a pad of Celite<sup>®</sup> and the catalyst was washed with dichloromethane/methanol 80/20 (500 mL). The filtrate was concentrated to dryness and the residue was purified by flash chromatography on silica gel (heptane/ethyl acetate 50/50) to afford **2** (6.7 g, 65%) as an orange oil.  $R_f$  (heptane/ethyl acetate 50/50): 0.18.  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.93 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 7.24 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 3.88 (s, 3H), 3.65 (t,  $J = 6.4$  Hz, 2H), 2.74 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 2.36 (s, 1H), 1.88 (tt,  $J = 7.6$  & 6.4 Hz, 2H).  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  167.2 [C], 147.5 [C], 129.6 [2 × CH], 128.4 [2 × CH], 127.6 [C], 61.7 [CH<sub>2</sub>], 51.9 [CH<sub>3</sub>], 33.7 [CH<sub>2</sub>], 32.0 [CH<sub>2</sub>].

#### 5.1.4. Methyl 4-(3-fluoropropyl)benzoate (**3**)

To a solution of **2** (5.00 g, 25.7 mmol) in dichloromethane (200 mL) cooled at 0 °C was added dropwise a 50% Deoxo-Fluor<sup>®</sup> solution in THF (20 mL, excess) over 15 min. The reaction mixture was warmed up to ambient temperature and stirred overnight. Then, it was cooled at 0 °C and water (100 mL) was slowly and cautiously added. The organic layer was separated, washed with water (2 × 100 mL) and brine (100 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (heptane/ethyl acetate 90/10 to 50/50) to afford **3** (3.55 g, 70%) as a yellow oil.  $R_f$  (heptane/ethyl acetate 50/50): 0.52.  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.96 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 7.26 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 4.44 (dt,  $J_{\text{HF}}^2 = 47.2$  Hz,  $J_{\text{HH}}^3 = 6.0$  Hz, 2H), 3.89 (s, 3H), 2.80 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 2.01 (dt,  $J_{\text{HF}}^2 = 27.2$  Hz,  $J_{\text{HH}}^3 = 7.6$  & 6.0 Hz, 2H).  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  166.9 [C], 146.5 [C], 129.7 [2 × CH], 128.4 [2 × CH], 128.0 [C], 82.8 [d,  $J_{\text{CF}}^1 = 164$  Hz, CH<sub>2</sub>], 51.9 [CH<sub>3</sub>], 31.6 [d,  $J_{\text{CF}}^2 = 19$  Hz, CH<sub>2</sub>], 31.3 [d,  $J_{\text{CF}}^3 = 5$  Hz, CH<sub>2</sub>].

#### 5.1.5. 3-(4-(3-Fluoropropyl)phenyl)-3-oxopropanenitrile (**4**)

To anhydrous tetrahydrofuran (50 mL) cooled at –60 °C, was carefully added a 2.5 M *n*-butyllithium solution in hexanes (23 mL, 57.5 mmol). A solution of acetonitrile (3.0 mL, 57.8 mmol) in anhydrous tetrahydrofuran (10 mL) was cautiously added dropwise while maintaining the temperature below –50 °C. The reaction mixture was stirred for 1 h at –60 °C. Then, a solution of **3** (3.78 g, 19.3 mmol) in anhydrous tetrahydrofuran (50 mL) was gently added to the mixture over 15 min while maintaining the temperature below –50 °C. After the addition, the content was stirred for an additional 2 h at –50 °C and the reaction was then quenched with methanol (10 mL) at –40 °C, poured into water (400 mL) and acidified with a 37% aqueous hydrochloric acid solution to pH 3. The mixture was extracted with ethyl acetate (2 × 200 mL) and the combined organic layers were then washed with water (2 × 100 mL) and brine (100 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (heptane/ethyl acetate 70/30 to 60/

40) to afford **4** (3.33 g, 16.2 mmol) as white crystals (84%).  $R_f$  (heptane/ethyl acetate 50/50): 0.37. Mp: 63–64 °C.  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.86 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 7.35 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 4.46 (dt,  $J_{\text{HF}}^2 = 47.2$  Hz,  $J_{\text{HH}}^3 = 6.0$  Hz, 2H), 4.07 (s, 2H), 2.84 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 2.04 (dt,  $J_{\text{HF}}^2 = 25.6$  Hz,  $J_{\text{HH}}^3 = 7.6$  & 6.0 Hz, 2H).  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  186.6 [C], 148.9 [C], 132.3 [C], 129.2 [2 × CH], 128.7 [2 × CH], 113.8 [C], 82.7 [d,  $J_{\text{CF}}^1 = 164$  Hz, CH<sub>2</sub>], 31.5 [d,  $J_{\text{CF}}^2 = 5$  Hz, CH<sub>2</sub>], 31.4 [d,  $J_{\text{CF}}^3 = 20$  Hz, CH<sub>2</sub>], 29.3 [CH<sub>2</sub>].

#### 5.1.6. Ethyl 3-cyano-4-(4-(3-fluoropropyl)phenyl)-4-oxobutanoate (**5**)

To a solution of **4** (5.34 g, 26.0 mmol) in ethanol (150 mL) was added in one portion, under vigorous stirring, sodium hydroxide (1.14 g, 28.6 mmol). The reaction mixture was stirred at ambient temperature for 15 min. Then, sodium iodide (3.90 g, 26.0 mmol) and ethyl bromoacetate (3.18 mL, 28.6 mmol) were added to the reaction mixture which was stirred at ambient temperature for 24 h. The reaction mixture was concentrated to dryness and the residue was partitioned between acidified water (100 mL, pH 1) and ethyl acetate (200 mL). The organic layer was separated, washed with water (200 mL) and brine (100 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (heptane/ethyl acetate 80/20 to 50/50) to afford **5** (6.15 g, 81%) as a yellow oil.  $R_f$  (heptane/ethyl acetate 50/50): 0.5.  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.98 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 7.36 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 4.74 (dd,  $J = 8.4$  & 5.6 Hz, 1H), 4.46 (dt,  $J_{\text{HF}}^2 = 47.2$  Hz,  $J_{\text{HH}}^3 = 5.6$  Hz, 2H), 4.18 (q,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 3.26 (dd,  $J = 17.2$  & 8.4 Hz, 1H), 2.92 (dd,  $J = 17.2$  & 5.6 Hz, 1H), 2.84 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 2.04 (dt,  $J_{\text{HF}}^2 = 19.6$  Hz,  $J_{\text{HH}}^3 = 7.6$  & 5.6 Hz, 2H), 1.26 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  188.0 [C], 169.5 [C], 148.9 [C], 131.8 [C], 129.3 [2 × CH], 129.2 [2 × CH], 116.4 [C], 82.6 [d,  $J_{\text{CF}}^1 = 165$  Hz, CH<sub>2</sub>], 61.6 [CH<sub>2</sub>], 34.1 [CH], 32.8 [CH<sub>2</sub>], 31.5 [d,  $J_{\text{CF}}^2 = 5$  Hz, CH<sub>2</sub>], 31.4 [d,  $J_{\text{CF}}^3 = 20$  Hz, CH<sub>2</sub>], 14.0 [CH<sub>3</sub>].

#### 5.1.7. Ethyl 2-(5-amino-3-(4-(3-fluoropropyl)phenyl)-1H-pyrazol-4-yl)acetate (**6**)

To a solution of **5** (6.15 g, 21.1 mmol) in ethanol (120 mL) were added dropwise, at ambient temperature, monohydrated hydrazine (3 mL, 63.3 mmol) and acetic acid (2 mL, 35.8 mmol). The reaction mixture was refluxed for 2 h. Then, it was concentrated to dryness and the residue was partitioned between ethyl acetate (50 mL) and a 10% potassium carbonate aqueous solution (20 mL). The organic layer was separated, washed with water (2 × 20 mL) and brine (20 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane/methanol 97/3) to afford **6** (3.25 g, 50%) as an orange oil.  $R_f$  (dichloromethane/methanol 95/5): 0.38.  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.45 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 7.26 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 6.24 (b,  $w_{1/2} = 88$  Hz, 3H), 4.46 (dt,  $J_{\text{HF}}^2 = 47.2$  Hz,  $J_{\text{HH}}^3 = 6.0$  Hz, 2H), 4.17 (q,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 3.41 (s, 2H), 2.77 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 2.08–1.95 (m, 2H), 1.27 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  171.9 [C], 153.8 [C], 143.0 [C], 141.7 [C], 129.0 [2 × CH], 127.8 [2 × CH], 127.7 [C], 96.8 [C], 82.9 [d,  $J_{\text{CF}}^1 = 164$  Hz, CH<sub>2</sub>], 61.1 [CH<sub>2</sub>], 31.8 [d,  $J_{\text{CF}}^2 = 19$  Hz, CH<sub>2</sub>], 31.0 [d,  $J_{\text{CF}}^3 = 5$  Hz, CH<sub>2</sub>], 29.4 [CH<sub>2</sub>], 14.1 [CH<sub>3</sub>].

#### 5.1.8. Ethyl 2-(2-(4-(3-fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo [1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetate (**7**)

To a solution of **6** (748 mg, 2.44 mmol) in ethanol (50 mL) was added acetylacetone (0.50 mL, 4.87 mmol). The reaction mixture was refluxed for 5 h. Once the reaction completed, the mixture was concentrated to dryness and the residue was dissolved in ethyl acetate (100 mL). The solution was then washed with water (2 × 50 mL) and brine (50 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane/methanol 99/1 to



98/2) to afford **7** (773 mg, 86%) as light yellow crystals. *R<sub>f</sub>* (dichloromethane/methanol 96/4): 0.60. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 7.70 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.30 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.54 (s, 1H), 4.47 (dt, *J*<sup>2</sup><sub>HF</sub> = 47.2 Hz, *J*<sup>3</sup><sub>HH</sub> = 6.0 Hz, 2H), 4.13 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.97 (s, 2H), 2.80 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.75 (s, 3H), 2.57 (s, 3H), 2.04 (dt, *J*<sup>2</sup><sub>HF</sub> = 26.8 Hz, *J*<sup>3</sup><sub>HH</sub> = 7.6 & 6.0 Hz, 2H), 1.19 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 171.8 [C], 157.9 [C], 154.7 [C], 147.6 [C], 144.8 [C], 141.4 [C], 131.3 [C], 128.7 [2 × CH], 128.4 [2 × CH], 108.5 [CH], 99.4 [C], 83.0 [d, *J*<sup>1</sup><sub>CF</sub> = 164 Hz, CH<sub>2</sub>], 60.7 [CH<sub>2</sub>], 31.9 [d, *J*<sup>2</sup><sub>CF</sub> = 20 Hz, CH<sub>2</sub>], 31.0 [d, *J*<sup>3</sup><sub>CF</sub> = 5 Hz, CH<sub>2</sub>], 29.2 [CH<sub>2</sub>], 24.6 [CH<sub>3</sub>], 16.8 [CH<sub>3</sub>], 14.1 [CH<sub>3</sub>].

#### 5.1.9. General procedure for the preparation of compounds **8**–**21**

To a solution of the appropriate amine (4 eq.) in anhydrous toluene (3 mL) was added dropwise, under argon and at room temperature, a 2.0 M trimethylaluminum solution in toluene (3–4 eq.). The resulting solution was stirred at room temperature for 1 h. Then, a solution of the ester **7** (50–300 mg, 1 eq.) in toluene (1 mL) was added in one portion and the mixture was heated at 110 °C (except otherwise stated) until completion (TLC) of the reaction. The mixture was then quenched with water (20 mL) and further diluted with a 0.1 M hydrochloric acid aqueous solution (10 mL), unless otherwise stated. The mixture was finally extracted twice with ethyl acetate (2 × 20 mL) and the combined organic layers were washed with water (20 mL) and brine (10 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness. The residue was either triturated in diethyl ether (2 mL) or purified by flash chromatography on silica gel (using dichloromethane/methanol 99/1 to 94/6 or dichloromethane/acetone 95/5 to 85/15) to afford the desired products **8** to **21**.

