



HAL
open science

Stratégies innovantes pour le radiomarquage de macro-biomolécules au fluor-18 pour des applications en imagerie moléculaire in vivo

Mélanie Roche

► **To cite this version:**

Mélanie Roche. Stratégies innovantes pour le radiomarquage de macro-biomolécules au fluor-18 pour des applications en imagerie moléculaire in vivo. Chimie organique. Université Paris-Saclay, 2018. Français. NNT : 2018SACLS031 . tel-01717859

HAL Id: tel-01717859

<https://theses.hal.science/tel-01717859v1>

Submitted on 26 Feb 2018

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.

Stratégies innovantes pour le radiomarquage de macro- biomolécules au fluor-18 pour des applications en imagerie moléculaire *in vivo*

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Université Paris-Sud

École doctorale n°571 Sciences Chimiques : Molécules, Matériaux,
Instrumentation et Biosystèmes (2MIB)
Spécialité de doctorat : Chimie

Thèse présentée et soutenue à Orsay, le 6 février 2018, par

Mélanie Roche

Composition du Jury :

Sandrine Lamandé-Langle Maître de conférences, Université de Lorraine (SRSMC/CNRS)	Rapporteur
Vincent Levacher Directeur de recherche, Normandie Université (COBRA/CNRS)	Rapporteur
Emmanuelle Schulz Directeur de recherche, Université de Paris-Sud (ICMMO/CNRS)	Président
Bertrand Kuhnast Ingénieur chercheur, CEA	Directeur de thèse
Aurélie Maisonial-Besset Maître de conférences, Université de Clermont-Ferrand (UMR 1240/CNRS/INSERM)	Invité
Simon Specklin Ingénieur-chercheur, CEA	Invité

Remerciements

Je remercie très sincèrement Madame Sandrine Lamandé-Langle, maitre de conférences à l'université de Lorraine, et Monsieur Vincent Levacher, directeur de recherche à Normandie Université, pour l'honneur qu'ils me font en acceptant de juger ces travaux et d'en être les rapporteurs. Je remercie également Mesdames Emmanuelle Schulz et Aurélie Maisonial-Besset pour l'intérêt qu'elles veulent accorder à cette thèse en acceptant de juger ce travail.

Je ne pourrai continuer mes remerciements sans les adresser à mon directeur de thèse Bertrand Kuhnast pour m'avoir permis d'effectuer cette thèse dans le laboratoire de chimie/radiochimie ainsi que sa disponibilité à toujours répondre à mes questions pour m'aider à avancer. Sa motivation permanente, sa bonne humeur, et son soutien ont été précieux dans les moments où les manip ne voulaient jamais fonctionner, particulièrement sur le travail des fluoropyridines ainsi que pour son aide du début à la fin de la rédaction de ce manuscrit. Je le remercie aussi pour m'avoir permis de participer à plusieurs congrès internationaux.

Je tiens également à remercier Simon Specklin pour son aide précieuse que ce soit au laboratoire ou encore pour les analyses (RMN, spectrométrie de masse) parfois difficiles à interpréter ainsi que pour les corrections du manuscrit. Merci également pour ces deux années passées ensemble au laboratoire, tant pour me permettre d'améliorer ou pour m'apprendre de nouvelles compétences, mais aussi pour les moments hors recherche (nettoyage au laboratoire etc.).

J'adresse aussi mes remerciements à Frédéric Taran pour le début de la collaboration sur la chimie click avec les sydnones ainsi qu'à Lucie Plougastel pour la synthèse de la sydnone modèle et pour les repas hebdomadaires avec Fanny à Saclay.

Je souhaite également remercier tous les stagiaires, thésards, post-doc que j'ai pu croiser : Elodie, Sébastien, Rémi, et lui souhaite plein de réussite pour sa thèse ainsi que Mylène, seulement pour quelques semaines. Je remercie plus particulièrement Fanny, pour les nombreuses heures passées ensemble pendant mes deux premières années au laboratoire, ses nombreux conseils, et maintenant son soutien en dehors du travail.

Je remercie également les radiochimistes, Fabien Caillé, Stéphane Le Helleix, Stéphane Demphel et pour les dernières semaines avant la fin de mon contrat, Françoise Hinnen, pour leur bonne humeur permanente. Et particulièrement Bertrand et Françoise pour les nombreuses manip de radiochimie qui ont permis de compléter mes résultats.

Malgré une équipe très masculine, je souhaiterais remercier Marie-Anne, même si nous n'avons pas travaillé ensemble, pour les discussions plus féminines que nous avons pu avoir.

Pour les mêmes raisons, je remercie les deux infirmières Christine Baron et Christine Manciot pour leur sympathie et leurs conseils pour les petits bobos.

Je souhaite également remercier l'équipe des biologistes, Emilie Jaumain, Benoit Jego, Charles Truillet et Alexandra Winkeler pour les bons moments passés dans les couloirs, ou autour d'un café.

Un grand merci à l'équipe des « jeunes » pour les moments passés autour d'un verre après le travail : Benoit, Charles, Emilie, Fabien, Hayet, Manon et Simon.

Je souhaite également adresser ma reconnaissance à mes parents, ma sœur, mon frère et ma famille au sens élargi, qui ont su me soutenir pendant toute la durée de mes études et ce malgré des doutes, et parfois des échecs.

Enfin, je ne peux terminer mes remerciements sans les adresser à toi, Arnaud, pour m'avoir soutenue, rejoint, et surtout encouragée tout au long de la thèse malgré les nombreux échecs au laboratoire et surtout pendant cette période de rédaction, pendant laquelle les weekends n'étaient pas toujours rythmés de nombreuses activités comme nous avons toujours eu l'habitude de les organiser.

Table des matières

Remerciements	i
Table des matières	iii
Liste des abréviations	vii
Avant-propos	xi
Introduction.....	1
Chapitre 1. Objectifs du projet de thèse	3
Chapitre 2. Imagerie moléculaire	7
1. Généralités	7
2. Les différents types d'imagerie	8
3. Résumé sur les types d'imagerie	10
4. La médecine nucléaire	12
4.1. Les radioisotopes émetteurs de positons β^+	14
4.2. Radiotraceurs utilisés en imagerie TEP	16
Chapitre 3. Radiomarquage de macro-biomolécules	18
1. Intérêt des macro-biomolécules en imagerie	18
2. Le fluor-18 : production et radiochimie associée	19
2.1. Production du fluor-18	19
2.2. [^{18}F]Fluoruration par voie électrophile	20
2.3. [^{18}F]Fluoruration par voie nucléophile	22
3. Marquage de macro-biomolécules au fluor-18	25
3.1. Marquage indirect par approche prosthétique	25
3.2. Marquage direct	36
Chapitre 4. Chimie click	43
1. Généralités	43
2. Ligation de Staudinger	45
2.1. Généralités	45
2.2. Mécanisme réactionnel	45
2.3. Applications à la chimie du fluor-18	47
3. Cycloaddition 1,3 dipolaire	48
3.1. Généralités	48
3.2. Mécanisme réactionnel	49
3.3. Choix du catalyseur et du ligand	50
3.4. Applications au radiomarquage de macro-biomolécules avec du fluor-18	51
4. La chimie click contrainte	52
4.1. Généralités	52
4.2. Mécanisme réactionnel	53
4.3. Applications au radiomarquage de macro-biomolécules avec du fluor-18	55
5. La réaction de Diels-Alder à demande inverse en électrons	59
5.1. Généralités	59
5.2. Mécanisme réactionnel	59
5.3. Applications au radiomarquage de macro-biomolécules avec du fluor-18	60
5.4. Marquage <i>in vivo</i> par approche de pré-ciblage	61

6. Réaction thiol-Michael	64
6.1. Généralités	64
6.2. Mécanisme réactionnel	64
6.3. Applications au radiomarquage de macro-biomolécules avec du fluor-18	65
7. Bilan et rappel des objectifs	66
Résultats et discussion	71
Chapitre 1. Groupes prosthétiques pour la conjugaison par CuAAC et SPAAC	73
1. Réaction de CuAAC entre un azoture et un alcyne terminal	73
1.1. Résultats antérieurs	73
1.2. Objectifs	76
1.3. Analyse rétrosynthétique	77
1.4. Synthèse des groupes prosthétiques (références froides et précurseurs)	79
1.5. Synthèse des cystéines fonctionnalisées	83
1.6. Synthèse des références froides issues de la réaction de cycloaddition	84
1.7. Radiochimie	86
1.8. Conclusions	95
2. Réaction de SPAAC entre un azoture et un cyclooctyne contraint	96
2.1. Objectifs	96
2.2. Travaux réalisés	96
2.3. Radiochimie	98
Chapitre 2. Etiquette à motif pyridine pour la radiofluoration directe	101
1. Propriétés des pyridines	101
1.1. Généralités	101
1.2. Substitution nucléophile aromatique sur les pyridines	102
1.3. Synthèse des fluoropyridines en radiochimie	102
2. Résultats	105
2.1. Objectifs	105
2.2. Analyse rétrosynthétique	107
2.3. Synthèse des chloro- et fluoropyridines 21-27a et 21-27c	108
2.4. Synthèse des précurseurs triméthylammoniums b à partir des diméthylamines	115
2.5. Synthèse des pyridines fonctionnalisées par un triméthylammonium b par addition de triméthylamine aux 2-halogéno-pyridines a ou c	118
2.6. Stratégie alternative : synthèse des ammoniums quaternaires dérivés du DABCO	123
2.7. Stratégie alternative : Synthèse des ammoniums quaternaires à partir de 2-triflyloxy-pyridines	125
3. Conclusion et perspectives	126
Chapitre 3. Nouvelle réaction de click contrainte en chimie du fluor-18	128
1. Les sydnones	128
1.1. Généralités	128
1.2. Synthèse et fonctionnalisation des sydnones	129
1.3. Halogénéation des sydnones	130
1.4. Réactions de cycloadditions avec les sydnones	131
1.5. Cycloaddition sur les alcynes contraints	135
2. Synthèse des deux réactifs pour la réaction de SPSAC	139
2.1. Objectifs	139
2.2. Synthèse du BCN fluoré	140
2.3. Synthèse du DBCO fluoré	148
2.4. Synthèse de la sydnone modèle	150
2.5. Synthèse des références froides	151

2.6. Radiochimie	152
3. Conclusions	154
Chapitre 4. Marquage enzymatique	155
1. Etiquetage de protéines	155
1.1. Protéines auto-fluorescentes	155
1.2. Etiquetage chimique de protéines d'intérêt	156
1.3. Motifs de reconnaissance peptidiques	157
1.4. Etiquettes enzymatiques	159
1.5. Etiquette polypeptidique et catalyse enzymatique secondaire	161
1.6. Résumé et comparaison des différentes étiquettes	162
2. Applications	163
2.1. Applications <i>in vitro</i>	163
2.2. Applications <i>in vivo</i>	165
2.3. Applications pour l'imagerie TEP au fluor-18	166
3. Synthèse de dérivés de benzylguanine pour une application du SNAP-tag au fluor-18	168
3.1. Objectifs	168
3.2. Synthèse de la référence froide et des précurseurs de radiomarquage	168
4. Conclusion	174
Conclusion et perspectives	175
1. Cycloaddition catalysée au cuivre	177
2. Etude méthodologique de radiomarquage de pyridines	179
3. Cycloaddition contrainte, sans catalyse au cuivre	180
4. Marquage enzymatique	181
5. Perspectives	182
Experimental part	183
1. Organic synthesis	185
1.1. General information	185
1.2. Experimental procedures	186
2. Radiochemistry	241
2.1. General procedure for fluorine-18 radiolabeling	241
2.2. Fluorine-18 labelling of compounds	243
Bibliographie.....	249

Liste des abréviations

18-crown-6	1,4,7,10,13,16-Hexaoxacyclooctadécane
Ac	Acétyle
AFP	Autofluorescent protein
AGT	<i>O</i> ⁶ -Alkylguanine-DNA alkyltransferase
AM	Activité molaire
aq.	Aqueux/aqueuse
Asc	Ascorbate
BC	Benzylcytosine
BCN	<i>N</i> -[(1 <i>R</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>S</i>)-Bicyclo[6.1.0]non-4-yn-9-ylmethyloxycarbonyl]-1,8-diamino-3,6-dioxaoctane
BG	Benzylguanine
BirA	<i>E. coli</i> biotin ligase
Bn	Benzyle
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyle
BPS	Bathophenanthrolinedisulfonic acid (sel de bathophénanthroline disulfonate)
Bq	Becquerel
BSA	Albumine sérique bovine
BuLi	<i>n</i> -Butyllithium
c.d.	Corrigé de la décroissance
cat.	Catalytique
CCM	Chromatographie sur couche mince
CDI	1,1'-Carbonyldiimidazole
CT	Computed tomography
CuAAC	Copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition
CuSAC	Copper(I)-catalyzed sydnone-alkyne cycloaddition
Cy ₅	Cyanines émettant dans le proche infrarouge à infrarouge
δ	Déplacement chimique (RMN)
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane
DAST	Diethyl-amino-sulfur trifluoride
dba	Dibenzylidèneacétone
DBCO	Dibenzocyclooctyne
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimide
DCE	Dichloroéthane
DCM	Dichlorométhane
DIAD	Diisopropyl azodicarboxylate
DIEA	<i>N,N</i> -Diisopropyléthylamine
DMAP	4-Diméthylaminopyridine
DMF	Diméthylformamide
DMG	Diméthylglycine
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EDC	1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
eDHFR	<i>E. coli</i> dihydrofolate reductase
EGF	Epidermal growth factor (facteur de croissance épidermique)
éq./eq	Equivalent
Et	Ethyle

Et ₂ O	Ether diéthylique
Et ₃ N	Triéthylamine
EtOAc	Acétate d'éthyle
EtOH	Ethanol
EWG	Electron-withdrawing group (groupement électroattracteur)
FDG	2- Désoxy-2-fluoro- <i>D</i> -glucose
FDOPA	6-Fluoro-3,4-dihydroxyphénylalanine
FIAsH	Fluorescein arsenical helix binder
GFP	Green fluorescent protein
GP	Groupement partant
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
h	Heure
HATU	Hexafluorophosphate de (diméthylamino)- <i>N,N</i> -diméthyl(3 <i>H</i> -[1,2,3]triazolo[4,5- <i>b</i>]pyridin-3-yloxy)méthaniminium
HMDS	Bis(triméthylsilyl)amine
HOBt	Hydroxybenzotriazole
HPLC	High performance liquid chromatography (chromatographie liquide haute performance)
IEDDA	Inverse electron-demand Diels–Alder reaction (réaction de Diels-Alder à demande inverse en électrons)
IRM	Imagerie par résonance magnétique
<i>J</i>	Constante de couplage (en Hertz)
<i>k</i>	Constante de vitesse
K ₂₂₂	Kryptofix K ₂₂₂ 4,7,13,16,21,21-hexaoxa-1,10-diazabicyclo[8.8.8]hexacosane
LC-MS	Chromatographie en phase liquide-spectrométrie de masse
LDA	Diisopropylamidure de lithium
LUMO	Lowest occupied molecular orbital
Me	Méthyle
MeCN	Acétonitrile
MeOH	Méthanol
min	Minute
Mp	Melting point
MW	Molecular weight (masse moléculaire)
NBS	<i>N</i> -Bromosuccinimide
NCS	<i>N</i> -Chlorosuccinimide
ND/n.d.	Non déterminé/not determined
NFSI	<i>N</i> -Fluorobenzenesulfonimide
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimide
NIS	<i>N</i> -Iodosuccinimide
NMP	<i>N</i> -Méthyl-2-pyrrolidone
Nu	Nucléophile
PALM	Photoactivated localization microscopy (Microscopie par localisation photoactivée)
PBS	Phosphate-buffered saline
Pd/C	Palladium sur charbon
PEG	Polyéthylène glycol
Ph	Phényle
ppm	Partie par million
PPTase	Phosphopantéthéinyle transférase

PSMA	Prostate-specific membrane antigen
Py	Pyridine
Qté	Quantité
ReAsH	Resorufin arsenical helix binder
R _f	Rapport frontal
RGD	Tripeptide Arg-Gly-Asp
RhoBo	Rhodamine-derived bisboronic acid
RMN/NMR	Résonance magnétique nucléaire
ROS	Espèces réactives à l'oxygène
RRC	Rendement radiochimique
s	Seconde
SiFA	Silicon fluoride acceptors
SN	Substitution nucléophile
SNAr	Substitution nucléophile aromatique
SPAAC	Strain-Promoted azide-alkyne cycloaddition
SPSAC	Strain-Promoted sydnone-alkyne cycloaddition
t _{1/2}	Temps de demi-vie (période radioactive)
TA	Température ambiante
TBAF	Fluorure de tétrabutylammonium
TBS	<i>tert</i> -Butyldiméthylsilyle
TBTA	Tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amine
TBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium tetrafluoroborate
<i>t</i> Bu	<i>Tert</i> -butyle
<i>t</i> BuOH	<i>Tert</i> -butanol
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride
TCO	<i>Trans</i> -cyclooctène
TEMP	Tomographie par émission monophotonique
TEP	Tomographie par émission de positons
Tet	Tétrazine
Tf	Sulfonate de trifluorométhane
TFA	Acide trifluoroacétique
THF	Tétrahydrofurane
TMP	Triméthoprim
TMS	Triméthylsilyle
Ts	Tosyle (4-méthylbenzènesulfonyle)
TSTU	Tétrafluoroborate de [bis(diméthylamino)méthylène](2,5-dioxo-1-pyrrolidinyl)oxonium
TTTA	Tris[(<i>tert</i> -butyl)triazolylmethyl]amine
US	Ultrasons
UV	Ultraviolet

Avant-propos

✓ A propos de la thèse

Cette thèse a été réalisée du 2 décembre 2014 au 1^{er} décembre 2017, au Service Hospitalier Frédéric Joliot (SHFJ) à Orsay. Le SHFJ fait partie de l'Institut Joliot, 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 préclinique et clinique dans les domaines de l'oncologie et de 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). L'imagerie TEP permet d'obtenir des informations à la fois qualitatives et quantitatives dans le diagnostic de maladies. Cette technique utilise des radiotraceurs qui doivent être le plus spécifique possible d'un biomarqueur de la maladie. C'est pourquoi le radiomarquage de macro-biomolécules présente un intérêt croissant. Dans ce contexte, mes travaux de thèse ont consisté à développer de nouvelles méthodes de radiomarquage de macro-biomolécules au fluor-18 pour des applications en imagerie TEP *in vivo*.

✓ 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 l'imagerie moléculaire et plus précisément l'imagerie TEP, les méthodes de radiomarquage de macro-biomolécules au fluor-18, ainsi qu'une partie sur la chimie click, qui permet d'effectuer des réactions rapides pour le radiomarquage en deux temps, appelé marquage prosthétique. Au-delà du radiomarquage prosthétique classique, d'autres approches plus exploratoires permettant un marquage de la macro-biomolécule en une seule étape ou bien un marquage *in vivo* par pré-ciblage seront abordés. La deuxième partie du manuscrit est dédiée aux résultats de recherche obtenus, classés à la fois par vitesse croissante mais aussi par bioorthogonalité des réactions de conjugaison envisagées. 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 et de radiochimie qui ont été effectuées 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, finalise 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 ¹H) et du carbone (RMN ¹³C) ainsi que par son rapport frontal (Rf). Les points de fusion ont été systématiquement mesurés pour les composés obtenus sous forme de solide. Des analyses LC-MS ont été effectuées sur les composés nécessaires pour la publication en cours de rédaction.

✓ A propos des publications et communications

Une partie des travaux relatifs au sujet de thèse (CuAAC et SPAAC avec le dérivé de FPyZIDE) a permis l'écriture d'une publication qui devrait être soumise prochainement dans *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* ou *Journal of Fluorine Chemistry*. Les recherches effectuées ont également donné lieu à la présentation de plusieurs posters, dont l'International Symposium on Radiopharmaceutical Sciences (ISRS'17, Dresden, Allemagne), dans le domaine de la radiochimie ainsi qu'aux Rencontres Internationales de Chimie Thérapeutique (Caen, 2016) avec l'obtention d'un prix de poster qui a permis de financer la participation à ce même congrès l'année suivante à Toulouse en 2017.

Publications :

Chapitre de livre :

S. Specklin, F. Caillé, M. Roche, B. Kuhnast. Fluorine-18 radiolabeling of biologics. *Fluorine in Life Sciences: Pharmaceuticals, Medicinal Diagnostics, and Agrochemicals*. Elsevier, Inc., Cambridge, MA, USA, 2018, 9780128127339.

Publication en cours de rédaction:

M. Roche, S. Specklin, K. Générmont, B. Kuhnast. PEG-^[18F]FPyZIDE : a versatile prosthetic reagent for the fluorine-18-radiolabeling of biologics *via* copper-catalyzed or strained-promoted alkyne-azide cycloaddition. *J. Label. Compd and Radiopharm.* or *J. Fluorine Chem.*

Actes de congrès suite à des posters présentés lors de l'« International Symposium of Radiopharmaceutical Sciences » (ISRS'17, du 14 au 19 mai, Dresden):

M. Roche, S. Specklin, B. Kuhnast. ^[18F]FPyZIDE, new prosthetic group for the fluorine-18 radiolabeling of biologics *via* click chemistry. *J. Label. Compd and Radiopharm.* **2017**, 60 (Suppl. 1), S159.

M. Roche, S. Specklin, B. Kuhnast. Influence of the ring substituents to prepare 2-^[18F]fluoropyridines. *J. Label. Compd and Radiopharm.* **2017**, 60 (Suppl. 1), S252.

M. Roche, L. Plougastel, S. Specklin, F. Caillé, D. Audisio, F. Taran, B. Kuhnast. Copper-free sydnone-alkyne cycloaddition for the fluorine-18-radiolabeling of biologics. *J. Label. Compd and Radiopharm.* **2017**, 60 (Suppl. 1), S254.

Posters:

Présenté lors des Rencontres Internationale de Chimie Thérapeutique (RICT 2016, du 6 au 9 Juillet, Caen, France) avec obtention d'un prix de poster:

M. Roche, L. Plougastel, S. Specklin, F. Caillé, D. Audisio, F. Taran, B. Kuhnast. Copper-free sydnone-alkyne cycloaddition for the fluorine-18-radiolabeling of biologics.

Présenté lors du PSL Chemical Biology Symposium (2016, du 8 au 9 décembre, Paris, France):*

M. Roche, L. Plougastel, S. Specklin, F. Caillé, D. Audisio, F. Taran, B. Kuhnast. Fluorine-18-radiolabeling of biologics: application of copper-free alkyne-sydnone bioconjugation.

Présenté lors des Rencontres Internationale de Chimie Thérapeutique (RICT 2017, du 5 au 7 Juillet, Toulouse, France):

M. Roche, S. Specklin, B. Kuhnast. ^[18F]FPyZIDE, a new versatile prosthetic group for the fluorine-18 radiolabeling of biologics *via* click chemistry.

- ✓ Formations effectuées
- Techniques (22 h)
 - Zotero 8h
 - Formation complémentaire en radioprotection 14h
- Transversales (30 h)
 - Concrétiser et réussir son projet de mobilité internationale 5h
 - Les métiers de la R&D 4h
 - Les métiers hors R&D 7h
 - Workshop FLI « Imaging your career » 14h
- Scientifiques (40 h)
 - Colloque Lumière Paris Sud 8h
 - Ecole d'été LABEX Lermite « La chaîne du médicament » 18h
 - Journées doctorants 2MIB (novembre 2015) 7h
 - Journées doctorants 2MIB (novembre 2016) 7h

Introduction

Chapitre 1. Objectifs du projet de thèse

La Tomographie par Emission de Positons (TEP) est une technique d'imagerie non invasive et quantitative qui permet de suivre le devenir *in vivo* de radiotraceurs, molécules présentant un ciblage spécifique préalablement marquées avec un émetteur de positons. Les radionucléides les plus utilisés pour la TEP sont des émetteurs de positons à demi-vie brève tels que le carbone-11 ($t_{1/2} = 20,4$ minutes), le fluor-18 ($t_{1/2} = 109,8$ minutes) ou le gallium-68 ($t_{1/2} = 67$ minutes), ou des radiométaux à demi-vie longue tels que le cuivre-64 ($t_{1/2} = 12,6$ heures) ou le zirconium-89 ($t_{1/2} = 78,2$ heures).

Deux catégories de radiotraceurs se distinguent: les « petites molécules », la plus fréquemment rencontrée, et les macro-biomolécules (peptides, protéines, oligosaccharides, acides nucléiques). Le marquage de ces dernières est un défi chimique et un enjeu majeur pour l'imagerie moléculaire et la médecine nucléaire. Parmi les radioisotopes émetteurs de positons mentionnés ci-dessus, le fluor-18 représente un compromis particulièrement intéressant. En effet, il peut être produit à l'échelle de la centaine de GBq en cyclotron biomédical et son taux élevé de désintégration par émission β^+ ainsi que la faible énergie de son positon permettent d'obtenir des images de haute résolution tout en limitant la dose reçue au patient. De plus, sa période radioactive est suffisamment longue pour pouvoir concevoir des schémas de radiosynthèse multi-étapes. Cependant, contrairement aux « petites molécules », l'introduction directe du fluor-18 sur la macro-biomolécule n'est pas aisée à cause des conditions drastiques d'insertion de ce dernier lors du marquage (températures élevées, conditions très basiques). De telles approches existent mais restent rares et nécessitent la fonctionnalisation de la macro-biomolécule avec une étiquette spécifique pour l'introduction du fluor-18 (Figure 1 Marquage direct).

Une méthode pour pallier ce problème, et aussi la plus couramment employée, est l'approche prosthétique.

Les deux éléments clés de cette approche sont :

- **un groupe prosthétique**, qui agit comme un lien entre la macro-biomolécule et l'atome radioactif. Le groupe prosthétique est donc une petite molécule bifonctionnelle permettant d'introduire le fluor-18, dans les conditions habituelles dans un premier temps, puis de conjuguer ce groupe à la macro-biomolécule dans un second temps (Figure 1 Marquage prosthétique) grâce à une fonction chimique dédiée.
- le choix de **la réaction de conjugaison** du groupe prosthétique avec la macro-biomolécule.

La robustesse de cette approche tient au fait que la préparation du groupe prosthétique et la réaction de conjugaison sont dissociées permettant ainsi de garder un large choix de

réactions chimiques pour le radiomarquage du groupe prosthétique tout en assurant sa conjugaison avec la macro-biomolécule, dans des conditions non-destructrices pour cette dernière.

Une autre approche, plus innovante et particulièrement bien adaptée aux macro-biomolécules telles que les anticorps, est de réaliser le radiomarquage directement *in vivo* par stratégie de pré-ciblage (Figure 1 Marquage par pré-ciblage). Cette stratégie consiste à dissocier l'injection de la macro-biomolécule de celle du radiotaceur (ou effecteur radioactif) pour optimiser la durée de biodistribution spécifique et améliorer le rapport signal sur bruit vis-à-vis de la période du fluor-18. L'effecteur se lie *in vivo* à la macro-biomolécule soit par réaction chimique bioorthogonale soit par réaction enzymatique.

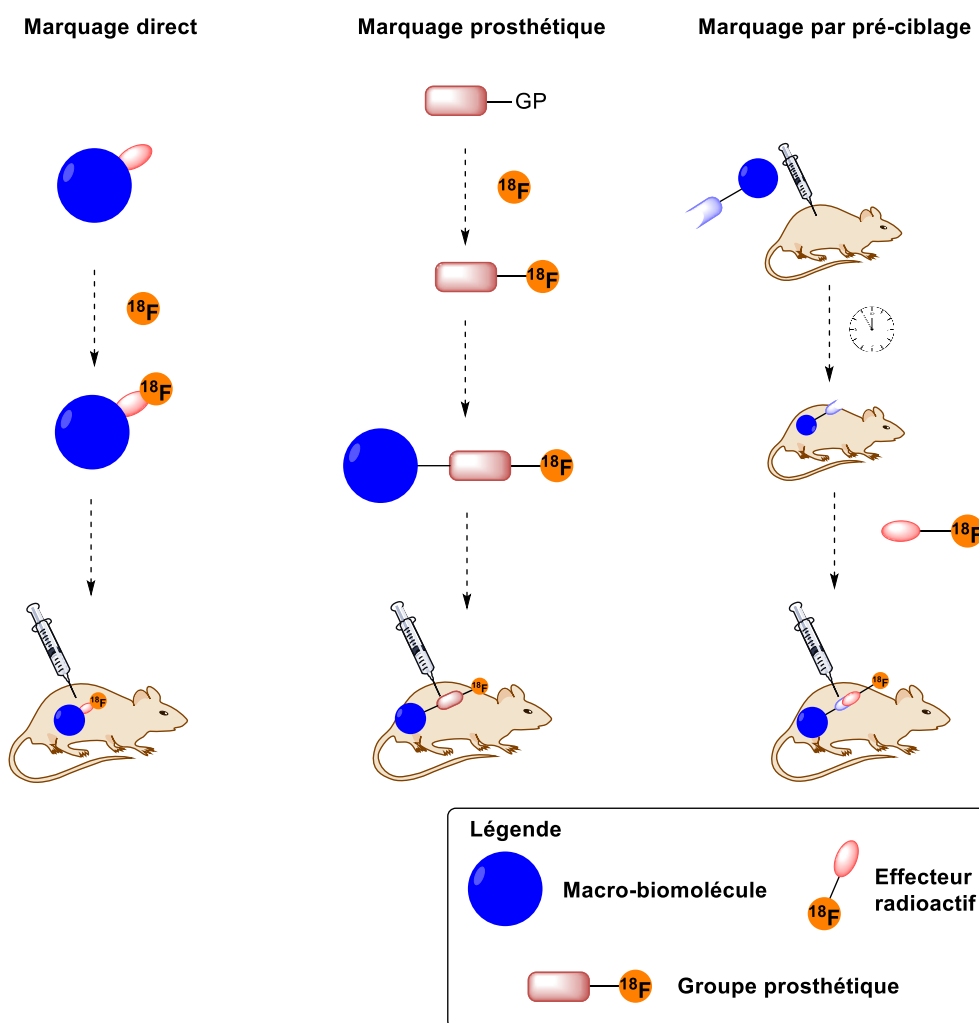


Figure 1. Approches pour le radiomarquage de macro-biomolécules au fluor-18

Au cours de ce travail de thèse plusieurs stratégies de radiomarquage de macro-biomolécules ont été explorées :

- Radiomarquage prosthétique par réaction de cycloaddition de Huisgen catalysée au cuivre(I) (CuAAC): Des groupes prosthétiques dérivés de fluoropyridines fonctionnalisées avec une entité azoture ou alcyne ont été synthétisés. Le

radiomarquage au fluor-18 de ces groupes prosthétiques a été réalisé et la cinétique de conjugaison à une cystéine fonctionnalisée étudiée. Cependant, l'utilisation du cuivre pour la réaction de cycloaddition peut être néfaste pour la macro-biomolécule et exclure une utilisation *in vivo* (Figure 2 – encadré orange).

- Radiomarquage prosthétique par réaction de cycloaddition sans catalyse au cuivre : Afin de pallier les problèmes potentiels engendrés par l'utilisation du cuivre et d'augmenter la vitesse de réaction de conjugaison, deux modèles de groupes prosthétiques sur la base de cyclooctynes ont été développés. Ils ont été radiomarqués au fluor-18 et utilisés dans 2 types de cycloaddition :
 - Strained Promoted Alkyne Azide Cycloaddition (SPAAC) : la cinétique de réaction des cyclooctynes radiomarquées avec un azoture modèle a été étudiée.
 - Strained Promoted Sydnone-Alkyne Cycloaddition (SPSAC) qui utilise une sydnone (hétérocycle aromatique mésoionique) et dont la vitesse de réaction est augmentée par rapport à la SPAAC (Figure 2 – encadré vert).

Au-delà de l'approche prosthétique classique, d'autres stratégies plus exploratoires ont été abordées au cours de cette thèse :

- Vers un marquage direct de la macro-biomolécule par pré-conjugaison d'une étiquette à motif pyridine : une étude méthodologique sur la réactivité des pyridines substituées a été effectuée, en vue de marquer la macro-biomolécule en une seule étape. Une série de pyridines avec des groupements permettant de renforcer son caractère électrodéficient a été étudiée. Une étude des conditions de radiomarquage, notamment la température de réaction, sera initiée. (Figure 2 – encadré rouge).
- Approche enzymatique : Une dernière stratégie a aussi permis de développer une méthode enzymatique innovante. Le SNAP-Tag, protéine de réparation de l'ADN mutée, dont le substrat est un dérivé de la benzyle guanine et qui permet de radiomarquer covalamment une protéine de fusion (protéine d'intérêt + SNAP-Tag) a été étudié. Un dérivé de benzylguanine a été synthétisé et son radiomarquage au fluor-18 est en cours. (Figure 2 – encadré violet).

Dans le cadre d'applications *in vivo*, les réactions de click sans cuivre, tout comme l'approche enzymatique, pourraient servir à un radiomarquage de la macro-biomolécule d'intérêt par stratégie de pré-ciblage.

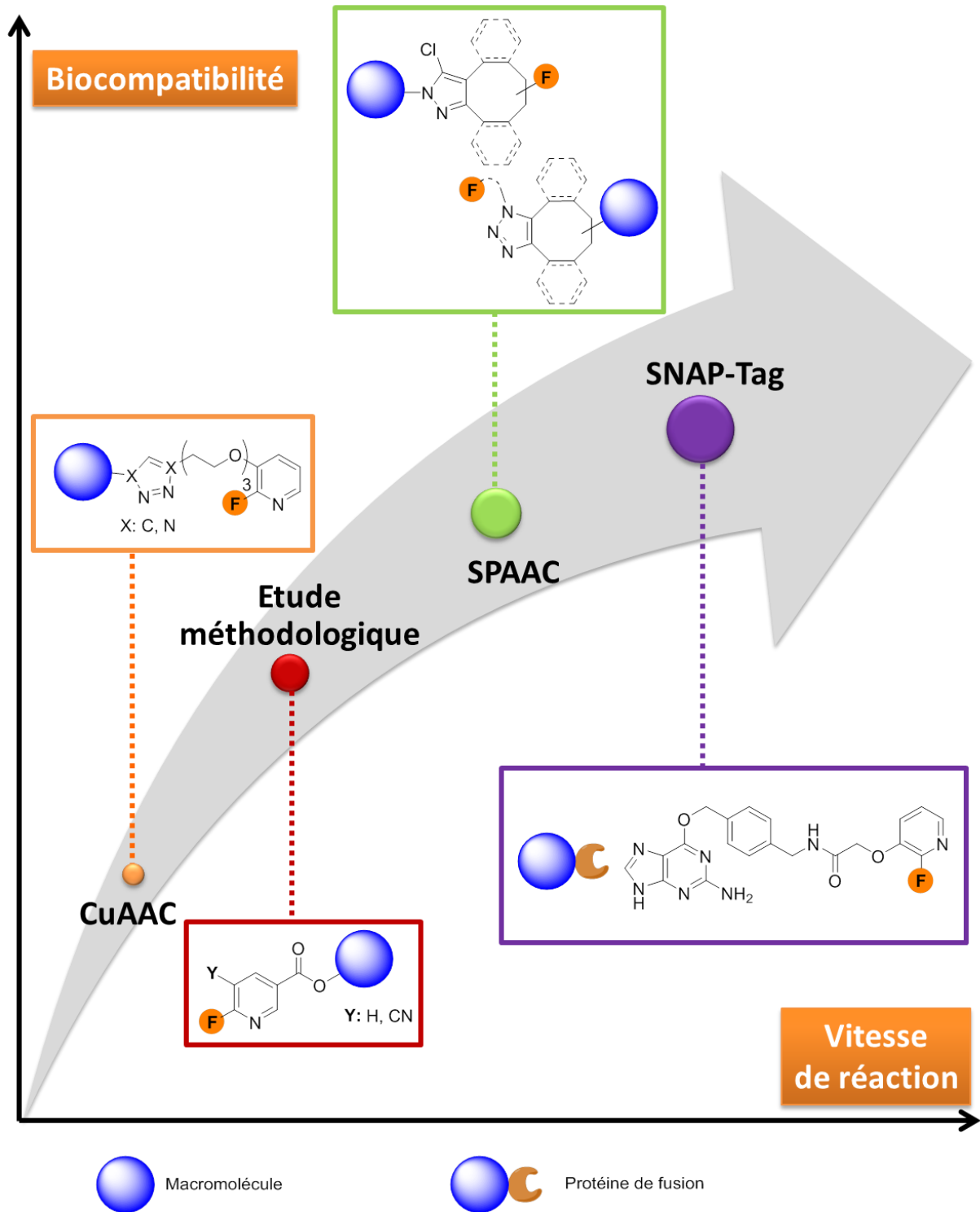


Figure 2. Projet de thèse : approche globale

Chapitre 2. Imagerie moléculaire

1. Généralités

L'imagerie moléculaire est une discipline scientifique dont le but est d'observer les processus biologiques en temps réel au niveau cellulaire et moléculaire directement dans les cellules, les tissus et même chez des sujets vivants dans le cadre d'applications précliniques et médicales. Cette observation se fait grâce à un ensemble de techniques d'imagerie non, ou faiblement, invasives permettant de visualiser un système biologique donné tout en minimisant sa perturbation. Chaque technique d'imagerie moléculaire utilise une instrumentation spécifique seule ou en combinaison avec des agents d'imagerie. Les données obtenues permettent d'identifier, de caractériser et de comprendre des processus physiologiques et physiopathologiques au niveau cellulaire et moléculaire. Grâce au développement de nouvelles méthodes ou de nouveaux composés, l'imagerie moléculaire promet d'énormes progrès en termes de diagnostic, de suivi thérapeutique, de développement de médicaments et aussi de compréhension des mécanismes à l'échelle nanoscopique telles que les interactions protéine-protéine et les transformations enzymatiques.