#### 5.1.10. 2-(2-(4-(3-Fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)-*N,N*-dimethylacetamide (**8**)

This amide was prepared following the general procedure described above using 50 mg of the ester **7** (0.135 mmol), 44 mg of *N,N*-dimethylamine hydrochloride (4 eq, 0.540 mmol), 271 μL of 2.0 M trimethylaluminum solution in toluene (4 eq, 0.542 mmol), and heating for 30 min. **8** (30 mg, 60%) was obtained as beige crystals after trituration in diethyl ether. *R<sub>f</sub>* (dichloromethane/methanol 97/3): 0.20. *t<sub>R</sub>* (HPLC A) = 1.18 min (purity: 97.1%). Mp: 162–164 °C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 7.75 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.29 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.52 (s, 1H), 4.48 (dt, *J*<sup>2</sup><sub>HF</sub> = 47.2 Hz, *J*<sup>3</sup><sub>HH</sub> = 6.0 Hz, 2H), 3.94 (s, 2H), 3.16 (s, 3H), 2.98 (s, 3H), 2.79 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.75 (s, 3H), 2.55 (s, 3H), 2.04 (dq<sup>5</sup>, *J*<sup>2</sup><sub>HF</sub> = 25.2 Hz, *J*<sup>3</sup><sub>HH</sub> = 7.6 Hz, 2H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 170.8 [C], 157.5 [C], 155.1 [C], 147.4 [C], 144.9 [C], 141.2 [C], 131.5 [C], 128.7 [2 × CH], 128.7 [2 × CH], 108.3 [CH], 100.6 [C], 83.0 [d, *J*<sup>1</sup><sub>CF</sub> = 163 Hz, CH<sub>2</sub>], 37.6 [CH<sub>3</sub>], 35.8 [CH<sub>3</sub>], 31.9 [d, *J*<sup>2</sup><sub>CF</sub> = 20 Hz, CH<sub>2</sub>], 31.1 [d, *J*<sup>3</sup><sub>CF</sub> = 5 Hz, CH<sub>2</sub>], 28.2 [CH<sub>2</sub>], 24.6 [CH<sub>3</sub>], 16.9 [CH<sub>3</sub>]. HR-ESI(+)-MS *m/z* calcd for C<sub>21</sub>H<sub>25</sub>FN<sub>4</sub>O: 369.2085 [M+H]<sup>+</sup>, found 369.2087.

#### 5.1.11. 2-(2-(4-(3-Fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)-*N*-methyl-*N*-propylacetamide (**9**)

This amide was prepared following to the general procedure described above using 300 mg of the ester **7** (0.81 mmol), 118 mg of *N*-methyl-*N*-propylamine (2 eq, 1.62 mmol), 163 μL of 2 M trimethylaluminum solution in toluene (4 eq., 3.24 mmol), and heating for 4 h. **9** was obtained as light yellow solid after flash chromatography on silica gel (dichloromethane/acetone 95/5 to 85/15) (170 mg, 53%). *R<sub>f</sub>* (dichloromethane/acetone 90/10): 0.22. *t<sub>R</sub>* (HPLC A) = 1.39 min (purity: 97.0%). Mp: 122–124 °C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 7.75 (d, 2H, *J* = 8.0 Hz), 7.28 (d, 2H, *J* = 8.0 Hz), 6.51 (s, 1H), 4.52 (dt, 2H, *J*<sup>2</sup><sub>HF</sub> = 47.2 Hz, *J*<sup>3</sup><sub>HH</sub> = 6.0 Hz), 3.94 (s, 1H, *rot A*), 3.92 (s, 1H, *rot B*), 3.42 (t, 1H, *J* = 7.2 Hz, *rot A*), 3.36 (t, 1H, *J* = 7.2 Hz, *rot B*), 3.12 (s, 1.5H, *rot A*), 2.95 (s, 1.5H, *rot B*), 2.79 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz),

2.74 (s, 3H), 2.54 (s, 3H), 2.03 (dq<sup>5</sup>, 2H, *J*<sup>2</sup><sub>HF</sub> = 25.2 Hz, *J*<sup>3</sup><sub>HH</sub> = 7.2 Hz), 1.65 (q<sup>5</sup>, 1H, *J* = 7.2 Hz, *rot A*), 1.54 (q<sup>5</sup>, 1H, *J* = 7.2 Hz, *rot B*), 0.91 (t, 1.5H, *J* = 7.2 Hz, *rot A*), 0.87 (t, 1.5H, *J* = 7.2 Hz, *rot B*). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ 170.6 [C, *rot A*], 170.5 [C, *rot B*], 157.4 [C], 155.0 [C], 174.5 [C], 144.4 [C], 141.1 [C], 131.5 [C], 128.7 [2 × CH], 128.6 [2 × CH], 108.2 [CH], 100.8 [C], 82.9 [d, *J*<sup>1</sup><sub>CF</sub> = 164 Hz, CH<sub>2</sub>], 51.6 [CH<sub>2</sub>, *rot A*], 49.6 [CH<sub>2</sub>, *rot B*], 35.6 [CH<sub>3</sub>, *rot A*], 33.7 [CH<sub>3</sub>, *rot B*], 31.9 [d, *J*<sup>2</sup><sub>CF</sub> = 19 Hz, CH<sub>2</sub>], 31.0 [d, *J*<sup>3</sup><sub>CF</sub> = 5 Hz, CH<sub>2</sub>], 28.4 [CH<sub>2</sub>, *rot A*], 27.9 [CH<sub>2</sub>, *rot B*], 24.5 [CH<sub>3</sub>], 21.5 [CH<sub>2</sub>, *rot A*], 20.3 [CH<sub>2</sub>, *rot B*], 16.8 [CH<sub>3</sub>], 11.1 [CH<sub>3</sub>, *rot A*], 11.0 [CH<sub>3</sub>, *rot B*]. HR-ESI(+)-MS *m/z* calcd for C<sub>23</sub>H<sub>29</sub>FN<sub>4</sub>O: 397.2398 [M+H]<sup>+</sup>, found 397.2389.

#### 5.1.12. 2-(2-(4-(3-Fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)-*N,N*-dipropylacetamide (**10**)

This amide was prepared following the general procedure described above using 150 mg of the ester **7** (0.41 mmol), 225 μL of *N,N*-dipropylamine (4 eq, 1.64 mmol), 810 μL of 2.0 M trimethylaluminum solution in toluene (4 eq, 1.64 mmol), and heating at 100 °C for 1 h. **10** (105 mg, 61%) was obtained as a beige solid after flash chromatography on silica gel (dichloromethane/methanol 99/1). *R<sub>f</sub>* (dichloromethane/methanol 97/3): 0.25. *t<sub>R</sub>* (HPLC A) = 1.55 min (purity: 95.4%). Mp: 82–84 °C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 7.76 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.28 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.52 (s, 1H), 4.48 (dt, *J*<sup>2</sup><sub>HF</sub> = 47.2 Hz, *J*<sup>3</sup><sub>HH</sub> = 6.0 Hz, 2H), 3.95 (s, 2H), 3.38 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 3.31 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.80 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.75 (s, 3H), 2.55 (s, 3H), 2.04 (dt, *J*<sup>2</sup><sub>HF</sub> = 25.2 Hz, *J*<sup>3</sup><sub>HH</sub> = 7.6 & 6.0 Hz, 2H), 1.65 (sex, *J* = 7.6 Hz, 2H), 1.55 (sex, *J* = 7.6 Hz, 2H), 0.91 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H), 0.86 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 170.4 [C], 157.4 [C], 155.0 [C], 147.5 [C], 144.8 [C], 141.2 [C], 131.5 [C], 128.7 [2 × CH], 128.6 [2 × CH], 108.2 [CH], 101.1 [C], 83.0 [d, *J*<sup>1</sup><sub>CF</sub> = 164 Hz, CH<sub>2</sub>], 49.9 [CH<sub>2</sub>], 48.0 [CH<sub>2</sub>], 31.9 [d, *J*<sup>2</sup><sub>CF</sub> = 19 Hz, CH<sub>2</sub>], 31.0 [d, *J*<sup>3</sup><sub>CF</sub> = 5 Hz, CH<sub>2</sub>], 28.1 [CH<sub>2</sub>], 24.5 [CH<sub>3</sub>], 22.2 [CH<sub>2</sub>], 20.8 [CH<sub>2</sub>], 16.8 [CH<sub>3</sub>], 11.3 [CH<sub>3</sub>], 11.2 [CH<sub>3</sub>]. HR-ESI(+)-MS *m/z* calcd for C<sub>25</sub>H<sub>33</sub>FN<sub>4</sub>O: 425.2711 [M+H]<sup>+</sup>, found 425.2720.

#### 5.1.13. *N*-Cyclopropyl-2-(2-(4-(3-fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)acetamide (**11**)

This amide was prepared following the general procedure described above using 50 mg of the ester **7** (0.135 mmol), 38 μL of *N*-cyclopropylamine (4 eq, 0.548 mmol), 274 μL of 2.0 M trimethylaluminum solution in toluene (4 eq, 0.548 mmol), and heating for 45 min. **11** (42 mg, 81%) was obtained as a white solid after trituration in cold diethyl ether. *R<sub>f</sub>* (dichloromethane/methanol 95/5): 0.28. *t<sub>R</sub>* (HPLC A) = 1.18 min (purity: 100.0%). Mp: 174–176 °C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 7.81 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.33 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.88 (b, *w*<sub>1/2</sub> = 21 Hz, 1H), 6.60 (s, 1H), 4.48 (dt, *J*<sup>2</sup><sub>HF</sub> = 47.2 Hz, *J*<sup>3</sup><sub>HH</sub> = 6.0 Hz, 2H), 3.80 (s, 2H), 2.81 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.79 (s, 3H), 2.65 (m, 1H), 2.60 (s, 3H), 2.05 (dt, *J*<sup>2</sup><sub>HF</sub> = 25.2 Hz, *J*<sup>3</sup><sub>HH</sub> = 7.6 & 6.0 Hz, 2H), 0.68 (q, *J* = 6.8 Hz, 2H), 0.33 (bt, *w*<sub>1/2</sub> = 21 Hz, 2H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 172.6 [C], 158.1 [C], 155.0 [C], 147.2 [C], 145.5 [C], 141.8 [C], 130.4 [C], 128.9 [2 × CH], 128.8 [2 × CH], 108.5 [CH], 100.1 [C], 83.0 [d, *J*<sup>1</sup><sub>CF</sub> = 164 Hz, CH<sub>2</sub>], 31.9 [d, *J*<sup>2</sup><sub>CF</sub> = 20 Hz, CH<sub>2</sub>], 31.7 [CH<sub>2</sub>], 31.1 [d, *J*<sup>3</sup><sub>CF</sub> = 5 Hz, CH<sub>2</sub>], 24.4 [CH], 22.5 [CH<sub>3</sub>], 16.9 [CH<sub>3</sub>], 6.3 [2 × CH<sub>2</sub>]. HR-ESI(+)-MS *m/z* calcd for C<sub>22</sub>H<sub>25</sub>FN<sub>4</sub>O: 381.2085 [M+H]<sup>+</sup>, found 381.2089.

#### 5.1.14. *N*-Cyclopropyl-2-(2-(4-(3-fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)-*N*-methylacetamide (**12**)

Note: The general procedure described above failed to generate the desired amide in acceptable amount and purity. The following alternative pathway was thus used. To a solution of **25** (277 mg, 0.81 mmol) in dichloromethane (5 mL), were added successively **24** (66 mg, 0.62 mmol), TBUT (260 mg, 0.81 mmol) and DIPEA (1.08 mL, 6.2 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 4 h. Then, it was partitioned between water and



dichloromethane. The aqueous layer was extracted with dichloromethane (3 × 15 mL). The combined organic layers were washed with a 1 M hydrochloric acid aqueous solution (20 mL), brine (20 mL), dried over sodium sulfate and concentrated to dryness. The crude was purified on silica gel chromatography (toluene/acetone 80/20 to 70/30) to afford **12** as a pale yellow oil (40 mg, 15%).  $R_f$  (toluene/acetone 50/50): 0.53.  $t_R$  (HPLC A) = 1.35 min (purity: 70.0%).  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz)  $\delta$  7.73 (d, 2H,  $J$  = 8.8 Hz), 7.28 (d, 2H,  $J$  = 8.8 Hz), 6.51 (s, 1H), 4.47 (dt, 2H,  $J^2_{HF}$  = 45.2 Hz,  $J^3_{HH}$  = 6.0 Hz), 4.13 (s, 2H), 2.95 (s, 3H), 2.88–2.86 (m, 1H), 2.79 (t, 2H,  $J$  = 7.6 Hz), 2.74 (s, 3H), 2.54 (s, 3H), 2.03 (m, 2H,  $J^3_{HF}$  = 18.3 Hz), 0.91–0.85 (m, 4H).  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ , 100 MHz)  $\delta$  173.8 [C], 157.4 [C], 155.0 [C], 147.6 [C], 144.6 [C], 141.1 [C], 131.6 [C], 128.6 [4 × CH], 108.2 [CH], 101.1 [C], 83.0 [d,  $J^1_{CF}$  = 163 Hz,  $CH_2$ ], 34.2 [CH], 31.9 [d,  $J^2_{CF}$  = 19 Hz,  $CH_2$ ], 31.3 [CH<sub>3</sub>], 31.0 [d,  $J^3_{CF}$  = 5 Hz,  $CH_2$ ], 28.8 [CH<sub>2</sub>], 24.6 [CH<sub>3</sub>], 16.8 [CH<sub>3</sub>], 9.26 [2 × CH<sub>2</sub>].