L'exploration d'un phénomène biologique spécifique en imagerie moléculaire suit en général plusieurs étapes, qu'il y ait développement d'un (radio)traceur ou non en fonction de la (des) modalité(s) d'imagerie qui sera(ont) utilisée(s) (Figure 3):

- 1) Identification du processus biologique (normal ou pathologique) d'intérêt
- 2) Choix d'une cible moléculaire spécifique pour visualiser le processus d'intérêt = choix du biomarqueur
- 3) Choix de l'instrument d'imagerie et design d'un agent d'imagerie si nécessaire
- 4) Synthèse chimique (et radiochimique pour la TEP et la TEMP) de l'agent d'imagerie
- 5) Caractérisation *in vitro* de l'agent d'imagerie
- 6) Caractérisation *in vivo* de l'agent d'imagerie et/ou de la pertinence de la technique d'imagerie sur modèles animaux (évaluation de la spécificité, sélectivité et éventuelle toxicité) = validation du biomarqueur
- 7) Modèles et algorithmes pour analyser les images
- 8) Translation en imagerie clinique si approbation par les agences réglementaires.

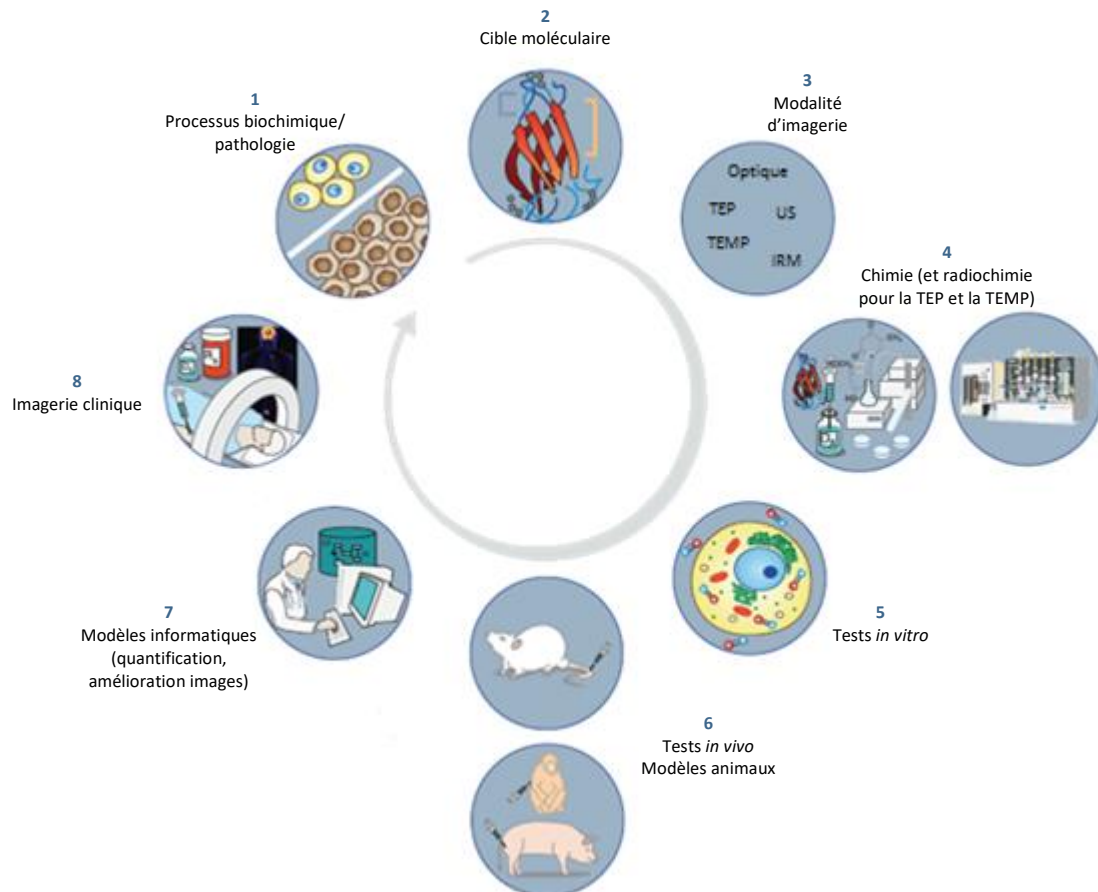


Figure 3. Etapes du processus de développement en imagerie (adapté de James et Gambhir¹)

2. Les différents types d'imagerie

a) Echographie

L'échographie est une méthode d'imagerie qui utilise des ondes ultra-sonores. Les ondes émises par le transducteur pénètrent dans les tissus et sont différemment réfléchies en fonction de la nature des tissus. Le transducteur reçoit ces ondes réfléchies qui transformées permettent d'obtenir des images. L'échographie permet d'étudier de nombreux organes de l'abdomen, du petit bassin ou du cou (thyroïde, foie, rate, pancréas, reins, vessie) ainsi que les vaisseaux sanguins, les ligaments et le cœur. Cette technique d'imagerie permet de visualiser par exemple une infection, une malformation ou une tumeur. De plus, elle est facile à mettre en œuvre mais ne peut cependant pas s'appliquer à l'observation du cerveau ou des organes contenant de l'air du fait que l'os et l'air sont de mauvais conducteurs des ondes sonores.

b) Imagerie par rayons X

Le principe du scanner consiste à mesurer l'absorption des rayons X par les tissus en fonction de la densité de ces derniers. On peut distinguer deux types de scanner : radiographie (planaire) et la tomodensitométrie (images tridimensionnelles). Il apparaît donc un contraste entre les tissus en fonction de leur densité; les os marquent le plus fort contraste. L'injection

d'un produit de contraste peut également être utilisée afin d'améliorer ce contraste. L'imagerie par rayons X est utilisée pour la visualisation de modifications de volumes ou d'anomalies de structures comme par exemple des infections, hémorragies, tumeurs ou ganglions etc. ainsi qu'en oncologie pour contrôler la réponse à une chimiothérapie.

c) Imagerie optique

L'imagerie optique est une méthode d'imagerie partiellement invasive et peut être classée en deux catégories : l'imagerie de fluorescence et l'imagerie de bioluminescence.

✓ L'imagerie de fluorescence

L'imagerie de fluorescence consiste en l'injection d'une sonde fluorescente qui émet dans le visible ou le proche infra-rouge. Suite à l'excitation de la sonde par un laser, sa désexcitation par fluorescence émet une radiation lumineuse qui est détectée par une caméra et permet ensuite de générer des images. Pour des applications *in vivo*, des sondes émettant dans le proche infra-rouge (700 à 900 nm) sont préférées pour limiter l'absorption de la lumière émise par les tissus (400 à 650 nm) et l'eau (> 900 nm). Cette gamme de longueur d'ondes de 700 à 900 nm est appelée « fenêtre de transparence des tissus ». En fonction des dispositifs utilisés, l'imagerie de fluorescence peut être utilisée chez le petit animal pour déterminer des processus biologiques au niveau cellulaire.

✓ L'imagerie de bioluminescence

L'imagerie de bioluminescence repose quant à elle sur la détection de luminescence émise par les organismes ou cellules vivantes exprimant ou générant par processus enzymatique des molécules émettant de la lumière (ex. luciférase). Ces enzymes sont introduites dans les cellules par transfection de gènes. Comme l'imagerie de fluorescence, la bioluminescence permet de déterminer des processus biologiques au niveau cellulaire.

d) Imagerie par résonance magnétique

L'imagerie par résonance magnétique nucléaire (IRM) est une technique d'imagerie non ionisante qui repose sur le principe de la résonance magnétique nucléaire. Elle permet d'obtenir des images en 2 ou 3 dimensions. Un champ puissant et stable est produit par un aimant supraconducteur autour du sujet en observation. Cet aimant, essentiellement par magnétisation des atomes d'hydrogène des molécules d'eau des tissus, permet d'aligner les moments magnétiques de spin non appariés, en parallèle ou en anti-parallèle. Un second champ magnétique oscillant, plus faible, appelé « radiofréquence » est alors appliqué de manière à modifier légèrement cet alignement. Le retour à l'alignement initial appelé relaxation génère un signal électromagnétique mesurable à partir duquel les images seront reconstruites. Des agents de contrastes (paramagnétiques tels que les complexes de gadolinium ou superparamagnétiques tels que des nanoparticules d'oxyde de fer) permettent d'augmenter le contraste des images en influençant le temps de relaxation des noyaux d'hydrogène des molécules d'eau environnantes. L'IRM permet essentiellement

d'obtenir des images anatomiques des tissus mais peut être également utilisée dans une approche fonctionnelle.

e) Imagerie nucléaire

L'imagerie nucléaire repose sur l'injection à un animal ou à un patient de traceurs radioactifs, puis sur la détection externe des rayonnements émis par la désintégration des radionucléides grâce à des gamma-caméras. Deux types d'imagerie nucléaire peuvent être différenciés, l'imagerie TEMP (Tomographie par Emission MonoPhotonique) et l'imagerie TEP (Tomographie par Emission de Positons). Ce sont des techniques d'imagerie fonctionnelle, c'est-à-dire qu'elles permettent de mesurer des processus biologiques dynamiques tels que des activités métaboliques, l'occupation de récepteurs ou la mesure de flux, sanguin par exemple.

✓ Imagerie TEMP

L'imagerie TEMP est basée sur la détection de traceurs émetteurs de rayonnement γ , comme l'iode-123 ou le technétium-99m. A partir des images en 3 dimensions des organes, il est possible d'observer la cinétique de distribution du radiotracer. Cette technique est utilisée pour la cancérologie, la cardiologie et l'imagerie cérébrale.

✓ Imagerie TEP

L'imagerie TEP est utilisée pour la détection de radiotraceurs marqués avec des émetteurs de positons. Elle permet de visualiser la distribution du radiotracer et de mesurer la concentration de la radioactivité dans différents organes, dont le cerveau. Elle est utilisée dans le cadre de maladies neurologiques, neuroinflammatoires, ou encore en oncologie et en cardiologie. Elle sera utilisée dans le cadre des travaux de cette thèse et sera donc présentée plus en détails dans : Introduction Chapitre 2. 4).

En imagerie nucléaire, les images ne présentent aucun repère anatomique, ces deux techniques sont donc acutellement toujours couplées à un scanner CT ou, plus récemment, à une IRM.

3. Résumé sur les types d'imagerie

Toutes les techniques d'imagerie présentées ci-dessus sont utilisées en préclinique, puis en clinique. L'imagerie optique reste partiellement invasive et elle est souvent utilisée en clinique *via* des méthodes préopératoires mini-invasives. (Figure 4).

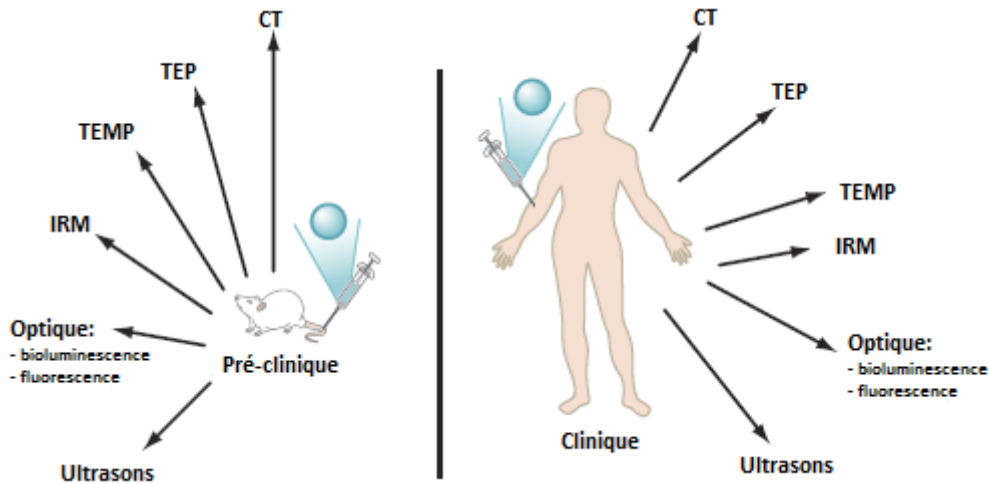


Figure 4. Applications de l'imagerie moléculaire *in vivo* en préclinique et en clinique (adaptée de James et Gambhir¹)

Les imageries optiques, TEMP et TEP sont très sensibles, ce qui signifie qu'elles peuvent être utilisées avec de faibles quantités d'agents d'imagerie (Tableau 1).² L'imagerie IRM est une méthode moins sensible mais intéressante puisqu'elle possède une très bonne résolution spatiale.

Modalité d'imagerie	Technique ionisante	Résolution spatiale	Pénétration tissulaire	Sensibilité de détection des agents d'imagerie	Utilisation
US	Non	0,01-0,1 mm (image surface) 1-2 mm (en profondeur)	mm-cm	10^{-12} M	Petit animal et clinique
CT	Oui	50-200 μ m (préclinique) 0,5-1 mm (clinique)	Illimité	ND	Petit animal et clinique
Fluorescence	Non	2-3 mm	< 1 cm	10^{-9} - 10^{-12} M	Petit animal et clinique
Bioluminescence	Non	3-5 mm	1-2 cm	10^{-15} - 10^{-17} M	Petit animal
IRM	Non	25-100 μ m (préclinique) 1 mm (clinique)	Illimité	10^{-3} - 10^{-5} M	Petit animal et clinique
TEMP	Oui	1-2 mm (préclinique) 8-10 mm (clinique)	Illimité	10^{-10} - 10^{-11} M	Petit animal et clinique
TEP	Oui	1-2 mm (préclinique) 5-7 mm (clinique)	Illimité	10^{-11} - 10^{-12} M	Petit animal et clinique

* ND : Non déterminé

Tableau 1. Tableau comparatif des modalités d'imagerie

En résumé, chacune des modalités d'imagerie permet d'obtenir des informations différentes et souvent complémentaires. Elles peuvent être utilisées seules ou combinées. Par exemple, l'imagerie TEP est souvent utilisée avec un scanner CT ou, plus récemment, avec une IRM afin d'obtenir des informations anatomiques en plus de l'information fonctionnelle. L'imagerie TEP est une modalité d'imagerie attrayante, puisqu'elle permet d'obtenir des informations à la fois qualitatives et quantitatives en utilisant des doses faibles de radiotraceurs.

4. La médecine nucléaire

La médecine nucléaire permet, grâce à des radioéléments, de diagnostiquer (imagerie) ou soigner (radiothérapie) des patients. Le radiopharmaceutique, médicament clé de la médecine nucléaire, est une molécule contenant un isotope radioactif ayant un ciblage biologique spécifique. Le radiopharmaceutique, une fois injecté au patient, se fixe sur la cible d'intérêt (organe ou tissu biologique). Dans le cas de la radiothérapie, les rayonnements (énergie) émis par des radioisotopes adaptés (émetteurs de particules α ou β^-) sont absorbés à très courtes distances afin de détruire des cellules tumorales par exemple (thérapie vectorisée ou métabolique). Dans le cadre du diagnostic en imagerie, les rayonnements de nature électromagnétique sont captés par un dispositif de détection externe qui permet de localiser les zones d'accumulation du radiopharmaceutique de manière à la fois qualitative et quantitative. L'imagerie nucléaire est une technique considérée comme non invasive puisqu'elle ne nécessite que l'injection du radiopharmaceutique par voie intraveineuse. Les quantités de matière injectées sont de l'ordre de la dizaine à quelques dizaines de nanomoles, on parle généralement de « micro-dosing ». De plus, la brève demi-vie physique de certains radioisotopes (^{18}F ou ^{11}C) permet de limiter la dosimétrie des patients.

La médecine nucléaire distingue deux types d'imagerie, l'imagerie TEMP (Introduction Chapitre 2. 2. e) et l'imagerie TEP.

a) Champs d'applications

L'imagerie TEP permet de suivre le devenir d'une molécule *in vivo* préalablement marquée avec un radio-isotope émetteur de positons. Les émetteurs de positons les plus utilisés en imagerie TEP peuvent être classés en deux catégories selon la chimie de radiomarquage : les isotopes métalliques (^{68}Ga , ^{64}Cu , ^{89}Zr) qui sont introduits sur la molécule d'intérêt par une liaison de coordination grâce à un groupement chélateur bifonctionnel et les isotopes non métalliques (^{11}C , ^{18}F) qui sont eux introduits par liaison covalente sur la molécule. L'imagerie TEP est une méthode d'imagerie fonctionnelle, c'est-à-dire basée sur l'observation du fonctionnement d'un organe et non sur son anatomie. Elle est le plus souvent combinée à une imagerie scanner CT, qui permettra de donner des informations anatomiques, qui ne sont pas obtenues par imagerie TEP seule. Une observation de la cinétique de biodistribution mais aussi la mesure de la concentration en molécule marquée accumulée dans un organe, pourront être évaluées. Elle permet ainsi d'étudier le fonctionnement de récepteurs ou d'enzymes. Plusieurs autres paramètres peuvent être mesurés en imagerie TEP tels que le débit sanguin, le volume sanguin, le pH intracellulaire ainsi que la consommation tissulaire en oxygène ou en glucose (dans le cadre de diagnostic de cancer par exemple). La précision des résultats est liée à la performance du tomographe, allant du détecteur de photons à la technique de reconstruction de l'image.

b) Principe physique

Le positon β^+ émis par l'atome radioactif parcourt un chemin dépendant de son énergie cinétique initiale, appelé parcours moyen (quelques millimètres au maximum). Dès que ce dernier a perdu toute son énergie et que son mouvement est quasiment égal à zéro, le choc obtenu avec un électron du milieu produit une réaction d'annihilation qui génère deux photons d'énergie égale à 511 keV émis à 180° l'un de l'autre, on parle alors de photons émis en coïncidence (Figure 5).

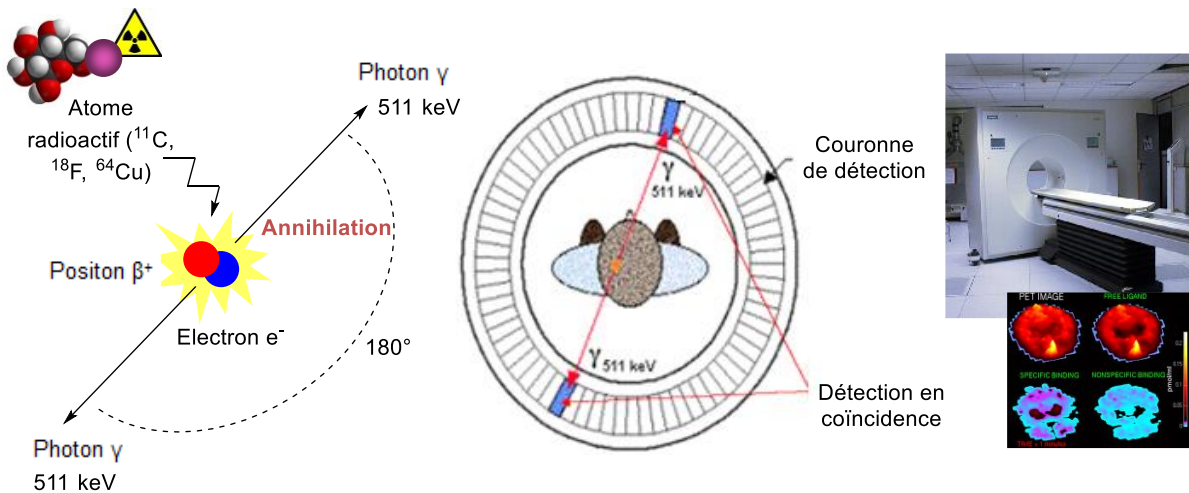


Figure 5. Schéma de principe de l'imagerie TEP

Le principe de l'imagerie TEP est basé sur la détection de ces photons émis en coïncidence par un système de cristaux scintillants et de collimation électronique. De nombreuses réactions d'annihilation se produisent dans l'organisme et, grâce à un système de fenêtre de coïncidence de 10 à 20 nanosecondes, le système est capable de détecter s'il s'agit de photons provenant du même positon ou non. Si les deux photons parviennent aux deux détecteurs, placés face à face, dans la fenêtre de coïncidence, l'appareil en déduit qu'il s'agit de deux photons issus de la même annihilation. L'un des deux photons peut arriver au détecteur avec un léger retard, dû au fait que l'annihilation n'a pas forcément lieu au centre de la ligne de coïncidence de ces deux détecteurs. La mesure du retard permet de détecter le lieu de l'annihilation et donc de la cible atteinte par le radiotracteur. Enfin, l'acquisition des données, puis leur traitement vont permettre d'obtenir des images tridimensionnelles.

Avant l'annihilation, le positon parcourt une distance de quelques millimètres. L'image finale obtenue, après traitement, donne donc la distribution statistique de tous les points d'annihilation, et non celle du radiotracteur, et donc de ses positons directement. Cette distance est déterminée par le parcours moyen du positon dépendant de son énergie initiale, qui sera différente selon les isotopes utilisés. En effet, plus l'énergie du positon sera faible, plus sa distance de parcours moyen sera courte et donc meilleure sera la résolution de l'image. La non-colinéarité des deux photons émis, qui peut être de l'ordre de $0,5^\circ$, résultant de l'annihilation d'un positon qui n'a pas perdu toute son énergie cinétique, est

aussi une limite en termes de résolution spatiale. Ces données permettent donc d'expliquer la raison pour laquelle la résolution, de l'ordre de quelques millimètres, des caméras TEP n'est pas idéale.

4.1. Les radioisotopes émetteurs de positons β^+

a) Propriétés

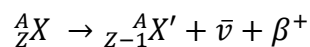
Les isotopes émetteurs de positons β^+ les plus couramment utilisés en imagerie TEP sont le carbone-11, le fluor-18, le cuivre-64, le gallium-68 et le zirconium-89.

Comme tous les autres radio-isotopes, ils se caractérisent par (Tableau 2):

- Une période (temps de demi-vie), définie comme l'intervalle de temps au bout duquel l'activité de l'isotope est divisée par deux. Cette valeur est obtenue à partir de la constante de désintégration λ , qui est caractéristique de chaque noyau radioactif.

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

- Un mode de décroissance. Un radionucléide β^+ se désintègre par émission d'un positon et d'un neutrino. Le noyau fils obtenu dans le cas du fluor-18, carbone-11, gallium-68 ou zirconium-89 est un noyau stable.



- Une activité molaire qui correspond à l'activité d'un radionucléide par unité de quantité de matière exprimée en mole. Une activité molaire maximale théorique est atteinte lorsque le radionucléide est pur, et est généralement évaluée pour une mole.

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

L'activité molaire est inversement proportionnelle à la période du radionucléide. En effet, pour une activité donnée, plus la période du radioélément est courte, plus la quantité de molécule marquée par un radioélément sera faible.

L'imagerie TEP présente une résolution spatiale acceptable (de l'ordre de quelques millimètres) et une grande sensibilité.² Grâce à ces caractéristiques, les quantités injectées chez les patients peuvent être faibles (de l'ordre de la dizaine à quelques dizaines de nanomoles). Les doses habituellement injectées chez un patient sont comprises entre 185 et 370 MBq, variant selon la nature du phénomène à observer ou selon le radiotraceur utilisé.³

Radioélément	Période	Activité molaire théorique (GBq.mol ⁻¹)	E _{max} (MeV)	Parcours maximal eau (mm)	Mode de décroissance (%)
Carbone-11	20,4 min	3,41.10 ¹¹	0,96	4,1	β ⁺ (99,8)
Fluor-18	109,8 min	6,33.10 ¹⁰	0,63	2,4	β ⁺ (96,9)
Gallium-68	1,13 h	1,02.10 ¹¹	1,89	8,2	β ⁺ (89)
Cuivre-64	12,7 h	9,13.10 ⁹	0,65	1,4	β ⁺ (17,5)
Zirconium-89	3,2 jours	/	0,90	3,8	β ⁺ (23)

Tableau 2. Principales caractéristiques physiques des isotopes émetteurs de positons β⁺

Le ¹¹C et le ¹⁸F sont les radioisotopes les plus utilisés en imagerie TEP, au moins en termes de diversité de molécules marquées. Le radiomarquage au carbone-11 présente l'avantage de pouvoir réaliser facilement des marquages isotopiques, c'est-à-dire remplacer un atome de carbone-12 par un atome de carbone-11, par un procédé radiochimique adapté. Ainsi le radiotraceur a la même structure chimique que la molécule d'intérêt et ses propriétés de ciblage *in vivo* ne seront pas altérées.⁴ Cependant, sa courte demi-vie restreint son utilisation à des radiotraceurs dont la distribution est rapide. Ce radioisotope n'est pas adapté au radiomarquage d'anticorps par exemple dont les pharmacocinétiques sont lentes. Le fluor-18, grâce à ses propriétés intéressantes (énergie maximale du positon plus faible, et donc meilleure résolution spatiale, temps de demi-vie plus long en comparaison avec le ¹¹C) est l'isotope le plus utilisé pour le radiomarquage en imagerie TEP.⁵ L'atome de fluor est peu présent dans les produits naturels mais de plus en plus fréquemment rencontré dans les médicaments. En effet, la substitution d'un atome d'hydrogène ou d'un groupement hydroxyle est considérée comme bioisostérique, et peut même créer de meilleurs pharmacophores.

Les radioéléments de type métalliques, tels le cuivre-64 et le zirconium-89 sont fréquemment utilisés pour le radiomarquage de macro-biomolécules grâce à leur demi-vie plus longue et aux conditions douces d'introduction (rapide, température moins élevée, milieu aqueux), comparativement à celles du fluor-18. Le gallium-68 a une période radioactive plus courte que le fluor-18 mais partage la même chimie de coordination que le cuivre-64 ou le zirconium-89. Il est essentiellement utilisé pour le radiomarquage de petits peptides à distribution rapide. Cependant, la complexation non covalente des radiométaux à la macro-biomolécule nécessite sa fonctionnalisation avec un groupement chélateur. Ce dernier peut d'une part risquer de modifier les propriétés pharmacologiques de la macro-biomolécule et d'autre part risquer de relarguer le radiométal *in vivo* si les propriétés de complexation ne sont pas optimisées (Figure 6).⁶

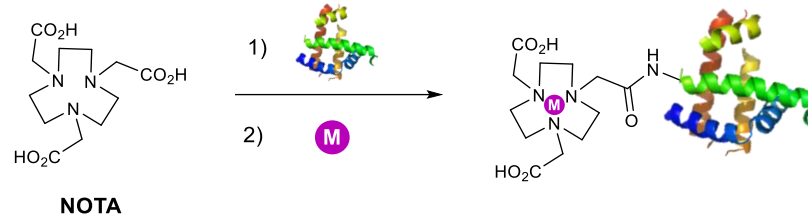


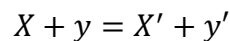
Figure 6. Stratégie générale de radiomarquage de macro-biomolécules avec un isotope métallique

b) Production des radioisotopes émetteurs β^+

Parmi les émetteurs de positons mentionnés ci-dessus (Tableau 2), tous sont produits dans un cyclotron sauf le gallium-68 qui est produit par un générateur $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$. Le germanium-68 (isotope parent), fixé sur une matrice, se désintègre à 100 % par capture électronique pour donner le gallium-68 qui peut être élué sélectivement de la matrice.

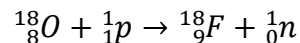
L'action combinée d'un champ magnétique et d'un champ électrique permet d'accélérer un faisceau de particules chargées dans le cyclotron. Elles parcourent une trajectoire en spirale depuis le centre du cyclotron jusqu'au bord tout en augmentant leur vitesse. Les radioisotopes sont ensuite obtenus par l'irradiation d'une cible, avec ce faisceau de particules accélérées à des énergies allant de quelques MeV à 70 MeV.

La cible, composée d'éléments stables, peut être liquide, gazeuse ou solide. La réaction de transmutation nucléaire peut alors s'écrire sous la forme :



- Avec : X : élément stable constituant la cible
- y : particule incidente (protons, deutons, noyau d'hélium)
- X' : radioélément généré
- y' : particule créée après réaction de transmutation nucléaire

Le fluor-18 peut de cette manière être obtenu avec un bombardement de protons sur des noyaux d'oxygène-18 (Équation 1) :



Équation 1. Equation de formation du fluor-18

4.2. Radiotraceurs utilisés en imagerie TEP

Les radiotraceurs possédant une AMM (Autorisation de Mise sur le Marché), peu nombreux, sont constitués de petites molécules. Les deux radiotraceurs les plus utilisés sont le 2-désoxy-2- ^{18}F fluoro-D-glucose (^{18}F FDG)⁷ et la 6- ^{18}F fluoro-L-DOPA (^{18}F FDOPA)^{8,9}. Le ^{18}F FDG, dérivé du glucose et qui a été le premier radiopharmaceutique à obtenir une AMM en 1998 permet de diagnostiquer avant tout les pathologies cancéreuses. En effet, la plupart des cellules cancéreuses ont un métabolisme énergétique augmenté et donc une

consommation accrue de glucose. Le [^{18}F]FDG est donc capté par ces cellules malades au même titre que le glucose. Néanmoins, du fait de la modification de la position 2 par le fluor-18, le [^{18}F]FDG, après une première étape de phosphorylation, n'est pas reconnu par les enzymes de la glycolyse et s'accumule dans les cellules. Cette accumulation est à la base de la détection des tumeurs et métastases par contraste avec les tissus sains environnants. Néanmoins le [^{18}F]FDG n'est pas spécifique et il s'accumule également naturellement dans les organes qui ont un métabolisme énergétique élevé (cœur, cerveau) ainsi que dans les foyers inflammatoires pouvant avoir divers origines. La [^{18}F]FDOPA est utilisée pour le diagnostic de la maladie de Parkinson et permet de détecter une perte fonctionnelle des terminaisons des neurones dopaminergiques dans le striatum.

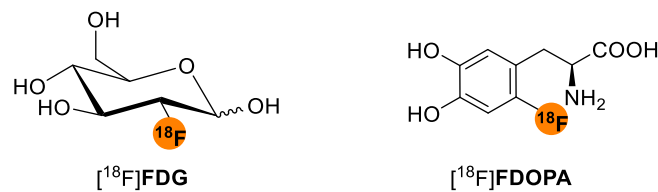


Figure 7. Molécules couramment utilisées en imagerie TEP

Comme dans le cas du [^{18}F]FDG, certains des radiopharmaceutiques déjà existants ne sont pas toujours totalement spécifiques vis-à-vis d'une maladie ou d'un processus donné. De plus, pour les petites molécules (par exemple pour le [^{18}F]FDG ou la [^{18}F]FDOPA), le radiomarquage reste spécifique à chaque molécule. En conséquence, le développement de méthodes générales permettant le radiomarquage de macro-biomolécules plus spécifiques (peptides, protéines, sucres, anticorps) apparaît donc comme particulièrement attrayante. Cependant, la fragilité des macro-biomolécules requiert l'utilisation de méthodes adaptées afin d'éviter la dénaturation de ces dernières.

Chapitre 3. Radiomarquage de macro-biomolécules

1. Intérêt des macro-biomolécules en imagerie

Le concept de « macromolécules » a été introduit pour la première fois en 1920 par Staudinger, qui a ensuite obtenu le prix Nobel de chimie en 1953, définissant le terme de « large molecule ». ^{10,11} Le terme de macro-biomolécules peut s'appliquer pour différents types d'entités moléculaires en fonction du point de vue scientifique mais avec comme idée commune que ces entités possèdent un grand nombre d'atomes (supérieur à 1000) et de ce fait un poids moléculaire élevé. Les biologistes se réfèrent aux quatre classes de « macro-biomolécules » qui composent le système vivant c'est-à-dire les acides nucléiques, les protéines, les carbohydrates et les lipides, tandis que du point de vue des chimistes, les macromolécules peuvent être étendues aux nanoparticules, aux agrégats, ou aux biomolécules synthétisées telles que les peptides, les oligonucléotides ou les polysaccharides.

L'utilisation de macro-biomolécules est intéressante puisqu'elle peut permettre des ciblage plus spécifiques et avec de meilleures affinités que les petites molécules. La forte affinité des macro-biomolécules pour leur cible peut s'expliquer par le fait que la reconnaissance se fait souvent par interactions entre domaines entiers et non pas simplement sur la base de quelques interactions électrostatiques discrètes entre le substrat et le site catalytique d'une enzyme ou d'un récepteur. Les anticorps, par exemple, présentent des affinités de reconnaissance pour leurs antigènes spécifiques avec des constantes allant jusqu'à 10^{-15} M. En termes de spécificité de reconnaissance, des aptamères (polymères d'acides nucléiques sélectionnés par technologie SELEX) ont été sélectionnés pour reconnaître sélectivement le 17β -estradiol ou le 17α -éthynylestradiol, deux stéroïdes de structure très proches. ¹² Enfin, les peptides présentent de manière générale de fortes affinités et sélectivités pour leurs cibles sans présenter le caractère immunogénique (toxique) que peuvent avoir les protéines ou les anticorps. De plus, la chimie de synthèse sur support solide ou des approches biotechnologiques permettent de produire des peptides originaux avec un grand nombre de modifications pouvant moduler leurs propriétés pharmacologiques, notamment la stabilité *in vivo*. Parmi les modifications qui peuvent être introduites, il sera possible de les fonctionnaliser avec des fonctions chimiques spécifiques permettant ensuite leur radiomarquage pour des applications en imagerie. Les peptides sont des molécules dont l'industrie pharmaceutique a largement reconnu l'intérêt dans l'arsenal thérapeutique et les applications en imagerie sont croissantes quoiqu'encore en retrait par rapport à la thérapie. ^{13,14} Reubi a démontré par exemple que la fonctionnalisation de dérivés de l'octréotide (octapeptide cyclique ciblant les récepteurs à la somatostatine de type 2 pour le diagnostic de certains cancers) avec des groupements chélateurs en vue d'un radiomarquage avec des radiométaux permettait d'améliorer la constante d'affinité du peptide pour son récepteur, atteignant des valeurs subnanomolaires (0,2 nM). ¹⁵

Parmi les émetteurs de positons présentés dans le chapitre précédent (Tableau 2), le fluor-18 apparait comme un bon compromis :

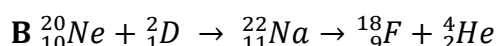
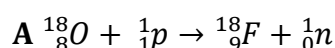
- Il est disponible au laboratoire (production quotidienne par les cyclotrons biomédicaux),
- Sa demi-vie est suffisamment longue pour envisager d'entreprendre des procédés de synthèse adaptés au radiomarquage de macro-biomolécules,
- Ses propriétés de désintégration sont presque optimales pour l'imagerie TEP en comparaison avec les autres émetteurs de positons.

D'un point de vue général, on distingue deux modes de marquage au fluor-18 découlant des deux formes physico-chimiques sous lesquelles il peut être produit: soit du fluor moléculaire $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ donnant accès à du fluor électrophile « $[^{18}\text{F}]\text{F}^+$ » soit des anions fluorures nucléophiles $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$.

2. Le fluor-18 : production et radiochimie associée

2.1. Production du fluor-18

Le fluor-18 peut être produit sous deux formes physico-chimiques : soit sous forme de fluor moléculaire $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ soit sous forme d'ions fluorures $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ (Équation 2). Dans les deux cas, l'accès au radioisotope se fait par bombardement de noyaux d'oxygène-18 par des protons accélérés à une énergie d'environ 18 MeV dans un cyclotron selon la réaction nucléaire $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$ (Équation 2 **A**). Si la cible dans le cyclotron est de l'eau enrichie en oxygène-18 ($\text{H}_2[^{18}\text{O}]\text{O}$), le fluor-18 sera obtenu sous forme d'anions fluorures $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ en solution dans l'eau. Cette production sans entraîneur conduira à du fluor-18 à haute activité molaire (111 à 370 GBq. μmol^{-1}). Si en revanche la cible est du dioxygène moléculaire enrichi en oxygène-18 ($[^{18}\text{O}]\text{O}_2$), le fluor-18 sera produit sous forme moléculaire $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$. Notons que le fluor-18 moléculaire peut également être produit selon la réaction $^{20}\text{Ne}(d,\alpha)^{18}\text{F}$ impliquant une cible de néon-20 irradiée par des deutons (noyaux de deutériums) à une énergie de 9 MeV (Équation 2 **B**). Dans les deux cas, l'addition de fluor moléculaire non radioactif est nécessaire pour réaliser l'échange isotopique $^{18}\text{F}\text{-}^{19}\text{F}$ afin de pallier le problème d'absorption du $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ sur la cible. L'inconvénient de ce mode de production avec entraîneur est la dilution isotopique engendrée par l'ajout de fluor-19 qui se traduit par une faible activité molaire.



Équation 2. Equations de formation du fluor-18 moléculaire

Plus récemment, une méthode multi-étapes a permis d'obtenir du $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ présentant une plus forte activité molaire, par substitution nucléophile, de l'iodure de méthyle, par des ions

[¹⁸F]fluorures, pour former le [¹⁸F]fluorure de méthyle.¹⁶ Ce dernier est ensuite soumis à une décharge électrique en présence de difluor pour obtenir le fluor moléculaire [¹⁸F]F₂ avec de meilleures activités molaires pouvant atteindre jusqu'à 55 GBq.μmol⁻¹.

a) Radiomarquage au fluor-18 et défis spécifiques des macro-biomolécules

Le radiomarquage de macro-biomolécules au fluor-18 doit à la fois tenir compte de certaines spécificités des macro-biomolécules, notamment leur « fragilité » chimique, et aussi de facteurs spécifiques à la chimie du fluor-18.

En chimie du fluor-18, les paramètres suivants doivent être pris en compte:

- Le temps total de préparation d'un radiotracer doit être adapté à la demi-vie du fluor-18. Ce temps comprend la radiosynthèse, la purification et également la formulation du composé pour une injection *in vivo*. Afin de réduire ce temps de réaction, l'isotope doit être, dans la mesure du possible, introduit lors d'une dernière étape.
- La chimie à l'état de traces. La quantité d'isotope fournie par le cyclotron est faible (pas plus d'une centaine de nanomoles d'ions [¹⁸F]fluorures), il se retrouve donc en large défaut par rapport aux autres réactifs. Ces conditions diminuent donc la vitesse de réaction.
- La synthèse de la référence ¹⁹F-fluorée est nécessaire; elle permettra de vérifier la formation du produit radioactif, par analyse chromatographique (HPLC, CCM), puisqu'il conserve le même temps de rétention ou R_f.
- Pour des raisons d'exposition aux rayonnements, la radiosynthèse s'effectue à l'aide d'un automate placé dans des cellules blindées par des parois de plomb. Cette automatisation contraint donc à synthétiser le radiotracer avec le moins d'étapes possibles car très souvent une seule purification HPLC est possible.

Afin de répondre à ces différentes exigences, des méthodes ont déjà été développées et sont décrites dans ce chapitre, après une introduction sur la chimie du fluor-18.

2.2. [¹⁸F]Fluoration par voie électrophile

Le champ d'application du fluor moléculaire [¹⁸F]F₂ se limite aux réactions d'addition et de substitution électrophiles aromatiques ou aux réactions de démétallation. Ces réactions ne sont pas régiosélectives (sauf dans le cas de la démétallation) et le fluor moléculaire présente un pouvoir oxydant important.

Pour pallier ces problèmes, d'autres composés inorganiques [¹⁸F]CF₃OF¹⁷, [¹⁸F]FCIO₃¹⁸, [¹⁸F]XeF₂¹⁹ ou [¹⁸F]AcOF²⁰, et organiques de type *N*-[¹⁸F]fluoro, dérivés du [¹⁸F]F₂ ont été synthétisés comme agents de fluoration électrophile (Figure 8).²¹⁻²³

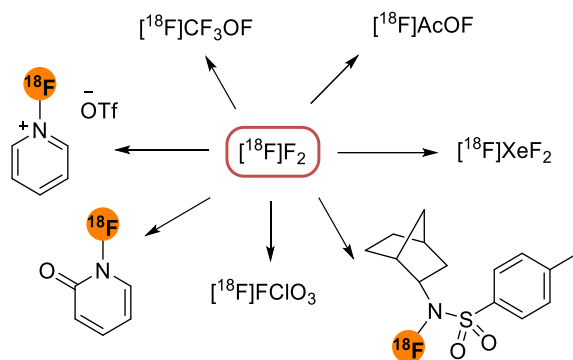


Figure 8. Synthèse des principaux agents de fluoration électrophile

En termes d'application au radiomarquage de macro-biomolécules, le $[^{18}\text{F}]$ hypofluorite d'acétyle ($[^{18}\text{F}]\text{AcOF}$), dérivé moins oxydant que le fluor moléculaire, a été utilisé pour le radiomarquage d'un peptide cycloRGDfMeV par le groupe de Ogawa en 2003 (Figure 9).²⁴ La réaction a permis d'obtenir le composé $[^{18}\text{F}]\text{-L2}$ majoritairement, avec le fluor-18 en position 2-, mais d'autres régioisomères ont été obtenus, et principalement le régioisomère comprenant le fluor-18 en position 4-.

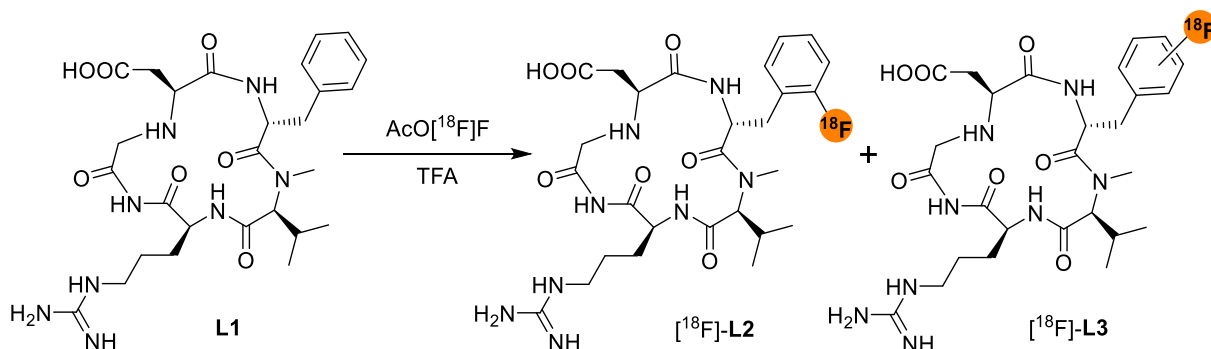


Figure 9. $[^{18}\text{F}]$ fluoruration d'un cycloRGDfMeV par voie électrophile en utilisant du $\text{AcO}[^{18}\text{F}]\text{F}$

Le dérivé $[^{18}\text{F}]\text{-L2}$ a été obtenu avec un rendement de 30 %. Les autres régioisomères monofluorés ont été obtenus avec un rendement global de formation égal à 30 %, et la formation d'un peptide difluoré a pu atteindre 10 % lorsque le rapport $\text{AcO}[^{18}\text{F}]\text{F}/\text{peptide}$ a été augmenté. L'activité molaire atteint seulement $29,6 \text{ MBq} \cdot \mu\text{mol}^{-1}$ puisque l'ajout de F_2 est nécessaire pour la production du $[^{18}\text{F}]$ fluor moléculaire.

Des études préliminaires avec l'hypofluorite d'acétyle non radioactif avaient montré que le résidu méthionine était plus rapidement oxydé en sulfone que la tyrosine ou la phénylalanine n'étaient fluorées. La réaction de fluoration a été effectuée dans des conditions acides (acides purs, TFA ou acide acétique), ce qui exclut l'utilisation de nombreuses macro-biomolécules naturelles ou synthétiques ainsi que de nombreux groupements protecteurs acido-labiles.^{25,26}

A ce jour, le radiomarquage au fluor-18 de macro-biomolécules par voie électrophile reste très peu utilisé à cause de ces nombreux inconvénients. La fluoration nucléophile permet d'obtenir des activités molaires plus élevées et est donc la méthode la plus utilisée pour le radiomarquage des macro-biomolécules.

2.3. [¹⁸F]Fluoruration par voie nucléophile

Les ions [¹⁸F]fluorures, issus de l'irradiation d'eau enrichie en oxygène-18 (H₂[¹⁸O]), sont la forme physico-chimique du fluor-18 la plus utilisée. Néanmoins, du fait de leur solvation dans l'eau, les ions [¹⁸F]fluorures ne sont que faiblement nucléophiles. Afin d'augmenter la nucléophilie des ions fluorures, une étape d'activation préliminaire avant le radiomarquage est requise. Ces derniers sont piégés sur une résine échangeuse d'anions, puis sont ensuite élués par une solution de carbonate alcalin (potassium ou césium) ou par une solution d'hydrogénocarbonate de tétrabutylammonium. Afin de limiter la solvation des ions [¹⁸F]fluorures, l'eau de la solution obtenue est éliminée par chauffage modéré sous flux d'hélium. Le résidu est ensuite mis en solution dans le solvant adéquat avant la réaction. Un solvant aprotique polaire tel que le DMF, le DMSO ou l'acétonitrile est utilisé pour la réaction de radiofluoruration, puisqu'il permet de renforcer le caractère nucléophile des ions fluorures. Afin de maximiser le caractère nucléophile des ions fluorures, des cations volumineux sont utilisés comme le césium et le tétraalkylammonium ou des cations moins volumineux comme le potassium, utilisé en combinaison avec des agents complexants tels que le Kryptofix-222 (K₂₂₂), ou le 18-crown-6.²⁷

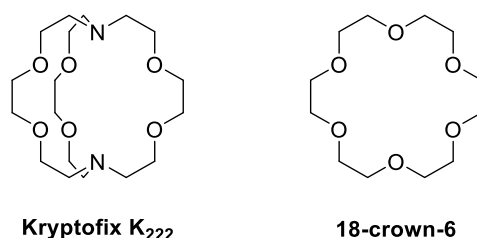


Figure 10. Structure du Kryptofix K₂₂₂ et du 18-crown-6

Deux catégories de substitutions nucléophiles peuvent être effectuées : la substitution en série aliphatique et la substitution en série aromatique.

a) Substitution nucléophile aliphatique

Le mécanisme réactionnel de la substitution nucléophile aliphatique s'effectue essentiellement par S_N2 en additionnant l'ion fluorure sur le carbone du substrat porteur du groupe partant (GP). Si l'addition s'effectue sur un centre chiral, cette attaque conduit à un inversement de configuration (Figure 11).²⁸

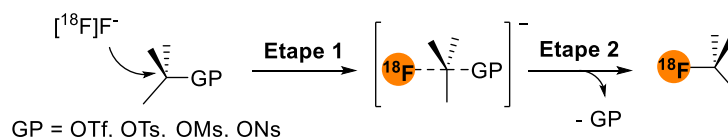
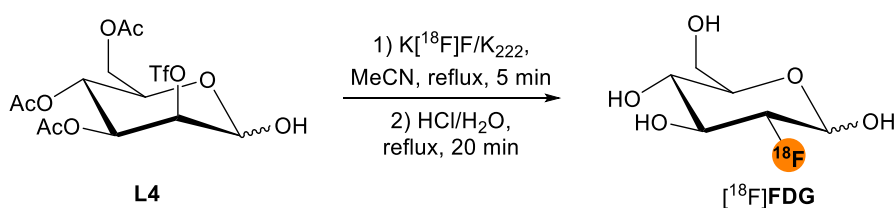


Figure 11. Mécanisme de substitution nucléophile aliphatique de type S_N2 pour le marquage au fluor-18

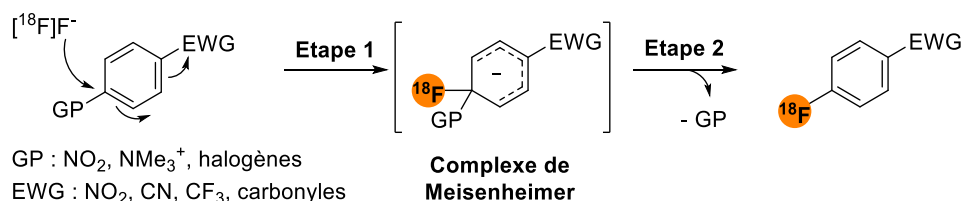
Les groupes partants les plus utilisés en série aliphatique pour le marquage au fluor-18 sont les groupements de type sulfonates (triflate, tosylate mesylate ou nosylate) ou les halogènes (Cl, Br, I) classés dans l'ordre de réactivité suivant : $RSO_3 > I > Br > Cl > F$. Le fluor peut aussi être utilisé, bien que n'étant pas le meilleur groupe partant, mais la dilution isotopique conduira à de faibles activités molaires.

Cette inversion de configuration est visible lors de la synthèse dans les conditions classiques du $[^{18}F]FDG$.²⁹ Le $[^{18}F]FDG$ est produit à partir du 2-triflate- β -mannose tétra-acétylé **L4** en présence de $K[^{18}F]F/K_{222}$ avec un rendement radiochimique de 70 % (activité molaire de $370 \text{ GBq} \cdot \mu\text{mol}^{-1}$) en moins de 30 minutes (Figure 12).

**Figure 12.** Synthèse du $[^{18}F]FDG$ à partir du mannose triflate²⁹

b) Substitution nucléophile aromatique

L'introduction du fluor-18 sur des structures aromatiques ou hétéroaromatiques se fait essentiellement par substitution nucléophile aromatique en utilisant des ions fluorures $[^{18}F]F^-$ puisque la substitution électrophile aromatique utilisant du fluor moléculaire $[^{18}F]F_2$ ou un de ses dérivés pose des problèmes de régiosélectivité et de formation de produits secondaires (Introduction Chapitre 3. 2.2). La réaction de substitution nucléophile aromatique nécessite cependant, dans la plupart des cas, la présence d'un groupement électroattracteur sur le noyau aromatique. Ainsi, l'addition initiale du fluor-18 est favorisée car le groupement électroattracteur (EWG), en position ortho- ou para- du groupe partant, permet de stabiliser le complexe de Meisenheimer grâce à une délocalisation de charges (Figure 13).²⁸

**Figure 13.** Mécanisme de substitution nucléophile aromatique S_NAr pour le marquage au fluor-18

Les groupes partants les plus utilisés dans le cadre de la substitution nucléophile aromatique sont les halogènes (Cl, Br, I), le nitro et le triméthylammonium classés dans l'ordre de réactivité suivant : $\text{NMe}_3^+ > F > \text{NO}_2 > \text{Cl} > \text{Br}$.²⁸ Les sels d'aryles triméthylammoniums sont très stables et permettent l'introduction du fluor-18 dans des conditions plus douces ainsi

que l'obtention de meilleurs rendements.³⁰ De plus, la purification HPLC en radiochimie de ces derniers, qui auront une polarité très différente du produit fluoré, sera d'autant facilitée. Le groupement électroattracteur inclut les groupements nitro-, trifluorométhyle et nitrile mais aussi les fonctions aldéhydes, cétones et esters avec un ordre de désactivation suivant : $\text{NO}_2 > \text{CF}_3 > \text{CN} > \text{CHO} > \text{COR} > \text{COOR}$.³⁰ La radiofluoruration nucléophile aromatique est habituellement effectuée dans un solvant polaire aprotique tel que le DMSO dans des conditions basiques, dues à la présence de carbonate de potassium, à des températures comprises entre 100 et 170 °C pendant 10 à 30 minutes.

L'emploi de dérivés de pyridines, par exemple, va permettre de faciliter la réaction de SNAr et les groupements activateurs ne seront pas nécessaires pour la substitution nucléophile hétéroaromatique avec des ions ^{18}F fluorures.³¹

Les conditions drastiques de fluoruration (température élevée, conditions basiques), incompatibles avec des fonctions chimiques sensibles ainsi que la nécessité d'avoir un groupement électroattracteur pour l'introduction du fluor-18 sont des contraintes majeures de la substitution nucléophile aromatique classique. D'autres méthodes récentes ne nécessitant pas de groupement électroattracteur ont alors été développées à partir de sels d'iodoniums, d'organoboranes ou encore d'ylures d'iode (Figure 14).

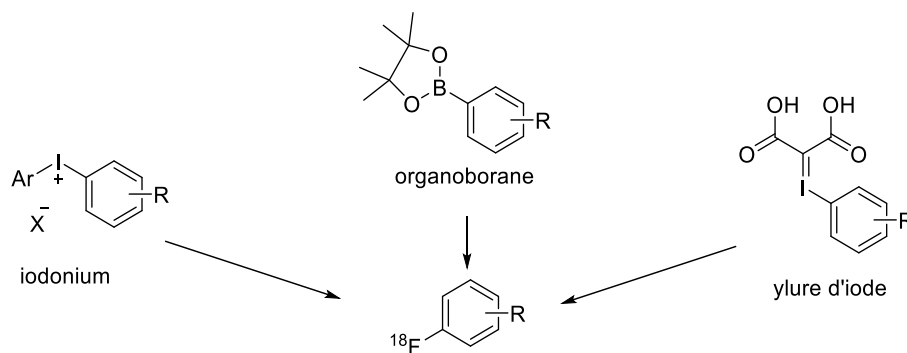


Figure 14. Précurseurs iodonium, organoborane ou ylure d'iode appliqués à la formation de ^{18}F fluoroaryles

Une méthode utilisant des sels de diaryles iodoniums dissymétriques a été développée afin de permettre l'introduction du fluor-18 à des températures plus faibles, pouvant être diminuées jusqu'à 130 °C (Figure 14).^{32,33} Cependant, la régiosélectivité de la substitution nucléophile aromatique n'est pas totale et peut générer la formation du ^{18}F aryle non souhaité issu du précurseur. Sur la base d'une méthode plus récente, de nombreux exemples de ^{18}F fluoruration à partir d'organoboranes (esters ou acides boroniques) aromatiques sont aujourd'hui décrits.³⁴ Par exemple, la ^{18}F FDOPA a été obtenue grâce à une catalyse au cuivre à partir de **L5** avec un rendement radiochimique de 40 % corrigé de la décroissance après déprotection (Figure 15).³⁵

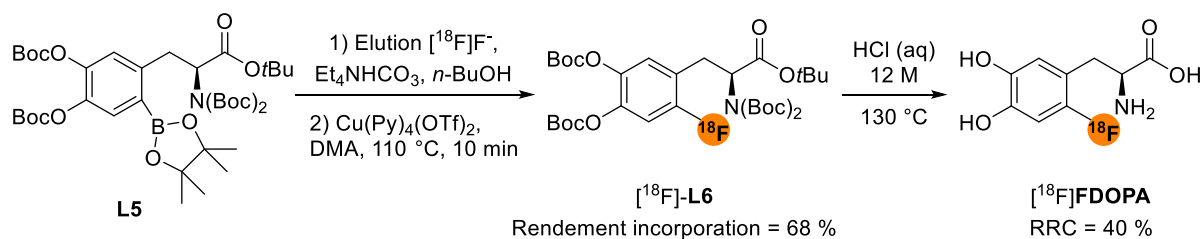


Figure 15. Radiosynthèse de [^{18}F]FDOPA à partir d'ester boronique

Enfin, quelques exemples de [^{18}F]fluoruration à partir d'ylures d'iode ont été rapportés, notamment la préparation du [^{18}F]FDPA, ligand de la TSPO 18 kDa, qui est un biomarqueur de la neuroinflammation ou le [^{18}F]N-benzylphényléthylamine, qui est un ligand des récepteurs à la sérotonine.^{36,37}

3. Marquage de macro-biomolécules au fluor-18

La fragilité des macro-biomolécules est en opposition avec les conditions drastiques d'introduction du fluor-18, liées à sa faible nucléophilie. Le radiomarquage de ces entités doit pouvoir être réalisé dans des conditions réactionnelles douces (température modérée), aqueuses et tamponnées, afin de ne pas dénaturer la macro-biomolécule. La première approche, indirecte, historiquement développée pour le radiomarquage de macro-biomolécules au fluor-18 dissocie formellement l'étape de radiofluoruration et le marquage de la macro-biomolécule. Cette approche, appelée « marquage prosthétique » consiste à préparer d'abord un synthon marqué au fluor-18 qui est ensuite conjugué à la macro-biomolécule. Certaines approches plus récentes utilisant la chimie du bore, de l'aluminium ou du silicium ont été mises à profit afin d'introduire le fluor-18 directement sur la macro-biomolécule après modification de cette dernière par l'un de ces éléments.

3.1. Marquage indirect par approche prosthétique

L'approche prosthétique est de loin la méthode la plus utilisée pour le radiomarquage de macro-biomolécules au fluor-18. Cette approche comprend deux étapes (Figure 16):

- Etape 1 : Préparation du groupe prosthétique qui est un synthon bifonctionnel possédant à la fois un site permettant le radiomarquage au fluor-18 (*i.e.* un groupe partant substituable par du fluor-18), et une fonction chimique réactive pour la conjugaison à la macro-biomolécule.
- Etape 2 : Conjugaison du groupe prosthétique à la macro-biomolécule.

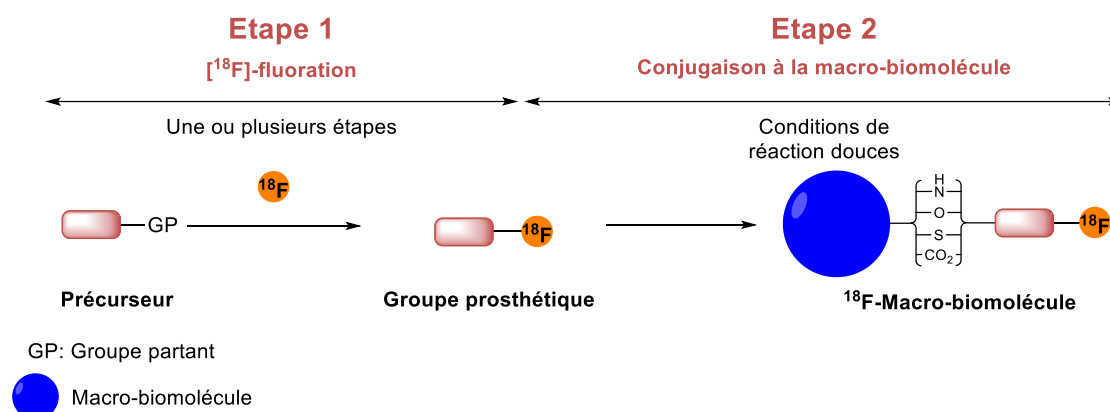


Figure 16. Stratégie générale du marquage au fluor-18 de macro-biomolécules par approche prosthétique

La conception du groupe prosthétique et le choix de la réaction de conjugaison doivent chacune répondre à plusieurs conditions présentées ci-dessous (Tableau 3).

Conception du groupe prosthétique (étape 1)	Réaction de conjugaison à la macro-biomolécule (étape 2)
Précurseur de marquage adapté permettant le radiomarquage au fluor-18 avec un haut rendement	Présence d'une fonction chimique « naturelle » ou auxiliaire pour la fonctionnalisation (amine, thiol, hydroxyle, acide carboxylique, azoture)
Préparation simple et rapide, idéalement en une seule étape	Conjugaison dans des conditions douces
Facilité d'automatisation	Régiosélectivité de la conjugaison
	Vitesse de la réaction de conjugaison
	Bioorthogonalité

Tableau 3. Conditions nécessaires pour l'utilisation d'un groupe prosthétique en vue du radiomarquage de macro-biomolécules

La fonction chimique de conjugaison sera choisie afin de permettre, autant que possible, une conjugaison efficace et régiosélective du groupe prosthétique sur la macro-biomolécule dans des conditions réactionnelles qui n'entraîneront pas de dégradation chimique ou biologique de cette dernière. Cette approche permet la préparation d'un large panel de groupes prosthétiques et donc le marquage de macro-biomolécules variées. Néanmoins, elle est nécessairement multi-étapes (au moins deux) due à la nécessité de préparer le groupe prosthétique puis de le conjuguer à la macro-biomolécule, ce qui peut être limitant au regard de la demi-vie du fluor-18 et de la possibilité d'automatiser le procédé. Par ailleurs, selon la fonction chimique de couplage, la régiosélectivité de la conjugaison ne pourra pas forcément être assurée du fait de la redondance de certaines fonctions chimiques sur la macro-biomolécule (e.g. fonctions amines sur des protéines). Cette méthode présente donc à la fois de nombreux avantages mais aussi des inconvénients relatifs à la spécificité de

manipulation du fluor-18 et à sa mise en place sur automates dans des enceintes blindées (Tableau 4).

Avantages	Inconvénients
Dissociation de la réaction de fluoration et du marquage de la macro-biomolécule permettant une conjugaison dans des conditions non destructrices	Synthèse multi-étapes pénalisante au regard de la demi vie du fluor-18
Large gamme de groupes prosthétiques dont les caractéristiques chimiques peuvent varier	Difficultés d'automatisation dues à la synthèse multi-étapes
Large panel de macro-biomolécules radiomarquables	Problème de régiosélectivité qui peut entraîner une perte d'activité biologique de la macro-biomolécule

Tableau 4. Avantages et inconvénients liés à l'approche prosthétique

L'approche prosthétique peut être divisée en deux catégories :

- Conjugaison du groupe prosthétique sur la macro-biomolécule native, sans modification préalable,
- Conjugaison du groupe prosthétique sur une macro-biomolécule fonctionnalisée.

Afin d'illustrer ces deux catégories, et en relation directe avec les objectifs de ce travail de thèse, les différentes applications de l'approche prosthétique seront exemplifiées sur le radiomarquage de peptides dans la suite de ce chapitre.

a) Conjugaison native

Les peptides, polymères de plusieurs acides aminés, possèdent de nombreuses fonctions chimiques qui peuvent servir de site de conjugaison pour le radiomarquage natif, donc sans modification préalable (Figure 17). La fonction amine en position *N*-terminale ainsi que celle de la chaîne latérale des lysines et la fonction thiol de la chaîne latérale des cystéines, sont les points d'ancrage les plus couramment utilisés dans cette approche. La fonction acide carboxylique peut aussi servir de site de conjugaison par le biais du *C*-terminal du peptide ou sur des chaînes latérales de l'acide glutamique ou de l'acide aspartique. La fonction phénol présente sur les tyrosines peut également permettre une fonctionnalisation. Le cas particulier d'une cystéine en position *N*-terminale peut permettre, quant à lui, la formation de thiazoline.

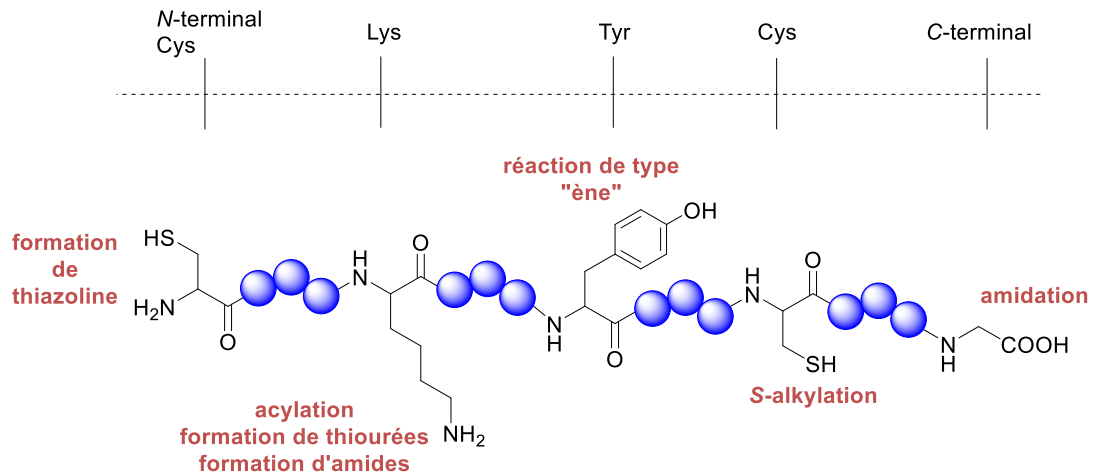


Figure 17. Fonctions chimiques d'un peptide permettant une conjugaison directe du groupe prosthétique

De nombreux groupements prosthétiques pour la conjugaison native à la macro-biomolécule ont été synthétisés selon des sélectivités bien définies (Figure 18):

- amines ($[^{18}\text{F}]\text{Py-TFP}$, $[^{18}\text{F}]\text{SFB}$),
- thiols ($[^{18}\text{F}]\text{FPyMe}$, $[^{18}\text{F}]\text{FBnBrA}$),
- phénols ($[^{18}\text{F}]\text{FS-PTAD}$),
- cystéines *N*-terminales ($[^{18}\text{F}]\text{FPyPEGCBT}$).

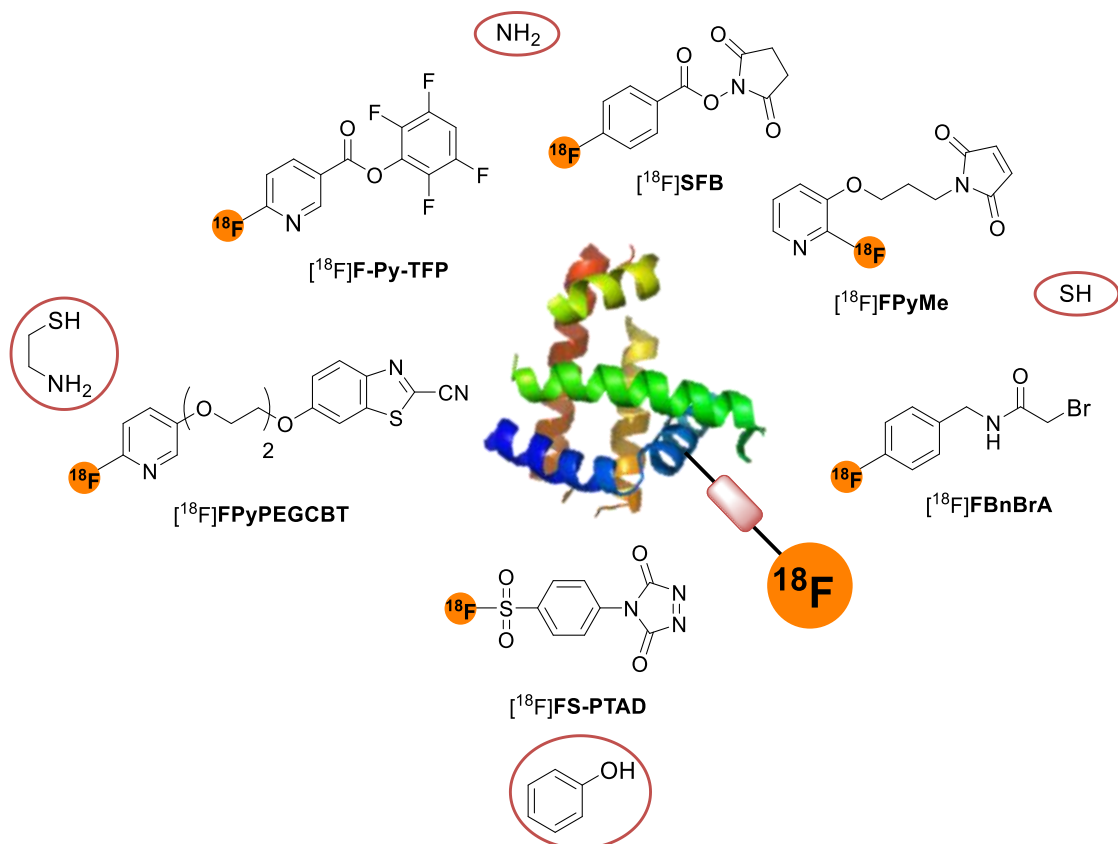


Figure 18. Exemples de groupements prosthétiques pour le radiomarquage de macro-biomolécules sans modification préalable

✓ Groupes prosthétiques sélectifs pour l'acylation des amines

Ces groupes prosthétiques sont les plus rencontrés pour le radiomarquage de peptides par acylation de la fonction amine *N*-terminale ou des résidus lysine. Une douzaine de groupes prosthétiques, dédiés à cette réaction de conjugaison, ont été synthétisés allant d'acides carboxyliques libres (acide [¹⁸F]fluoroacétique, acide [¹⁸F]fluoropropanoïque, acide [¹⁸F]fluorobenzoïque), conjugués à l'aide d'agents de couplage standards (EDC, DCC, TSTU, HATU), à des esters activés (*N*-succinimide, *p*-nitrophénol, tétrafluorophényle).¹¹ La préparation de ces groupes prosthétiques ne peut généralement pas se faire en une seule étape. En effet, la présence du proton labile sur l'acide carboxylique libre ou l'éventuelle hydrolyse du groupement activateur nécessitent de prendre des précautions particulières pour l'étape de fluoration. Le plus souvent, une protection de l'acide avec un ester d'alkyle permet de réaliser la première étape d'introduction du fluor-18 avec de bons rendements puisque cet ester jouera le rôle de groupement électroattracteur. L'acide libre, puis l'acide activé, en vue de la conjugaison, sont obtenus lors d'une deuxième et troisième étapes. Même si cette méthode est robuste, elle présente des inconvénients tels que la difficulté d'automatisation de ce processus multi-étapes ou encore le manque de régiosélectivité de la réaction d'acylation (marquage du *N*-terminal ainsi que de toutes les lysines présentes dans le peptide). Dans cette série, le composé le plus utilisé est l'ester de *N*-succinimidyl 4-[¹⁸F]fluorobenzoate ([¹⁸F]**SFB**), qui a été synthétisé selon deux voies de synthèse à partir de deux précurseurs de radiomarquage différents, soit le triflate de 4-triméthylammoniumbenzaldéhyde **L7**³⁸ ou l'acide triflate de 4-triméthylammonium benzoïque **L8**³⁹ (Figure 19). Dans les deux cas, l'aldéhyde et l'ester d'éthyle, positionnés en para du groupe partant (triflate de triméthylammonium) joueront le rôle de groupements électroattracteurs pour favoriser l'attaque du fluor-18. Le plus souvent, la réaction de fluoration est réalisée en utilisant le complexe de fluor-18 K[¹⁸F]F/K₂₂₂ dans le DMSO pendant 15 minutes à 120 °C permettant une incorporation du fluor-18 variant de 50 à 90 % selon les publications.¹¹ Les intermédiaires radioactifs obtenus (4-[¹⁸F]fluorobenzaldéhyde ou l'ester de 4-[¹⁸F]fluorobenzoate d'éthyle) sont oxydés (KMnO₄) ou saponifiés (NaOH) pour obtenir l'acide 4-[¹⁸F]fluorobenzoïque [¹⁸F]-**L9** de manière quantitative. Enfin, dans une dernière étape, l'acide est activé sous forme d'ester de succinimide pour obtenir le [¹⁸F]**SFB** avec des rendements de radiosynthèse variant de 30 à 60 % corrigés de la décroissance et des temps de synthèse allant de 35 à 100 minutes.^{38,39} La conjugaison au peptide se fait en milieu tamponné en quelques minutes à température ambiante. En dépit d'un procédé de radiosynthèse multi-étapes pouvant durer presque 2 heures, ce composé a encore été récemment utilisé pour le marquage du PSMA⁴⁰, pseudo dipeptide utilisé dans le diagnostic du cancer de la prostate, ou encore de l'insuline⁴¹.

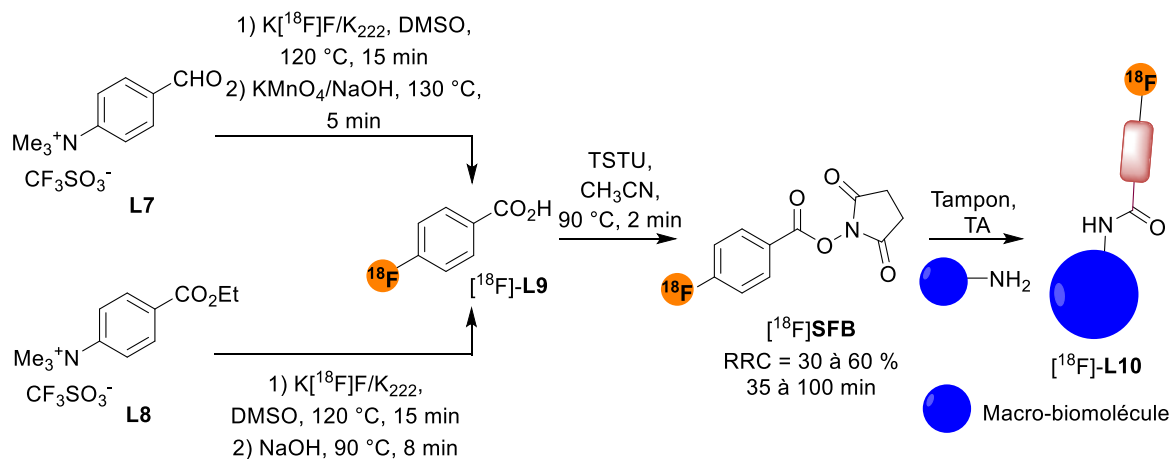


Figure 19. Synthèse du $[^{18}F]SFB$ puis conjugaison avec la macro-biomolécule

Récemment, Olberg *et al.* ont décrit la préparation d'un groupe prosthétique en une seule étape de radiosynthèse ($[^{18}F]F-Py-TFP$) pour l'acylation d'amines.⁴² Le noyau phényle a été remplacé par une pyridine et l'ester actif est un ester de tétrafluorophényle, permettant l'introduction du fluor-18 à une température de 40 °C. Ces résultats seront développés dans : Résultats et discussion Chapitre 2. 1.3. a) dans le but d'établir une étude méthodologique de radiomarquage à partir de pyridines activées.

D'autres réactifs possédant une fonction isothiocyanate^{43,44}, azoture d'aryle^{45,46}, amidoester⁴⁷ ou sultone⁴⁸ ont été développés pour réagir de manière spécifique avec les fonctions amines des peptides (*N*-terminal ou NH_2 d'un résidu lysine) pour former des thiourées, des azépines par photoactivation, des amidines et des amines β -sulfonylées (Figure 20). Leur utilisation reste cependant limitée.

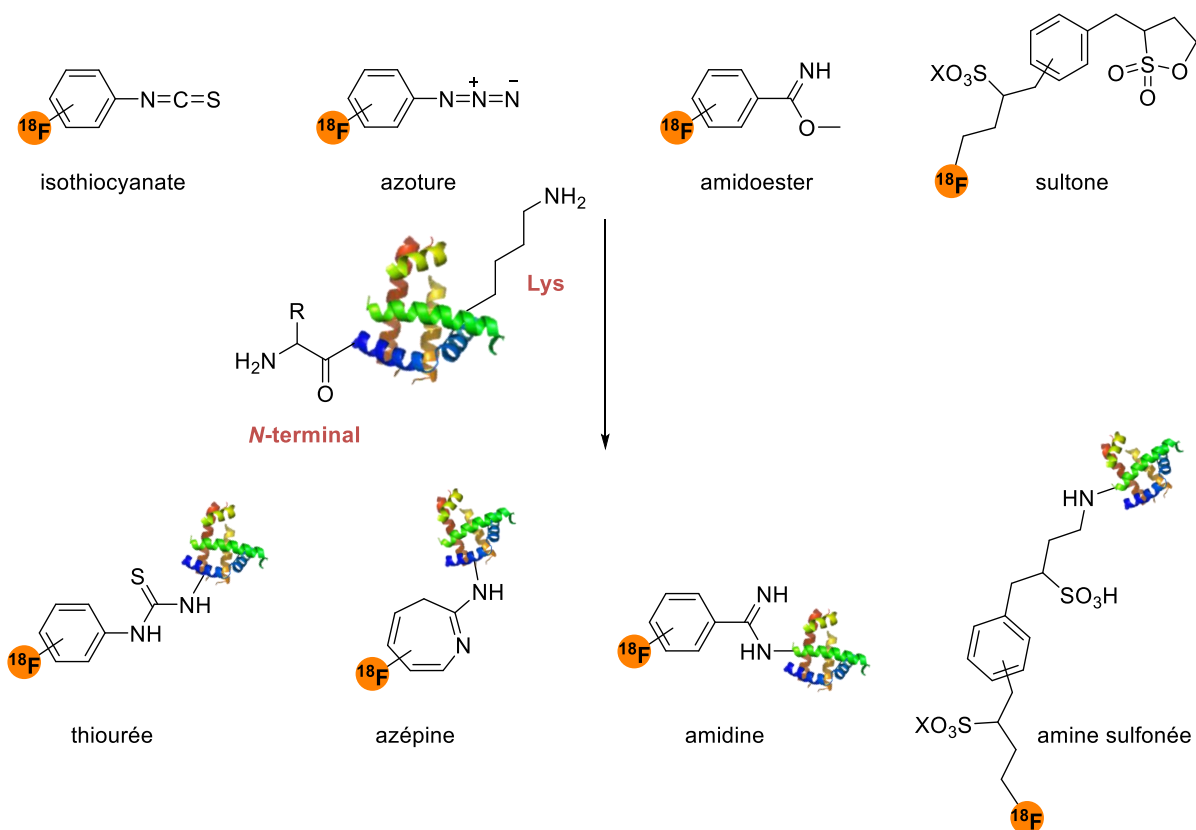


Figure 20. Fonctions isothiocyanate, azoture d'aryle, amidoester ou sultone pour la conjugaison sur une fonction amine

✓ Groupes prosthétiques sélectifs pour l'alkylation des thiols

La fonction thiol, présente sur les chaînes latérales des cystéines non impliquées dans des ponts disulfures, est la deuxième fonction la plus utilisée pour le radiomarquage par stratégie prosthétique. Les groupes prosthétiques sélectifs des thiols existants présentent des maléimides (^{18}F FPyMe)⁴⁹ ou des bromoacétamides (^{18}F FBnBrA), ces derniers ayant été initialement utilisés pour le marquage d'oligonucléotides 3'-phosphorothioate.⁵⁰ L'utilisation de groupes prosthétiques présentant une fonction maléimide pour une conjugaison par addition thiol-Michael seront décrits en détails dans : Introduction Chapitre 4. 6).