**5.1.15. 1-(Azetidin-1-yl)-2-(2-(4-(3-fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)ethanone (13)**

This amide was prepared following the general procedure described above using 150 mg of the ester **7** (0.406 mmol), 110  $\mu$ L of azetidine (4 eq, 1.63 mmol), 609  $\mu$ L of 2.0 M trimethylaluminium solution in toluene (3 eq, 1.22 mmol), and heating at 70 °C for 1 h. No acidic treatment was made for the work up of this reaction. **13** (75 mg, 49%) was obtained as a beige powder after trituration in cold diethyl ether.  $R_f$  (dichloromethane/methanol 96/4): 0.18.  $t_R$  (HPLC A) = 1.19 min (purity: 100.0%). Mp: 163–164 °C.  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  7.77 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 2H), 7.24 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 2H), 6.46 (s, 1H), 4.41 (dt,  $J^2_{HF}$  = 47.2 Hz,  $J^3_{HH}$  = 6.0 Hz, 2H), 4.20 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 2H), 3.97 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 2H), 3.63 (s, 2H), 2.73 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 2H), 2.67 (s, 3H), 2.49 (s, 3H), 2.17 (q<sup>5</sup>,  $J$  = 7.6 Hz, 2H), 2.04 (dt,  $J^3_{HF}$  = 25.2 Hz,  $J^3_{HH}$  = 7.6 & 6.0 Hz, 2H).  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  171.0 [C], 157.6 [C], 155.2 [C], 147.4 [C], 144.8 [C], 141.3 [C], 131.3 [C], 128.8 [2 × CH], 128.7 [2 × CH], 108.3 [CH], 100.0 [C], 83.0 [d,  $J^1_{CF}$  = 164 Hz,  $CH_2$ ], 50.7 [CH<sub>2</sub>], 48.1 [CH<sub>2</sub>], 31.9 [d,  $J^2_{CF}$  = 20 Hz,  $CH_2$ ], 31.1 [d,  $J^3_{CF}$  = 5 Hz,  $CH_2$ ], 26.4 [CH<sub>2</sub>], 24.6 [CH<sub>3</sub>], 16.8 [CH<sub>3</sub>], 15.1 [CH<sub>2</sub>]. HR-ESI(+)-MS  $m/z$  calcd for  $C_{22}H_{25}FN_4O$ : 381.2085 [M+H]<sup>+</sup>, found 381.2093.

**5.1.16. 2-(2-(4-(3-Fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)-1-(pyrrolidin-1-yl)ethanone (14)**

This amide was prepared following the general procedure described above using 150 mg of the ester **7** (0.406 mmol), 136  $\mu$ L of pyrrolidine (4 eq, 1.63 mmol), 710  $\mu$ L of 2.0 M trimethylaluminium solution in toluene (3.5 eq, 1.42 mmol), and heating for 1 h. **14** (107 mg, 67%) was obtained as white shiny foam after flash chromatography on silica gel (dichloromethane/methanol 99/1 to 97/3).  $R_f$  (dichloromethane/methanol 95/5): 0.29.  $t_R$  (HPLC A) = 1.27 min (purity: 100.0%). Mp: 156–159 °C.  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  7.79 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 2H), 7.29 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 2H), 6.52 (s, 1H), 4.47 (dt,  $J^2_{HF}$  = 47.2 Hz,  $J^3_{HH}$  = 6.0 Hz, 2H), 3.88 (s, 2H), 3.65 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 2H), 3.50 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 2H), 2.79 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 2H), 2.74 (s, 3H), 2.54 (s, 3H), 2.03 (dt,  $J^3_{HF}$  = 26.8 Hz,  $J^3_{HH}$  = 7.6 & 6.0 Hz, 2H), 1.99 (q<sup>5</sup>,  $J$  = 6.8 Hz, 2H), 1.86 (q<sup>5</sup>,  $J$  = 6.8 Hz, 2H).  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  169.4 [C], 157.5 [C], 155.2 [C], 147.5 [C], 144.8 [C], 141.2 [C], 131.5 [C], 128.8 [2 × CH], 128.6 [2 × CH], 108.2 [CH], 100.6 [C], 83.0 [d,  $J^1_{CF}$  = 164 Hz,  $CH_2$ ], 46.8 [CH<sub>2</sub>], 45.9 [CH<sub>2</sub>], 31.9 [d,  $J^2_{CF}$  = 19 Hz,  $CH_2$ ], 31.0 [d,  $J^3_{CF}$  = 5 Hz,  $CH_2$ ], 29.5 [CH<sub>2</sub>], 26.2 [CH<sub>2</sub>], 24.6 [CH<sub>3</sub>], 24.4 [CH<sub>2</sub>], 16.8 [CH<sub>3</sub>]. HR-ESI(+)-MS  $m/z$  calcd for  $C_{23}H_{27}FN_4O$ : 395.2242 [M+H]<sup>+</sup>, found 395.2252.

**5.1.17. 2-(2-(4-(3-Fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)-1-(piperidin-1-yl)ethanone (15)**

This amide was prepared following the general procedure described above using 150 mg of the ester **7** (0.406 mmol), 160  $\mu$ L of piperidine (4 eq, 1.62 mmol), 710  $\mu$ L of 2.0 M

trimethylaluminium solution in toluene (3.5 eq, 1.42 mmol), and heating for 2 h. **15** (101 mg, 61%) was obtained as beige crystals after trituration in cold diethyl ether.  $R_f$  (dichloromethane/methanol 96/4): 0.34.  $t_R$  (HPLC A) = 1.38 min (purity: 100.0%). Mp: 145–146 °C.  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  7.76 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 2H), 7.29 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 2H), 6.52 (s, 1H), 4.47 (dt,  $J^2_{HF}$  = 47.2 Hz,  $J^3_{HH}$  = 6.0 Hz, 2H), 3.95 (s, 2H), 3.57 (bs,  $w_{1/2}$  = 18 Hz, 4H), 2.79 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 2H), 2.75 (s, 3H), 2.55 (s, 3H), 2.03 (dt,  $J^3_{HF}$  = 25.2 Hz,  $J^3_{HH}$  = 7.6 & 6.0 Hz, 2H), 1.64–1.63 (m,  $w_{1/2}$  = 18 Hz, 2H), 1.53–1.52 (m,  $w_{1/2}$  = 18 Hz, 4H).  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  169.1 [C], 157.5 [C], 155.0 [C], 147.5 [C], 144.8 [C], 141.2 [C], 131.5 [C], 128.7 [2 × CH], 128.6 [2 × CH], 108.3 [CH], 100.8 [C], 83.0 [d,  $J^1_{CF}$  = 164 Hz,  $CH_2$ ], 46.9 [CH<sub>2</sub>], 43.1 [CH<sub>2</sub>], 31.9 [d,  $J^2_{CF}$  = 20 Hz,  $CH_2$ ], 31.0 [d,  $J^3_{CF}$  = 6.0 Hz,  $CH_2$ ], 28.1 [CH<sub>2</sub>], 26.4 [CH<sub>2</sub>], 25.6 [CH<sub>2</sub>], 24.6 [CH<sub>3</sub>], 24.5 [CH<sub>2</sub>], 16.9 [CH<sub>3</sub>]. HR-ESI(+)-MS  $m/z$  calcd for  $C_{24}H_{29}FN_4O$ : 409.2398 [M+H]<sup>+</sup>, found 409.2393.

**5.1.18. 2-(2-(4-(3-Fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)-1-morpholinoethanone (16)**

This amide was prepared following the general procedure described above using 100 mg of the ester **7** (0.271 mmol), 94 mg of morpholine (4 eq, 1.08 mmol), 540  $\mu$ L of 2.0 M trimethylaluminium solution in toluene (4 eq, 1.08 mmol), and heating at 100 °C for 1 h. **16** (89 mg, 80%) was obtained as an other solid after flash chromatography on silica gel (dichloromethane/methanol 99/1 to 97/3).  $R_f$  (dichloromethane/methanol 95/5): 0.33.  $t_R$  (HPLC A) = 1.15 min (purity: 95.6%). Mp: 118–120 °C.  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  7.80 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 2H), 7.31 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 2H), 6.54 (s, 1H), 4.48 (dt,  $J^2_{HF}$  = 47.2 Hz,  $J^3_{HH}$  = 5.6 Hz, 2H), 3.95 (s, 2H), 3.75–3.60 (m, 8H), 2.80 (t,  $J$  = 7.2 Hz, 2H), 2.76 (s, 3H), 2.56 (s, 3H), 2.04 (dt,  $J^3_{HF}$  = 25.2 Hz,  $J^3_{HH}$  = 7.2 & 5.6 Hz, 2H).  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  169.7 [C], 157.6 [C], 155.0 [C], 147.3 [C], 144.9 [C], 141.4 [C], 131.3 [C], 128.8 [2 × CH], 128.7 [2 × CH], 108.4 [CH], 100.2 [C], 83.0 [d,  $J^1_{CF}$  = 164 Hz,  $CH_2$ ], 66.9 [CH<sub>2</sub>], 66.7 [CH<sub>2</sub>], 46.4 [CH<sub>2</sub>], 42.3 [CH<sub>2</sub>], 31.9 [d,  $J^2_{CF}$  = 19 Hz,  $CH_2$ ], 31.1 [d,  $J^3_{CF}$  = 5 Hz,  $CH_2$ ], 27.9 [CH<sub>2</sub>], 24.6 [CH<sub>3</sub>], 16.9 [CH<sub>3</sub>]. HR-ESI(+)-MS  $m/z$  calcd for  $C_{23}H_{27}FN_4O_2$ : 411.2191 [M+H]<sup>+</sup>, found 411.2187.

**5.1.19. 2-(2-(4-(3-Fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)-1-(piperazin-1-yl)ethanone (17)**

This amide was prepared following the general procedure described above using 150 mg of the ester **7** (0.406 mmol), 140 mg of piperazine (4 eq, 1.63 mmol), 710  $\mu$ L of 2.0 M trimethylaluminium solution in toluene (3.5 eq, 1.42 mmol), and heating for 1 h. A basic treatment was used as work up. The reaction mixture was quenched with a 1.0 M sodium bicarbonate aqueous solution (10 mL) and the resulting inorganic precipitate was filtered off on a Büchner funnel. The filtrate was extracted as described in the general procedure. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane/methanol 97/3 to 94/6) to afford **17** (141 mg, 85%) as a pale yellow solid.  $R_f$  (dichloromethane/methanol 80/20): 0.36.  $t_R$  (HPLC A) = 0.69 min (purity: 98.5%). Mp: 69–70 °C.  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  7.78 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2H), 7.30 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2H), 6.53 (s, 1H), 4.48 (dt,  $J^2_{HF}$  = 47.2 Hz,  $J^3_{HH}$  = 6.0 Hz, 2H), 3.94 (s, 2H), 3.66 (t,  $J$  = 4.8 Hz, 2H), 3.62 (t,  $J$  = 4.8 Hz, 2H), 2.85–2.82 (m, 4H), 2.80 (bt, 2H,  $J$  = 7.6 Hz), 2.75 (s, 3H), 2.55 (s, 3H), 2.04 (dt,  $J^3_{HF}$  = 27.2 Hz,  $J^3_{HH}$  = 7.6 & 6.0 Hz, 2H), 1.96 (s, 1H).  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  169.5 [C], 157.7 [C], 155.0 [C], 147.3 [C], 144.9 [C], 141.4 [C], 131.2 [C], 128.8 [2 × CH], 128.7 [2 × CH], 108.4 [CH], 100.2 [C], 83.0 [d,  $J^1_{CF}$  = 164 Hz,  $CH_2$ ], 46.3 [CH<sub>2</sub>], 45.7 [CH<sub>2</sub>], 45.3 [CH<sub>2</sub>], 42.2 [CH<sub>2</sub>], 31.9 [d,  $J^2_{CF}$  = 20 Hz,  $CH_2$ ], 31.0 [d,  $J^3_{CF}$  = 5 Hz,  $CH_2$ ], 28.0 [CH<sub>2</sub>], 24.6 [CH<sub>3</sub>], 16.8 [CH<sub>3</sub>]. HR-ESI(+)-MS  $m/z$  calcd for  $C_{23}H_{27}FN_4O_2$ : 410.2351 [M+H]<sup>+</sup>, found 410.2358.



**5.120.** 2-(2-(4-(3-Fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)-1-(piperazin-1-yl)ethanone hydrochloride (**17.HCl**)

To a solution of **17** (28 mg, 0.068 mmol) in dichloromethane (0.50 mL) were added a few drops of a 1.25 M hydrochloric acid solution in methanol. The resulting precipitate was filtered on a Büchner funnel, washed with cold diethyl ether (4 × 2 mL) and suck-dried to afford **17.HCl** (14 mg, 46%) as bright yellow crystals. Mp: 120–122 °C. <sup>1</sup>H NMR (MeOD-*d*<sub>4</sub>) δ 7.65 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.40 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.15 (s, 1H), 4.47 (dt, *J*<sub>HF</sub><sup>2</sup> = 47.6 Hz, *J*<sub>HH</sub><sup>3</sup> = 6.0 Hz, 2H), 4.20 (s, 2H), 3.99 (bt, *w*<sub>1/2</sub> = 16 Hz, 2H), 3.89 (bt, *w*<sub>1/2</sub> = 16 Hz, 2H), 3.41 (bt, *w*<sub>1/2</sub> = 16 Hz, 2H), 3.31 (m, 2H), 2.96 (s, 3H), 2.85–2.80 (m, 5H), 2.04 (dt, *J*<sub>HF</sub><sup>3</sup> = 24.8 Hz, *J*<sub>HH</sub><sup>3</sup> = 7.2 & 6.0 Hz, 2H).

**5.121.** *N*-Benzyl-2-(2-(4-(3-fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)-*N*-methylacetamide (**18**)

This amide was prepared following the general procedure described above using 150 mg of the ester **7** (0.406 mmol), 210 μL of *N*-benzylmethylamine (4 eq, 1.63 mmol), 710 μL of 2.0 M trimethylaluminum solution in toluene (3.5 eq, 1.42 mmol), and heating for 1 h. **18** (112 mg, 62%) was obtained as an orange gum after flash chromatography on silica gel (dichloromethane/methanol 99/1) and a trituration in cold diethyl ether. *R*<sub>f</sub> (dichloromethane/methanol 98/2): 0.25. *t*<sub>R</sub> (HPLC A) = 1.47 min (purity: 100.0%). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 7.78–7.74 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.32–7.10 (m, 7H), 6.54 (s, 0.55H, *rot A*), 6.48 (s, 0.45H, *rot B*), 4.73 (s, 0.90H, *rot B*), 4.63 (s, 1.10 H, *rot A*), 4.48 (dt, *J*<sub>HF</sub><sup>2</sup> = 47.2 Hz, *J*<sub>HH</sub><sup>3</sup> = 6.0 Hz, 2H), 4.03 (s, 0.90H, *rot B*), 4.01 (s, 1.10H, *rot A*), 3.06 (s, 1.65H, *rot A*), 2.96 (s, 1.35H, *rot B*), 2.81 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.76 (s, 1.65H, *rot A*), 2.70 (s, 1.35H, *rot B*), 2.56 (s, 1.65H, *rot A*), 2.54 (s, 1.35H, *rot B*), 2.04 (dt, *J*<sub>HF</sub><sup>3</sup> = 25.6 Hz, *J*<sub>HH</sub><sup>3</sup> = 7.2 & 6.0 Hz, 2H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 171.3 [C, *rot B*], 171.0 [C, *rot A*], 157.6 [C, *rot B*], 157.4 [C, *rot A*], 155.1 [C], 147.3 [C, *rot A*], 147.5 [C, *rot B*], 144.9 [C], 141.2 [C], 137.4 [C, *rot A*], 136.7 [C, *rot B*], 131.3 [C], 128.7 [2 × CH], 128.6 [2 × CH], 128.5 [CH, *rot B*], 124.8 [CH, *rot A*], 128.0 [CH, *rot A*], 127.1 [CH, *rot B*], 127.1 [CH, *rot A*], 126.1 [CH, *rot B*], 108.2 [CH], 100.5 [C], 83.0 [d, *J*<sub>CF</sub><sup>1</sup> = 164 Hz, CH<sub>2</sub>], 53.5 [CH<sub>2</sub>, *rot B*], 51.2 [CH<sub>2</sub>, *rot A*], 35.1 [CH<sub>3</sub>, *rot A*], 34.2 [CH<sub>3</sub>, *rot B*], 31.9 [d, *J*<sub>CF</sub><sup>2</sup> = 20 Hz, CH<sub>2</sub>], 31.1 [CH<sub>2</sub>], 28.4 [CH<sub>2</sub>], 24.5 [CH<sub>3</sub>], 16.8 [CH<sub>3</sub>]. HR-ESI(+)-MS *m/z* calcd for C<sub>27</sub>H<sub>29</sub>FN<sub>4</sub>O: 445.2398[M+H]<sup>+</sup>, found 445.2414.

**5.122.** 2-(2-(4-(3-Fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)-*N*-methyl-*N*-(pyridin-3-yl)methylacetamide (**19**)

This amide was prepared following the general procedure described above using 198 μL of *N*-methyl-1-(pyridin-3-yl)methanamine (4 eq, 1.62 mmol), 710 μL of 2 M trimethylaluminum solution in toluene (3.5 eq, 1.42 mmol), 150 mg of the ester **7** (0.406 mmol) and heating for 1 h. No acidic treatment was made for the work up of this reaction. **19** was obtained as a pale yellow solid after flash chromatography on silica gel (dichloromethane/methanol 98/2 to 97/3) and trituration in cold diethyl ether (141 mg, 78%). *R*<sub>f</sub> (dichloromethane/methanol 94/4): 0.20. *t*<sub>R</sub> (HPLC A) = 0.88 min (purity: 97.5%). Mp: 149–151 °C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 8.52–8.48 (m, 2H), 7.80 (d, 0.6 H, *J* = 8.0 Hz, *rot B*), 7.72 (d, 1.4H, *J* = 8.0 Hz, *rot A*), 7.57 (d, 0.7 H, *J* = 8.0 Hz, *rot A*), 7.41 (d, 0.3H, *J* = 8.0 Hz, *rot B*), 7.31–7.20 (m, 3H), 6.54 (s, 0.7H, *rot A*), 6.48 (s, 0.3H, *rot B*), 4.74 (s, 0.6H, *rot B*), 4.62 (s, 1.4H, *rot A*), 4.48 (dt, 2H, *J*<sub>HF</sub><sup>2</sup> = 47.2 Hz, *J*<sub>HH</sub><sup>3</sup> = 6.0 Hz), 4.05 (s, 0.6H, *rot B*), 4.01 (s, 1.4H, *rot A*), 3.09 (s, 2.1H, *rot A*), 2.93 (s, 0.9H, *rot B*), 2.80 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz), 2.75 (s, 2.1H, *rot A*), 2.68 (s, 0.9H, *rot B*), 2.55 (s, 2.1H, *rot A*), 2.54 (s, 0.9H, *rot B*), 2.04 (dt, 2H, *J*<sub>HF</sub><sup>3</sup> = 25.6 Hz, *J*<sub>HH</sub><sup>3</sup> = 7.2 & 6.0 Hz). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ 171.4 [C, *rot B*], 171.3 [C, *rot A*], 157.7 [C], 155.0 [C], 149.2 [CH, *rot A*], 148.7 [CH, *rot A*], 148.6 [CH, *rot B*], 147.9 [CH, *rot B*], 147.5 [C, *rot A*], 147.0 [C, *rot B*], 144.8 [C, *rot A*], 144.7 [C, *rot B*], 141.3

[C], 135.9 [CH, *rot A*], 133.6 [CH, *rot B*], 133.1 [C, *rot A*], 132.2 [C, *rot B*], 131.4 [C, *rot A*], 131.1 [C, *rot B*], 128.6 [4 × CH], 123.5 [CH, *rot A*], 123.2 [CH, *rot B*], 108.3 [CH], 100.2 [C], 83.0 [d, *J*<sub>CF</sub><sup>1</sup> = 164 Hz, CH<sub>2</sub>], 51.2 [CH<sub>2</sub>, *rot A*], 48.9 [CH<sub>2</sub>, *rot B*], 35.4 [CH<sub>3</sub>, *rot A*], 34.2 [CH<sub>3</sub>, *rot B*], 31.8 [d, *J*<sub>CF</sub><sup>2</sup> = 20 Hz, CH<sub>2</sub>], 31.1 [CH<sub>2</sub>], 28.7 [CH<sub>2</sub>, *rot B*], 28.4 [CH<sub>2</sub>, *rot A*], 24.63 [CH<sub>3</sub>], 16.8 [CH<sub>3</sub>]. HR-ESI(+)-MS *m/z* calcd for C<sub>26</sub>H<sub>28</sub>FN<sub>5</sub>O<sub>2</sub>: 446.2351[M+H]<sup>+</sup>, found 446.2346.

**5.123.** 2-(2-(4-(3-Fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)-*N*-methyl-*N*-(2-(pyridin-2-ylmethyl)acetamide (**20**)

This amide was prepared following the general procedure described above using 300 mg of the ester **7** (0.81 mmol), 198 mg of *N*-methyl-1-(pyridin-2-yl)methanamine (2 eq, 1.63 mmol), 163 μL of 2 M trimethylaluminum solution in toluene (4 eq, 3.25 mmol), and heating for 5 h. **20** (110 mg, 30%) was obtained as a light yellow foam after flash chromatography on silica gel (dichloromethane/methanol 95/5). *R*<sub>f</sub> (dichloromethane/acetone 90/10): 0.19. *t*<sub>R</sub> (HPLC A) = 1.07 min (purity: 96.0%). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 8.56 (m, 1H), 7.78 (d, 0.8H, *J* = 8.0 Hz, *rot B*), 7.74 (d, 1.2H, *J* = 8.0 Hz, *rot A*), 7.63–7.57 (m, 1H), 7.29–7.14 (m, 4H), 6.53 (s, 0.6H, *rot A*), 6.48 (s, 0.4H, *rot B*), 4.83 (s, 0.8H, *rot B*), 4.75 (s, 1.2H, *rot A*), 4.48 (dt, 2H, *J*<sub>HF</sub><sup>2</sup> = 47.2 Hz, *J*<sub>HH</sub><sup>3</sup> = 5.6 Hz), 4.05 (s, 1.2H, *rot B*), 4.03 (s, 1.8H, *rot A*), 3.20 (s, 1.8H, *rot A*), 3.00 (s, 1.2H, *rot B*), 2.80 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz), 2.77 (s, 1.8H, *rot A*), 2.69 (s, 1.2H, *rot B*), 2.55 (s, 1.8H, *rot A*), 2.53 (s, 1.2H, *rot B*), 2.04 (m, 2H, *J*<sub>HF</sub><sup>3</sup> = 25.6 Hz). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): δ 171.6 [C, *rot B*], 171.1 [C, *rot A*], 157.6 [C], 156.9 [C], 155.0 [C, *rot A*], 154.9 [C, *rot B*], 149.4 [CH, *rot B*], 148.9 [CH, *rot A*], 147.5 [C, *rot A*], 147.3 [C, *rot B*], 144.8 [C, *rot A*], 144.6 [C, *rot B*], 141.2 [C], 136.6 [CH], 131.4 [C, *rot A*], 131.3 [C, *rot B*], 128.7 [2 × CH], 128.6 [2 × CH], 122.1 [CH], 120.1 [CH], 108.3 [CH, *rot A*], 108.2 [CH, *rot B*], 100.5 [C, *rot A*], 100.3 [C, *rot B*], 82.9 [d, *J*<sub>CF</sub><sup>1</sup> = 163 Hz, CH<sub>2</sub>], 55.5 [CH<sub>2</sub>, *rot B*], 53.5 [CH<sub>2</sub>, *rot A*], 36.1 [CH<sub>3</sub>, *rot A*], 34.6 [CH<sub>3</sub>, *rot B*], 31.9 [d, *J*<sub>CF</sub><sup>2</sup> = 19 Hz, CH<sub>2</sub>], 31.0 [d, *J*<sub>CF</sub><sup>3</sup> = 5 Hz, CH<sub>2</sub>], 28.5 [CH<sub>2</sub>, *rot B*], 28.3 [CH<sub>2</sub>, *rot A*], 24.5 [CH<sub>3</sub>], 16.8 [CH<sub>3</sub>]. HR-ESI(+)-MS *m/z* calcd for C<sub>26</sub>H<sub>28</sub>FN<sub>5</sub>O<sub>2</sub>: 446.2351 [M+H]<sup>+</sup>, found 446.2367.