✓ Groupes prosthétiques sélectifs des phénols

Le groupe de Ban a développé de nouveaux composés diazodicarboxamides cycliques qui réagissent efficacement et sélectivement avec la fonction phénylhydroxyle des tyrosines par réaction de type « ène ».⁵¹ Cette approche a ensuite été appliquée, par le groupe de Al-Momani, au marquage de peptides sur la fonction phénol du résidu tyrosine ^{18}F FS-PTAD (Figure 21).⁵²

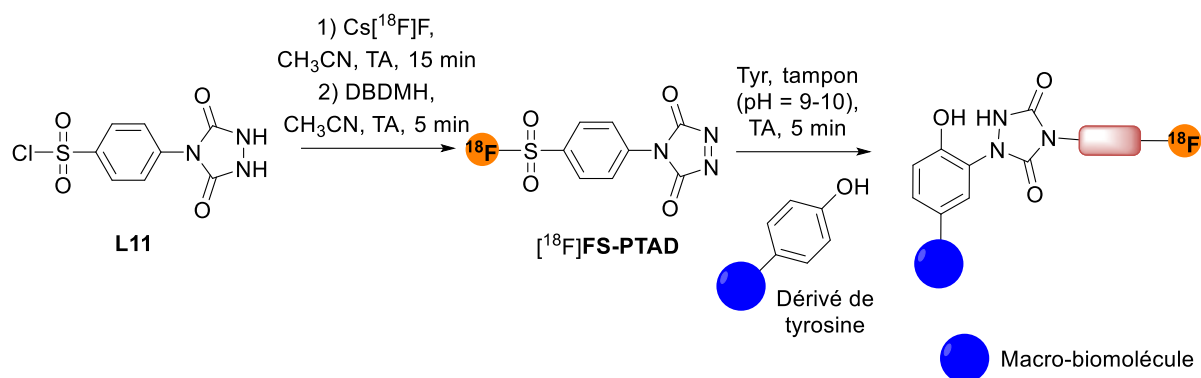


Figure 21. Radiosynthèse du $[^{18}\text{F}]\text{FS-PTAD}$ et marquage de peptide sur la chaîne latérale de la tyrosine

Le composé $[^{18}\text{F}]\text{FS-PTAD}$ est préparé en deux étapes : la radiofluoruration d'abord sur le précurseur **L11** par substitution du chlore de la fonction chlorosulfonyle par le fluor-18, puis une oxydation (1,3-dibromo-5,5-diméthylhydantoïne ou le *N*-bromosuccinimide) avec un rendement de 91 % corrigé de la décroissance en moins de 60 minutes de réaction. La conjugaison s'effectue ensuite en 5 minutes de réaction dans une solution tampon basique. A ce jour, c'est le premier et seul exemple décrit de radiomarquage sélectif de résidu de tyrosine.

✓ Groupes prosthétiques sélectifs des cystéines *N*-terminales

Les méthodes précédemment décrites ne sont pas régiosélectives puisque les acides aminés tels que la cystéine, la lysine ou la tyrosine sont susceptibles d'être présents plusieurs fois dans les peptides et protéines. Une méthode de radiomarquage de peptides totalement régiosélective, basée sur la présence d'une cystéine en position *N*-terminale a récemment été décrite. Ainsi positionné, le résidu cystéine présente un motif 1,2-aminoéthanthiol susceptible de réagir avec une fonction nitrile pour former une thiazoline (Figure 22). Deux groupes prosthétiques présentant une fonction 2-cyanobenzothiazole 6- $[^{18}\text{F}]\text{fluoroethyl-2-cyanobenzothiazole}$ ($[^{18}\text{F}]\text{-L14}$) et 6-(2- $[^{18}\text{F}]\text{fluoro-3-ethoxyethoxy}pyridinyl)2\text{-cyanobenzothiazole}$ ($[^{18}\text{F}]\text{FPyPEGCBT}$) ont été préparés en une seule étape à partir des précurseurs tosyloxy (**L12**) et triflate de triméthylammonium (**L13**) correspondants avec respectivement des rendements radiochimiques de 20 et 22 % corrigés de la décroissance (Figure 22).^{53,54} Ces deux groupes prosthétiques ont été utilisés pour le radiomarquage de peptides contenant notamment le motif RGD. Par exemple, le groupe de Jeon a décrit un rendement de marquage du peptide dimérique (cRGDyK)₂E-(PEG)₃-C de 80 % (corrigé de la décroissance) en 20 minutes de réaction et après purification.⁵³ La présence de TCEP comme agent réducteur dans le milieu réactionnel doit permettre d'éviter la formation de ponts disulfures et la dimérisation des peptides.

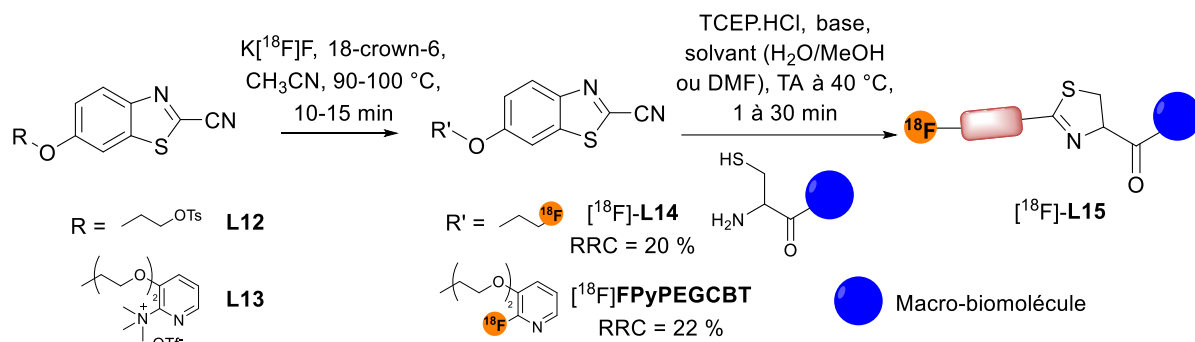


Figure 22. Groupes prosthétiques à base de cyanobenzothiazole puis condensation avec une cystéine en position terminale

Ces deux groupes prosthétiques sont les seuls qui assurent une totale régiosélectivité de conjugaison sans modifier (du moins sans ajout de fonction chimique exogène aux peptides et protéines) le peptide à radiomarquer.

Dans la plupart des cas, la régiosélectivité de la conjugaison sera assurée par l'introduction sur le peptide d'une fonction chimique orthogonale sur laquelle le groupe prosthétique radiomarqué réagira de manière régiosélective.

b) Conjugaison avec un peptide modifié

De nombreuses techniques pour modifier les peptides de manière spécifique ont permis de se tourner vers des approches prosthétiques régiosélectives. La conjugaison de fluorophores sur des peptides pour l'imagerie de fluorescence, mais aussi des approches de marquage directement *in vivo* ont largement stimulé le développement de réactions bioorthogonales.⁵⁵ Ces réactions ont ensuite été appliquées à la stratégie prosthétique pour le radiomarquage au fluor-18 de macro-biomolécules et de peptides en particulier (Figure 23). Malgré la modification du peptide, et peut être celle du ciblage *in vivo*, ces réactions permettent d'effectuer la conjugaison du groupe prosthétique au peptide dans des conditions douces et avec des temps de réaction relativement courts mais surtout avec une bonne régiosélectivité.

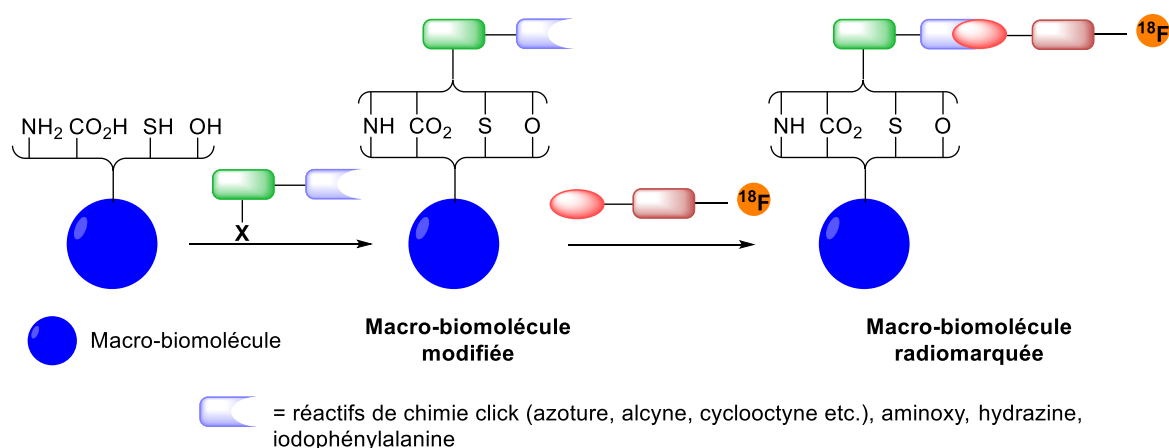


Figure 23. Principe de radiomarquage de macro-biomolécules modifiées

✓ Chimie click

La chimie click comprend une large gamme de réactions, souvent bioorthogonales, et déjà largement appliquées au marquage au fluor-18 de macro-biomolécules. Quelques exemples emblématiques de cette classe de réactions seront présentés dans le chapitre suivant : Introduction Chapitre 4.

✓ Formation d'imines : oximes et hydrazones

Les réactions permettant de former des oximes et des hydrazones à partir d'aldéhydes ou de cétones et d'hydroxylamines ou d'hydrazines respectivement sont couramment utilisées dans de nombreux domaines de la chimie et notamment dans celui de la bioconjugaison (Figure 24).⁵⁶ La réaction ne nécessite pas de catalyse mais ne peut être considérée comme une réaction click du fait de sa faible constante de vitesse (10^{-4} to 10^{-3} $M^{-1}.s^{-1}$). Pour une application *in vivo* et donc à très faible concentration, la vitesse de cette réaction serait un facteur limitant. De plus, la vitesse de réaction dépend aussi du pH utilisé ce qui est une seconde limitation pour des applications *in vivo* notamment par pré-ciblage.

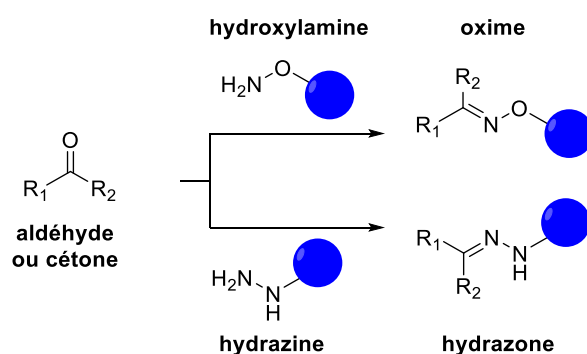
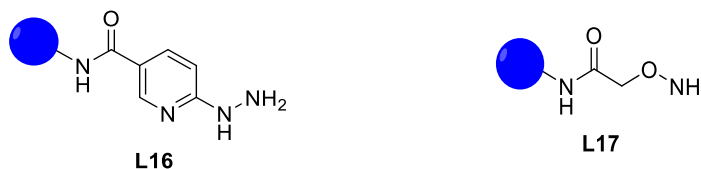


Figure 24. Formation des oximes et des hydrazones à partir d'un aldéhyde ou d'une cétone

Cette méthode a initialement été appliquée pour le radiomarquage au fluor-18 de peptides contenant le motif RGD et des dérivés de l'octréotide, par le groupe de Wester.^{57,58} Le 4- $[^{18}F]$ fluorobenzaldéhyde ($[^{18}F]$ FBA) est synthétisé en une seule étape à partir du précurseur 4-triméthylammonium-1-benzaldehyde avec un rendement isolé atteignant 50 % en 30 minutes de synthèse incluant la purification sur cartouche, sans recourir à une HPLC (Figure 25). La conjugaison du $[^{18}F]$ FBA avec les peptides a été effectuée ensuite en 15 minutes à 60 °C à pH fortement acide (2 à 3) pour un rendement d'environ 40 %. Par la suite, le groupe de Glaser a développé d'autres groupes prosthétiques présentant un aldéhyde aliphatique ($[^{18}F]$ fluoro-(PEG)₄-acétaldéhyde) ou aromatique ($[^{18}F]$ FBA ou 4- $[^{18}F]$ fluoropropoxybenzaldehyde) pour la formation d'oximes.⁵⁹ La conjugaison de ces groupes prosthétiques a été réalisée sur un peptide contenant le motif RGD en 20 minutes à 70 °C à pH 4 avec des rendements variant de 14 à 23 % (corrigés de la décroissance). Malgré le fait que la formation de l'imine ne nécessite pas de catalyse, l'utilisation d'aniline dans une étude cinétique entre le FBA, et un peptide fonctionnalisé par une hydrazine L16, a permis de montrer que la vitesse de réaction, entre 100 μ M de chacun des composés et 10 mM d'aniline, pouvait être augmentée jusqu'à 70 fois passant de $2,6 \pm 0,1$ $M^{-1}.s^{-1}$ à

$190 \pm \text{M}^{-1}.\text{s}^{-1}$.⁶⁰ Une étude comparative de cinétique entre l'hydrazine **L16** ou l'hydroxylamine **L17** et le benzaldéhyde, catalysé avec de l'aniline, a permis de montrer que la vitesse de formation de l'hydrazone est 244 fois plus élevée que la vitesse de formation de l'oxime (Tableau 5).



Quantités réactifs	100 μM	100 μM
Quantité aniline	100 mM	100 mM
Vitesses de réaction	$2000 \pm 100 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$	$8,2 \pm 1 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$

Tableau 5. Etude de la cinétique des réactions de formation d'hydrazone et d'oxime catalysés à l'aniline

Grâce à sa simplicité de synthèse et d'utilisation, le ^{18}F **FBA** est le groupe prosthétique le plus utilisé pour ce type de radiomarquage. Il présente cependant un inconvénient majeur puisque lors de sa préparation, le composé diméthylamino-, résultant de la déméthylation du précurseur peut être obtenu comme produit secondaire. Cette réaction secondaire a pour conséquence de diminuer le rendement de formation du ^{18}F **FBA** et le produit 4-diméthylaminobenzaldéhyde peut réagir compétitivement dans la réaction de conjugaison avec le composé hydroxylamine.⁶¹ Deux autres groupes prosthétiques, ^{18}F -**L18** et ^{18}F **FDR**, permettant le radiomarquage de peptides ont également été synthétisés (Figure 25).

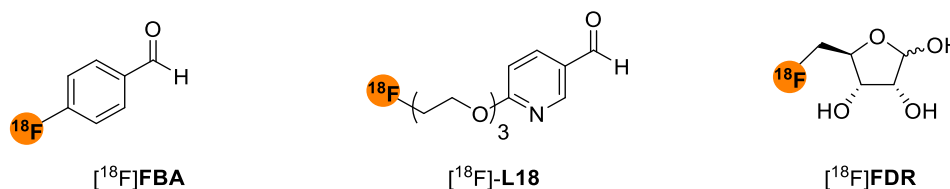


Figure 25. Groupes prosthétiques utilisés pour la formation d'oximes et d'hydrazones

✓ Systèmes pallado-catalysés

Très récemment, deux exemples utilisant une catalyse au palladium dans des réactions de Suzuki-Miyaura et Sonogashira ont été décrits. Le groupe de Davis, en 2009, a démontré la possibilité de réaliser un couplage de Suzuki-Miyaura sur un résidu cystéine d'une protéine, préalablement alkylé avec un groupe iodophényle (**L20**).⁶² Le couplage a été testé avec une dizaine d'acides et d'esters boroniques dans des conditions de réactions compatibles avec la protéine (tampon phosphate pH 8, 37 °C). Cette méthode a ensuite été adaptée et appliquée pour le radiomarquage au fluor-18 de peptides modèles dans lesquels une iodo-phénylalanine a été introduite en cours de synthèse, puis pour le radiomarquage de protéines fonctionnalisées avec un groupement iodophényle (Figure 26).⁶³ Le groupe prosthétique, l'acide 4- ^{18}F fluorophénylboronique ^{18}F -**L19** a été préparé en deux étapes à partir du triflate de di(4-iodophényl)iodonium avec un rendement de 4 à 17 % en 40

minutes. La conjugaison a ensuite été réalisée en 30 minutes avec des rendements de 30 à 50 % pour les peptides modèles mais chutant de 2 à 5 % pour les protéines.

Par la suite, en 2015, un dérivé de bombésine dérivatisé en *N*-terminal par une propargylglycine (**L23**) a aussi pu être marqué par réaction de Sonogashira dans des conditions organo-aqueuses (Figure 26).⁶⁴ Le groupe prosthétique 4-^[18F]iodophényle [^{18F}]-**L22** préparé en une seule étape a été couplé à la bombésine en 10 minutes de réaction à 25 °C, avec un rendement de 71 % (corrigé de la décroissance). Les auteurs rapportent néanmoins la nécessité d'introduire des quantités relativement importantes de peptide et de cuivre (Cu (I)). De plus, la réaction ne fonctionne pas en présence de groupements thiols libres, typiquement présents sur les chaînes latérales des résidus cystéine. L'élargissement de cette méthode à d'autres types de macro-biomolécules nécessitera donc des modifications du procédé.

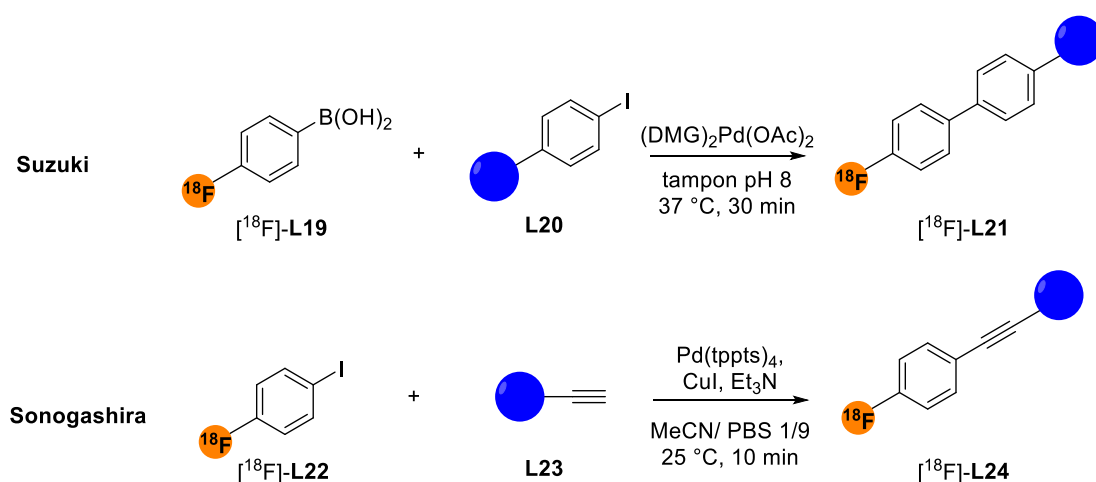


Figure 26. Marquage de macro-biomolécules par couplages pallado-catalysés

Le marquage prosthétique a largement démontré son applicabilité à un grand nombre de macro-biomolécules. Cependant, au regard du temps de demi-vie du fluor-18, le marquage en plusieurs étapes peut être un inconvénient majeur puisqu'il peut nécessiter plusieurs étapes de synthèse, plusieurs purifications et être difficilement automatisable. C'est pourquoi, des méthodes de marquage direct de macro-biomolécules ont aussi été explorées.

3.2. Marquage direct

Le marquage direct, souvent appelé « late stage labeling » permet d'introduire le fluor-18 en une seule étape contrairement à la stratégie prosthétique qui nécessite au moins deux étapes, à savoir la préparation du groupe prosthétique puis sa conjugaison à la macro-biomolécule. Cette approche de marquage direct présente deux avantages majeurs :

- Gain de temps au regard de la demi vie du fluor-18,
- Simplification du procédé de radiomarquage pouvant potentiellement permettre une simplification de l'automatisation.

Dans l'approche prosthétique, la fluoration du groupe prosthétique se fait principalement sur un atome de carbone par voie nucléophile. Mais d'autres atomes peuvent être utilisés pour le radiomarquage direct de macro-biomolécules afin de former une liaison stable pour limiter le risque de défluoration. Pour répondre à ces critères, l'atome en question doit posséder dans ce cas une énergie de dissociation élevée (Bond Dissociation Energy, BDE) pour la liaison avec le fluor et une faible énergie d'activation pour effectuer la liaison dans des conditions douces (température faible, pH neutre, utilisation limitée de solvants organiques) afin de ne pas dénaturer la macro-biomolécule (Tableau 6).

Liaison	BDE (kJ.mol⁻¹)
C-F	536
Si-F	540
B-F	766
Al-F	664

Tableau 6. Constantes de dissociation des liaisons avec le fluor^{65,66}

Les énergies d'activation pour les liaisons silicium-fluor et bore-fluor sont aussi plus faibles que celles avec le carbone; la formation de ces dernières sera donc plus facile et pourra s'effectuer dans des conditions plus douces. Le fluor, par ailleurs, forme des complexes avec certains métaux. L'aluminium est, par exemple, l'un des métaux qui forme l'une des liaisons les plus fortes avec le fluor.

Deux voies peuvent être utilisées pour le marquage direct de macro-biomolécules : la formation d'une liaison carbone-fluor (C-¹⁸F) dans des conditions spécifiques ou la formation d'une liaison non carbonée-fluor (Y-¹⁸F) en utilisant le silicium, le bore ou l'aluminium, le tout en une seule étape de synthèse.

a) Formation d'une liaison carbone-fluor

La substitution nucléophile est la méthode de radiofluoration la plus utilisée, mais les ions fluorures sont des nucléophiles faibles, ce qui demande donc des conditions réactionnelles drastiques. Ces conditions ne sont pas compatibles avec le radiomarquage direct des macro-biomolécules. Une méthode d'ouverture d'hétérocycles contraints, dont l'énergie d'activation est plus faible, a été développée afin de pallier ces problèmes. Les premiers résultats ont été décrits par le groupe d'Ametamey en 2009 en fonctionnalisant les peptides par un cycle aziridine.⁶⁷ Les ions [¹⁸F]fluorures permettent ensuite, par réaction nucléophile, l'ouverture du cycle en une seule étape. L'équipe d'Ametamey a appliqué cette méthode sur deux peptides et un dérivé de thymidine permettant d'obtenir les composés radiomarqués [¹⁸F]-**L26**, [¹⁸F]-**L27** et [¹⁸F]-**L28** en utilisant des ions [¹⁸F]fluorures, du Kryptofix K₂₂₂, et du Cs₂CO₃ dans le DMSO à 70 ou 90 °C avec des rendements radiochimiques allant de 7 à 87 % selon la fragilité plus ou moins importante du peptide (Figure 27). Cette approche, qui permet une relative modération de la température, nécessite néanmoins l'emploi de solvants organiques, ce qui n'est pas compatible avec tout type de peptides ou d'autres macro-biomolécules.

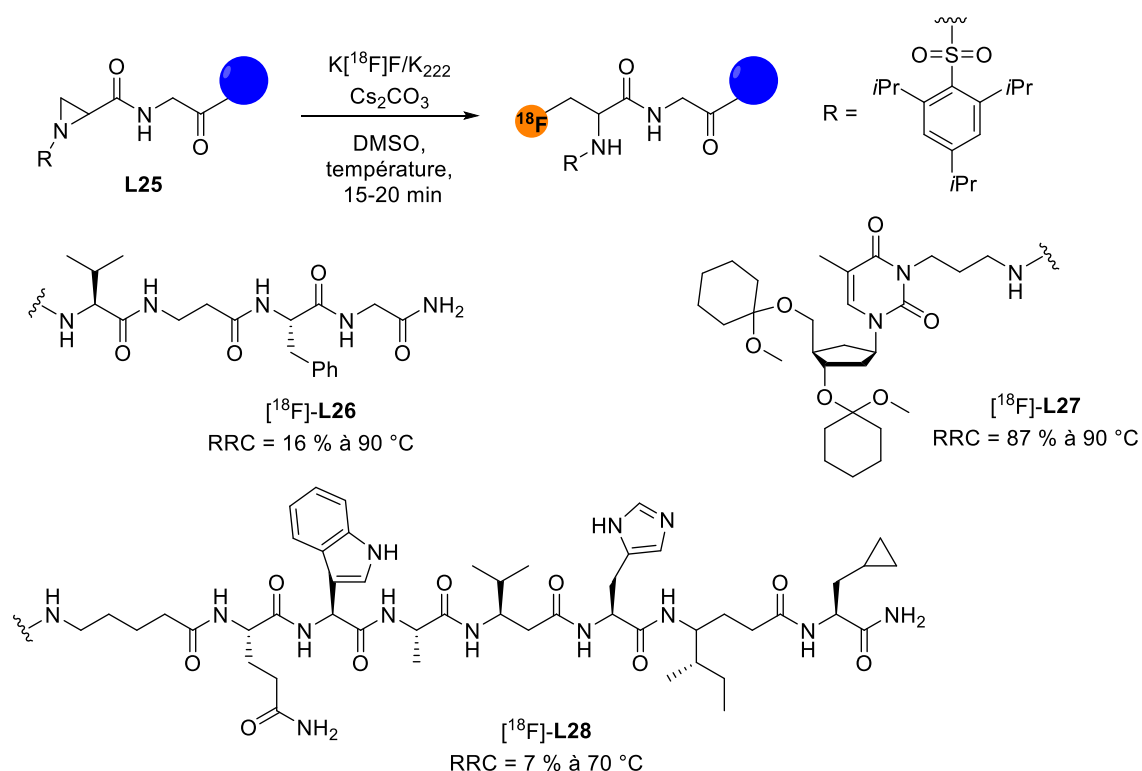


Figure 27. Méthode de marquage direct par ouverture de cycle d'aziridine

Le groupe de Schirmacher, en 2011, se basant sur l'idée de cycles contraints a développé une approche utilisant un dérivé comprenant un époxyde.⁶⁸ Un dérivé de l'octréotide a été fonctionnalisé par formation d'une oxime, avec un aldéhyde présentant un motif oxirane. Le radiomarquage direct n'a pas permis d'obtenir le composé souhaité. En revanche, l'ouverture de l'oxirane par des ions $[^{18}\text{F}]$ fluorures dans des conditions standards de radiofluoration a permis de préparer un nouveau groupe prosthétique qui a ensuite été couplé par formation d'oxime dans une approche prosthétique classique avec un rendement global variant de 28 à 32 %.

En 2009, en substitution nucléophile aromatique, le groupe d'Ametamey a développé un dérivé benzénique, comportant deux groupements électroattracteurs, permettant d'activer le noyau aromatique afin de diminuer la température de radiofluoration à 50 °C.⁶⁹ Cette approche est détaillée dans : Introduction Chapitre 2. 1.3. a.

L'approche directe, par formation de liaisons C-F, a permis de marquer plusieurs peptides, mais avec de faibles rendements, dus à la dégradation possible des peptides du fait de réactions réalisées à des températures allant de 50 à 70 °C dans des solvants organiques ou organo-aqueux. Ces conditions de radiomarquage sont encore trop drastiques (température trop élevée, solvant organique) pour permettre d'obtenir une méthode générale de radiomarquage de macro-biomolécules. D'autres méthodes de radiofluoration directes basées sur la formation de liaisons Si-F, B-F ou encore Al-F ont été développées, permettant d'obtenir des liaisons fortes formées dans des conditions douces.

b) Formation d'une liaison hétéroatome-fluor

✓ Liaison silicium-fluor

L'énergie de dissociation élevée (540 kJ.mol^{-1})⁷⁰ et la faible énergie d'activation permettent une formation rapide de la liaison silicium-fluor. La formation de la liaison silicium- ^{18}F fluor a été rapportée pour la première fois en 1958 afin d'étudier le radiomarquage par échange isotopique entre des métaux fluorés et le tétrafluorure de silicium.⁷¹ Il a été démontré, par la suite, que cette liaison, réputée solide, était instable vis-à-vis de l'hydrolyse, du fait de sa forte polarisation. L'exposition de rats au ^{18}F fluorure de triméthylsilane (inhalation du gaz radioactif) a permis de démontrer le passage rapide du composé dans le compartiment sanguin mais également de visualiser la rapide accumulation de radioactivité dans le squelette de l'animal signe d'une hydrolyse et de libération d'ions ^{18}F fluorures ayant un fort tropisme pour le tissu osseux.⁷² Dans l'objectif d'améliorer la stabilité de tels composés, l'ajout de groupements encombrants sur le silicium a ensuite été étudié. Le groupe de Schirmacher a développé en 2006 un nouveau concept de « silicon-fluoride acceptor » (SiFa) en synthétisant de nouveaux dérivés de silicium pour le radiomarquage au fluor-18 en ajoutant deux groupements *tert*-butyles, afin de stabiliser la liaison silicium-fluor dans l'eau (Figure 28).⁷³ Le « SiFa » a ensuite été conjugué à un dérivé de l'octréotide par formation d'une oxime, puis le composé obtenu **L29** a été radiomarké par échange isotopique ^{19}F - ^{18}F dans un mélange acétonitrile/eau 9/1 avec un rendement radiochimique moyen compris entre 55 et 65 %.

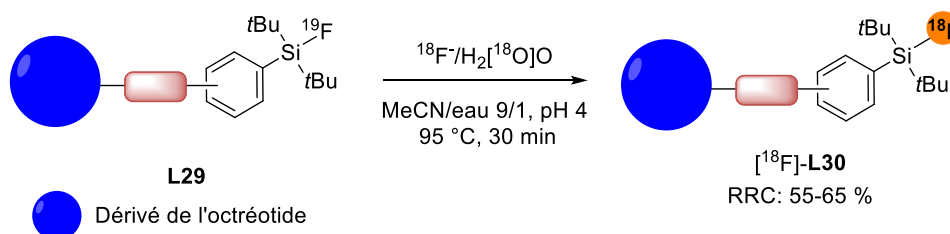


Figure 28. Radiomarquage d'un dérivé de l'octréotide par formation d'une liaison Si- ^{18}F

Cette méthode de marquage est donc intéressante mais la présence des groupements *tert*-butyles entraîne une augmentation de la lipophilie du peptide conjugué. L'impact de cette approche sur la biodistribution de la bombésine a été notoire, entraînant notamment une importante accumulation et métabolisation dans le foie.⁷⁴ Afin de pallier ce problème, de nombreux groupements hydrophiles ont été introduits tels que des chaînes PEG seules⁷⁵ ou combinées avec des carbohydrates.^{76,77} Enfin, le radiomarquage étant réalisé par échange isotopique ^{19}F - ^{18}F , l'activité molaire reste faible du fait de l'impossibilité de séparer le précurseur du produit radioactif.

✓ Liaison bore-fluor

La liaison bore-fluor étant très stable, les aryles trifluoroborates sont couramment utilisés pour former des liaisons C-C par couplage de Suzuki et sont préparés à partir des acides ou esters boroniques correspondants en utilisant du bifluorure de potassium (KHF_2).⁷⁸

L'équipe de Perrin a été la première à développer une méthode de radiomarquage en une seule étape, à partir d'esters phénylboroniques, en utilisant du bi- ^{18}F fluorure de potassium (Figure 29 A).⁷⁹ Ces travaux ont permis de radiomarquer un dérivé de biotine afin d'étudier ses interactions spécifiques avec l'avidine. La réaction a été effectuée dans un milieu aqueux tamponné mais aucune information n'a permis de conclure sur la stabilité de la liaison B- ^{18}F F en milieu aqueux. Cette méthode ne permet pas d'obtenir des activités molaires élevées puisqu'un ajout de fluor-19 est nécessaire afin d'augmenter le taux de conversion de la réaction. Des dérivés aromatiques, contenant des groupements électroattracteurs tels que des fluorures en α - de l'ester boronique, ont ensuite été utilisés afin d'augmenter la déficience électronique du noyau aromatique, ce qui contribue à la stabilité du groupement trifluoroborate.⁸⁰

En 2014, Perrin *et al.* ont développé une méthode de marquage par échange isotopique ^{19}F - ^{18}F en utilisant un zwitterion d'ammonium méthyltrifluoroborate dans une solution tampon qui a montré une bonne stabilité *in vivo* (Figure 29 B).⁸¹ Des dérivés de peptides contenant le motif RGD et un dérivé de l'octréotide ont ainsi pu être radiomarqués avec des activités molaires élevées (100-150 GBq. μmol^{-1}).

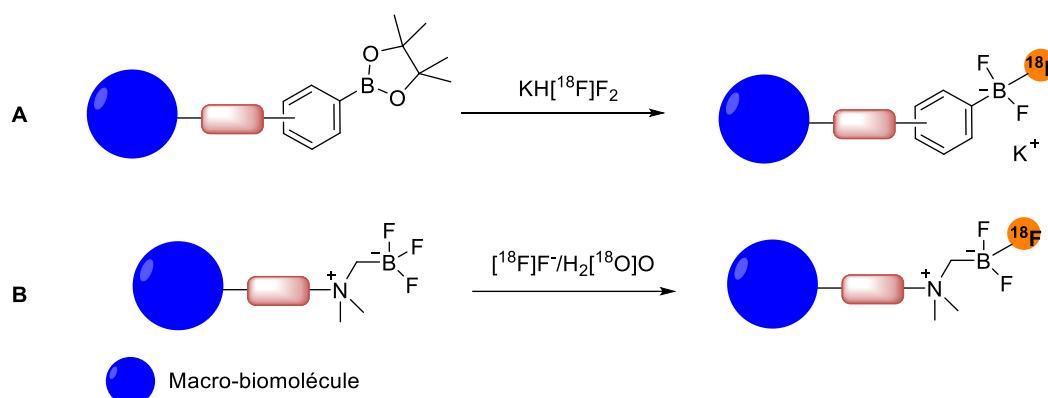


Figure 29. Radiomarquage de macro-biomolécules à partir de dérivés borylés

Ces composés, stables, pourront aussi être modifiés (avec des fonctions permettant des réactions de cycloaddition 1,3 dipolaires ou additions thiol-Michael) et être utilisés, comme groupements prosthétiques, pour un radiomarquage standard en deux temps.

✓ Complexes aluminium-fluor

Les atomes de fluor peuvent être d'excellents ligands de certains métaux et peuvent fournir des complexes très stables, comme c'est le cas par exemple avec l'ion aluminium Al^{3+} . La stratégie repose sur une approche similaire à celle employée lors d'un marquage par coordination. Par conséquent, le composé $\text{Al}[^{18}\text{F}]\text{F}_2^+$ est d'abord formé à partir de trichlorure d'aluminium et d'ions fluorures $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ puis complexé, par un agent chélatant bifonctionnel (BFCA), préalablement conjugué à la macro-biomolécule (Figure 30).⁸²

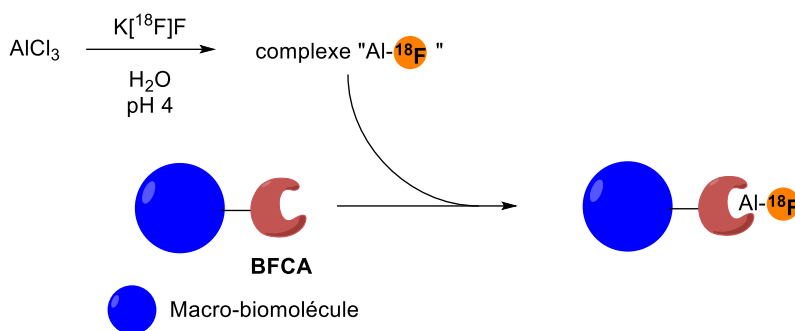


Figure 30. Radiomarquage par coordination du complexe $\text{Al}^{[18\text{F}]\text{F}}$

L'enjeu de cette réaction est de trouver des agents chélatants qui permettront de conserver une bonne stabilité de la liaison de coordination lors d'applications *in vivo*. Des travaux publiés par l'équipe de McBride décrivent le radiomarquage des peptides IMP 272 et IMP 449 fonctionnalisés avec deux agents chélatants différents DTPA et NOTA (Figure 31).⁸³ Par la suite, l'équipe de McBride a testé deux autres agents chélatants, le NODA-MPAA et le c-NETA.⁸⁴ Le composé c-NETA a permis d'obtenir les meilleurs rendements (87 %) à pH 4 à 100 °C en 30 minutes de réaction. Le radiomarquage de macro-biomolécules sensibles, peut aussi être effectué en deux temps, avec la coordination du $^{[18\text{F}]}$ fluorure d'aluminium par l'agent chélatant en premier lieu, puis la conjugaison à la macro-biomolécule, afin d'éviter sa dénaturation, selon une approche prosthétique.