**5.124.** 2-(2-(4-(3-Fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)-*N*-methyl-*N*-phenethylacetamide (**21**)

This amide was prepared following the general procedure described above using 300 mg of the ester **7** (0.81 mmol), 220 mg of *N*-methylphenethylamine (2 eq, 1.63 mmol), 163 μL of 2 M trimethylaluminum solution in toluene (4 eq, 3.25 mmol), and heating at 110 °C for 4 h. **21** (84 mg, 23%) was obtained as pale orange solid after flash chromatography on silica gel (dichloromethane/acetone 95/5 to 80/20). *R*<sub>f</sub> (dichloromethane/acetone 90/10): 0.19. *t*<sub>R</sub> (HPLC A) = 1.39 min (purity: 96.4%). Mp: 99–101 °C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 7.70–7.72 (m, 2H), 7.30–7.25 (m, 4H), 7.22–7.19 (m, 2H), 7.18–7.14 (m, 1H), 6.53 (s, 0.5H, *rot A*), 6.51 (s, 0.5H, *rot B*), 4.48 (dt, 2H, *J*<sub>HF</sub><sup>2</sup> = 48 Hz, *J*<sub>HH</sub><sup>3</sup> = 6.0 Hz), 3.92 (s, 1H, *rot A*), 3.88 (s, 1 H, *rot B*), 3.71 (t, 0.98H, *J* = 7.2 Hz, *rot B*), 3.61 (t, 1.02H, *J* = 7.2 Hz, *rot A*), 3.02 (s, 1.5H, *rot A*), 2.93 (s, 1.5H, *rot B*), 2.85–2.77 (m, 4H), 2.76 (s, 1.5H, *rot A*), 2.74 (s, 1.5H, *rot B*), 2.57 (s, 1.5H, *rot A*), 2.52 (s, 1.5H, *rot B*), 2.09–1.96 (dq<sup>5</sup>, 2H, *J*<sub>HF</sub><sup>3</sup> = 26.8 Hz, *J*<sub>HH</sub><sup>3</sup> = 6.0 Hz). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ 170.8 [C, *rot B*], 170.5 [C, *rot A*], 157.4 [C], 155.0 [C], 174.3 [C], 144.7 [C], 141.2 [C], 139.3 [C, *rot A*], 138.3 [C, *rot B*], 131.4 [C, *rot A*], 131.3 [C, *rot B*], 128.8 [2 × CH], 128.7 [2 × CH], 128.6 [4 × CH], 126.5 [CH, *rot B*], 126.1 [CH, *rot A*], 108.2 [CH], 100.6 [C], 82.9 [d, *J*<sub>CF</sub><sup>1</sup> = 163.8 Hz, CH<sub>2</sub>], 51.9 [CH<sub>2</sub>, *rot B*], 50.6 [CH<sub>2</sub>, *rot A*], 36.5 [CH<sub>3</sub>, *rot A*], 34.9 [CH<sub>2</sub>, *rot B*], 34.1 [CH<sub>3</sub>, *rot B*], 33.6 [CH<sub>2</sub>, *rot A*], 31.9 [d, *J*<sub>CF</sub><sup>2</sup> = 19.6 Hz, CH<sub>2</sub>], 31.0 [d, *J*<sub>CF</sub><sup>3</sup> = 5.4 Hz, CH<sub>2</sub>], 28.5 [CH<sub>2</sub>, *rot A*], 27.9 [CH<sub>2</sub>, *rot B*], 24.5 [CH<sub>3</sub>], 16.8 [CH<sub>3</sub>]. HR-ESI(+)-MS *m/z* calcd for C<sub>28</sub>H<sub>31</sub>FN<sub>4</sub>O: 459.2555 [M+H]<sup>+</sup>, found 459.2556.



#### 5.1.25. *N*-Benzylcyclopropanamine (**22**)

To a solution of cyclopropylamine (5.0 g, 87 mmol) in tetrahydrofuran (120 mL) was added triethylamine (19 mL, 131 mmol) at ambient temperature. Benzyl bromide (12 mL, 105 mmol) was then carefully added dropwise to the reaction mixture which was stirred overnight at ambient temperature. The reaction mixture was partitioned between water and ethyl acetate. The aqueous layer was extracted twice with ethyl acetate (2 × 100 mL). The combined organic layers were washed with water (2 × 100 mL) and brine (100 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness. The residue was purified by chromatography on silica gel (dichloromethane/methanol 100/0 to 98/2) to afford **22** (3.25 g, 49%) as a light yellow oil.  $R_f$  (dichloromethane/methanol 96/4): 0.36.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  7.33 (m, 4H), 7.29–7.24 (m, 1H), 3.86 (s, 2H), 2.17 (m, 1H), 1.91 (s, 1H), 0.48–0.44 (m, 2H), 0.43–0.39 (m, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$  140.5 [C], 128.4 [2 × CH], 128.2 [2 × CH], 126.8 [CH], 53.7 [CH<sub>2</sub>], 30.0 [CH], 6.4 [2 × CH<sub>2</sub>].

#### 5.1.26. *N*-Benzyl-*N*-methylcyclopropanamine (**23**)

To a cooled solution (0 °C) of **22** (3.0 g, 20.3 mmol) in methanol (40 mL) was added a 37% wt. aqueous formaldehyde solution (2.5 mL, 30.5 mmol). Sodium borohydride (1.15 g, 30.5 mmol) was cautiously added to the mixture (exothermic reaction) which was then stirred for 30 min at 0 °C. Once completed, the reaction was quenched with a saturated potassium carbonate aqueous solution (100 mL). The mixture was then extracted twice with ethyl acetate (2 × 50 mL). The organic layers were combined, washed twice with water (2 × 25 mL) and brine (25 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness. The residue was purified by chromatography on silica gel (dichloromethane/methanol 100/0 to 99/1) to afford **23** (2.45 g, 74%) as a colorless oil.  $R_f$  (dichloromethane/methanol 95/5): 0.41.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  7.32–7.24 (m, 5H), 3.68 (s, 2H), 2.27 (s, 3H), 1.73–1.70 (m, 1H), 0.49–0.45 (m, 4H).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$  138.4 [C], 129.3 [2 × CH], 128.0 [2 × CH], 126.8 [CH], 62.2 [CH<sub>2</sub>], 41.9 [CH], 38.4 [CH<sub>3</sub>], 7.1 [2 × CH<sub>2</sub>].

#### 5.1.27. *N*-Methylcyclopropanamine hydrochloride (**24**)

To a solution of **23** (417 mg, 2.59 mmol) in methanol (10 mL) was cautiously added 10% palladium on charcoal (26 mg, 1 mol %). The reaction vessel was degassed under reduced pressure and filled with hydrogen at 1 atm (two cycles). The reaction mixture was stirred at ambient temperature overnight. Then, the catalyst was filtered off using a Celite<sup>®</sup> pad and washed with dichloromethane/methanol 80/20 (100 mL). Amethanolic 10 M hydrochloric acid solution (3 mL) was added. The filtrate was further concentrated to dryness to afford **24** (177 mg, 63%) as a pale yellow oil stored under argon.  $R_f$  (dichloromethane/methanol 90/10): 0.1.  $^1\text{H}$  NMR (MeOH-*d*<sub>4</sub>, 400 MHz)  $\delta$  2.77 (m, 4H), 0.91–0.89 (m, 4H).  $^{13}\text{C}$  NMR (MeOH-*d*<sub>4</sub>, 100 MHz)  $\delta$  32.5 [CH<sub>3</sub>], 31.2 [CH], 2.6 [2 × CH<sub>2</sub>].

#### 5.1.28. 2-(2-(4-(3-Fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetic acid (**25**)

To a solution of the ester **7** (460 mg, 1.26 mmol) in methanol (10 mL), was added potassium hydroxide (212 mg, 3.78 mmol). The reaction mixture was heated at 40 °C for 5 h. Water (5 mL) was added to quench the reaction. The reaction mixture was then acidified to pH 2 with a 1 M hydrochloric acid aqueous solution. The formed precipitate was filtered off, washed with diethyl ether, and dried under vacuum to afford **25** as a beige solid (277 mg, 64%), that was engaged without further purification in the coupling step (see preparation of **12** above).

#### 5.2. Binding studies

Binding affinities for the TSPO ( $K_i$ ) were determined using membrane homogenates from rat heart and screened against [<sup>3</sup>H] PK11195 ( $K_d = 1.8$  nM,  $c = 0.2$  nM). Affinities for the CBR were determined at a unique concentration (1 μM), using membrane homogenates from rat cerebral cortex and screened against [<sup>3</sup>H] flunitrazepam ( $K_d = 2.1$  nM,  $c = 0.4$  nM). This work was done by CEREP (<http://www.cerep.fr>).

#### 5.3. $\text{LogD}_{7.4}/\text{clogP}$ determination, and TPSA calculation

$\text{LogD}_{7.4}$  (*n*-octanol/buffer pH 7.4 partition coefficient) values were determined based on a validated and standardized HPLC method (HPLC B), by conversion of the recorded retention time for each compound (correlation between retention times and known  $\text{logD}$  values of similar compounds). Calculated  $\text{LogP}$  ( $\text{cLogP}$ ) as well as topological polar surface area (TPSA, expressed in Å<sup>2</sup>) were determined using ChemDraw Professional 15.0 (Cambridge Soft, PerkinElmer, Waltham, MA, USA).

#### 5.4. Microsomal metabolic stability evaluation

Compounds were incubated with hepatic microsomal fractions (male CD1 mouse, male Sprague-Dawley rat or humans (BD pool)) using the following experimental conditions throughout the study: microsomal proteins concentration = 0.25 mg/mL; substrate concentration = 0.5 μM; cofactor = 1 mM NADPH. For each compound to be tested, 5 samples were prepared, and incubated respectively for 0, 5, 10, 20 and 30 min. Enzyme activity was stopped with 1 volume of CH<sub>3</sub>CN, and proteins removed by centrifugation. The supernatant fluids were then analysed by UPLC/HRMS (UPLC: Polaris C18 (50 × 2.0 mm, 3 μm) column (Agilent, Santa Clara, CA, USA); mobile phase: (A) H<sub>2</sub>O + 0.1% formic acid, (B) CH<sub>3</sub>CN + 0.1% formic acid; gradient (A/B): 90:10 to 10:90 (2.1 min), then 10:90 for 0.3 min and back to 90:10 (0.1 min); 0.5 mL/min; injection volume: 5 μL. HRMS: Thermo Scientific Hybride Q Exactive™ quadripole-Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Inc., NYSE:TMO, Waltham, MA, USA)). The data were collected and processed using GMSU software (GUBBS, Alpharetta, GA, USA), leading to quantification of the unchanged tested compound. Intrinsic clearances were expressed as μL/min/mg protein, and calculated, for each compound, as below.

First, the percentage of unchanged compound (% stability) at T = 5, 10, 20 and 30 min was calculated by normalizing the data at these time points to the data recorded at T = 0 min for the analyte/internal standard peak area ratio. % stability = [peak area ratio at T/peak area ratio at T<sub>0</sub>] × 100. Then, the elimination slope (–k) (k is expressed in min<sup>–1</sup>) was determined using a linear regression of the neperian logarithm (ln) of the % stability versus the incubation time (T). Finally, intrinsic clearance (lnC) was determined as follows:  $\text{lnC} = [k/\text{protein concentration}] \times 1000$  (protein concentration is expressed in mg/mL).

#### Acknowledgments

This work was supported by CEA-<sup>12</sup>BM intramural programs, as well as partly by the European Union's Seventh Framework Programme [FP7/2007–2013] INMiND (Grant agreement n° HEALTH-F2-2011-278850) and France Life Imaging (Grant agreement n° ANR-11-INBS-0006). The authors wish to thank LGCR Analytical Sciences (Sanofi, Chilly Mazarin) for  $\text{logD}_{7.4}$  measurements, DMPK (Sanofi, Montpellier) and DSAR Drug Disposition (Sanofi, Vitry) for preliminary metabolism studies. HRMS determination has benefited from the facilities and expertise of scientific service,



HPLC–Mass spectrometry of ICSN, CNRS, Gif sur Yvette, France ([www.icsn.cnrs-gif.fr](http://www.icsn.cnrs-gif.fr)).

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.09.025>.

## References

- V. Papadopoulos, M. Baraldi, T.R. Guilarte, T.B. Knudsen, J.-J. Lacapère, P. Lindemann, M.D. Norenberg, D. Nutt, A. Weizman, M.-R. Zhang, M. Gavish, Translocator protein (18 kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function, *Trends Pharmacol. Sci.* 27 (2006) 402–409, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2006.06.005>.
- P. Casellas, S. Gallieue, A.S. Basile, Peripheral benzodiazepine receptors and mitochondrial function, *Neurochem. Int.* 40 (2002) 475–486, [http://dx.doi.org/10.1016/S0197-0186\(01\)00118-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0197-0186(01)00118-8).
- V. Papadopoulos, H. Amri, N. Boujrad, C. Cascio, M. Culty, M. Garnier, M. Hardwick, H. Li, B. Vidic, A.S. Brown, J.L. Reversa, J.M. Bernassau, K. Drieu, Peripheral benzodiazepine receptor in cholesterol transport and steroidogenesis, *Steroids* 62 (1997) 21–28, [http://dx.doi.org/10.1016/S0039-128X\(96\)00154-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0039-128X(96)00154-7).
- R. Rupprecht, V. Papadopoulos, G. Rammes, T.C. Baghai, J. Fan, N. Akula, G. Groyer, D. Adams, M. Schumacher, Translocator protein (18 kDa) (TSPO) as a therapeutic target for neurological and psychiatric disorders, *Nat. Rev. Drug Discov.* 9 (2010) 971–988, <http://dx.doi.org/10.1038/nrd3295>.
- C.J.D. Austin, J. Kahlert, M. Kassiou, L.M. Rendina, The translocator protein (TSPO): a novel target for cancer chemotherapy, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45 (2013) 1212–1216, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2013.03.004>.
- E.L. Werry, M.L. Barron, M. Kassiou, TSPO as a target for glioblastoma therapeutics, *Biochem. Soc. Trans.* 43 (2015) 531–536, <http://dx.doi.org/10.1042/BST20150015>.
- S.W. Chua, M. Kassiou, L.M. Ittner, The translocator protein as a drug target in Alzheimer's disease, *Expert Rev. Neurother.* 14 (2014) 439–448, <http://dx.doi.org/10.1586/14737175.2014.896201>.
- S. Venneti, B.J. Lopresti, C.A. Wiley, The peripheral benzodiazepine receptor (Translocator protein 18 kDa) in microglia: from pathology to imaging, *Prog. Neurobiol.* 80 (2006) 308–322, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pneurobio.2006.10.002>.
- A.M. Scarf, M. Kassiou, The translocator protein, *J. Nucl. Med.* 52 (2011) 677–680, <http://dx.doi.org/10.2967/jnumed.110.086629>.
- C. Luus, R. Hanani, A. Reynolds, M. Kassiou, The development of PET radioligands for imaging the translocator protein (18 kDa): what have we learned? *J. Label. Compd. Radiopharm.* 53 (2010) 501–510, <http://dx.doi.org/10.1002/jlcr.1752>.
- A.M. Scarf, L.M. Ittner, M. Kassiou, The translocator protein (18 kDa): central nervous system disease and drug design, *J. Med. Chem.* 52 (2009) 581–592, <http://dx.doi.org/10.1021/jm8011678>.
- F. Dollé, C. Luus, A. Reynolds, M. Kassiou, Radiolabelled molecules for imaging the translocator protein (18 kDa) using Positron Emission Tomography, *Curr. Med. Chem.* 16 (2009) 2899–2923, <http://dx.doi.org/10.2174/092986709788803150>.
- S. Taliani, I. Pugliesi, F. Da Settimo, Structural requirements to obtain highly potent and selective 18 kDa Translocator Protein (TSPO) Ligands, *Curr. Top. Med. Chem.* 11 (2011) 860–886, <http://dx.doi.org/10.2174/156802611795165142>.
- A.M. Scarf, C. Luus, E. Da Pozzo, S. Selleri, C. Guarino, C. Martini, L.M. Ittner, M. Kassiou, Evidence for complex binding profiles and species differences at the translocator protein (TSPO) (18 kDa), *Curr. Mol. Med.* 12 (2012) 488–493.
- R.B. Banati, J. Newcombe, R.N. Gunn, A. Cagnin, F. Turkheimer, F. Heppner, G. Price, F. Wegner, G. Giovannoni, D.H. Miller, G.D. Perkin, T. Smith, A.K. Hewson, G. Bydder, G.W. Kreutzberg, T. Jones, M.L. Cuzner, R. Myers, The peripheral benzodiazepine binding site in the brain in multiple sclerosis, *Brain* 123 (2000) 2321–2337, <http://dx.doi.org/10.1093/brain/123.11.2321>.
- B. Ferzaz, E. Brault, G. Bourliand, J.-P. Robert, G. Poughon, Y. Claustre, F. Marguet, P. Liere, M. Schumacher, J.-P. Nowicki, J. Fournier, B. Marabout, M. Sevrin, P. George, S. Soubrie, J. Benavides, B. Scatton, SSR 180575 (7-Chloro-N, N5-trimethyl-4-oxo-3-phenyl-3,5-dihydro-4H-pyridazino[4,5-b]indole-1-acetamide), a Peripheral Benzodiazepine Receptor ligand, promotes neuronal survival and repair, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 301 (2002) 1067–1078, <http://dx.doi.org/10.1124/jpet.301.3.1067>.
- N. Leduq, F. Bono, T. Sulpice, V. érie Vin, P. Janiak, G.L. Fur, S.E. O'Connor, J.-M. Herbert, Role of peripheral benzodiazepine receptors in mitochondrial, cellular, and cardiac damage induced by oxidative Stress and ischemia-reperfusion, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 306 (2003) 828–837, <http://dx.doi.org/10.1124/jpet.103.052068>.
- C. Thominiaux, A. Damont, B. Kuhnast, S. Demphel, S. Le Helleix, S. Boissard, L. Rivron, F. Chauveau, H. Boutin, N. Van Camp, R. Boisgard, S. Roy, J. Allen, T. Rooney, J. Benavides, P. Hantraye, B. Tavitian, F. Dollé, Radiosynthesis of 7-chloro-N,N-dimethyl-5-[11C]methyl-4-oxo-3-phenyl-3,5-dihydro-4H-pyridazino[4,5-b]indole-1-acetamide, [11C]SSR180575, a novel radioligand for imaging the TSPO (peripheral benzodiazepine receptor) with PET, *J. Label. Compd. Radiopharm.* 53 (2010) 767–773, <http://dx.doi.org/10.1002/jlcr.1794>.
- F. Chauveau, H. Boutin, N. Van Camp, C. Thominiaux, P. Hantraye, L. Rivron, F. Marguet, M.-N. Castel, T. Rooney, J. Benavides, F. Dollé, B. Tavitian, In vivo imaging of neuroinflammation in the rodent brain with [11C]SSR180575, a novel indoleacetamide radioligand of the translocator protein (18 kDa), *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 38 (2011) 509–514, <http://dx.doi.org/10.1007/s00259-010-1628-5>.
- N. Van Camp, S. Lavisse, L. Rbah, R. Aaron-Badin, C. Jan, F. Dollé, T. Rooney, E. Brouillet, P. Hantraye, 11C-SSR180575 evaluated under normal and pathological conditions in nonhuman primate brain, *J. Nucl. Med.* 53 (Suppl. 1) (2012), 109P.
- Y.-Y. Cheung, M.L. Nickels, D. Tang, J.R. Buck, H.C. Manning, Facile synthesis of SSR180575 and discovery of 7-chloro-N, N5-trimethyl-4-oxo-3-(6-[18F]fluoropyridin-2-yl)-3,5-dihydro-4H-pyridazino[4,5-b]indole-1-acetamide, a potent pyridazinoindole ligand for PET imaging of TSPO in cancer, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 24 (2014) 4466–4471, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.07.091>.
- A. Damont, F. Marguet, F. Puech, F. Dollé, Synthesis and in vitro characterization of novel fluorinated derivatives of the TSPO 18 kDa ligand SSR180575, *Eur. J. Med. Chem.* 101 (2015) 736–745, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.07.033>.
- H. Boutin, F. Chauveau, C. Thominiaux, B. Kuhnast, M.-C. Grégoire, S. Jan, R. Trebossen, F. Dollé, B. Tavitian, F. Mattner, A. Katsifis, In vivo imaging of brain lesions with [11C]CLINME, a new PET radioligand of peripheral benzodiazepine receptors, *Glia* 55 (2007) 1459–1468, <http://dx.doi.org/10.1002/glia.20562>.
- C. Thominiaux, F. Mattner, I. Greguric, H. Boutin, F. Chauveau, B. Kuhnast, M.-C. Grégoire, C. Loc'h, H. Valette, M. Bottlaender, P. Hantraye, B. Tavitian, A. Katsifis, F. Dollé, Radiosynthesis of 2-[6-chloro-2-(4-iodophenyl)imidazo[1,2-a]pyridin-3-yl]-N-ethyl-N-[11C]methyl-acetamide, [11C]CLINME, a novel radioligand for imaging the peripheral benzodiazepine receptors with PET, *J. Label. Compd. Radiopharm.* 50 (2007) 229–236, <http://dx.doi.org/10.1002/jlcr.1258>.
- C.J.R. Fookes, T.Q. Pham, F. Mattner, I. Greguric, C. Loc'h, X. Liu, P. Berghofer, R. Shepherd, M.-C. Grégoire, A. Katsifis, Synthesis and biological evaluation of substituted [18F]imidazo[1,2-a]pyridines and [18F]pyrazolo[1,5-a]pyrimidines for the study of the peripheral benzodiazepine receptor using Positron Emission Tomography, *J. Med. Chem.* 51 (2008) 3700–3712, <http://dx.doi.org/10.1021/jm7014556>.
- F. Dollé, F. Hinnen, A. Damont, B. Kuhnast, C. Fookes, T. Pham, B. Tavitian, A. Katsifis, Radiosynthesis of [18F]PBR111, a selective radioligand for imaging the translocator protein (18 kDa) with PET, *J. Label. Compd. Radiopharm.* 51 (2008) 435–439, <http://dx.doi.org/10.1002/jlcr.1559>.
- T. Bourdier, T.Q. Pham, D. Henderson, T. Jackson, P. Lam, M. Izard, A. Katsifis, Automated radiosynthesis of [18F]PBR111 and [18F]PBR102 using the Tracerlab FXFN and Tracerlab MXFDG module for imaging the peripheral benzodiazepine receptor with PET, *Appl. Radiat. Isot.* 70 (2012) 176–183, <http://dx.doi.org/10.1016/j.apradiso.2011.07.014>.
- S. Dedeurwaerdere, P.D. Callaghan, T. Pham, G.L. Rahardjo, H. Amhaoul, P. Berghofer, M. Quinlivan, F. Mattner, C. Loc'h, A. Katsifis, M.-C. Grégoire, PET imaging of brain inflammation during early epileptogenesis in a rat model of temporal lobe epilepsy, *EJNMMI Res.* 2 (2012) 60, <http://dx.doi.org/10.1186/2191-219X-2-60>.
- J.D. Verschuier, J. Towson, S. Eberl, A. Katsifis, D. Henderson, P. Lam, L. Wen, C. Loc'h, F. Mattner, S. Thomson, A. Mohamed, M.J. Fulham, Radiation dosimetry of the translocator protein ligands [18F]PBR111 and [18F]PBR102, *Nucl. Med. Biol.* 39 (2012) 742–753, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnucmedbio.2011.11.003>.
- F. Mattner, A. Katsifis, M. Staykova, P. Ballantyne, D.O. Willenborg, Evaluation of a radiolabelled peripheral benzodiazepine receptor ligand in the central nervous system inflammation of experimental autoimmune encephalomyelitis: a possible probe for imaging multiple sclerosis, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 32 (2004) 557–563, <http://dx.doi.org/10.1007/s00259-004-1690-y>.
- N. Arlicot, A. Katsifis, L. Garreau, F. Mattner, J. Vergote, S. Duval, S. Bodard, D. Guilloteau, S. Chalou, Evaluation of CLINDE as potent translocator protein (18 kDa) SPECT radiotracer reflecting the degree of neuroinflammation in a rat model of microglial activation, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 35 (2008) 2203–2211, <http://dx.doi.org/10.1007/s00259-008-0834-x>.
- F. Mattner, D.L. Bandini, M. Staykova, P. Berghofer, M.C. Grégoire, P. Ballantyne, M. Quinlivan, S. Fordham, T. Pham, D.O. Willenborg, A. Katsifis, Evaluation of [123I]-CLINDE as a potent SPECT radiotracer to assess the degree of astroglia activation in cuprizone-induced neuroinflammation, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 38 (2011) 1516–1528, <http://dx.doi.org/10.1007/s00259-011-1784-2>.
- F. Mattner, K. Mardon, A. Katsifis, Pharmacological evaluation of [123I]-CLINDE: a radioiodinated imidazopyridine-3-acetamide for the study of peripheral benzodiazepine binding sites (PBBS), *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 35 (2007) 779–789, <http://dx.doi.org/10.1007/s00259-007-0645-5>.
- Q. Guo, A. Colasanti, D.R. Owen, M. Onega, A. Kamalakaran, I. Bennacef, P.M. Matthews, E.A. Rabiner, F.E. Turkheimer, R.N. Gunn, Quantification of the specific translocator protein signal of 18F-PBR111 in healthy humans: a genetic polymorphism effect on in vivo binding, *J. Nucl. Med.* 54 (2013) 1915–1923, <http://dx.doi.org/10.2967/jnumed.113.121020>.