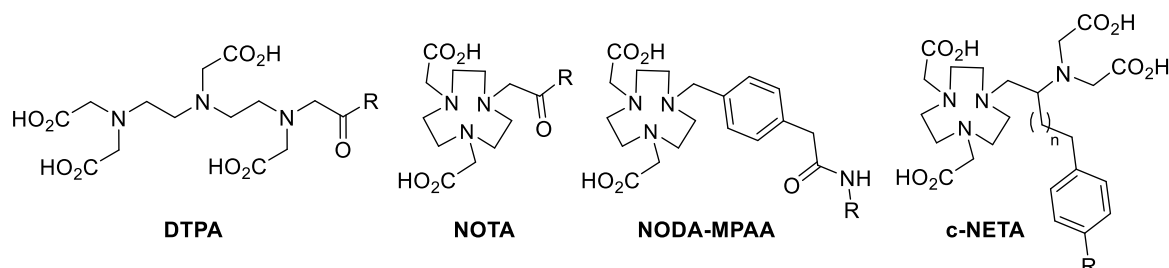


Figure 31. Agents chélatants utilisés pour l'introduction du complexe $\text{Al}^{[18\text{F}]\text{F}}$ sur la macro-biomolécule

Cette méthode a été appliquée au radiomarquage d'un dérivé du PSMA, pour l'imagerie du cancer de la prostate, en utilisant le chélatant HBED (Figure 32). La stabilité du complexe $\text{HBED-Al}^{[18\text{F}]\text{F}^{2+}}$ a par ailleurs été démontrée *in vitro*.⁸⁵ La radiofluorination a été réalisée à 35 °C en 15 minutes, incluant la purification *via* SPE (solid-phase extraction). Le $\text{Al}^{[18\text{F}]\text{PSMA-HBED}}$ est actuellement utilisé pour des applications précliniques.

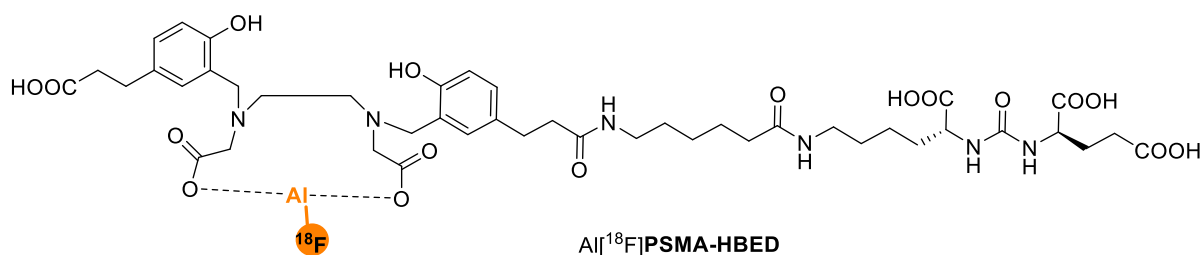


Figure 32. Structure chimique du $\text{Al}^{[18\text{F}]\text{PSMA-HBED}}$

Cette dernière application avec un radiomarquage effectué à une température peu élevée (35 °C) permet de conclure sur l'intérêt de cette méthode de marquage direct de macro-biomolécules, bien que pour certains radiomarquages, les conditions de réaction restent encore drastiques.

Chapitre 4. Chimie click

1. Généralités

Le terme « chimie click » a été défini pour la première fois par le groupe de Sharpless en 2001.⁸⁶ Selon Sharpless, une réaction de chimie click doit être « modulaire, rapide, stéréospécifique et donner de très bons rendements avec pas ou peu de formation de sous-produits, qui peuvent être éliminés sans méthode chromatographique ». La réaction doit aussi être respectueuse de l'environnement et si possible être réalisable dans l'eau.

La chimie click peut donc répondre aux conditions nécessaires pour le marquage de macro-biomolécules. De plus, la plupart des réactions de chimie click sont bioorthogonales, c'est-à-dire sélective en milieu biologique, ce qui pourrait permettre de futures applications en chimie *in vivo* dans une approche de pré-ciblage. En d'autres termes, elle assure la chimiosélectivité de la réaction entre le marqueur (radioactif par exemple) et la molécule d'intérêt dans le milieu biologique (Figure 33).

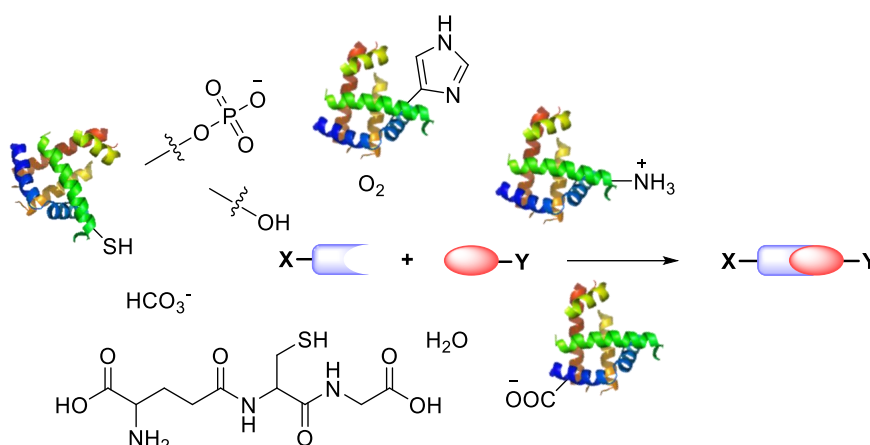


Figure 33. Principe général de la chimie click en milieu complexe

Différentes réactions de chimie click, dont certaines bioorthogonales, sont actuellement décrites en chimie du fluor-18⁸⁷ dans le cadre du marquage de macro-biomolécules par utilisation d'un groupe prosthétique: la ligation de Staudinger,⁸⁸ la chimie click catalysée au cuivre plus fréquemment appelée « Copper(I)-catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition » (CuAAC),⁸⁹ la chimie click contrainte, sans cuivre, connue sous le nom de « Strain-Promoted Azide-Alkyne Cycloaddition » (SPAAC), la cycloaddition de Diels-Alder à demande inverse en électrons (IEDDA)⁹⁰ et l'addition thiol-Michael⁹¹ (Tableau 7).

Réaction	Réactif 1	Réactif 2	Produit obtenu	Bioorthogonalité
Ligation de Staudinger		R_2-N_3		Oui
CuAAC	$R_1-C\equiv C$	R_2-N_3		Non à cause de la présence du cuivre
SPAAC		R_2-N_3		Oui
IEDDA				Oui
Addition de thiol-Michael	$R-SH$	$EWG-C=C$		Non à cause de la multiplicité des cystéines dans un peptide

* EWG : groupement électroattracteur

Tableau 7. Tableau récapitulatif des réactions de chimie bioorthogonale les plus utilisées en radiochimie

Les réactions click répertoriées ci-dessus présentent des constantes de vitesses de réaction variées (Figure 34).⁹² En effet, plus la vitesse de la réaction sera élevée, plus la probabilité de réaction *in vivo*, et donc dans un milieu dilué, sera grande. Certaines réactions sont plus rapides mais présentent des inconvénients pour le marquage *in vivo*, comme c'est le cas pour la réaction de CuAAC, nécessitant l'utilisation du cuivre. Il convient alors de trouver un compromis entre vitesse de réaction et toxicité/stabilité des composés *in vivo*.

Les réactions présentées dans ce chapitre peuvent dans tous les cas servir pour le radiomarquage de macro-biomolécules au fluor-18 dans une approche prosthétique standard. Certaines d'entre elles, en vertu de leur constante cinétique, peuvent aussi servir dans une stratégie de marquage *in vivo* par pré-ciblage. Le radiomarquage par approche enzymatique sera détaillé dans : Résultats et discussion Chapitre 4.

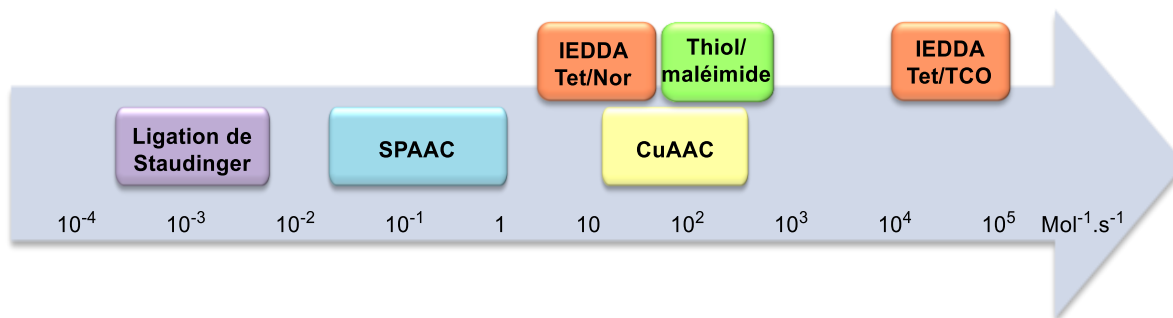


Figure 34. Représentation des constantes de vitesse des réactions click utilisées pour le radiomarquage au fluor-18 de macro-biomolécules allant de 10^{-5} à $10^5 \text{ mol}^{-1}.\text{s}^{-1}$ ⁹²

2. Ligation de Staudinger

2.1. Généralités

La réduction de Staudinger entre un azoture et une triphénylphosphine dans l'eau a été décrite en 1919 par Staudinger et Meyer (mécanisme en Figure 35 A).¹ Cette réaction a par la suite été améliorée par l'équipe de Bertozzi en 2000, et dès lors appelée ligation de Staudinger.² Cette modification de la réaction a permis de considérer la ligation de Staudinger comme bioorthogonale du fait de l'utilisation de substrats non présents dans les milieux biologiques, de la stabilité de ces derniers en milieu aqueux mais aussi de la chimiosélectivité de la réaction.

2.2. Mécanisme réactionnel

La différence entre la réduction et la ligation de Staudinger tient à l'utilisation d'une phosphine particulière, portant un groupement carbonyle, dont la fonction est de piéger l'intermédiaire iminophosphorane. Les deux mécanismes réactionnels sont semblables (Figure 35). Par réaction d'addition nucléophile, la phosphine se lie à l'azoture, puis par réaction intramoléculaire un composé cyclique à 4 chaînons se forme. Un réarrangement de ce dernier, puis l'élimination d'azote permettent d'obtenir l'intermédiaire iminophosphorane. Dans le cas de la réduction de Staudinger, l'addition d'eau provenant du milieu permet de récupérer l'amine primaire et l'oxyde de triphénylphosphine (Figure 35 A). Pour la ligation de Staudinger, une deuxième attaque intramoléculaire entre l'iminophosphorane et le carbonyle permet d'obtenir l'amide final (Figure 35 B).

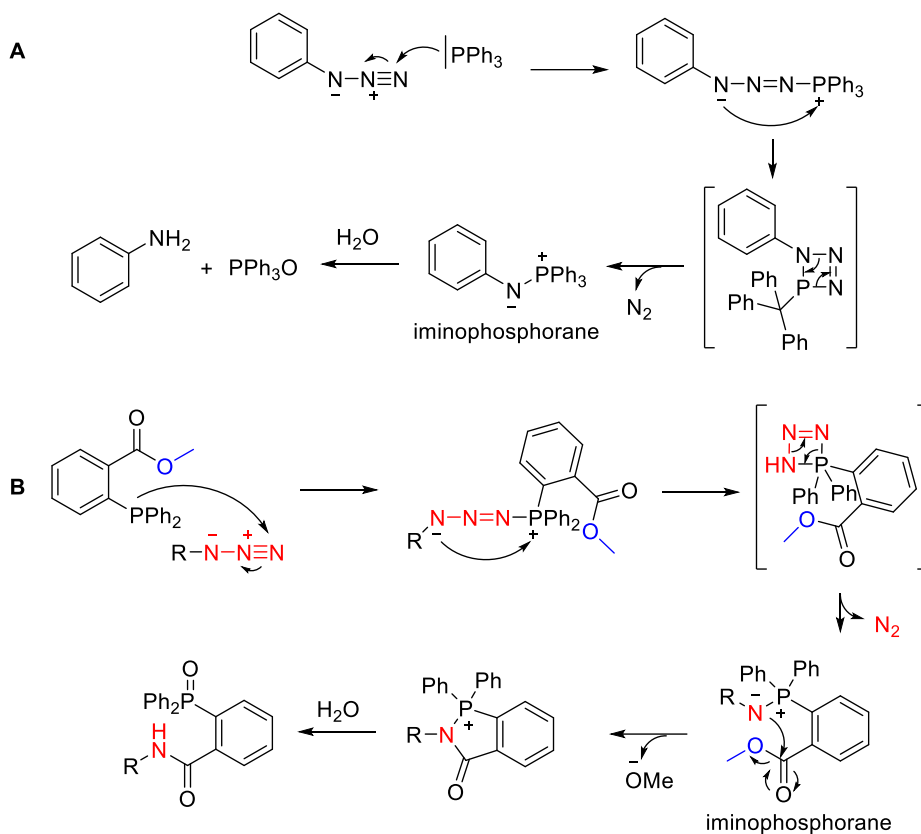


Figure 35. Mécanisme de réaction A) de la réduction de Staudinger B) de la ligation de Staudinger

Cette ligation a par la suite été améliorée par les groupes de Raines et de Bertozzi en 2000 afin d'éliminer la partie de la molécule contenant la phosphine oxydée.^{95,96} Dans ce cas, le groupement d'intérêt est fonctionnalisé sur l'acide carboxylique et non plus directement sur le noyau aromatique. Cette modification permet de récupérer seulement l'amide et d'éliminer l'oxyde de phosphine formé, c'est la ligation « traceless » de Staudinger (Figure 36). Cette dénomination s'explique par le fait que cette réaction permet *in fine* de former une liaison peptidique, et donc d'ajouter un ou plusieurs acides aminés, sans modifier la nature de la chaîne peptidique.

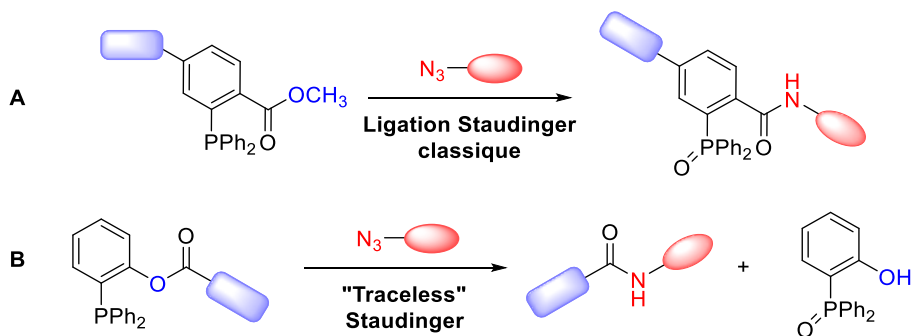


Figure 36. Schéma de la ligation de Staudinger A) classique B) "traceless"

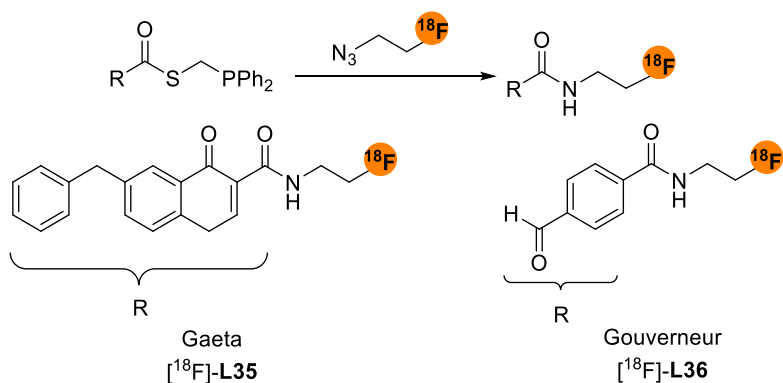


Figure 39. Exemples de ligation de Staudinger à partir de diphénylphosphines soufrées

La ligation de Staudinger est donc une méthode d'approche prosthétique intéressante pour le marquage au fluor-18 car elle permet une ligation non catalysée avec des temps de réaction courts et de très hauts rendements radiochimiques.

Une étude de pré-ciblage (Introduction Chapitre 4. 5.4) pour un radiomarquage *in vivo* a été effectuée, par le groupe de Vugts en 2011, en utilisant la ligation de Staudinger classique.¹⁰¹ Différents azotures ont été conjugués à un anticorps monoclonal sans affecter son immunoréactivité, sa pharmacocinétique ou encore sa conjugaison avec sa cible. Différentes phosphines, radiomarquées par du zirconium-89, du gallium-67, de l'iode-123 ou encore du lutécium-177 ont été synthétisées. Malgré la rapidité de la réaction *in vitro*, les résultats *in vivo*, n'ont pas permis d'obtenir un radiomarquage suffisamment rapide de l'anticorps, et des résultats *in vitro* ont même montré la formation d'un sous-produit issu de la phosphine due à une oxydation dans un tampon phosphate salin.

3. Cycloaddition 1,3 dipolaire

3.1. Généralités

La réaction la plus répandue correspondant aux critères de click est la cycloaddition 1,3-dipolaire entre un azoture et un alcyne terminal, catalysée par des sels de cuivre (I), la CuAAC. Michael a rapporté pour la première fois la version thermique de cette réaction, en 1893 à partir de l'azoture de phényle et de l'éthynedicarboxylate de diméthyle pour former le 1,2,3 triazole trisubstitué correspondant.¹⁰² La cycloaddition 1,3 dipolaire a ensuite été étudiée par Huisgen de manière plus particulière au milieu du 20^{ème} siècle.¹⁰³ Cette réaction fait intervenir un azoture (dipôle) et un alcyne (dipolarophile) pour former un triazole, cycle à 5 chaînons, par activation thermique, conduisant à la formation de deux régioisomères : 1,4 et 1,5 (Figure 40 A). La difficulté de séparation des régioisomères avec les techniques de chromatographie classiques ainsi que le chauffage prolongé de la réaction, pour une conversion totale, ne permettent pas son utilisation avec les systèmes biologiques.

En 2002, les groupes de Meldal ainsi que celui de Fokin et Sharpless ont montré la possibilité d'effectuer la cycloaddition régiosélective d'un alcyne terminal sur un azoture, par catalyse

au cuivre à température ambiante, afin de ne former que le régioisomère 1,4 (Figure 40 B).^{104,105} Cette voie de synthèse permet alors de s'affranchir du chauffage prolongé utilisé dans la méthode de Huisgen et d'augmenter la vitesse de réaction d'un facteur 10⁷.

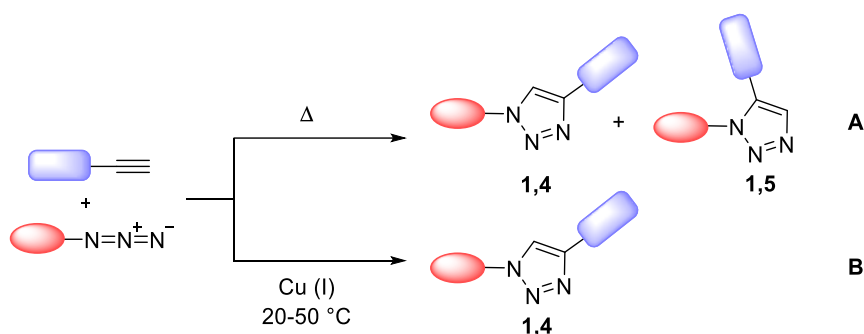


Figure 40. Cycloaddition 1,3 dipolaire entre un alcyne et un azoture A) par voie thermique B) par voie catalytique

3.2. Mécanisme réactionnel

Le mécanisme de la réaction a été étudié par les équipes de Meldal et de Sharpless en 2002.^{104,105} Les deux groupes suggèrent une coordination du Cu (I) par liaison σ à l'alcyne terminal pour former l'acétylure de cuivre. Des calculs ont confirmé cette hypothèse et prédit un mécanisme cyclique non-concerté.¹⁰⁶ Ce dernier a ensuite été réévalué en 2013 par le groupe de Fokin afin de mettre en évidence l'implication de deux atomes de cuivre dans le mécanisme (Figure 41).¹⁰⁷ En effet, dans cette étude, ils ont démontré le double rôle du cuivre par rapport à l'interprétation précédente. En étudiant la réaction à partir d'un acétylure de cuivre préformé par liaison σ , Fokin *et al.* ont montré que la réaction n'atteignait pas un taux de conversion suffisant si un équivalent de complexe de cuivre, lié par liaison π à l'alcyne, n'était pas ajouté en complément. La réaction entre l'azoture et l'acétylure de cuivre formé a été traitée par un catalyseur enrichi en ⁶³Cu. L'enrichissement final de la réaction de cycloaddition en ⁶³Cu a permis de démontrer qu'un second atome de cuivre intervient dans l'étape de cycloaddition.

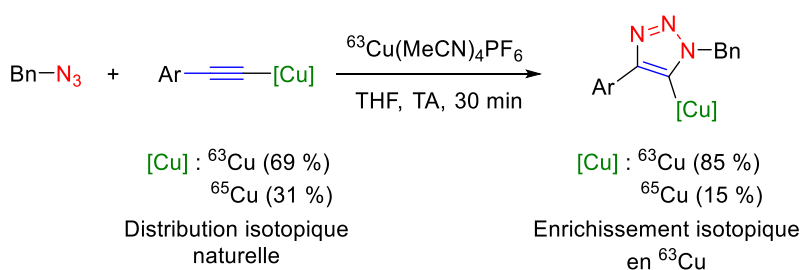


Figure 41. Etude de l'intervention du cuivre dans l'étape de cycloaddition par utilisation de cuivre-63

Le premier atome de cuivre se lie donc par liaison covalente σ à l'alcyne, puis le deuxième cuivre vient se fixer par liaison π à l'alcyne (Figure 42). L'addition de l'alcyne sur l'azoture conduit à une espèce bimétallique évoluant vers le triazole. Ces résultats conduisent donc à un mécanisme de cycloaddition, non-concertée, catalysé par deux atomes de cuivre.

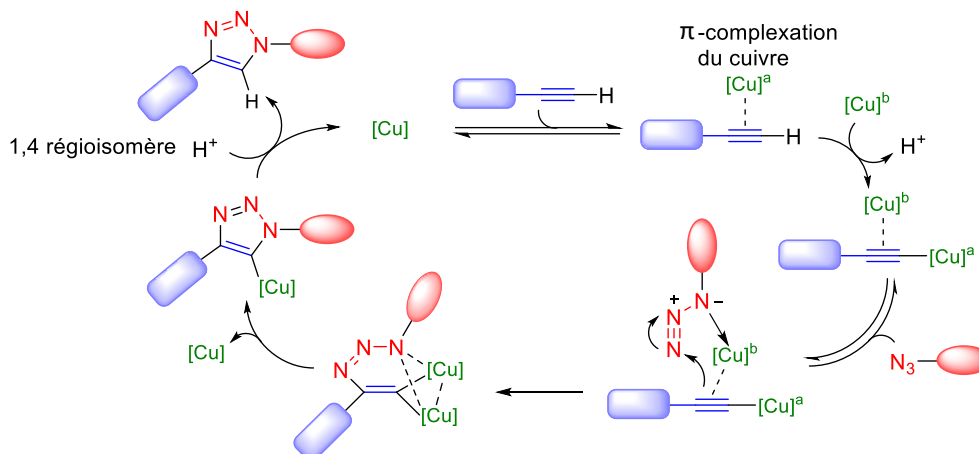


Figure 42. Mécanisme supposé de la CuAAC établi par Fokin *et al.*¹⁰⁷

3.3. Choix du catalyseur et du ligand

Le cuivre est utilisé en tant que catalyseur dans la réaction de CuAAC à son degré d'oxydation I. L'utilisation de sels de cuivre II, réduits *in situ* par un agent réducteur, généralement l'ascorbate de sodium, est la méthode de choix pour la catalyse de la réaction.¹⁰⁸ Les sels de cuivre I (iodure, bromure, acétate) peuvent aussi être utilisés sans réducteur mais peuvent être facilement oxydés par l'oxygène de l'air. Par conséquent, ils sont fréquemment employés avec un agent réducteur tel que l'ascorbate de sodium et une base (Et₃N, DIEA).¹⁰⁵ En effet, le groupe de Wong a démontré en 2002 que l'utilisation d'une base pour la catalyse avec l'iodure de cuivre permettait d'accélérer la réaction.¹⁰⁹ Certains complexes de cuivre tels que le [Cu(CH₃CN)₄]PF₆ et le [Cu(CH₃CN)₄]OTf sont parfois aussi utilisés. La vitesse de réaction de la CuAAC peut encore être accélérée en présence d'un ligand du cuivre (I).¹⁰⁸

De nombreux ligands spécifiques du cuivre (I) permettent d'accélérer la réaction de cycloaddition en le stabilisant à son degré d'oxydation; le tris(benzyltriazolylmethyl)amine (TBTA) est le ligand le plus utilisé (Figure 43 A).¹¹⁰ Ce dernier étant peu soluble dans l'eau, des modifications lui ont été apportées. Les groupements benzyles ont été remplacés par des alcanes fonctionnalisés par un groupement *tert*-butyle ou un groupement alcool (Figure 43 A).^{111,112} Le sel bathophénanthroline disulfonate (BPS), a aussi démontré une augmentation de la vitesse de réaction en phase aqueuse à de très faibles concentrations (Figure 43 B). Des dérivés de benzimidazoles ont aussi été étudiés et peuvent encore augmenter la vitesse de réaction de click (Figure 43 C).^{113,114}

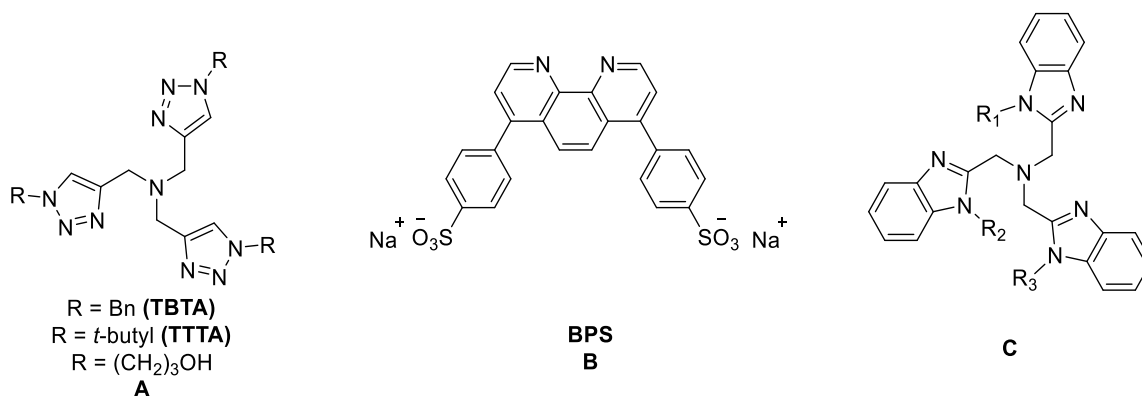


Figure 43. Exemples de ligands utilisés pour la CuAAC

La réaction de CuAAC est intéressante puisque sa vitesse de réaction est rapide mais la génération d'espèces réactives à l'oxygène (ROS) détectées lors d'applications en cultures cellulaires a limité son utilisation dans les systèmes vivants.^{115,116} L'augmentation de l'activité catalytique du cuivre, et donc la réduction de la quantité utilisée, a été démontrée en utilisant des ligands hydrosolubles lors de la réaction de cycloaddition.¹¹⁷

3.4. Applications au radiomarquage de macro-biomolécules avec du fluor-18

La chimie click catalysée au cuivre I a été utilisée pour la première fois pour le radiomarquage au fluor-18 de peptides en 2006 par Marik et Sutcliffe.¹¹⁸ Des [¹⁸F]fluoroalcyne (n=1-3) [¹⁸F]-**L37** à [¹⁸F]-**L39** ont été mis en réaction avec des peptides fonctionnalisés par un acide 3-azido-propanoïque **L40** (Figure 44). Le radiomarquage au fluor-18 des chaînes alcanes tosylées avec du K[¹⁸F]F/K₂₂₂, a permis d'obtenir de meilleurs rendements avec le pentyne et l'hexyne (respectivement 81 et 61 %), qu'avec le butyne (seulement 31 %). La réaction de click a été effectuée dans plusieurs conditions (Figure 44 **A**). Les meilleurs résultats ont été obtenus avec l'iodure de cuivre et la *N,N*-diisopropyléthylamine en présence d'ascorbate de sodium pour donner le triazole correspondant [¹⁸F]-**L41** avec des rendements radiochimiques corrigés de la décroissance compris entre 54 et 99 % selon le peptide utilisé. En 2007, Glaser et Årstadt se sont aussi intéressés au radiomarquage de peptides par chimie click. Contrairement à Marik et Sutcliffe, l'atome de fluor-18 est porté par le partenaire azoture et l'alcyne est porté par le peptide (Figure 44 **B**). Plusieurs alcyne **L43** différemment fonctionnalisés ont été testés pour les conditions de click à la fois avec du sulfate de cuivre et du cuivre natif, en présence d'un tampon phosphate et du composé azoture de [¹⁸F]éthyle [¹⁸F]-**L42**. Le sulfate de cuivre a donné de meilleurs rendements pour la formation de triazoles [¹⁸F]-**L44**. Ces conditions ont ensuite été appliquées sur un peptide modèle en utilisant du sulfate de cuivre et de l'ascorbate de sodium pendant 15 minutes à température ambiante permettant d'obtenir le peptide radiomarké avec un rendement radiochimique de 92 % corrigé de la décroissance.

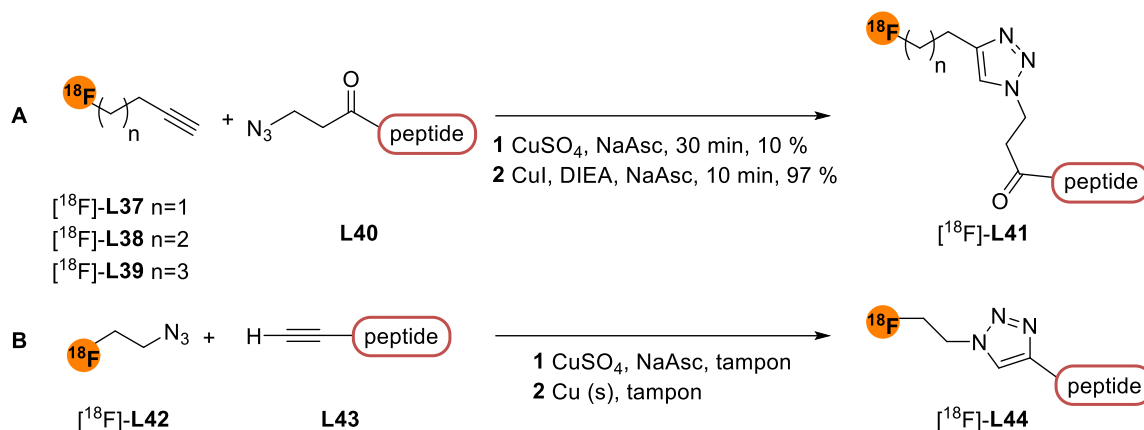


Figure 44. Premiers radiomarquages de peptides par CuAAC

De nombreux dérivés de chaînes alcanes ($[^{18}\text{F}]\text{-L39}$, $[^{18}\text{F}]\text{-L42}$), chaînes PEG ($[^{18}\text{F}]\text{-L45}$), mais aussi d'aryles ($[^{18}\text{F}]\text{-L46}$, $[^{18}\text{F}]\text{-L47}$), de pyridines ($[^{18}\text{F}]\text{-L48}$, $[^{18}\text{F}]\text{-L49}$) ou encore de sucres ($[^{18}\text{F}]\text{-L50}$, $[^{18}\text{F}]\text{-L51}$, $[^{18}\text{F}]\text{-L52}$ ¹¹⁹) ont été modifiés pour introduire à la fois la fonction permettant la réaction de click (alcyne ou azoture) et le fluor-18 (Figure 45).^{87,120}

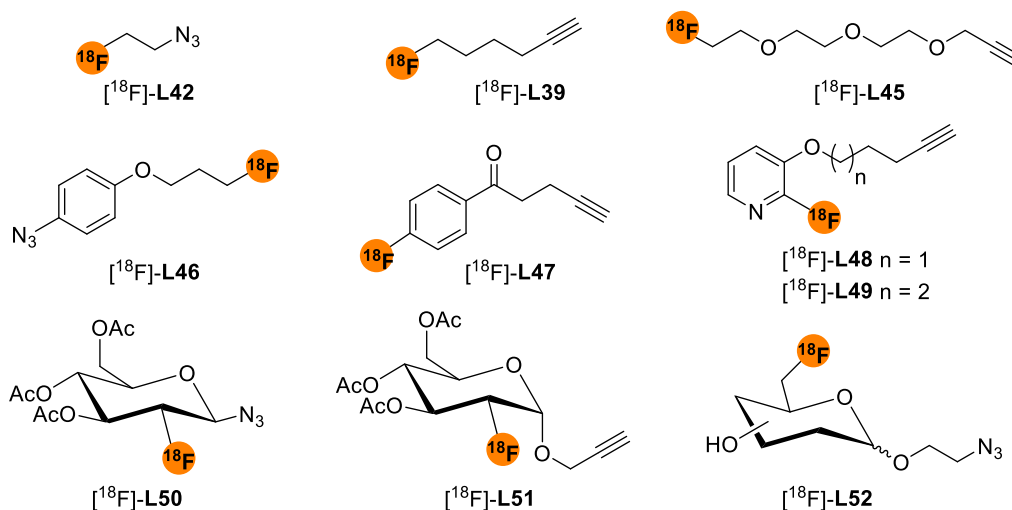


Figure 45. Exemples de groupes prosthétiques développés pour le marquage au fluor-18 en CuAAC

La chimie click catalysée au cuivre I, grâce à sa vitesse de réaction élevée, est très intéressante pour le marquage de macro-biomolécules pour la TEP. Cependant, du fait de la toxicité et des quantités de cuivre utilisées dans la réaction, les applications dans les systèmes vivants restent limitées. Pour répondre à la problématique de marquage dans des systèmes biologiques, une méthode moderne basée sur de la chimie click non catalysée a été appliquée au radiomarquage, c'est la chimie click contrainte appelée SPAAC.

4. La chimie click contrainte

4.1. Généralités

La première réaction de chimie click contrainte entre un cyclooctyne et un azoture de phényle a été décrite par Wittig et Krebs en 1961.¹²¹ Le cyclooctyne, plus petit cycle

contenant un alcyne stable, réagit de manière efficace et provoque « comme une explosion » lorsqu'il est mis en contact avec l'azoture de phényle à température ambiante pour former un seul produit, le triazole.

Une des premières applications de bioconjugaison a été mise en oeuvre en 2004 par le groupe de Bertozzi. Ils ont utilisé pour cela un cyclooctyne **OCT** (Figure 47) fonctionnalisé par une biotine pour la ligation *in vitro* et *in vivo* à la surface de glycanes préalablement fonctionnalisés avec un azoture, et ce sans toxicité apparente.¹²²

4.2. Mécanisme réactionnel

Le mécanisme réactionnel est comparable à celui de la cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen mais la tension du cycle, due au cyclooctyne, entraîne une diminution de l'énergie d'activation permettant à cette réaction d'avoir lieu à des températures plus faibles voire même à température ambiante (Figure 46). Cependant, contrairement à la cycloaddition 1,3-dipolaire catalysée au cuivre (I) où seul le 1,4 triazole est formé, la réaction de SPAAC amène à la formation de deux régioisomères **A** et **B**.

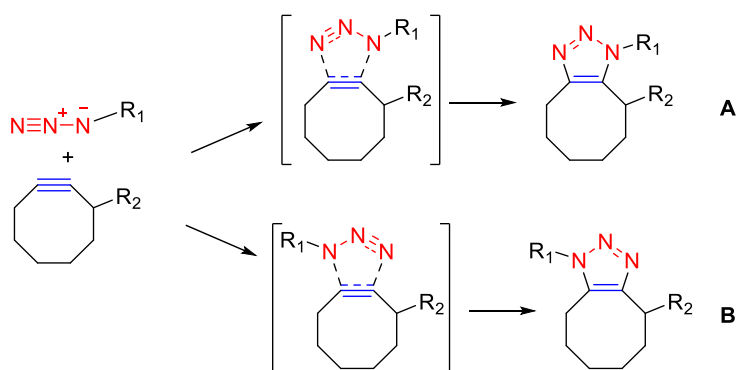
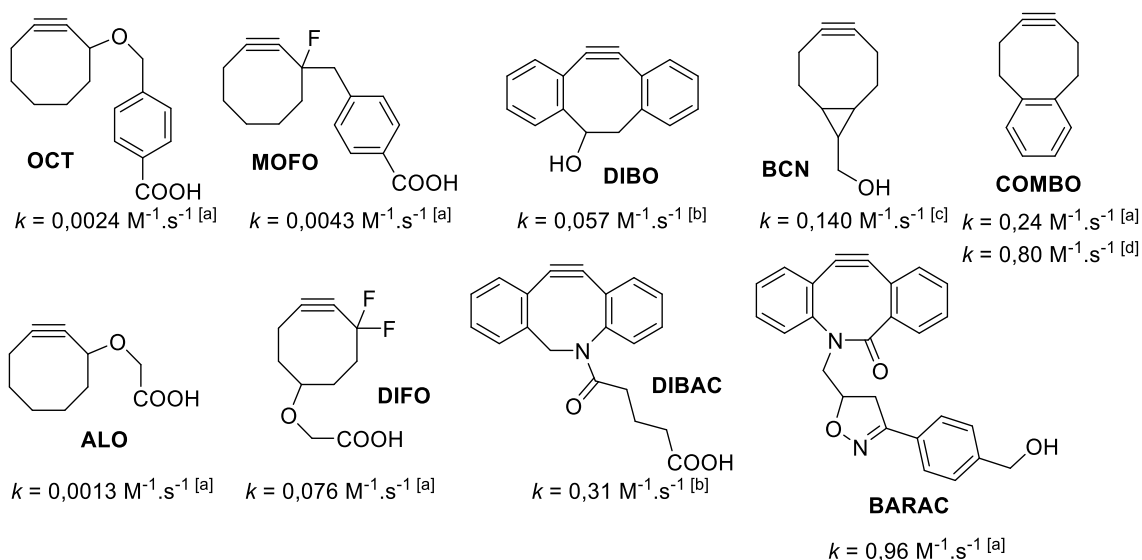


Figure 46. Mécanisme concerté de la réaction de SPAAC avec obtention de deux régioisomères

En règle générale, si les groupements R₁ et R₂ sont encombrés, le composé **B** est obtenu majoritairement par rapport au composé **A** pour des raisons de gêne stérique.

La vitesse de réaction de la SPAAC est inférieure à celle de la CuAAC et est de l'ordre de grandeur de celle de la ligation de Staudinger ($k = 2.10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).¹²³

Les premiers résultats en bioconjugaison ainsi que l'absence d'utilisation de catalyse au cuivre ont motivé le développement de nouveaux cyclooctynes afin d'améliorer la constante de vitesse de la réaction (Figure 47).¹²⁴



[a] Acétonitrile, [b] Méthanol, [c] eau 1/3 acétonitrile (v/v), [d] eau 3/4 acétonitrile (v/v)

Figure 47. Exemples de cyclooctynes développés pour améliorer la constante de vitesse de la réaction de SPAAC

Le composé **ALO** a été imaginé afin d'augmenter la solubilité en milieu aqueux du fait de l'absence de cycle aromatique mais n'a pas permis d'améliorer la constante de vitesse de la réaction.¹²⁵ L'ajout d'un groupement électroattracteur en position propargylique a permis d'augmenter la vitesse de réaction. Le groupe de Bertozzi a démontré que l'ajout d'un atome de fluor comme dans **MOFO**, puis d'un deuxième comme dans **DIFO** permettaient d'augmenter la vitesse de réaction jusqu'à un facteur 32.^{125,126}

Alors que l'équipe de Bertozzi poursuivait l'amélioration de la réactivité des fluorocyclooctynes en modifiant le **DIFO**¹²⁷, l'équipe de Boons a choisi de s'intéresser aux dérivés de dibenzocyclooctynes. En effet, la présence des deux groupements aromatiques permet d'augmenter la tension de cycle et donc la réactivité du cyclooctyne. Le premier dibenzocyclooctyne modifié portant un alcool, le **DIBO**, décrit par le groupe de Boons en 2008, a permis d'obtenir une constante de vitesse de $0,057 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.¹²⁸ La présence d'un groupement amide à l'intérieur du cycle a permis d'obtenir le composé **BARAC** et ainsi d'augmenter la vitesse d'un facteur 400 par rapport au composé **OCT** de départ avec une constante de vitesse avoisinant les $1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.¹²⁹ Un composé contenant un amide exocyclique, le **DIBAC** a aussi été développé par le groupe de Van Delft mais n'a pas permis d'améliorer la vitesse de réaction ($k = 0,31 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$).^{130,131} Les dibenzocyclooctynes réagissent plus rapidement mais sont aussi moins stables. Le composé **BARAC**, par exemple, a un temps de demi-vie de seulement 24 heures dans un tampon phosphate.

Les dernières générations de cyclooctynes¹³² se caractérisent par la présence d'un cyclopropane (**BCN**) ou d'un benzène (**COMBO**) à l'opposé de la triple liaison. Ceci a permis d'obtenir des composés possédant des propriétés intéressantes à la fois en termes de vitesse de réaction mais aussi en termes d'accessibilité de synthèse (4 étapes pour le **BCN** et 5 étapes pour le **COMBO** comparativement à 7 et 10 étapes pour **BARAC** et **DIBAC** respectivement) et de solubilité dans un solvant aqueux.^{133,134} Bien qu'ils soient moins

rapides que certains dérivés de dibenzocyclooctynes, du fait de l'absence des deux cycles aromatiques, ces composés présentent de meilleures solubilités dans l'eau. Ces derniers présentent une constante de vitesse supérieure à celles des premiers cyclooctynes développés (OCT, ALO, MOFO, DIFO) grâce au cyclopropane et au benzène permettant d'augmenter la tension du cycle à 8 chaînons ($k = 0,140 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour le **BCN** et $k = 0,80 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour le **COMBO** dans un mélange eau/acétonitrile).

Cependant, en dépit du caractère bioorthogonal conféré à la SPAAC, les cyclooctynes peuvent réagir avec des thiols libres par addition thiol-yne en milieu biologique (Introduction Chapitre 4. 6).^{135,136} La difficulté de synthèse des cyclooctynes, comparativement à celle des alcynes vrais est aussi l'un des inconvénients majeurs de la réaction de SPAAC.

4.3. Applications au radiomarquage de macro-biomolécules avec du fluor-18

Grâce à l'absence de cuivre et donc à une meilleure compatibilité avec les systèmes biologiques, de nombreux couples de réactifs ont été synthétisés pour le radiomarquage de macro-biomolécules au fluor-18. Deux stratégies de synthèse sont alors envisageables. La première consiste en la préparation d'un dérivé de cyclooctyne marqué au fluor-18 pour le radiomarquage d'une molécule d'intérêt fonctionnalisée avec un azoture. La deuxième, l'inverse, un composé azoture est marqué au fluor-18 puis engagé dans une réaction de SPAAC avec une molécule d'intérêt fonctionnalisée par un cyclooctyne. Dans les deux cas, deux régioisomères sont susceptibles de se former.

La première application de marquage au fluor-18 par réaction de SPAAC a été décrite en 2011 par l'équipe de Wuest.¹³⁷ Dans cet exemple, le dérivé de DBCO [¹⁸F]-**L53** a été obtenu par réaction d'acylation entre un **DBCO-amine** commercial et le 4-¹⁸F]fluorobenzoate *N*-succinimidyle [¹⁸F]**SFB** dans l'acétonitrile pendant 30 minutes à 40 °C (Figure 48). Après purification par HPLC, le [¹⁸F]-**L53** a été obtenu avec un rendement de 85 % corrigé de la décroissance et une pureté chimique supérieure à 95 %. Une analyse du métabolisme et une étude de biodistribution effectuées sur des souris ont montré une clairance rapide dans le sang et dans les autres organes ($t_{1/2} = 53 \text{ s}$).

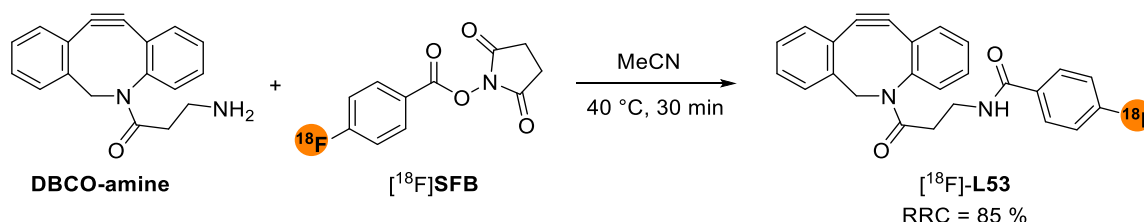


Figure 48. Fonctionnalisation du **DBCO-amine** par [¹⁸F]**SFB**

Ce cyclooctyne a ensuite été utilisé pour la réaction de SPAAC avec des molécules modèles et des composés bioactifs fonctionnalisés par un azoture tels que des carbohydrates ([¹⁸F]-**L54**) et la geldanamycine ([¹⁸F]-**L55**), antibiotique permettant la régulation du cycle

cellulaire en dégradant les protéines altérées par des mutations (Figure 49). Cette méthode générale peut permettre le marquage d'autres macro-biomolécules.

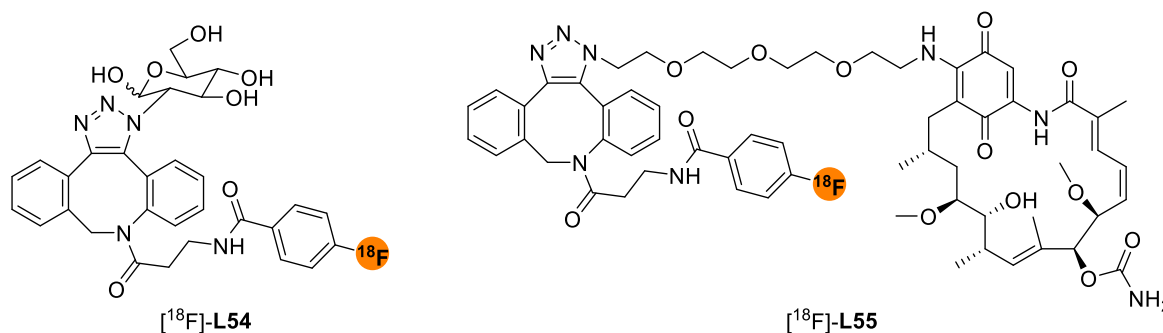


Figure 49. Exemples d'applications avec le DBCO-4-fluorobenzoate

L'utilisation de cyclooctynes a aussi été développée dans le cadre du radiomarquage de peptides. Deux dérivés de **DBCO** ont permis le marquage de macro-biomolécules pré-fonctionnalisées par un azoture tel qu'un peptide A20FMDV2, ligand du récepteur à l'intégrine $\alpha_v\beta_6$ ou un peptide Tyr³-octréotate.^{138,139}

Dans le premier exemple, la conjugaison entre un dérivé du DBCO radiomarqué au fluor-18 et un peptide A20FMDV2 fonctionnalisé par un azoture a été réalisée en 30 minutes pour obtenir [18F]-L56 avec un rendement supérieur à 70 % (Figure 50).¹⁴⁰ A ce jour, ce conjugué n'a pas été évalué *in vivo*, mais la même équipe avait déjà radiomarqué ce peptide avec du 4-[18F]fluorobenzoate et du [18F]fluoropentyne et avait observé d'importantes différences de biodistribution dues aux différences de lipophilie des groupes prosthétiques utilisés.¹³⁸

Dans le deuxième exemple, un peptide Tyr³-octréotate fonctionnalisé par un azoture a été marqué par du [18F]**ADIBO** (analogue « aliphatique » du [18F]-L53) en seulement 10 à 15 minutes de réaction afin d'obtenir [18F]-L57 avec des rendements dépassant 87 % dès 10 minutes (Figure 50).¹³⁹

La biodistribution des composés radiomarqués lors d'imagerie TEP permet d'évaluer la quantité de composé fixé sur la cible d'intérêt, ainsi que sa voie d'élimination. Les propriétés physico-chimiques, dont la lipophilie, du groupement prosthétique peuvent modifier les propriétés de liaison du radiotracer à sa cible. La taille et la lipophilie des cyclooctynes peuvent être considérées comme une limitation pour le radiomarquage de petits peptides.

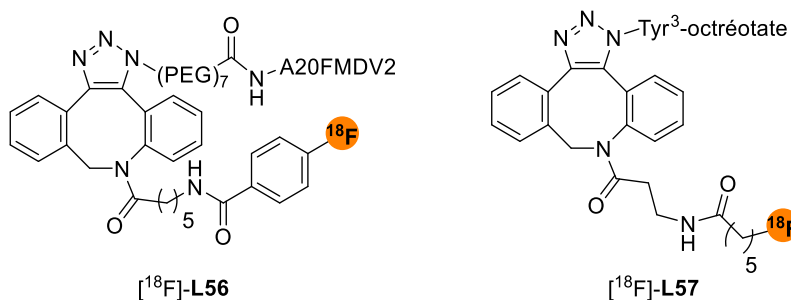


Figure 50. Exemples de marquage de peptides fonctionnalisés par un azoture par conjugaison avec un dérivé de DBCO

L'approche inverse, correspondant à la réaction de SPAAC entre une macro-biomolécule fonctionnalisée par un cyclooctyne et un azoture marqué au fluor-18 a été développée par l'équipe de Elsinga pour le radiomarquage d'une Lys³-bombésine fonctionnalisée par un dérivé de **DBCO**.¹⁴¹ Différents azotures radiofluorés tels que l'azoture de [¹⁸F]fluorobutane [¹⁸F]-**L58**, l'azoture de 4-[¹⁸F]fluorobenzyle [¹⁸F]-**L59** ou encore l'azoture de [¹⁸F]fluorotriéthoxybutane [¹⁸F]-**60** ont été synthétisés pour cette étude avec des rendements de 19, 31 et 37 % pour les composés [¹⁸F]-**L64**, [¹⁸F]-**L63** et [¹⁸F]-**L62**, respectivement (Figure 51). En dépit des modifications structurales induites par la présence du cyclooctyne radiomarqué, l'affinité du peptide pour les récepteurs « gastrin releasing peptide » reste élevée.

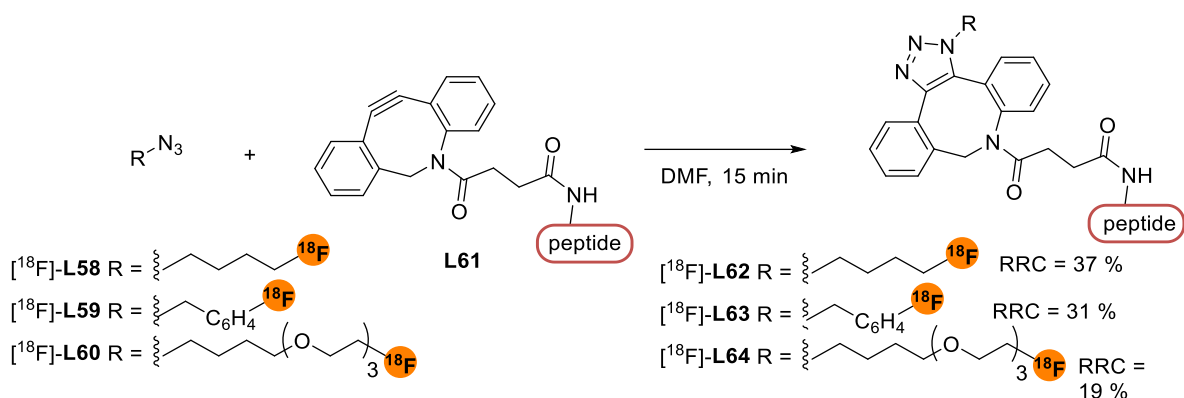


Figure 51. Exemples de marquage de peptide fonctionnalisé sur un dérivé **DBCO** avec différents azotures [¹⁸F]fluorés

En 2012, le groupe d'Evans a optimisé les conditions de radiomarquage de l'azoture de [¹⁸F]fluoroéthyle [¹⁸F]-**L42** avec cinq dérivés de cyclooctynes **L65** à **L70** (Figure 52). Les meilleurs rendements radiochimiques ont été obtenus en réalisant la réaction dans l'acétonitrile, pendant 15 minutes à 90 °C.¹⁴²

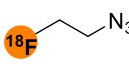
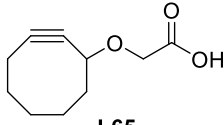
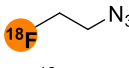
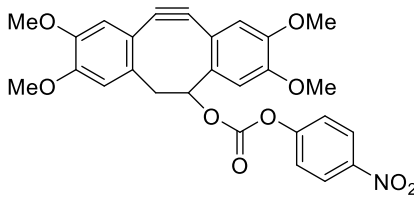
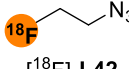
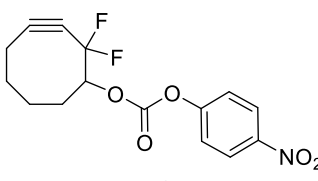
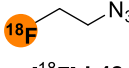
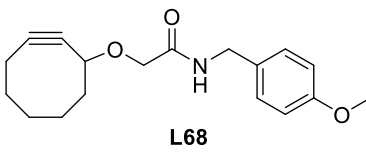
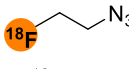
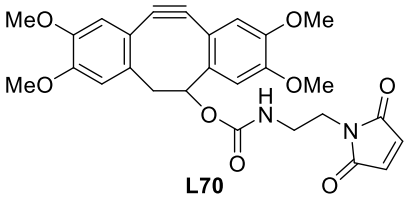
Azoture	Cyclooctyne	T (°C)	Temps (min)	Solvant	RRC (%)
 $[^{18}\text{F}]\text{-L42}$	 L65	40	15	MeCN	4,4
		40	15	H ₂ O	0,3
		90	15	MeCN	24,9
 $[^{18}\text{F}]\text{-L42}$	 L66	40	15	MeCN	7,1
		40	15	H ₂ O	33,3
		40	60	H ₂ O	36,2
		90	15	MeCN	31,5
 $[^{18}\text{F}]\text{-L42}$	 L67	40	15	MeCN	62,1
		40	15	H ₂ O	26,1
		40	60	H ₂ O	17,8
		90	15	MeCN	97,1
 $[^{18}\text{F}]\text{-L42}$	 L68	90	15	MeCN	60,4
 $[^{18}\text{F}]\text{-L42}$	 L70	40	15	MeCN	3,2
		90	15	MeCN	9,6

Figure 52. Etude méthodologique de température et solvants pour la réaction de SPAAC avec l'azoture de [¹⁸F]fluoroéthyle

Une problématique générale dans le radiomarquage de peptides reste la purification du produit final par HPLC, compte tenu de la stœchiométrie des réactions de conjugaison. Pour pallier le problème de séparation des réactifs (groupe prosthétique radiofluoré et peptide d'intérêt) du produit (peptide conjugué avec le groupe prosthétique radiofluoré), le groupe de Kim a proposé une méthode originale.¹⁴³ Cette étude a été effectuée avec quatre peptides fonctionnalisés par un **DBCO**. Premièrement, la réaction de marquage au fluor-18 du groupe prosthétique contenant l'azoture, puis celle de click sont effectuées. Ensuite, un second azoture immobilisé sur une résine est introduit dans le mélange réactionnel afin de « piéger » le DBCO n'ayant pas réagi. Après filtration et lavage, les peptides marqués sont obtenus en 35 minutes de réaction avec un rendement de 92 % corrigé de la décroissance.

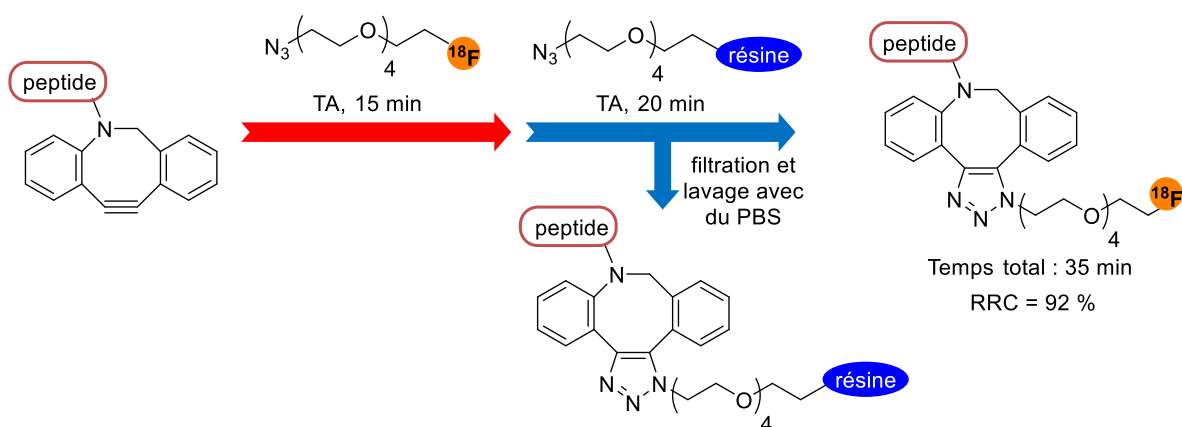


Figure 53. Méthode de purification de peptides développée par l'équipe de Kim¹⁴³

5. La réaction de Diels-Alder à demande inverse en électrons

5.1. Généralités

La réaction de click entre le *trans*-cyclooctène (TCO) et la tétrazine, basée sur la réaction de Diels-Alder à demande inverse en électrons (IEDDA), a été explorée pour la première fois par le groupe de Fox en 2008 et répertoriée dans la liste des réactions bioorthogonales.¹⁴⁴ La réaction entre un *trans*-cyclooctène et une dipyridyltétrazine conduit à la pyridazine avec une constante de vitesse de $2000 (\pm 400) M^{-1}.s^{-1}$ dans un mélange méthanol/eau (9/1).

La réaction de Diels-Alder à demande inverse en électrons a l'avantage d'être une réaction très rapide et non réversible grâce à la perte d'azote moléculaire. Cette réaction peut être effectuée avec de hauts rendements dans les solvants organiques, l'eau ou encore des solutions tampons.

5.2. Mécanisme réactionnel

Les dérivés *trans*-cyclooctènes agissent comme diénophiles et les diaryltétrazines comme diènes par réaction de Diels-Alder. Cette réaction a lieu suivant deux étapes successives : une réaction de Diels-Alder à demande inverse en électrons suivie d'une réaction de rétro-Diels-Alder pour éliminer le diazote formé (Figure 54).

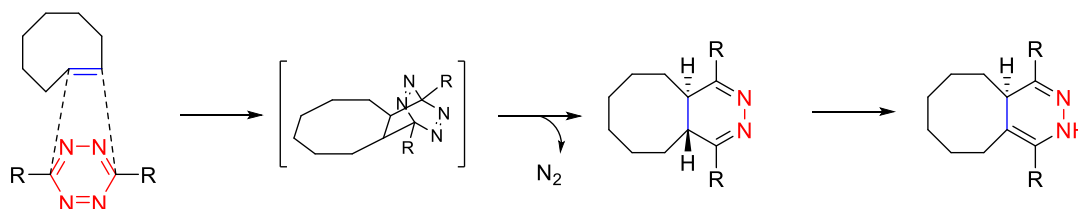


Figure 54. Mécanisme de la réaction entre un *trans*-cyclooctène et une tétrazine

Cette réaction est d'autant plus rapide dans l'eau, mais certaines tétrazines ne sont pas stables en milieu aqueux et peuvent conduire à une ouverture de cycle puis à la formation de 1,3,4-oxadiazole.¹⁴⁵ Elles sont donc souvent substituées par des groupements aryles afin

d'éviter la réaction immédiate avec l'eau. Le TCO peut aussi s'isomériser dans l'eau en composé *cis*, conduisant à un composé moins contraint et donc moins réactif vis-à-vis des tétrazines.

Peu de temps après, la réaction entre le norbornène **L71** et des monoaryltétrazines **L72** a été développée par le groupe de Hilderbrand pour donner une dihydropyridazine en utilisant le même mécanisme que la réaction TCO/tétrazine (Figure 55).¹⁴⁶ Cette réaction a donné lieu à la formation de 4 isomères différents. Le norbornène est plus stable que le *trans*-cyclooctène mais aussi moins réactif ($k = 1,6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$).

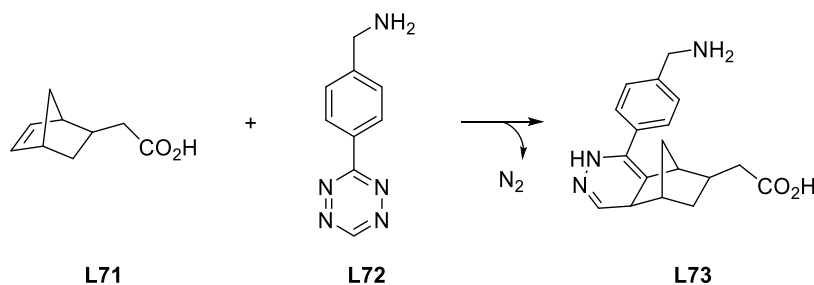


Figure 55. Réaction entre la monoaryltétrazine et le norbornène

5.3. Applications au radiomarquage de macro-biomolécules avec du fluor-18

La ligation tétrazine/TCO a été utilisée dans une approche de groupe prosthétique pour le marquage au fluor-18 de peptides. Le premier groupe prosthétique synthétisé pour le marquage au fluor-18 a été développé par le groupe de Fox en 2010.¹⁴⁷ Un premier essai a été effectué en utilisant un dérivé de tétrazine pour la conjugaison avec un *trans*-cyclooctène porté par la molécule d'intérêt. L'instabilité de la tétrazine et donc le rendement radiochimique de seulement 1 % a amené vers un changement de stratégie. Un dérivé de cyclooctène marqué au fluor-18 [¹⁸F]-**L74** a été synthétisé à partir du précurseur nosylate avec un rendement corrigé de la décroissance de 71 % après 15 minutes de réaction. Ce dernier a ensuite été impliqué dans une réaction de conjugaison avec un peptide contenant le motif RGD préalablement fonctionnalisé par une tétrazine **L75** (Figure 56).¹⁴⁸

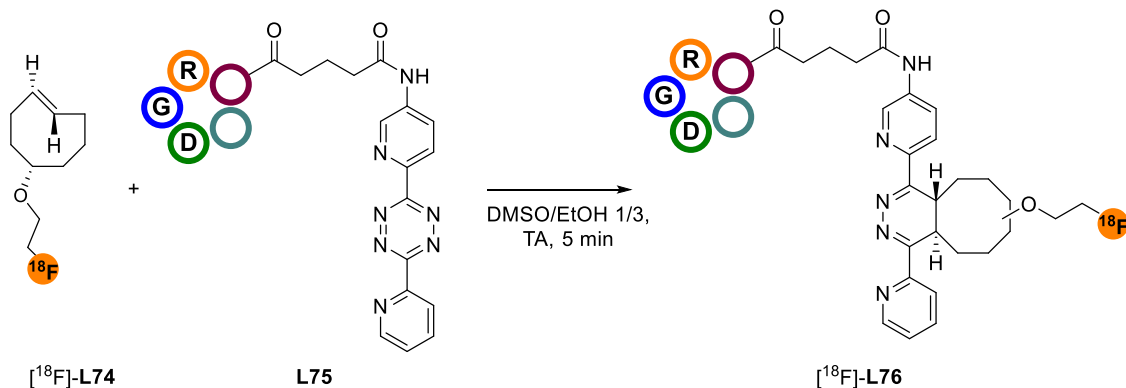


Figure 56. Marquage du RGD au fluor-18 par réaction TCO/tétrazine

Un autre peptide, l'exendine-4, ligand du récepteur du glucagon-like peptide, a été marqué au fluor-18 en utilisant la même méthode que précédemment. L'exendine-4 a été modifiée en position 12 par remplacement d'une lysine par une cystéine afin d'être conjuguée à la tétrazine fonctionnalisée avec une entité maléimide. Le radiomarquage a été réalisé par conjugaison par réaction IEDDA avec un dérivé de *trans*-cyclooctène marqué au fluor-18.^{149,150}

Un travail récent avec du fluor-18 a montré que la modification de la tétrazine en ajoutant un groupement trifluorométhyle ($[^{18}\text{F}]\text{-L77}$) a permis d'augmenter la stabilité métabolique (Figure 57).¹⁵¹ Des modifications sur le groupe prosthétique TCO ($[^{18}\text{F}]\text{-L78}$) ont aussi permis d'augmenter la vitesse de réaction jusqu'à $3,3 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (Figure 57).¹⁵²

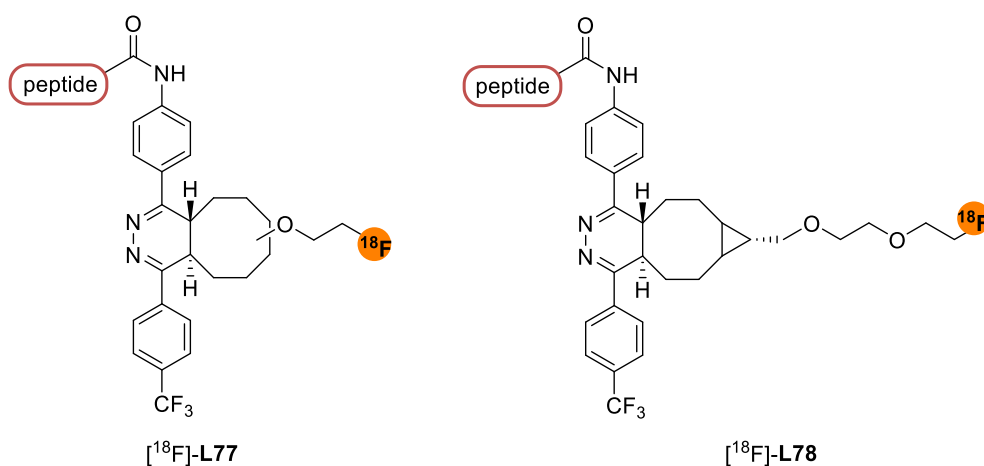


Figure 57. Modifications de la tétrazine et du TCO afin améliorer leurs propriétés

5.4. Marquage *in vivo* par approche de pré-ciblage

L'imagerie par pré-ciblage s'avère utile pour les macro-biomolécules dont la pharmacodistribution est lente, notamment pour les anticorps. En effet, de manière générale en imagerie, le rapport signal spécifique sur bruit est un critère majeur d'obtention d'images exploitables. Or dans le cas des anticorps, ce rapport n'est exploitable que 24 à 48 heures après injection des anticorps en raison de leur pharmacodistribution et de l'élimination lente des anticorps n'ayant pas atteint leur cible (signal non spécifique = bruit). Un marquage direct avec des radioisotopes à courte demi-vie tel que le fluor-18 n'est donc pas envisageable.

Pour utiliser des anticorps comme agents d'imagerie (ou d'autres macro-biomolécules à distribution lente), deux possibilités sont envisageables :

- Soit le radiomarquage est réalisé avec un isotope de demi-vie adaptée.

Le radiomarquage direct d'anticorps a déjà été effectué avec du cuivre-64 ($t_{1/2} = 12,6 \text{ h}$) ou du zirconium-89 ($t_{1/2} = 3,2 \text{ jours}$).^{153,154} Ces résultats de radiomarquage direct au zirconium ont permis d'obtenir des images de tumeurs avec un bon rapport signal sur bruit. Cependant, le relargage de Zr^{4+} dû à la chélation non optimisée ou encore la dose efficace

élevée reçue par le patient ($0,53-0,66 \text{ mSv.MBq}^{-1}$ contre $0,02 \text{ mSv.MBq}^{-1}$ pour un examen de [^{18}F]FDG) sont des inconvénients majeurs de cette méthode (Figure 58 A).¹⁵⁵

- Soit une stratégie de pré-ciblage est utilisée avec des émetteurs de positons à vie brève.

Cette méthode consiste à injecter un anticorps, préalablement fonctionnalisé avec une entité chimique spécifique, puis à attendre sa distribution spécifique à sa cible (24 à 48 heures), et enfin à injecter « un effecteur » contenant le radionucléide qui réagira sélectivement avec l'anticorps fonctionnalisé (Figure 58 B).^{156,157} L'un des défis majeurs de cette approche est que l'anticorps et l'effecteur radioactif doivent réagir de manière chimiosélective et bioorthogonale et ce, en dépit de la grande dilution des réactifs *in vivo*. La réaction de l'effecteur radioactif avec l'anticorps pré-fonctionnalisé doit être rapide vis-à-vis de la période du fluor-18. Les réactions de chimie click permettent de répondre à la plupart de ces critères. Des exemples de stratégie de pré-ciblage utilisant la chimie click ont déjà été développés pour l'imagerie TEP.^{155,157,158} Les réactions tétrazine/TCO sont, à ce jour, les réactions de chimie click les plus rapides.

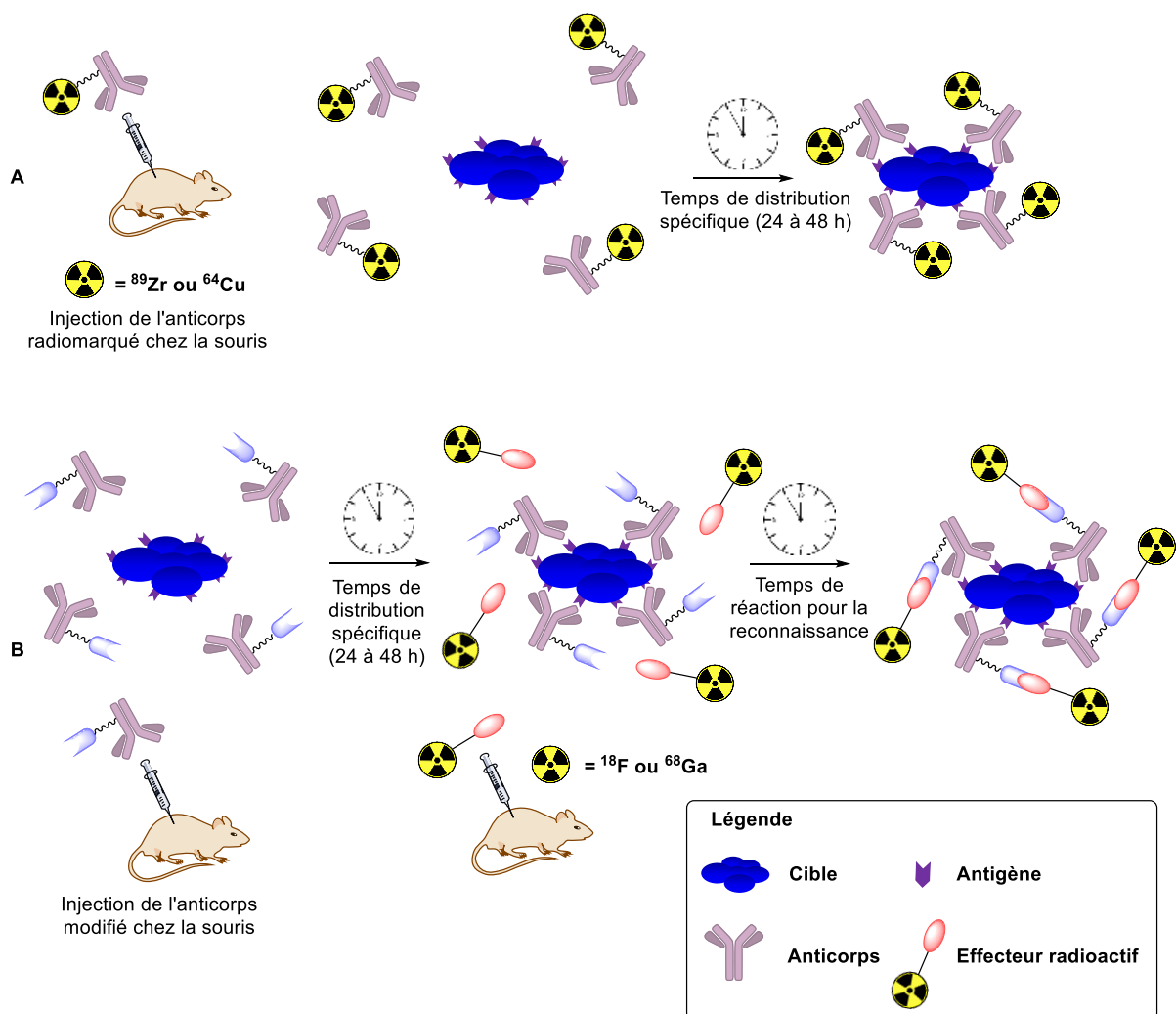


Figure 58. Stratégie de marquage d'anticorps A) par marquage direct B) par « pré-ciblage »

Un marquage à l'indium-111 a été développé pour des applications *in vivo* en imagerie TEP par pré-ciblage entre un TCO lié à un anticorps et le radionucléide porté par la tétrazine (tétrazine fonctionnalisée par un chélateur bifonctionnel DOTA pour complexer l'indium-111).¹⁵⁹ Le composé TCO-anticorps (anticorps CC49 dirigé contre des carcinomes du colon humain) a d'abord été injecté chez la souris afin que l'anticorps se fixe sur sa cible, puis, 24 heures après, la tétrazine contenant l'indium-111 a été injectée. La fixation sur la tumeur xéno greffée a été observée 3 heures après l'injection de la tétrazine avec un important rapport tumeur/muscles de 12. Aucun signal radioactif non-spécifique dans le sang ou dans les autres organes n'a été détecté. L'élimination rapide de la tétrazine radioactive des organes non-ciblés montre sa bioorthogonalité vis-à-vis du TCO.

Plusieurs réactions de pré-ciblage ont ensuite été développées avec différents radioisotopes puis avec du fluor-18 en utilisant des tétrazines ou des *trans*-cyclooctènes radiomarqués [¹⁸F]-L79 à [¹⁸F]-L82 (Figure 59).^{152,160-162}

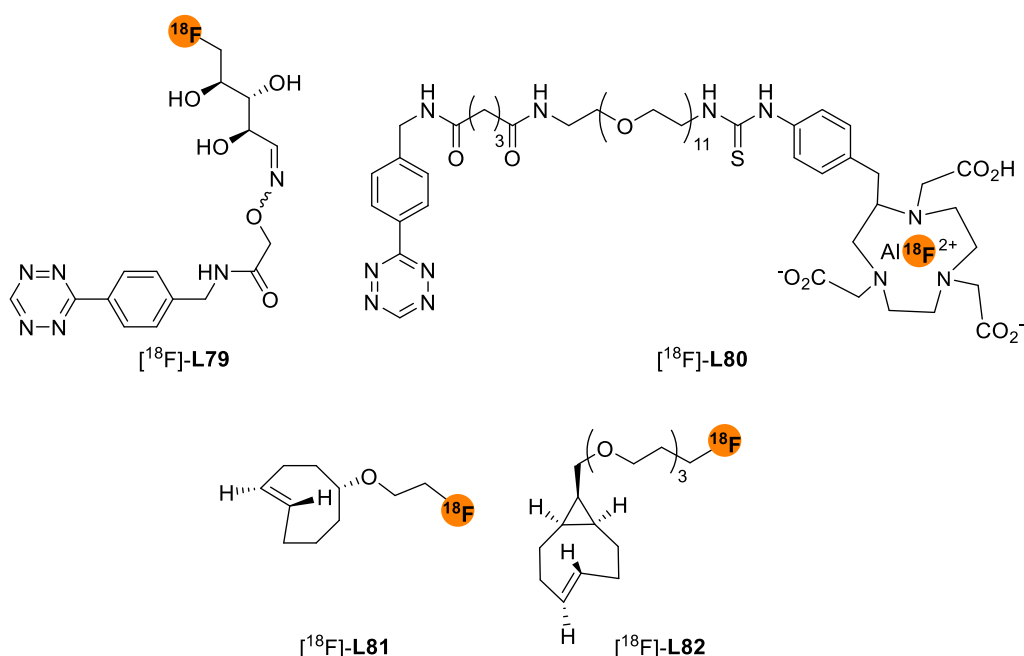


Figure 59. Tétrazines et *trans*-cyclooctènes dans le cadre d'applications de pré-ciblage avec le fluor-18

L'équipe de Meyer a récemment appliqué *in vivo* la stratégie de pré-ciblage par ligation TCO/tétrazine à un marquage au fluor-18.¹⁶¹ Ils ont obtenu des images de tumeurs de cellules BxPC3 xéno greffées chez la souris en utilisant des anticorps marqués au cuivre-64 (approche directe). Dans un deuxième temps, Meyer *et al.* ont radiomarqué un dérivé de tétrazine au fluor-18 pour la réaction bioorthonale *in vivo* avec un anticorps 5B1, ciblant le marqueur d'adénocarcinome pancréatique, fonctionnalisé par un TCO. L'anticorps fonctionnalisé a été injecté à des souris porteuses de xéno greffes de cellules BxPC3 (adénocarcinome pancréatique humain) 72 heures avant l'injection de la tétrazine NOTA [¹⁸F]-L80 marquée au fluor-18 par complexation de Al[¹⁸F]²⁺. En imagerie TEP, la tumeur a pu être observée à partir d'une heure après l'injection de la tétrazine. Dans le tractus digestif et

les organes d'élimination (foie et reins), le signal non spécifique reste modéré. Une analyse dosimétrique a montré que cette approche de pré-ciblage a réduit d'un facteur 60 la dose efficace reçue en comparaison avec un marquage direct de l'anticorps au zirconium-89.