- [35] L. Feng, C. Svarer, G. Thomsen, R. de Nijs, V.A. Larsen, P. Jensen, D. Adamsen, A. Dyssegaard, W. Fischer, P. Meden, D. Krieger, K. Møller, G.M. Knudsen, L.H. Pinborg, In vivo quantification of cerebral translocator protein binding in humans using 6-chloro-2-(4'-123I-iodophenyl)-3-(N,N-diethyl)-imidazo[1,2-a]pyridine-3-acetamide SPECT, *J. Nucl. Med.* 55 (2014) 1966–1972, <http://dx.doi.org/10.2967/jnumed.114.143727>.
- [36] P. Jensen, L. Feng, I. Law, C. Svarer, G.M. Knudsen, J.D. Mikkelsen, R. de Nijs, V.A. Larsen, A. Dyssegaard, G. Thomsen, W. Fischer, D. Guilloteau, L.H. Pinborg, TSPO imaging in glioblastoma multiforme: a direct comparison between 123I-CLINDE SPECT, 18F-FET PET, and gadolinium-enhanced MR imaging, *J. Nucl. Med.* 56 (2015) 1386–1390, <http://dx.doi.org/10.2967/jnumed.115.158998>.
- [37] A. Colasanti, Q. Guo, P. Giannetti, M.B. Wall, R.D. Newbould, C. Bishop, M. Omega, R. Nicholas, O. Ciccirelli, P.A. Muraro, O. Malik, D.R. Owen, A.H. Young, R.N. Gunn, P. Piccini, P.M. Matthews, E.A. Rabiner, Hippocampal neuroinflammation, functional connectivity, and depressive symptoms in multiple sclerosis, *Biol. Psychiatry*, (n.d.), doi:10.1016/j.biopsych.2015.11.022.
- [38] S. Selleri, F. Bruni, C. Costagli, A. Costanzo, G. Guerrini, G. Ciciani, B. Costa, C. Martini, 2-Arylpirazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl acetamides. New potent and selective peripheral benzodiazepine receptor ligands, *Bioorg. Med. Chem.* 9 (2001) 2661–2671, [http://dx.doi.org/10.1016/S0968-0896\(01\)00192-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0968-0896(01)00192-4).
- [39] A. Reynolds, R. Hanani, D. Hibbs, A. Damont, E.D. Pozzo, S. Selleri, F. Dollé, C. Martini, M. Kassiou, Pyrazolo[1,5-a]pyrimidine acetamides: 4-Phenyl alkyl ether derivatives as potent ligands for the 18 kDa translocator protein (TSPO), *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20 (2010) 5799–5802, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.07.135>.
- [40] S.D. Banister, S.M. Wilkinson, R. Hanani, A.J. Reynolds, D.E. Hibbs, M. Kassiou, A practical, multigram synthesis of the 2-(2-(4-alkoxyphenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)acetamide (DPA) class of high affinity translocator protein (TSPO) ligands, *Tetrahedron Lett.* 53 (2012) 3780–3783, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tetlet.2012.05.044>.
- [41] S.D. Banister, C. Beinat, S.M. Wilkinson, B. Shen, C. Bartoli, S. Selleri, E. Da Pozzo, C. Martini, F.T. Chin, M. Kassiou, Ether analogues of DPA-714 with subnanomolar affinity for the translocator protein (TSPO), *Eur. J. Med. Chem.* 93 (2015) 392–400, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.02.004>.
- [42] M.L. James, R.R. Fulton, D.J. Henderson, S. Eberl, S.R. Meikle, S. Thomson, R.D. Allan, F. Dollé, M.J. Fulham, M. Kassiou, Synthesis and in vivo evaluation of a novel peripheral benzodiazepine receptor PET radioligand, *Bioorg. Med. Chem.* 13 (2005) 6188–6194, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2005.06.030>.
- [43] C. Thominaux, F. Dollé, M.L. James, Y. Bramoullé, H. Boutin, L. Besret, M.-C. Grégoire, H. Valette, M. Bottlaender, B. Tavitian, P. Hantraye, S. Selleri, M. Kassiou, Improved synthesis of the peripheral benzodiazepine receptor ligand [11C]DPA-713 using [11C]methyl triflate, *Appl. Radiat. Isot.* 64 (2006) 570–573, <http://dx.doi.org/10.1016/j.apradiso.2005.12.003>.
- [44] M.L. James, R.R. Fulton, J. Vercoullie, D.J. Henderson, L. Garreau, S. Chalon, F. Dollé, S. Selleri, D. Guilloteau, M. Kassiou, DPA-714, a new translocator protein-specific ligand: synthesis, radiofluorination, and pharmacologic characterization, *J. Nucl. Med.* 49 (2008) 814–822, <http://dx.doi.org/10.2967/jnumed.107.046151>.
- [45] A. Damont, F. Hinnen, B. Kuhnast, M.-A. Schöllhorn-Peyronneau, M. James, C. Luus, B. Tavitian, M. Kassiou, F. Dollé, Radiosynthesis of [18F]DPA-714, a selective radioligand for imaging the translocator protein (18 kDa) with PET, *J. Label. Compd. Radiopharm.* 51 (2008) 286–292, <http://dx.doi.org/10.1002/jlcr.1523>.
- [46] B. Kuhnast, A. Damont, F. Hinnen, T. Catarina, S. Demphel, S. Le Helleix, C. Coulon, S. Goutal, P. Gervais, F. Dollé, [18F]DPA-714, [18F]PBR111 and [18F]FEDAA1106-selective radioligands for imaging TSPO 18 kDa with PET: automated radiosynthesis on a TRACERLab FX-FN synthesizer and quality controls, *Appl. Radiat. Isot.* 70 (2012) 489–497, <http://dx.doi.org/10.1016/j.apradiso.2011.10.015>.
- [47] H. Boutin, F. Chauveau, C. Thominaux, M.-C. Grégoire, M.L. James, R. Trebossen, P. Hantraye, F. Dollé, B. Tavitian, M. Kassiou, 11C-DPA-713: a novel peripheral benzodiazepine receptor PET ligand for in vivo imaging of neuroinflammation, *J. Nucl. Med.* 48 (2007) 573–581.
- [48] F. Chauveau, N.V. Camp, F. Dollé, B. Kuhnast, F. Hinnen, A. Damont, H. Boutin, M. James, M. Kassiou, B. Tavitian, Comparative evaluation of the translocator protein radioligands 11C-DPA-713, 18F-DPA-714, and 11C-PK11195 in a rat model of acute neuroinflammation, *J. Nucl. Med.* 50 (2009) 468–476, <http://dx.doi.org/10.2967/jnumed.108.058669>.
- [49] J. Doorduyn, H.C. Klein, R.A. Dierckx, M. James, M. Kassiou, E.F.J. Vries, [11C]-DPA-713 and [18F]-DPA-714 as new PET tracers for TSPO: a comparison with [11C]-PK11195 in a rat model of herpes encephalitis, *Mol. Imaging Biol.* 11 (2009) 386–398, <http://dx.doi.org/10.1007/s11307-009-0211-6>.
- [50] C.J. Endres, J.M. Coughlin, K.L. Gage, C.C. Watkins, M. Kassiou, M.G. Pomper, Radiation dosimetry and biodistribution of the TSPO ligand 11C-DPA-713 in humans, *J. Nucl. Med.* 53 (2012) 330–335, <http://dx.doi.org/10.2967/jnumed.111.094565>.
- [51] C.J. Endres, M.G. Pomper, M. James, O. Uzuner, D.A. Hammoud, C.C. Watkins, A. Reynolds, J. Hilton, R.F. Dannals, M. Kassiou, Initial evaluation of 11C-DPA-713, a novel TSPO PET ligand, in humans, *J. Nucl. Med.* 50 (2009) 1276–1282, <http://dx.doi.org/10.2967/jnumed.109.062265>.
- [52] L.D. Gershen, P. Zanotti-Fregonara, L.H. Dustin, et al., Neuroinflammation in temporal lobe epilepsy measured using positron emission tomographic imaging of translocator protein, *JAMA Neurol.* 72 (2015) 882–888, <http://dx.doi.org/10.1001/Neuro.2015.0941>.
- [53] F. Chauveau, N.V. Camp, F. Dollé, B. Kuhnast, F. Hinnen, A. Damont, H. Boutin, M. James, M. Kassiou, B. Tavitian, Comparative evaluation of the Translocator Protein radioligands 11C-DPA-713, 18F-DPA-714, and 11C-PK11195 in a rat model of acute neuroinflammation, *J. Nucl. Med.* 50 (2009) 468–476, <http://dx.doi.org/10.2967/jnumed.108.058669>.
- [54] D. Ory, A. Postnov, M. Koole, S. Celen, B. de Laat, A. Verbruggen, K.V. Laere, G. Bormans, C. Casteels, Quantification of TSPO overexpression in a rat model of local neuroinflammation induced by intracerebral injection of LPS by the use of [18F]DPA-714 PET, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 43 (2015) 163–172, <http://dx.doi.org/10.1007/s00259-015-3172-9>.
- [55] S. Gargiulo, S. Anzilotti, A.R.D. Coda, M. Gramanzini, A. Greco, M. Panico, A. Vinciguerra, A. Zannetti, C. Vicidomini, F. Dollé, G. Pignataro, M. Quarantelli, L. Annunziato, A. Brunetti, M. Salvatore, S. Pappatà, Imaging of brain TSPO expression in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis with 18F-DPA-714 and micro-PET/CT, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 43 (2016) 1348–1359, <http://dx.doi.org/10.1007/s00259-016-3311-y>.
- [56] C. Thomas, J. Vercoullie, A. Domène, C. Tauber, M. Kassiou, D. Guilloteau, C. Destrieux, S. Sérière, S. Chalon, Detection of neuroinflammation in a rat model of subarachnoid hemorrhage using [18F]DPA-714 PET imaging, *Mol. Imaging* 15 (2016) 1–8, <http://dx.doi.org/10.1177/1536012116639189>.
- [57] A. Martín, R. Boisgard, B. Thézé, N. Van Camp, B. Kuhnast, A. Damont, M. Kassiou, F. Dollé, B. Tavitian, Evaluation of the PBR/TSPO radioligand [18F]DPA-714 in a rat model of focal cerebral ischemia, *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* 30 (2010) 230–241, <http://dx.doi.org/10.1038/jcbfm.2009.205>.
- [58] H. Boutin, C. Prenant, R. Maroy, J. Galea, A.D. Greenhalgh, A. Smigova, C. Cawthorne, P. Julyan, S.M. Wilkinson, S.D. Banister, G. Brown, K. Herholz, M. Kassiou, N.J. Rothwell, [18F]DPA-714: direct comparison with [11C]PK11195 in a model of cerebral ischemia in rats, *PLoS One* 8 (2013) e56441, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0056441>.
- [59] J. Zheng, A. Winkler, M.-A. Peyronneau, F. Dollé, R. Boisgard, Evaluation of PET imaging performance of the TSPO radioligand [18F]DPA-714 in mouse and rat models of cancer and inflammation, *Mol. Imaging Biol.* 18 (2015) 127–134, <http://dx.doi.org/10.1007/s11307-015-0877-x>.
- [60] A. Winkler, R. Boisgard, A.R. Awde, A. Dubois, B. Thézé, J. Zheng, L. Ciobanu, F. Dollé, T. Viel, A.H. Jacobs, B. Tavitian, The translocator protein ligand [18F]DPA-714 images glioma and activated microglia in vivo, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 39 (2012) 811–823, <http://dx.doi.org/10.1007/s00259-011-2041-4>.
- [61] G. Pottier, N. Bernards, F. Dollé, R. Boisgard, [18F]DPA-714 as a biomarker for positron emission tomography imaging of rheumatoid arthritis in an animal model, *Arthritis Res. Ther.* 16 (2014) R69, <http://dx.doi.org/10.1186/ar4508>.
- [62] Y.Y.J. Gent, K. Weijers, C.F.M. Molthoff, A.J. Windhorst, M.C. Huisman, M. Kassiou, G. Jansen, A.A. Lammertsma, C.J. van der Laken, Promising potential of new generation translocator protein tracers providing enhanced contrast of arthritis imaging by positron emission tomography in a rat model of arthritis, *Arthritis Res. Ther.* 16 (2014) R70, <http://dx.doi.org/10.1186/ar4509>.
- [63] N. Bernards, G. Pottier, B. Thézé, F. Dollé, R. Boisgard, In vivo evaluation of inflammatory bowel disease with the aid of  $\mu$ PET and the translocator protein 18 kDa radioligand [18F]DPA-714, *Mol. Imaging Biol.* 17 (2015) 67–75, <http://dx.doi.org/10.1007/s11307-014-0765-9>.
- [64] S. Lavisse, K. Inoue, C. Jan, M.A. Peyronneau, F. Petit, S. Goutal, J. Dauguet, M. Guillemier, F. Dollé, L. Rbah-Vidal, N.V. Camp, R. Aron-Badin, P. Remy, P. Hantraye, [18F]DPA-714 PET imaging of translocator protein TSPO (18 kDa) in the normal and excitotoxically-lesioned nonhuman primate brain, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 42 (2014) 478–494, <http://dx.doi.org/10.1007/s00259-014-2962-9>.
- [65] N. Arlicot, J. Vercoullie, M.-J. Ribeiro, C. Tauber, Y. Venel, J.-L. Baulieu, S. Maia, P. Corcia, M.G. Stabin, A. Reynolds, M. Kassiou, D. Guilloteau, Initial evaluation in healthy humans of [18F]DPA-714, a potential PET biomarker for neuroinflammation, *Nucl. Med. Biol.* 39 (2012) 570–578, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnucmedbio.2011.10.012>.
- [66] S. Lavisse, D. García-Lorenzo, M.-A. Peyronneau, B. Bodini, C. Thiriez, B. Kuhnast, C. Comtat, P. Remy, B. Stankoff, M. Bottlaender, Optimized quantification of translocator protein radioligand 18F-DPA-714 uptake in the brain of genotyped healthy volunteers, *J. Nucl. Med.* 56 (2015) 1048–1054, <http://dx.doi.org/10.2967/jnumed.115.156083>.
- [67] S.S. Golla, R. Boellaard, V. Oikonen, A. Hoffmann, B.N.M. van Berckel, A.D. Windhorst, J. Virta, E.T. de Beek, G.J. Groeneveld, M. Haaparanta-Solin, P. Luoto, N. Savisto, O. Solin, R. Valencia, A. Thiele, J. Eriksson, R.C. Schuit, A.A. Lammertsma, J. Rinne, Parametric binding images of the TSPO ligand [18F]DPA-714, *J. Nucl. Med.* (June 3, 2016), <http://dx.doi.org/10.2967/jnumed.116.173013> published ahead of print.
- [68] S.S.V. Golla, R. Boellaard, V. Oikonen, A. Hoffmann, B.N.M. van Berckel, A.D. Windhorst, J. Virta, M. Haaparanta-Solin, P. Luoto, N. Savisto, O. Solin, R. Valencia, A. Thiele, J. Eriksson, R.C. Schuit, A.A. Lammertsma, J.O. Rinne, Quantification of [18F]DPA-714 binding in the human brain: initial studies in healthy controls and Alzheimer's disease patients, *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* 35 (2015) 766–772, <http://dx.doi.org/10.1038/jcbfm.2014.261>.
- [69] L. Hamelin, J. Lagarde, G. Dorothée, C. Leroy, M. Labit, R.A. Comley, L.C. de Souza, H. Corne, L. Dauphinot, M. Bertoux, B. Dubois, P. Gervais, O. Colliot, M.C. Potier, M. Bottlaender, M. Sarazin, Clinical IMABio3 team, Early and protective microglial activation in Alzheimer's disease: a prospective study using 18F-DPA-714 PET imaging, *Brain J. Neurol.* 139 (2016) 1252–1264, <http://dx.doi.org/10.1093/brain/aww017>.