Ces résultats permettent de conclure que l'IEDDA est une réaction bioorthogonale adaptée au radiomarquage *in vivo* par stratégie de pré-ciblage. Sa constante de vitesse est, par ailleurs, du même ordre de grandeur que certaines réactions enzymatiques dont les applications pour le marquage *in vivo* seront détaillées dans : Résultats et discussion Chapitre 4. 2.2.

6. Réaction thiol-Michael

6.1. Généralités

La réaction thiol-Michael fait interagir des thiols, en tant que nucléophiles sur des systèmes α,β -insaturés. Les acrylates, et leurs dérivés tels que les méthacrylates, les maléimides, les esters de fumarates, les acrylonitriles, les cinnamates et les crotonates, peuvent être utilisés comme électrophiles dans la réaction thiol-Michael. Cette réaction est considérée comme orthogonale permettant d'obtenir de hauts rendements dans des conditions de réaction douces.^{163,164}

6.2. Mécanisme réactionnel

La réaction de thiol-Michael est catalysée par une base permettant de générer le thiolate (Figure 60). Le thiolate réagit ensuite par addition nucléophile avec un système α,β -insaturé pour former un intermédiaire chargé négativement. Le carbone en α - du groupement électroattracteur de l'anion est aussi une base forte et récupère le proton de la base pour former le produit anti-Markovnikov.^{164,165}

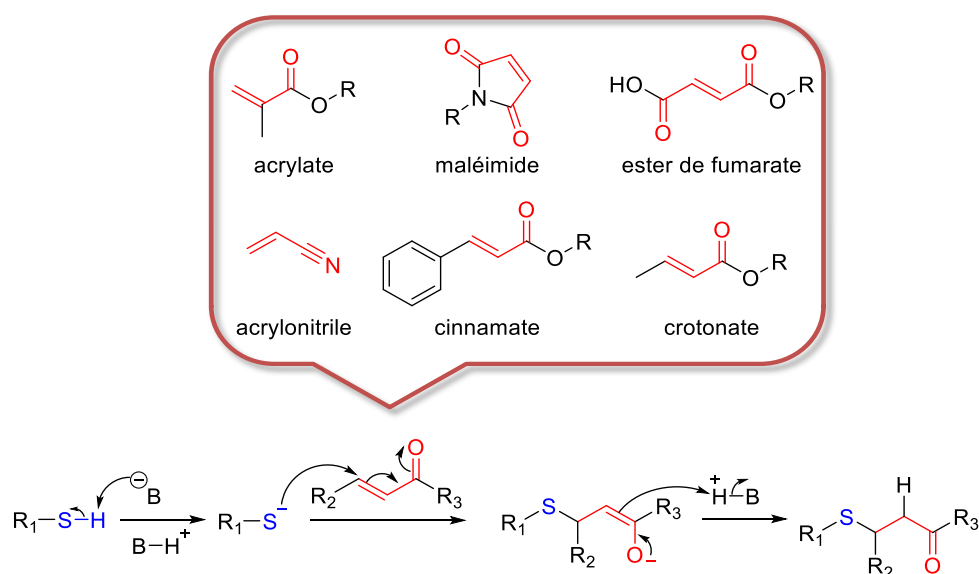


Figure 60. Mécanisme de la réaction thiol-Michael

La vitesse ainsi que la conversion des réactions d'addition thiol-Michael dépendent du pH, des deux réactifs ainsi que du solvant, et principalement de la solubilité des réactifs dans ce dernier.¹⁶⁶ Plus la base utilisée sera forte, meilleure sera la déprotonation du thiol et donc plus rapide sera la réaction. De manière générale, la base pour déprotoner le thiol doit avoir un pKa de l'ordre de celui du thiol. La réactivité des thiols est proportionnelle au pKa de ce dernier, les sulfanylpropanoate et les sulfanylacétates sont plus réactifs que les thioalcanes.¹⁶³ Pour les accepteurs de Michael, la nature du groupement électroattracteur et le degré de substitution modifient la réactivité; plus la déficience électronique est importante, meilleure sera la réactivité. Il a donc été démontré que l'ordre de réactivité est le suivant : maléimide > fumarate > acrylate > acrylonitrile > crotonate > cinnamate > méthacrylate.¹⁶³ L'encombrement stérique de l'accepteur de Michael peut aussi influencer la vitesse de réaction; plus le composé sera encombré, plus lente sera la réaction.

La fonction thiol est présente sur les chaînes latérales des cystéines des peptides et des protéines ne présentant pas de pont disulfure. De plus, la cystéine, n'étant pas un acide aminé extrêmement fréquent dans la séquence des peptides, le nombre d'éléments conjugués à la chaîne polypeptidique sera limité (en comparaison avec une fonctionnalisation sur le résidu lysine par exemple). Les maléimides, grâce à leur importante électrodéficience et donc importante réactivité, sont de bons groupes prosthétiques pour la conjugaison avec des cystéines. En effet, la réaction entre un thiol et un maléimide est très répandue puisqu'elle ne nécessite pas de chauffage ou de catalyseur, et peut être effectuée dans de nombreux solvants organiques et même des tampons aqueux.¹⁶⁴ Elle est donc très utilisée pour des applications de bioconjugaison, que ce soit pour la fonctionnalisation de polymères ou de macro-biomolécules.¹⁶⁷⁻¹⁶⁹ Elle a aussi été développée dans le cadre du radiomarquage de molécules au fluor-18.

6.3. Applications au radiomarquage de macro-biomolécules avec du fluor-18

Trois principaux groupes prosthétiques présentant une fonction maléimide ont été décrits et utilisés en radiochimie du fluor-18 pour le marquage de macro-biomolécules, [¹⁸F]FPyMe, [¹⁸F]FBEM, [¹⁸F]FBAM (Figure 61).^{49,170,171} Le composé [¹⁸F]FPyMe est synthétisé en une seule étape à partir du composé [¹⁸F]-L83, protégé par un furane afin d'éviter la dégradation du maléimide lors du marquage au fluor-18, dans des conditions classiques de radiochimie suivi d'une déprotection par réaction de rétro-Diels-Alder. Les composés [¹⁸F]FBEM et [¹⁸F]FBAM sont synthétisés respectivement à partir des composés déjà connus [¹⁸F]SFB et [¹⁸F]FBA.¹⁷²

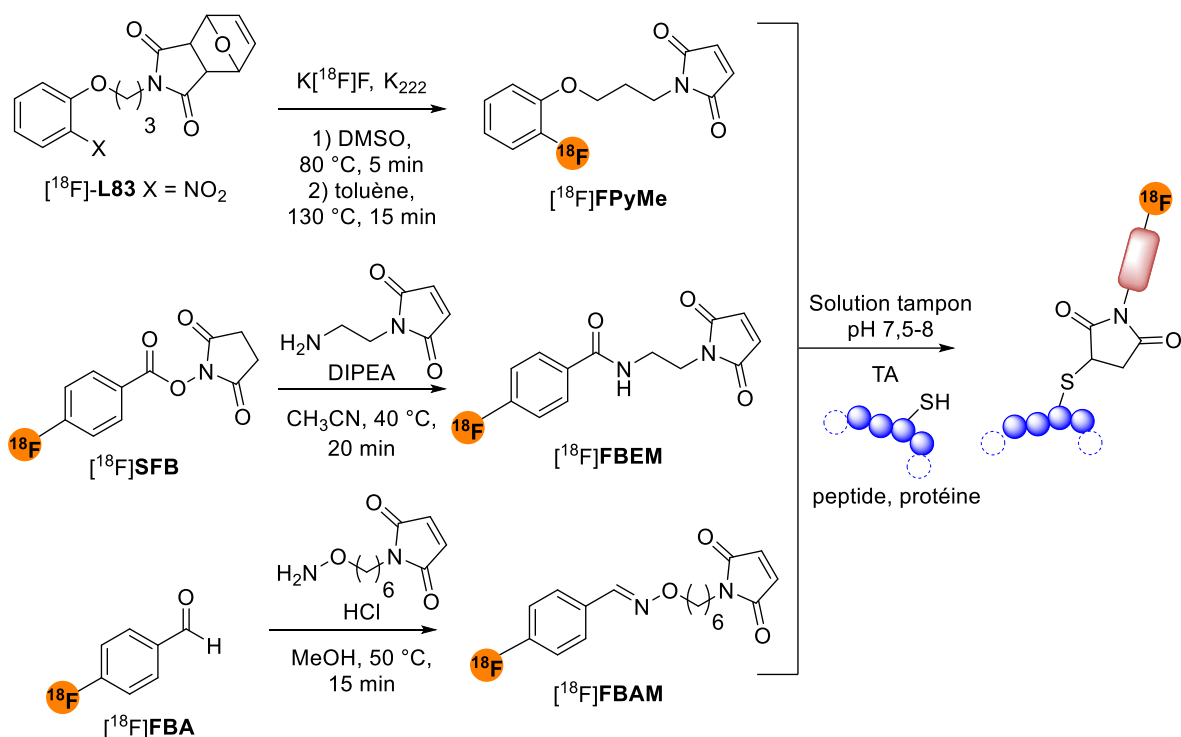


Figure 61. Groupes prosthétiques à base de maléimide décrits pour une application en chimie du fluor-18

Les groupes prosthétiques contenant un maléimide ont par la suite permis de marquer des peptides qui ciblent les récepteurs au glucagon,¹⁷³ ou encore, à l'EGF.¹⁷⁴

Récemment, le groupe de Wu a développé un nouveau groupe prosthétique présentant une fonction sulfone de vinyle ([¹⁸F]-L84) pour le radiomarquage au fluor-18 par addition thiol-Michael. La préparation du groupe prosthétique marqué au fluor-18 se fait en une seule étape, ce qui en fait un avantage par rapport aux composés contenant un maléimide.¹⁷⁵ Un dérivé de la neurotensine Cys-NT (L85), modifié coté N-terminal par addition d'une cystéine, a ensuite été marqué au fluor-18 afin d'étudier l'implication des récepteurs à la neurotensine dans la croissance tumorale.

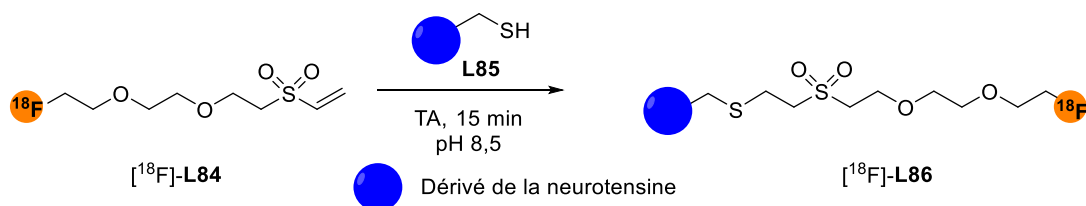


Figure 62. Marquage par addition thiol-Michael de sulfone de vinyle

7. Bilan et rappel des objectifs

Les exemples de radiomarquages de macro-biomolécules sont nombreux dans la littérature mais chaque approche présente des avantages et des inconvénients (Tableau 8).^{123,176} A ce jour, aucune des approches décrites n'est considérée comme idéale pour le radiomarquage de macro-biomolécules que ce soit *in vitro*, ou *in vivo* par pré-ciblage.

La stratégie prosthétique, et notamment l'utilisation de [¹⁸F]SFB, a fait preuve de sa robustesse étant donné le nombre d'utilisations décrites dans la littérature, mais l'aspect multi-étapes de cette approche et le manque de sélectivité de la réaction de conjugaison amènent à réfléchir à de nouvelles approches.

Les marquages directs au fluor-18, tels qu'ils sont rapportés dans la littérature, souffrent de faibles rendements de marquage (ouverture de cycles à trois chaînons contraints), utilisent des éléments non-conventionnels tels que le bore ou l'aluminium ou nécessitent l'emploi de groupements accepteurs de fluor-18 très lipophiles (SiFA), ce qui peut affecter la biodistribution et la liaison à sa cible de la macro-biomolécule. L'activité molaire des produits radiomarqués est en outre souvent faible du fait de l'utilisation de réactifs fluorés ou du besoin d'addition de fluor stable.

Les réactions de chimie click, introduites il y a une dizaine d'années, dans le cadre de radiomarquage de macro-biomolécules au fluor-18 par approche prosthétique, ont été une vraie valeur ajoutée et sont aujourd'hui très utilisées. En effet, les groupes prosthétiques marqués au fluor-18 sont préparés, le plus souvent, en une seule étape et la réaction de conjugaison est souvent efficace et bioorthogonale. Cependant, le radiomarquage *in vivo* par pré-ciblage n'a jusqu'à présent été que peu développé, en dépit de son utilité pour l'utilisation en imagerie de macro-biomolécules à biodistribution lente (*e.g.* anticorps). Seule l'application de la réaction d'IEDDA entre une tétrazine et un *trans*-cyclooctène, reconnue comme l'une des réactions de chimie click les plus rapides, a permis de faire la preuve de concept *in vivo* d'un marquage d'anticorps par pré-ciblage.¹⁶¹

Marquage prosthétique standard (réactions principales sur macro-biomolécules natives ou pré-fonctionnalisées)				
Réaction	Réactif 1	Réactif 2	Constantes de vitesse (M ⁻¹ .s ⁻¹)	Commentaires
Acylation des amines		R ₂ -NH ₂	ND	Approche robuste et très largement utilisée Manque de régiosélectivité Compétition entre l'acylation et l'hydrolyse du succinimide en milieu aqueux
Formation d'oxime et d'hydrazone	R ₁ -C(=O)H ou R ₁ -C(=O)R ₂	H ₂ N-O-R ₃ ou H ₂ N-NH-R ₃	10 ⁻⁴ -10 ⁻³	Facilité de préparation du groupe prosthétique Réaction à pH acide
Systèmes pallado-catalysés			ND	Régioslectif Faibles rendements de conjugaison
Formation de thiazoline			ND	Facilité de préparation du groupe prosthétique Régiosélectif Nécessite une Cys en N-terminal
Marquage direct				
Réaction	Produit de départ	Produit de couplage	Constantes de vitesse (M ⁻¹ .s ⁻¹)	Commentaires
C-F			ND	Solvant organo-aqueux Température encore élevée Rendements aléatoires
B-F			ND	Solvant organo-aqueux Faible activité molaire
SiFA			ND	Solvant organo-aqueux Faible activité molaire Lipophilie du groupe accepteur
« AIF »			ND	Radiofluoruration à faible température avec HBED Radiofluoruration à température élevée avec DOTA ou NOTA

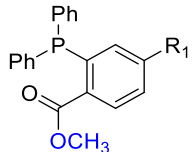

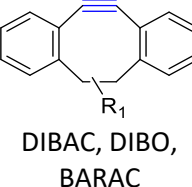
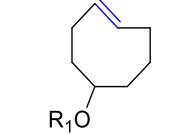
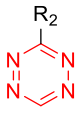

Chimie click – marquage prosthétique et pré-ciblage				
Réaction	Réactif 1	Réactif 2	Constantes de vitesse (M ⁻¹ .s ⁻¹)	Commentaires
Ligation de Staudinger		R ₂ -N ₃	0,003	Faible vitesse de réaction Phosphines sensibles à l'oxydation
CuAAC	R ₁ -C≡C	R ₂ -N ₃	10-100 (Cu 10-100 μM)	Vitesse de réaction élevée Cytotoxicité du cuivre utilisé pour la catalyse
SPAAC	 OCT, DIFO, BCN	R ₂ -N ₃	0,0012-0,014 (MeCN)	Pas de catalyseur Vitesse de réaction faible
	 DIBAC, DIBO, BARAC		0,17-0,96	Pas de catalyseur Vitesse plus élevée Manque de régiosélectivité (Sensibles aux thiols)
IEDDA			210-2800	Vitesse de réaction très élevée Réactifs sensibles à l'eau TCO peut s'isomériser
Addition de thiol-Michael	R-SH		734	Rapidité de réaction Faible stabilité du maléimide et du produit d'addition Manque de régiosélectivité

Tableau 8. Récapitulatif des constantes de vitesse et des inconvénients de chaque réaction de click

Ce travail de thèse s'attachera à essayer de lever certaines barrières observées dans les approches décrites à ce jour pour le radiomarquage de macro-biomolécules au fluor-18 :

- Deux nouveaux réactifs versatiles ont été développés pour un marquage de macro-biomolécules par approche prosthétique standard utilisant les réactions de CuAAC et SPAAC pour leur conjugaison (Résultats et discussion – chapitre 1),
- Dans l'optique d'un marquage direct, une étude sur la réactivité de la pyridine vis-à-vis de la (radio)fluoruration a été initiée (Résultats et discussion – chapitre 2),
- La réaction de chimie click de SPSAC, a été appliquée pour la première fois en chimie du fluor-18 pour des marquages par approche prosthétique mais aussi dans l'optique d'un marquage *in vivo* par pré-ciblage (Résultats et discussion – chapitre 3),
- Une approche enzymatique, dans un but de marquage *in vivo* par pré-ciblage, a enfin été explorée (Résultats et discussion – chapitre 4).

Résultats et discussion

Chapitre 1. Groupes prosthétiques pour la conjugaison par CuAAC et SPAAC

1. Réaction de CuAAC entre un azoture et un alcyne terminal

1.1. Résultats antérieurs

Comme décrit dans l'introduction (Introduction Chapitre 4.3.4), de nombreux composés pour la réaction de cycloaddition catalysée au cuivre pour la radiochimie ont été synthétisés ces dix dernières années.

Les groupes de Kuhnast et de Inkster, en 2008, ont publié à quelques mois d'intervalle deux nouveaux groupes prosthétiques **L48** et **L49**, dérivés d'une pyridine, pour l'utilisation en chimie click catalysée au cuivre I (Figure 63).^{177,178} Les deux groupes prosthétiques sont presque semblables, mais **L49** possède un carbone supplémentaire sur la chaîne alcyne.

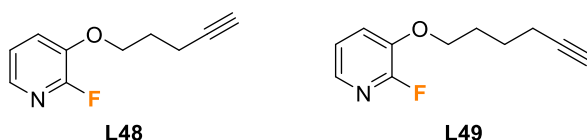
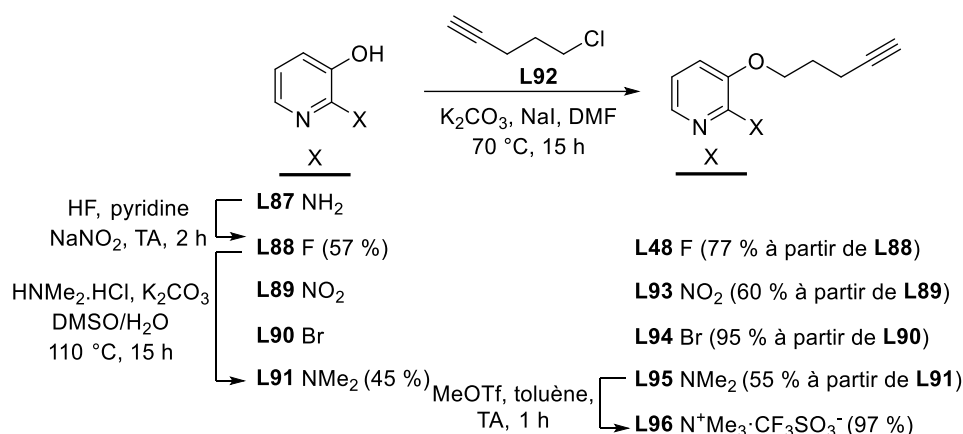


Figure 63. Structures des dérivés de fluoropyridines pour la réaction de CuAAC décrits dans la littérature^{177,178}

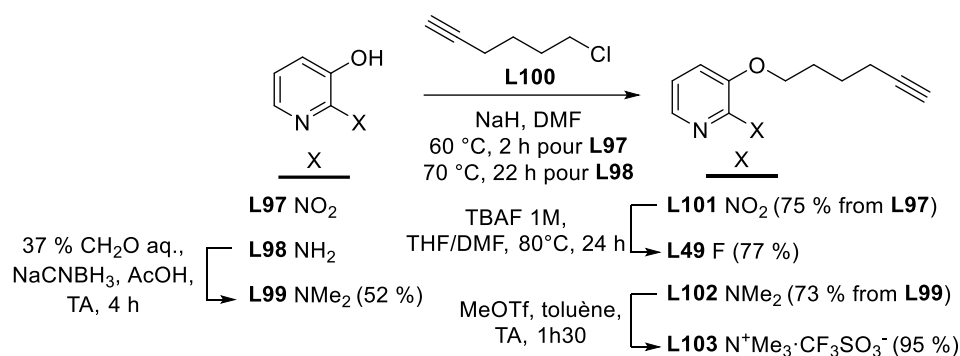
La référence froide **L48** (Figure 64) a été obtenue en deux étapes par réaction de Balz-Schiemann à partir de l'aminopyridine **L87**, puis alkylation avec l'alcyne **L92** avec un rendement de 44 %.

Trois précurseurs de radiomarquage ont été synthétisés (Figure 64) :

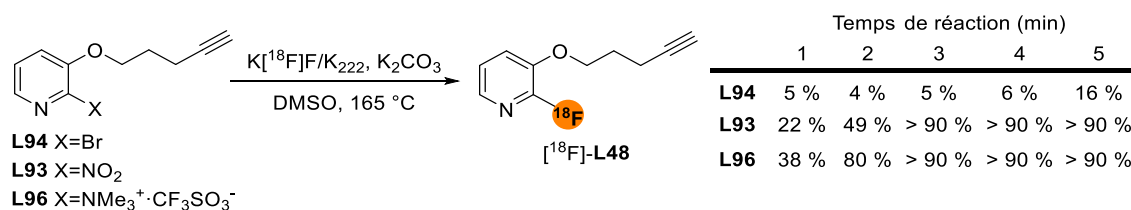
- Précurseur bromé **L94** obtenu par alkylation de la bromopyridine commerciale **L90** avec l'alcyne **L92** avec un rendement de 95 %.
- Précurseur nitro- **L93** obtenu par alkylation de la nitropyridine **L89** avec l'alcyne **L92** avec un rendement de 60 %.
- Précurseur triméthylammonium **L96** obtenu en quatre étapes par amination de la fluoropyridine **L88** conduisant au composé **L91**, alkylation de ce dernier avec **L92** puis formation du précurseur **L96** par méthylation de la fonction diméthylamine avec du trifluorométhylsulfonate avec un rendement de 14 % sur ces trois étapes.


 Figure 64. Synthèse de la référence froide et des précurseurs de **L48** de Kuhnast¹⁷⁷

La référence froide **L49** (Figure 65) a été obtenue d'abord par alkylation de la nitropyridine **L97** avec l'alcyne **L100**, puis fluoration du composé nitro- **L101** en présence de fluorure de tétrabutylammonium avec un rendement global de 58 % sur deux étapes. Le précurseur **L103** a été préparé en trois étapes. La diméthylaminopyridine **L99** a été obtenue par amination réductrice du composé aminopyridine **L98**. Cette dernière a ensuite été alkylée avec l'alcyne **L100**, puis méthylée avec du triflate de méthyle pour obtenir le composé triméthylammonium **L103** avec un rendement global de 36 % sur trois étapes.


 Figure 65. Synthèse de la référence froide et des précurseurs de **L49** d'Inkster¹⁷⁸

La cinétique de la radiosynthèse de [¹⁸F]-**L48** à partir des précurseurs bromo-, nitro- et triméthylammonium, a été suivie pendant 5 minutes à 165 °C dans le diméthylsulfoxyde (Figure 66).¹⁷⁷ Les rendements ont été calculés sur la base d'une analyse par chromatographie sur couche mince radioactive.


 Figure 66. Radiochimie à partir des précurseurs nitro- et triméthylammonium **L48**¹⁷⁷

Cette étude cinétique a permis de démontrer que la réaction de substitution nucléophile aromatique avec le fluor-18 est très rapide, que ce soit avec le groupement partant nitro-**L93** ou triméthylammonium **L96**, le rendement est supérieur à 90 % après 3 minutes de réaction à 165 °C. La conversion est encore plus rapide à partir du groupe partant triméthylammonium, comme cela a été observé sur d'autres dérivés de pyridine (Figure 81).⁴⁹ En revanche, avec le précurseur bromé **L94**, la conversion est plus lente, et atteint seulement 16 % au bout de 5 minutes.

La préparation de [¹⁸F]-**L49** a été étudiée dans trois solvants différents (diméthylsulfoxyde, diméthylformamide et acétonitrile) ainsi qu'à des températures différentes par Inkster *et al.* (Figure 67).¹⁷⁸ Les rendements ont été calculés sur la base d'une analyse par chromatographie sur couche mince radioactive.

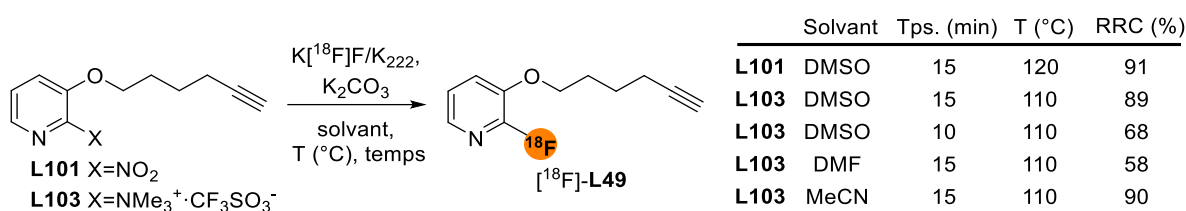


Figure 67. Radiochimie à partir des précurseurs nitro- et triméthylammonium **L49**¹⁷⁸

La réaction est très rapide avec les deux précurseurs nitro- **L101** et triméthylammonium **L103**, à la fois dans le diméthylsulfoxyde et l'acétonitrile à 110 °C, avec des rendements tous proches de 90 %, mais obtenus avec un temps de synthèse plus long que pour [¹⁸F]-**L48**. En revanche, avec le diméthylformamide, le rendement atteint seulement 58 % après 15 minutes à 110 °C.

Par la suite, l'équipe d'Inkster a développé en 2013 le dérivé **L106** présentant un espaceur de type PEG entre la pyridine et l'alcyne (Figure 68).¹⁷⁹ Le diéthylène glycol **L104** a été fonctionnalisé avec un alcyne terminal en utilisant le bromure de propargyle pour obtenir le composé **L105** avec un rendement de 51 %. La référence froide **L106** a été obtenue par réaction de Mitsunobu entre l'alcool **L105** et la 3-hydroxy-2-fluoropyridine avec un rendement de 66 %. Le triméthylammonium **L108** a ensuite été formé en deux étapes à partir du composé fluoré **L106**, avec la diméthylamine **L107** comme intermédiaire, puis méthylation avec un rendement global de 26 % sur quatre étapes.

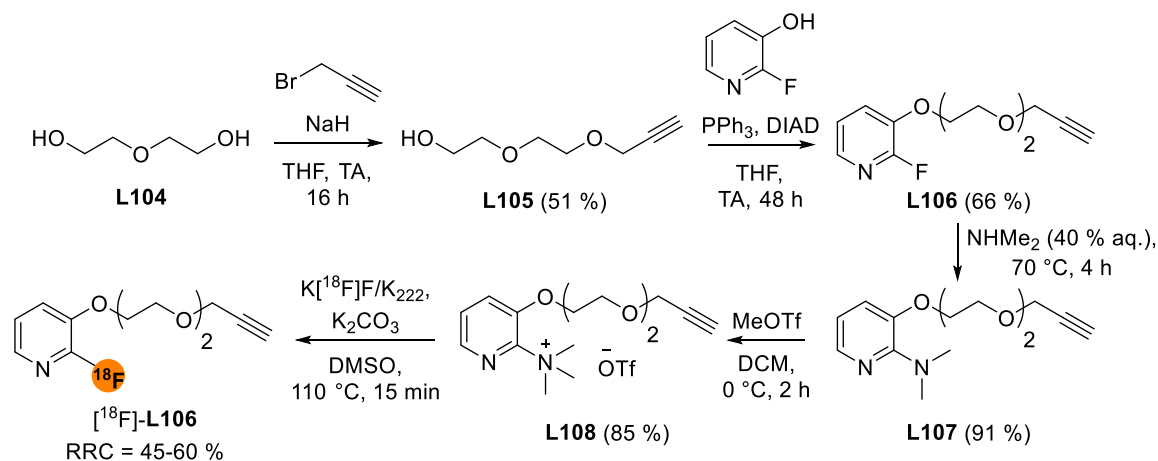


Figure 68. Synthèse de **L106** décrite par l'équipe d'Inkster¹⁷⁹

Le radiomarquage au fluor-18 de ce dernier s'effectue dans des conditions standards de marquage en utilisant du $\text{K}[^{18}\text{F}]\text{F}/\text{K}_{222}$ et du K_2CO_3 dans le diméthylsulfoxyde à 110°C pendant 15 minutes avec des rendements compris entre 45 et 60 %.

Les applications au radiomarquage de macro-biomolécules décrites avec ces groupes prosthétiques sont :

- Pour ^{18}F -**L48** : marquage de Losartan (ligand des récepteurs à l'angiotensine) et des peptides contenant le motif RGD.^{180,181}
- Pour ^{18}F -**L49** et ^{18}F -**L106** : marquage de peptides^{178,179} et d'oligonucléotides¹⁸².

1.2. Objectifs

L'objectif de cette partie est de synthétiser deux nouveaux groupes prosthétiques, présentant respectivement un alcyne ou un azoture, analogues de **L48**, **L49** et **L106**, pour la réaction de cycloaddition catalysée au cuivre. Ces nouveaux groupes prosthétiques tirent avantage des propriétés de réactivité de la pyridine vis-à-vis de la radiofluoration et de la possibilité de les conjuguer avec une macro-biomolécule par CuAAC. Ils pourront être utilisés dans une approche prosthétique classique pour le marquage de macro-biomolécules. Ce nouveau couple de groupes prosthétiques « symétriques » pourra être utilisé pour la CuAAC avec une macro-biomolécule fonctionnalisée soit par un alcyne, soit par un azoture. Les composés ^{18}F -**L48** et ^{18}F -**L49** sont volatils, ce qui est considéré comme pénalisant en radiochimie. C'est pourquoi, il a été décidé d'introduire une chaîne PEG dans la structure du groupe prosthétique (de manière similaire à **L106**¹⁷⁹) pour « alourdir » la chaîne alkyle mais aussi pour assurer une meilleure solubilité du groupe prosthétique dans un milieu organo-aqueux. Le composé **FPyKYNE** présentera donc une fonction alcyne portée par une chaîne triéthylène glycol. L'analogue **FPyZIDE**, portant une fonction azoture, sera également préparé (Figure 69).

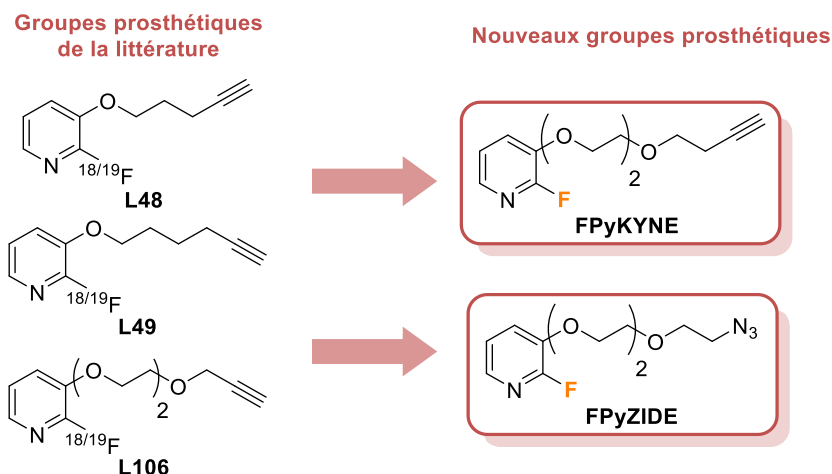


Figure 69. Structure des nouveaux groupes prosthétiques pour la CuAAC

Ces derniers seront ensuite couplés avec une cystéine modèle fonctionnalisée pour la preuve de concept, puis utilisés comme groupes prosthétiques pour le marquage de macro-biomolécules (Figure 70).

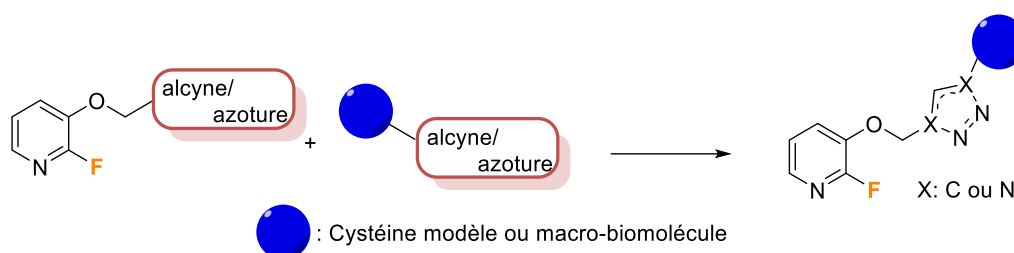


Figure 70. Structure générale des groupes prosthétiques pour la chimie click catalysée au cuivre

1.3. Analyse rétrosynthétique

Les références froides (**FPyKYNE** et **FPyZIDE**) ainsi que les précurseurs nitro- et triméthylammonium associés seront synthétisés à la fois en série alcyne et en série azoture sur le même modèle que **L106**. Le précurseur bromo-, malgré sa facilité de préparation, n'a pas été retenu pour ce travail puisqu'il a donné de mauvais rendements pour la préparation de [^{18}F]-**L48** comparativement aux précurseurs nitro- et triméthylammonium.¹⁷⁷ Les références froides de cycloaddition seront obtenues dans les deux cas par réaction de click catalysée au cuivre en une étape entre **FPyKYNE** et **FPyZIDE** et les cystéines fonctionnalisées correspondantes (azoture et alcyne respectivement).

a) Rétrosynthèse des références froides

La synthèse des références froides résultera de la réaction de cycloaddition de **FPyKYNE** ou **FPyZIDE** avec les cystéines fonctionnalisées respectivement avec un azoture ou un alcyne (Schéma 1). Les fluoropyridines **FPyKYNE** et **FPyZIDE** seront synthétisées par *O*-alkylation des hydroxypyridines correspondantes et des chaînes alcyne et azoture respectivement tosylées. Une ou plusieurs étapes seront aussi nécessaires pour la synthèse des pyridines selon le

groupement utilisé, en position 2-. Les cystéines fonctionnalisées seront préparées par S-alkylation de la fonction thiol du *N*-acétyl-L-cystéinate de méthyle commercial et des chaînes alcyne ou azoture tosylées correspondantes. La cystéine utilisée sera protégée par des fonctions méthyle et acétyle afin d'éviter la poly-alkylation.