- [70] M.-J. Ribeiro, J. Vercouillie, S. Debais, J.-P. Cottier, I. Bonnaud, V. Camus, S. Banister, M. Kassiou, N. Arlicot, D. Guilloteau, Could 18 F-DPA-714 PET imaging be interesting to use in the early post-stroke period? *EJNMMI Res.* 4 (2014) 1–8, <http://dx.doi.org/10.1186/s13550-014-0028-4>.
- [71] L. Pichard, G. Gillet, C. Bonfils, J. Dornergue, J.P. Thénot, P. Maurel, Oxidative metabolism of zolpidem by human liver cytochrome P450S, *Drug Metab. Dispos.* 23 (1995) 1253–1262.
- [72] A. Garrigou-Gadenne, J.P. Durand, P.L. Thenot, Morselli, the disposition and pharmacokinetics of alpidem, a new anxiolytic, in the rat, *Drug Metab. Dispos.* 19 (1991) 574–579.
- [73] A. Katsifis, C. Loc'h, D. Henderson, T. Bourdier, T. Pham, I. Greguric, P. Lam, P. Callaghan, F. Mattner, S. Eberl, M. Fulham, A rapid solid-phase extraction method for measurement of non-metabolised peripheral benzodiazepine receptor ligands, [18F]PBR102 and [18F]PBR111, in rat and primate plasma, *Nucl. Med. Biol.* 38 (2011) 137–148, <http://dx.doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2010.07.008>.
- [74] M.-A. Peyronneau, W. Saba, S. Goutal, A. Damont, F. Dollé, M. Kassiou, M. Bottlaender, H. Valette, Metabolism and quantification of [18F]DPA-714, a new TSPO Positron Emission Tomography radioligand, *Drug Metab. Dispos.* 41 (2013) 122–131, <http://dx.doi.org/10.1124/dmd.112.046342>.
- [75] V. Médran-Navarrete, A. Damont, M.-A. Peyronneau, B. Kuhnast, N. Bernards, G. Pottier, F. Marguet, F. Puech, R. Boisgard, F. Dollé, Preparation and evaluation of novel pyrazolo[1,5-a]pyrimidine acetamides, closely related to DPA-714, as potent ligands for imaging the TSPO 18 kDa with PET, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 24 (2014) 1550–1556, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.01.080>.
- [76] A. Damont, V. Médran-Navarrete, F. Cacheux, B. Kuhnast, G. Pottier, N. Bernards, F. Marguet, F. Puech, R. Boisgard, F. Dollé, Novel pyrazolo[1,5-a]pyrimidines as translocator protein 18 kDa (TSPO) ligands: synthesis, in vitro biological evaluation, [18F]-labeling, and in vivo neuroinflammation PET images, *J. Med. Chem.* 58 (2015) 7449–7464, <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00932>.
- [77] D.R. Sidler, T.C. Lovelace, J.M. McNamara, P.J. Reider, Aluminum-amine complexes for the conversion of carboxylic esters to amides. Application to the synthesis of LTD4 antagonist MK-0679, *J. Org. Chem.* 59 (1994) 1231–1233, <http://dx.doi.org/10.1021/jo00085a001>.
- [78] A. Basha, M. Lipton, S.M. Weinreb, A mild, general method for conversion of esters to amides, *Tetrahedron Lett.* 18 (1977) 4171–4172, [http://dx.doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)83457-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0040-4039(01)83457-2).
- [79] J.I. Levin, E. Turos, S.M. Weinreb, An alternative procedure for the aluminum-mediated conversion of esters to amides, *Synth. Commun.* 12 (1982) 989–993, <http://dx.doi.org/10.1080/00397918208061938>.
- [80] K. Yoshida, K. Nakayama, Y. Yokomizo, M. Ohtsuka, M. Takemura, K. Hoshino, H. Kanda, K. Namba, H. Nitanaï, J.Z. Zhang, V.J. Lee, W.J. Watkins, MexAB-OprM specific efflux pump inhibitors in *Pseudomonas aeruginosa*. Part 6: exploration of aromatic substituents, *Bioorg. Med. Chem.* 14 (2006) 8506–8518, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2006.08.037>.
- [81] E. Barresi, A. Bruno, S. Taliani, S. Cosconati, E. Da Pozzo, S. Salerno, F. Simorini, S. Daniele, C. Giacomelli, A.M. Marini, C. La Motta, L. Marinelli, B. Cosimelli, E. Novellino, G. Greco, F. Da Settimo, C. Martini, Deepening the topology of the translocator protein binding site by novel *N,N*-dialkyl-2-arylindol-3-ylglyoxylamides, *J. Med. Chem.* 58 (2015) 6081–6092, <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00689>.
- [82] G. Trapani, M. Franco, L. Riccardi, A. Latrofa, G. Genchi, E. Sanna, F. Tuveri, E. Cagetti, G. Biggio, G. Liso, Synthesis and binding affinity of 2-phenylimidazo [1, 2-a] pyridine derivatives for both central and peripheral benzodiazepine receptors. A new series of high-affinity and selective ligands for the peripheral type, *J. Med. Chem.* 40 (1997) 3109–3118.
- [83] G. Trapani, M. Franco, A. Latrofa, A. Carotti, M. Serra, E. Sanna, G. Biggio, G. Liso, Novel 2-phenylimidazo[1,2- a ]pyridine derivatives as potent and selective ligands for peripheral benzodiazepine receptors: synthesis, binding affinity, and in vivo studies, *J. Med. Chem.* 42 (1999) 3934–3941, <http://dx.doi.org/10.1021/jm991035g>.
- [84] G. Trapani, V. Laquintana, N. Denora, A. Trapani, A. Lopodota, A. Latrofa, M. Franco, M. Serra, M.G. Pisu, I. Floris, E. Sanna, G. Biggio, G. Liso, Structure–activity relationships and effects on neuroactive steroid synthesis in a series of 2-phenylimidazo[1,2-*a*]pyridineacetamide peripheral benzodiazepine receptors ligands, *J. Med. Chem.* 48 (2005) 292–305, <http://dx.doi.org/10.1021/jm049610q>.
- [85] S.A. Hitchcock, L.D. Pennington, Structure–brain exposure relationships, *J. Med. Chem.* 49 (2006) 7559–7583, <http://dx.doi.org/10.1021/jm0606642i>.

**Titre :** Synthèse de nouveaux ligands pour l'imagerie de la neuroinflammation par Tomographie par Emission de Positons

**Mots clés :** Chimie médicinale, Radiochimie, Imagerie moléculaire, Neuroinflammation, TEP

**Résumé :** Mes travaux de thèse ont consisté au développement de nouvelles sondes moléculaires pour l'imagerie *in vivo* par Tomographie par Emission de Positons (TEP) de la neuroinflammation. Phénomène clé dans de nombreuses maladies neurodégénératives (maladie d'Alzheimer par exemple), la neuroinflammation se caractérise par l'activation de la microglie et la surexpression de biomarqueurs tels que la protéine de translocation 18 kDa (TSPO), mais aussi les récepteurs aux cannabinoïdes de type 2 (CB<sub>2</sub>R) et les récepteurs purinergiques P2Y<sub>12</sub> et P2Y<sub>14</sub>.

Mes travaux reposent sur la synthèse chimique de nouveaux ligands de ces quatre cibles biologiques choisies, leur évaluation *in vitro* et le radiomarquage isotopique des candidats les plus prometteurs par un émetteur de positons à vie brève (carbone-11 ou fluor-18).

La première partie de ma thèse a été consacrée à la TSPO, pour laquelle deux familles chimiques de ligands ont particulièrement été visées : les pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidines (tête de série DPA-713) et les pyridazino[4,5-*b*]indoles (tête de série SSR180575). Plusieurs séries de composés ont été synthétisées (25 molécules divulguées dans ce manuscrit) et évaluées

*in vitro* pour leur affinité et sélectivité pour la TSPO. Ces molécules contiennent pour la plupart un atome de fluor placé dans une position propice à un marquage ultérieur au fluor-18 ( $t_{1/2}$  : 109,8 min) tout en tenant compte de leur métabolisme *in vivo*.

La seconde partie de ma thèse a été dédiée au développement de ligands des CB<sub>2</sub>R pour lesquels une série originale de dérivés fluorés, basée sur le thiazol-2-ylidène A-836339, ont été synthétisés (7 molécules) et caractérisés *in vitro*. Enfin, la dernière partie de ma thèse s'est concentrée sur la synthèse de ligands des P2Y<sub>12</sub>R et P2Y<sub>14</sub>R avec, pour chacun de ces récepteurs, des séries distinctes de composés de type 6-aminonicotines et 5,6,7,8-tetrahydro pyrido[4,3-*d*]pyrimidines (11 molécules au total), et présentant des opportunités de marquage soit au fluor-18, soit au carbone-11 ( $t_{1/2}$  : 20,4 min).

Toute cible confondue, mon travail a également consisté, pour les candidats les plus prometteurs, à synthétiser les molécules dites « précurseurs de marquage » correspondantes, et à suivre leur radiomarquage et les premières évaluations *in vivo* de ces radiotraceurs par imagerie TEP chez le rongeur.

**Title:** Synthesis of novel ligands for imaging neuroinflammation with Positron Emission Tomography

**Keywords:** Medicinal chemistry, Radiochemistry, Molecular imaging, Neuroinflammation, PET

**Abstract:** My PhD thesis consisted in the development of new molecular probes dedicated to the *in vivo* imaging of neuroinflammation using Positron Emission Tomography (PET). Identified as a key phenomenon in neuro degenerative diseases (Alzheimer's disease for example), neuroinflammation is characterized by microglial activation and the surexpression of biomarkers such as the translocator protein 18 kDa (TSPO), the type-2 cannabinoid receptors (CB<sub>2</sub>R) and the purinergic receptors P2Y<sub>12</sub> and P2Y<sub>14</sub>.

This work relies on the chemical synthesis of new ligands consecrated to the four selected biological targets, their *in vitro* characterization and the radiolabeling of the most promising candidates by a short-lived positron-emitter (fluorine-18 or carbon-11).

The first part of my PhD was devoted to the TSPO, and two chemical families of compounds were investigated: the pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidines (lead: DPA-713) and the pyridazino[4,5-*b*]indoles (lead: SSR180575). Several series of new ligands have been synthesized (25

compounds disclosed in this manuscript) and *in vitro* characterized for their TSPO affinity and selectivity. Most of these molecules contain a fluorine atom located at a suitable position for fluorine-18 labeling ( $t_{1/2}$ : 109.8 min) taking their *in vivo* metabolism into account.

The second part of my work was focused on the development of CB<sub>2</sub>R ligands, for which a novel series of fluorinated derivatives based on the thiazol-2-ylidene A-836339 have been synthesized (7 compounds) and *in vitro* evaluated. Finally, the last part of my PhD concentrated on the synthesis of new P2Y<sub>12</sub>R and P2Y<sub>14</sub>R ligands with, for each receptor, distinct series (6-aminonicotines / 5,6,7,8-tetrahydropyrido[4,3-*d*]pyrimidines) of molecules (11 compounds) with the aim of a radiolabeling with fluorine-18 or carbon-11 ( $t_{1/2}$ : 20.4 min).

Whatever the target, my work also consisted, for the most promising candidates, in preparing the so-called "labeling precursors", following their radiolabeling and the first *in vivo* evaluation of these radiotracers by PET imaging in rodent.