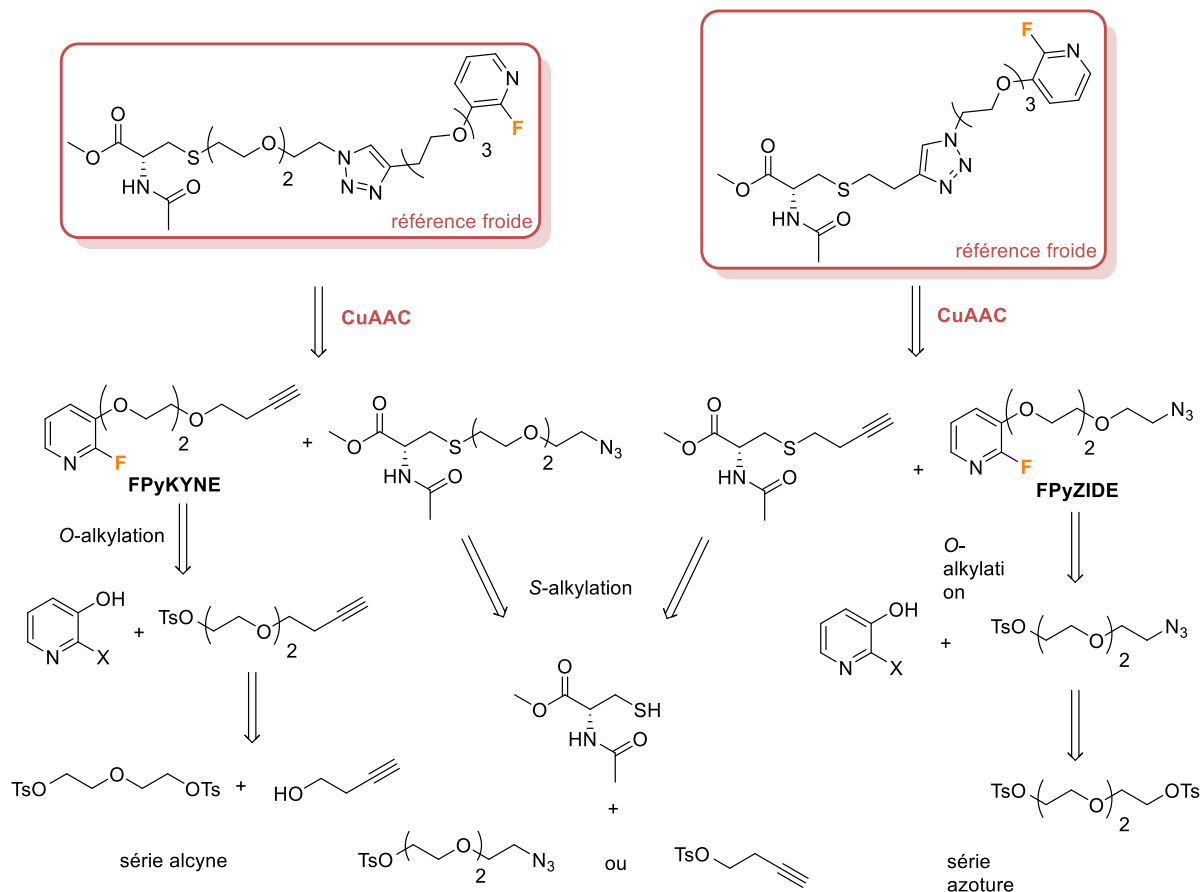
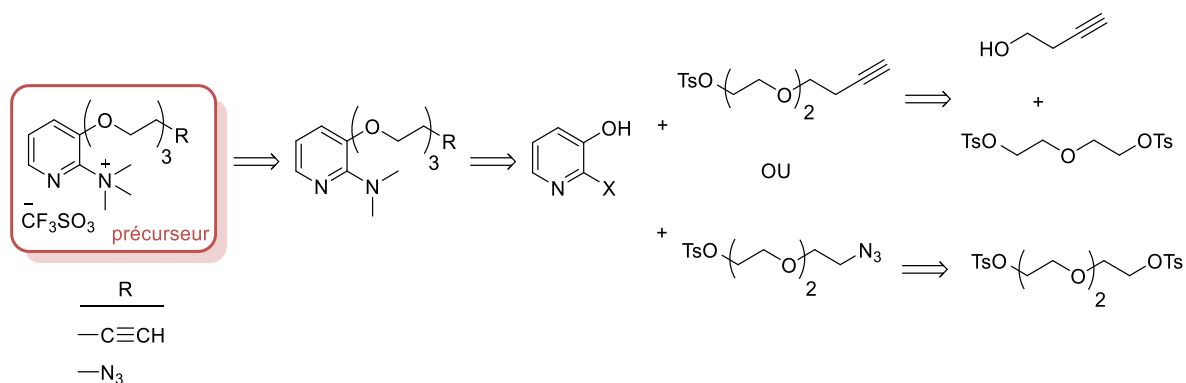


Schéma 1. Analyse rétrosynthétique des réactions de CuAAC avec FPyKYNE et FPyZIDE

b) Rétrosynthèse des précurseurs

Le groupe triméthylammonium est privilégié par rapport au nitro- pour la substitution nucléophile aromatique en raison de son bon caractère nucléofuge qui a été constaté lors du radiomarquage de [¹⁸F]-L48.¹⁷⁷ Néanmoins, l'intermédiaire nitro- intervient au cours de la préparation des précurseurs de radiomarquage triméthylammoniums et il pourra également servir de précurseur de radiomarquage. Le groupement triflate de triméthylammonium résultera de la quaternarisation des diméthylaminopyridines portant les motifs alcyne et azoture respectivement (Schéma 2). Ces diméthylaminopyridines seront elles mêmes obtenues par réaction entre les 2-x-3-hydroxypyridines et les chaînes alkoxy-alcyne ou alkoxy-azoture tosylées. Les chaînes alkoxy seront préparées en une étape à partir d'éthylènes glycols commerciaux.

Schéma 2. Analyse rétrosynthétique des précurseurs de CuAAC pour **FPyKYNE** et **FPyZIDE**

1.4. Synthèse des groupes prosthétiques (références froides et précurseurs)

a) Synthèse de **FPyKYNE** et des précurseurs en série alcyne

La synthèse de la chaîne PEG fonctionnalisée par un alcyne s'effectue en une étape par alkylation de la fonction alcool du 3-butyn-1-ol avec le diéthylène glycol di(*p*-toluènesulfonate) en présence d'hydrure de sodium à température ambiante pour obtenir **1** avec un rendement de 46 % (Schéma 3). Ce rendement moyen est expliqué par la formation d'un sous-produit résultant de la double alkylation du dérivé ditosylé. Cette chaîne a ensuite été engagée dans une réaction de *O*-alkylation avec la 3-hydroxy-2-nitropyridine en présence d'hydrure de sodium à 70 °C pour obtenir **2** avec un rendement de 71 %. Le composé **2** est un intermédiaire clé, à la fois pour la synthèse de la référence froide **FPyKYNE**, comme point de départ pour la formation du précurseur triméthylammonium et aussi comme précurseur de marquage. La référence froide **FPyKYNE** (**3**) a été obtenue par réaction de substitution nucléophile aromatique à partir du composé **2** en présence de TBAF dans le diméthylsulfoxyde à 70 °C avec un rendement global de 47 %.¹⁸³ La référence froide **FPyKYNE** a finalement été obtenue avec un rendement global de 10 % après 3 étapes à partir du diéthylène glycol di(*p*-toluènesulfonate).

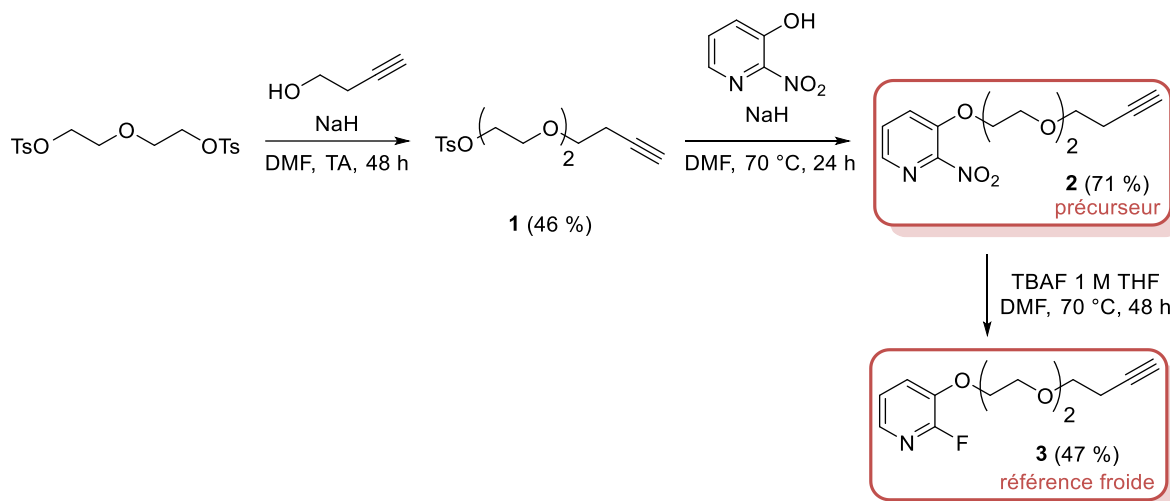


Schéma 3. Synthèse du précurseur nitro- **2** et de la référence froide **3**

Pour la synthèse du précurseur triméthylammonium, la nitropyridine **2** a été traitée par du chlorhydrate de diméthylamine en présence de K_2CO_3 à $150\text{ }^\circ\text{C}$ pendant 48 heures, mais seules des traces du composé attendu ont été observées ($\leq 1\%$). La réaction de formation de la diméthylamine à partir du nitro- n'ayant pas donné de résultats satisfaisants, une autre méthode a été envisagée. Le composé **4** a finalement été obtenu par substitution nucléophile hétéroaromatique du fluor à partir de **3**. En effet, le fluor est un meilleur groupe partant que le groupement nitro- en $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$. Le composé **4** a été synthétisé à partir de **FPyKYNE (3)** avec de la diméthylamine en solution à 33 % dans de l'éthanol, à $100\text{ }^\circ\text{C}$ avec 81 % de rendement (Schéma 4).

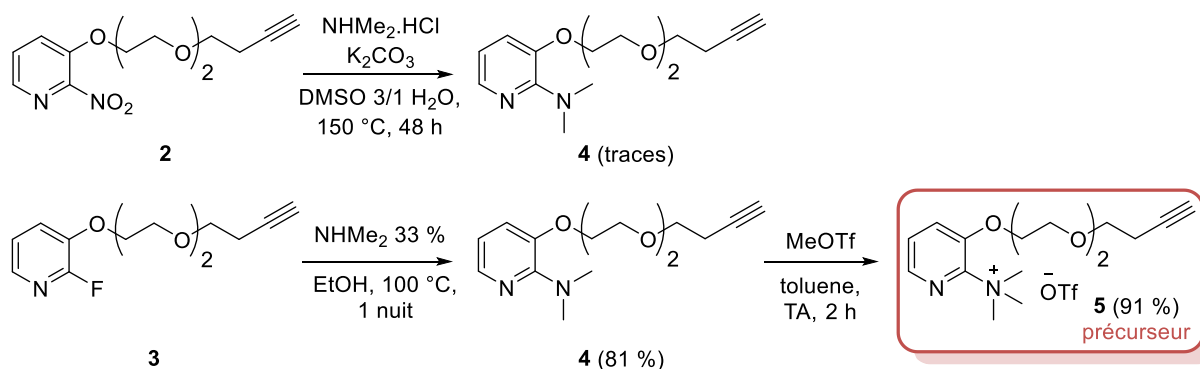


Schéma 4. Synthèse du précurseur de marquage série alcyne

La quaternarisation de l'amine pour obtenir le précurseur triflate de triméthylammonium **5** a été effectuée par ajout de triflate de méthyle au composé **4** dans le toluène à température ambiante selon des conditions décrites avec un rendement de 91 %.^{177,178} Le précurseur **5** a été obtenu avec un rendement de 8 % sur 5 étapes à partir du diéthylène glycol di(*p*-toluènesulfonate).

b) Synthèse de FPyZIDE et des précurseurs en série azoture

Une première approche pour la synthèse de **FPyZIDE** a été envisagée en reprenant les conditions utilisées pour la synthèse de **FPyKYNE**. La chaîne tosylée fonctionnalisée par un azoture **6** a été préparée en une étape à partir du triéthylène glycol di(*p*-toluènesulfonate) et de l'azoture de sodium avec un rendement de 48 % (Schéma 5). Malgré les précautions prises (addition progressive de l'azoture de sodium), la conversion n'était pas totale et du produit di-substitué a été formé. De plus, la purification du composé **6** par chromatographie est délicate compte tenu de la polarité proche entre le produit de départ, le mono-substitué et le di-substitué. Le composé **6** a ensuite été engagé dans une réaction de *O*-alkylation avec de la 3-hydroxy-2-nitropyridine, du carbonate de potassium dans le diméthylformamide à 90 °C pour former le composé nitro- **7** avec un rendement de 92 % qui pourra être utilisé comme intermédiaire ou comme précurseur. La préparation de la référence froide **FPyZIDE** (**8**) a été effectuée par réaction de **7** avec du fluorure de tétrabutylammonium dans le diméthylformamide à 70 °C avec un rendement de 66 %. La diméthylaminopyridine **9**, puis la quaternarisation de l'amine ont été réalisées à partir de **8** dans les mêmes conditions que pour **3** avec un rendement de 87 % sur deux étapes. Au final, **FPyZIDE** et le précurseur triméthylammonium **10** ont été obtenus avec des rendements respectifs de 29 % sur 3 étapes et de 25 % sur 5 étapes.

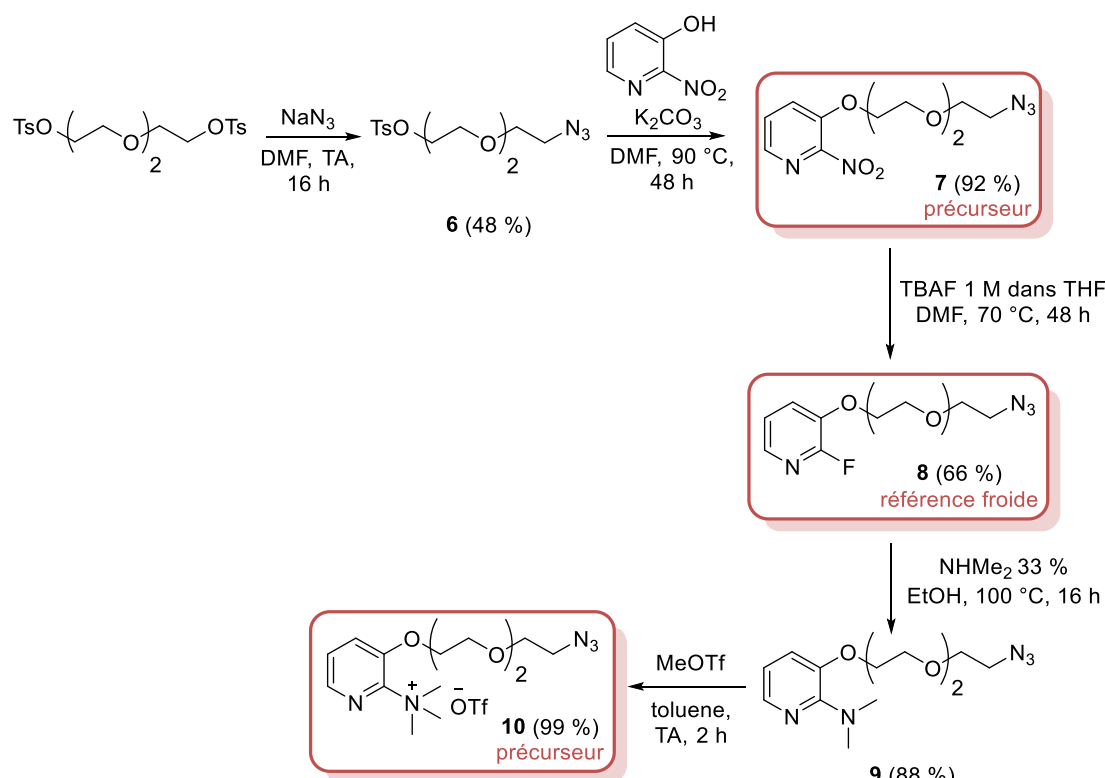


Schéma 5. Synthèse de la référence froide **FPyZIDE** et des précurseurs

Au cours de la thèse, la voie de synthèse des composés **6**, **8** et **10** a été modifiée pour améliorer les rendements de préparation de ces composés (Schéma 6). Tout d'abord, la synthèse de la chaîne PEG a été optimisée afin de pallier le problème de faible rendement dû

à la formation du composé di-azoture et pour faciliter l'étape de purification. D'après une voie de synthèse décrite dans la littérature, le composé tosylé **6** a été obtenu avec un rendement de 70 % en deux étapes, contre 48 % en une seule étape dans la première version (Schéma 6 **A**).¹⁸⁴ A partir du produit commercial 2-(2-(2-chloroéthoxy)éthoxy)éthanol, la substitution du chlore par un azoture, suivi de la tosylation de l'alcool correspondant, a permis d'obtenir le composé bifonctionnel **6** désiré avec des rendements de 88 % et 79 % respectivement pour chaque étape, soit un rendement global de 70 % sur les deux étapes. Dans une approche plus convergente, la référence froide **FPyZIDE** et le précurseur **10** ont été préparés séparément par *O*-alkylation de la 3-hydroxy-2-fluoropyridine et de la 3-hydroxy-2-diméthylaminopyridine avec la chaîne tosylée **6** respectivement. La 3-hydroxy-2-fluoropyridine est commerciale, et la 3-hydroxy-2-diméthylaminopyridine a été préparée en une étape d'amination réductrice à partir de la 3-hydroxy-2-aminopyridine en présence de formaldéhyde, de cyanoborohydrure de sodium et d'acide acétique dans l'acétonitrile à température ambiante. La référence froide **FPyZIDE** a été obtenue en une étape à partir de la 3-hydroxy-2-fluoropyridine et de la chaîne tosylée **6** en présence de carbonate de potassium dans le diméthylformamide à 90 °C avec un rendement de 75 % (Schéma 6 **B**). A partir de **12** et dans les mêmes conditions d'alkylation, la diméthylamine **9** a été obtenue puis méthylée avec le triflate de méthyle afin de récupérer le précurseur triflate de triméthylammonium **10** avec un rendement de 41 % sur 3 étapes (Schéma 6 **C**).

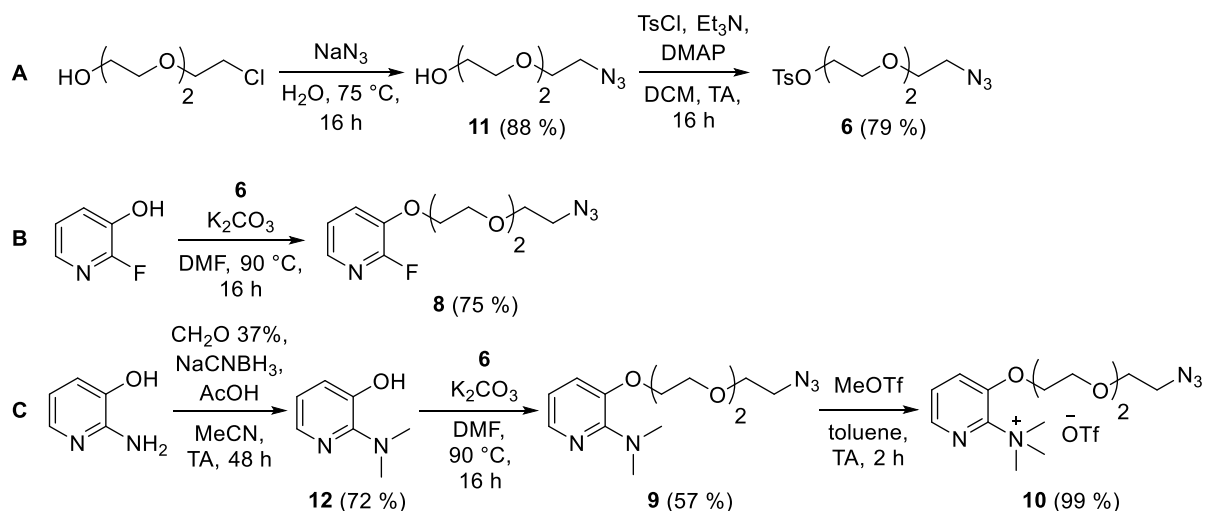


Schéma 6. Schéma de la synthèse optimisée pour obtenir **FPyZIDE** ainsi que son précurseur

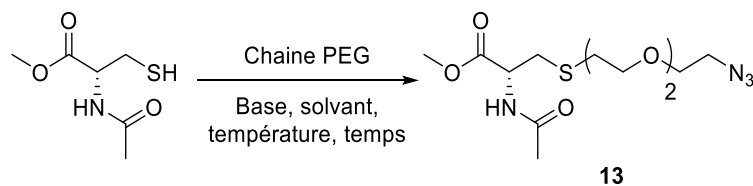
En conclusion, le nombre d'étapes, que ce soit pour la synthèse de la référence froide **8** ou pour le précurseur **10**, n'a pas été diminué, mais le rendement global de la synthèse a été amélioré, particulièrement pour la référence froide **FPyZIDE**. De plus, les difficultés observées lors de la purification de la chaîne PEG **6** ont été supprimées. **FPyZIDE** a finalement été synthétisé en 3 étapes avec un rendement global de 52 % au lieu de 29 % et le précurseur **10** a lui été synthétisé en 5 étapes avec un rendement global de 28 % au lieu de 25 %.

1.5. Synthèse des cystéines fonctionnalisées

Afin d'obtenir les deux couples de click, les cystéines fonctionnalisées avec une fonction azoture pour la série alcyne et une fonction alcyne pour la série azoture doivent aussi être préparées. La cystéine utilisée sera protégée au niveau des fonctions acides carboxyliques et amine et sera fonctionnalisée sur la fonction thiol afin d'effectuer la réaction de cycloaddition avec les pyridines fluorées correspondantes **3** et **8**.

a) Synthèse de la cystéine **13** fonctionnalisée par un azoture

La fonctionnalisation de la cystéine sera réalisée par alkylation de la fonction thiol avec un dérivé présentant la fonction azoture. La chaîne PEG **6**, fonctionnalisée par un azoture, déjà obtenue lors de la formation de la référence froide **8** de la série azoture a pu être réutilisée pour la synthèse de la cystéine fonctionnalisée. Différentes conditions ont été testées afin d'obtenir le composé **13** (Tableau 9). La S-alkylation de la cystéine par la chaîne PEG avec une base forte, ici l'hydrure de sodium, à température ambiante, dans différents solvants (DMF et THF) a permis d'obtenir du produit mais seulement avec une faible conversion (Tableau 9 – entrées 1 et 2). Le produit **13** a été isolé avec un rendement de 22 % dans le THF. La formation de produits secondaires en CCM, n'ayant pas pu être identifiés, a été observée à température ambiante, c'est pourquoi la réaction n'a pas été réalisée à une température plus élevée. Un autre essai a été effectué à température ambiante, avec du méthanolate de sodium dans le méthanol, mais seuls les produits de départ ont été observés (Tableau 9 – entrée 3). Deux autres essais ont été effectués à 50 °C avec deux bases différentes. Le premier essai a été effectué, avec de la triéthylamine, sur la chaîne PEG triéthylène glycol di(*p*-toluenesulfonate) commerciale, en vue d'introduire l'azoture dans une deuxième étape (Tableau 9 – entrée 4). Le composé désiré n'a pas pu être observé mais la présence des produits de départ et de produits de dégradation a uniquement pu être constatée. Le deuxième essai a été réalisé avec du carbonate de potassium, et **6** et a permis d'obtenir **13** avec un rendement de 73 % (Tableau 9 – entrée 5).



Entrée	Réactif	Base	Solvant	Température	Temps	Résultat
1	$\text{TsO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$	NaH	DMF	TA	16 h	Peu de conversion (non isolé)
2	$\text{TsO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$	NaH	THF	TA	16 h	22 % produit
3	$\text{TsO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$	CH_3ONa	MeOH	TA	2 jours	Aucune réaction
4	$\text{TsO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OTs}$	Et_3N	DCE	50 °C	3 h	Produits de départ + sous-produits
5	$\text{TsO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$	K_2CO_3	DMF	50 °C	4 h	73 % produit

Tableau 9. Conditions testées pour la S-alkylation entre la cystéine et les chaînes PEG

b) Synthèse de la cystéine 15 fonctionnalisée par un alcynes

La stratégie de synthèse de la cystéine fonctionnalisée pour la série azoture sera d'utiliser une chaîne alcane simple, le butynyle. La première étape a consisté en une réaction de tosylation du 3-butyn-1-ol, en utilisant le chlorure de tosyloyle avec la triéthylamine comme base dans le dichlorométhane à température ambiante pour obtenir le composé **14** avec un rendement de 79 %. La chaîne tosylée **14** a ensuite été couplée à la L-cystéine protégée par réaction de S-alkylation en présence d'une base forte, l'hydrure de sodium, dans le diméthylformamide à température ambiante pour obtenir **15** avec un rendement de 54 % (Schéma 7). La cystéine fonctionnalisée **15** pour la série azoture a été obtenue avec un rendement global de 43 %.

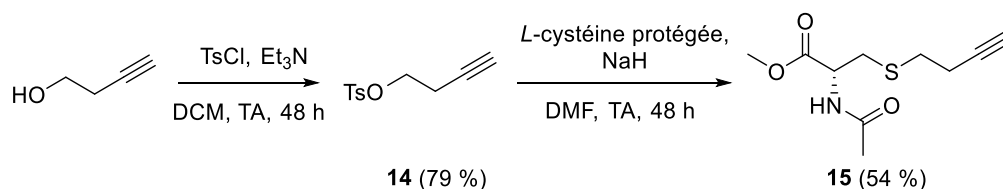


Schéma 7. Synthèse de la cystéine modèle pour la série azoture

1.6. Synthèse des références froides issues de la réaction de cycloaddition

Les partenaires de cycloaddition étant obtenus, les réactions de click entre les deux couples PEG-fluoropyridines (**FPyKYNE** et **FPyZIDE**) et cystéines fonctionnalisées (**13** et **15**) ont ensuite été étudiées.

a) Cycloaddition catalysée au cuivre I entre FPyKYNE et 13

La réaction de cycloaddition entre **3** et la cystéine fonctionnalisée associée **13** a été effectuée dans des conditions classiques de click catalysée au cuivre (Schéma 8).¹⁰⁸ Le triazole **16** a été obtenu en utilisant le sulfate de cuivre en tant que catalyseur, l'ascorbate de sodium en tant que réducteur dans un mélange eau/*tert*-butanol 1/1, à température ambiante avec un rendement de 85 % (Schéma 8).

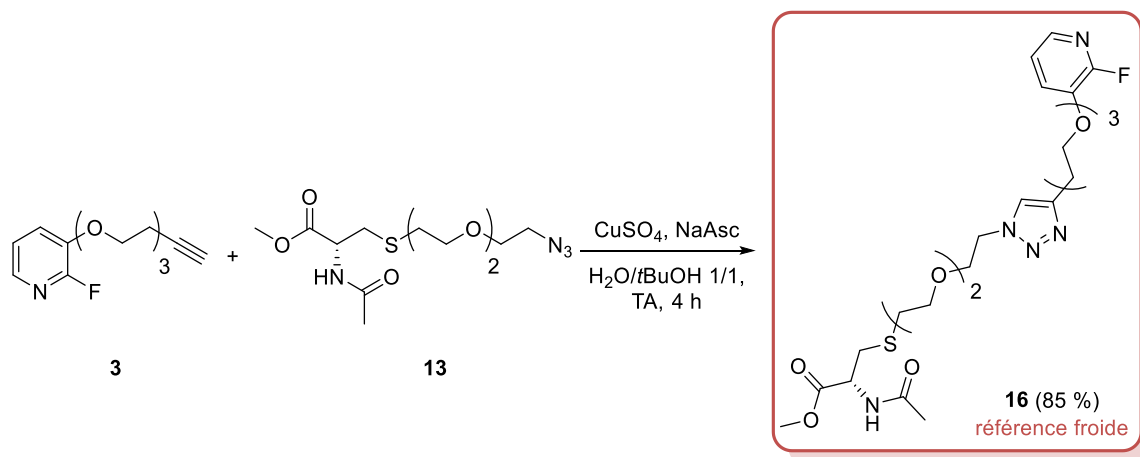


Schéma 8. Réaction de CuAAC avec FPyKYNE

b) Cycloaddition catalysée au cuivre I entre FPyZIDE et 15

Deux types de conditions ont été testées pour la réaction de click entre **8** et la cystéine modèle fonctionnalisée par un alcyne **15** en utilisant du cuivre I ou du cuivre II.^{108,118} Un premier essai avec de l'iodure de cuivre, du tris(benzyltriazolylmethyl)amine (TBTA) et de la triéthylamine a été effectué à température ambiante, puis à 40 °C (Tableau 10 – entrée 1). La conversion étant faible, même après 48 heures à 40 °C, le produit n'a pas pu être isolé. Par la suite, des conditions identiques à celles utilisées pour la préparation de **16** ont permis d'obtenir le triazole désiré **17** avec un rendement de 57 % (Tableau 10 – entrée 2).

diméthylsulfoxyde à 160 °C pendant 5 minutes en utilisant un automate TRACERLab FX N Pro. (Schéma 9).

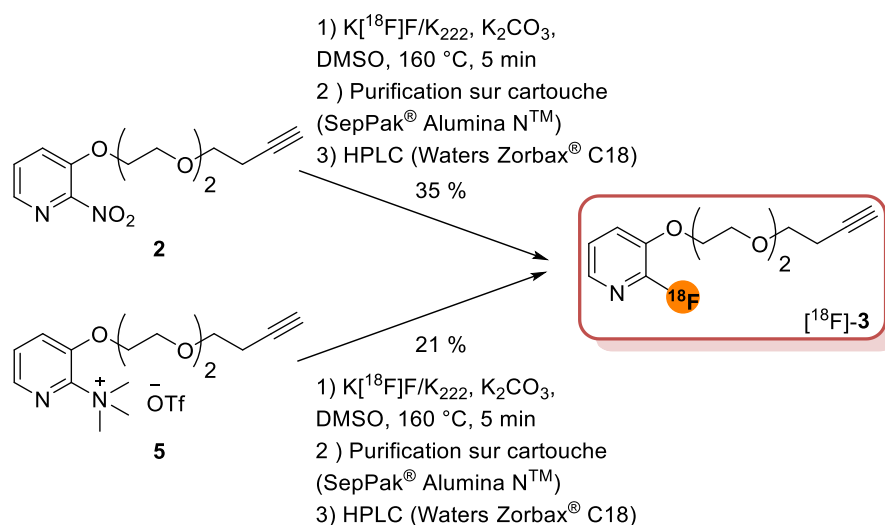


Schéma 9. Synthèse du composé radiomarqué au fluor-18 [¹⁸F]FPyKYNE à partir des deux précurseurs

En parallèle, le composé [¹⁸F]FPyZIDE a été marqué dans les mêmes conditions que [¹⁸F]FPyKYNE (Schéma 10).

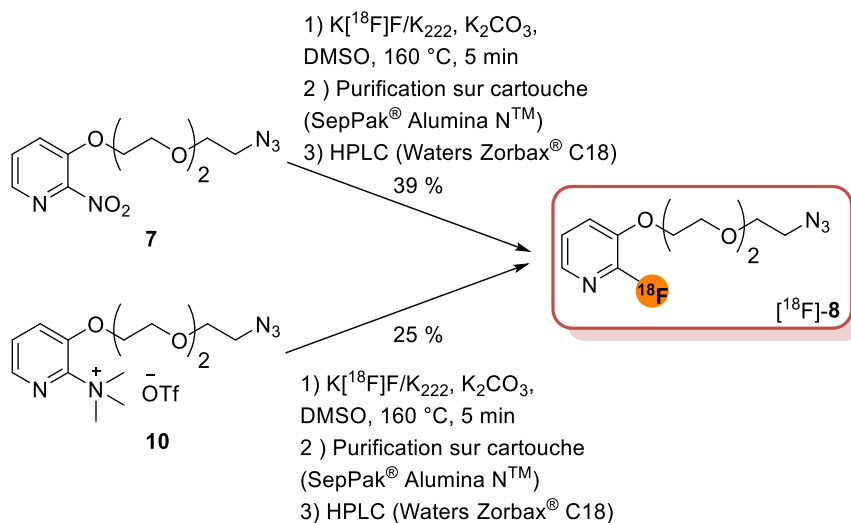


Schéma 10. Synthèse du composé radiomarqué au fluor-18 [¹⁸F]FPyZIDE à partir des deux précurseurs

Une fois la réaction de radiomarquage effectuée, il faut séparer le radioligand [¹⁸F]FPyKYNE ou [¹⁸F]FPyZIDE de l'ensemble des autres composants du milieu réactionnel, comprenant les ions fluorures n'ayant pas réagi, l'excès de précurseur et d'autres produits secondaires. Le milieu réactionnel est alors pré-purifié sur cartouche d'alumine (SepPak® Alumina N™) qui va piéger les sels tels que le ¹⁸F-fluorure de potassium $K[^{18}F]F$, pour récupérer principalement les molécules organiques. Une purification par HPLC phase inverse est ensuite effectuée sur colonne semi-préparative Zorbax® SB-C18. Deux phases mobiles différentes ont été utilisées en fonction du précurseur choisi pour assurer une bonne séparation entre le précurseur et le radioligand. Dans le cas de l'utilisation du précurseur

nitro-, un mélange isocratique ternaire eau/méthanol/tétrahydrofurane/(+ acide phosphorique) a été utilisé alors qu'un mélange isocratique binaire eau/acétonitrile/(+ acide trifluoroacétique) a été choisi dans le cas de l'utilisation du précurseur ammonium quaternaire. Le choix de la phase mobile est différent puisque contrairement au triméthylammonium, les polarités du précurseur nitro- et du radioligand sont proches, ce qui oblige à utiliser un mélange ternaire afin de mieux les séparer. La fraction collectée en HPLC contenant le radioligand a ensuite été diluée dans de l'eau pour diminuer la teneur en solvant organique du mélange avant reformulation sur une cartouche de silice greffée (SepPak® C18). La reformulation a permis ensuite de remplacer l'éluant de l'HPLC par l'éluant d'intérêt, ici un mélange éthanol/eau pour réaliser la réaction de cycloaddition. Un aliquot de cette solution a été prélevé pour le contrôle qualité et le reste de la solution a été fractionné pour étudier la réaction de cycloaddition avec les cystéines fonctionnalisées, respectivement **13** et **15**.

La réaction de radiomarquage au fluor-18 de [¹⁸F]FPyKYNE à partir du composé nitro- **2** a été effectuée trois fois avec un rendement isolé moyen corrigé de la décroissance de 35 %. Le même composé a été obtenu à partir du triméthylammonium **5** avec un rendement isolé moyen de 21 % corrigé de la décroissance (6 radiomarquages). En dépit de la différence de rendement radiochimique, la pureté radiochimique est supérieure à 95 % et l'activité molaire moyenne est de 118 GBq.μmol⁻¹ quel que soit le précurseur utilisé (Tableau 12).

Précurseur [¹⁸ F]FPyKYNE	Rendement*	Pureté	AM
2	35 %	> 95 %	118 GBq/μmol
5	21 %	> 95 %	

*Les rendements sont corrigés de la décroissance.

Tableau 12. Données analytiques pour le marquage de [¹⁸F]FPyKYNE

Le composé de départ triméthylammonium **5** étant utilisé sans purification, des impuretés, contenant éventuellement des composés susceptibles d'être marqués par substitution nucléophile avec le ¹⁸F⁻, peuvent être présentes et donc diminuer le rendement de la réaction de radiomarquage. Les chromatogrammes radioactifs des HPLC semi-préparatives montrent d'ailleurs bien la présence de plusieurs sous-produits radioactifs lors du marquage des deux précurseurs (Figure 71), mais qui sont présents en quantité plus importante lorsque le précurseur triméthylammonium **5** est utilisé (Figure 71 B).

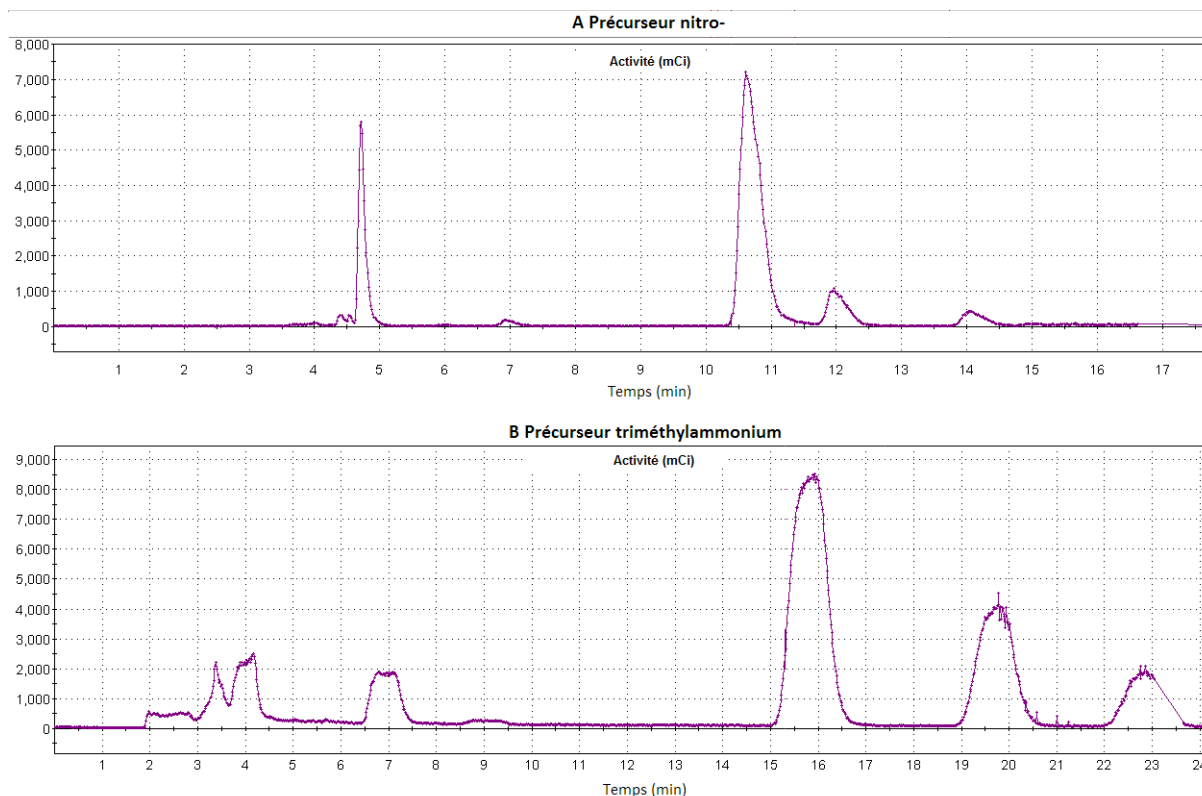


Figure 71. Exemples de chromatogrammes semi-préparatifs du marquage des précurseurs A) nitro- et B) triméthylammonium de $[^{18}\text{F}]\text{FPyKYNE}$

La réaction de radiomarquage au fluor-18 de $[^{18}\text{F}]\text{FPyZIDE}$ à partir du composé nitro- **7** a été effectuée six fois avec un rendement moyen corrigé de la décroissance de 39 %. Le même composé a été obtenu à partir du triméthylammonium **10** avec un rendement moyen de 25 % corrigé de la décroissance (12 radiomarquages). Le composé $[^{18}\text{F}]\text{FPyZIDE}$ a été obtenu dans les deux cas avec une pureté radiochimique supérieure à 95 % et une activité molaire moyenne de $145 \text{ GBq} \cdot \mu\text{mol}^{-1}$ (Tableau 13). Tout comme en série alcyne, les rendements de radiomarquage sont meilleurs en utilisant le précurseur nitro- plutôt que le précurseur ammonium quaternaire.

Précurseur $[^{18}\text{F}]\text{FPyZIDE}$	Rendement*	Pureté	AM
7	39 %	> 95 %	145 GBq/ μmol
10	25 %	> 95 %	

* Les rendements sont corrigés de la décroissance

Tableau 13. Données analytiques pour le marquage de $[^{18}\text{F}]\text{FPyZIDE}$

En conclusion, les résultats de radiochimie obtenus pour $[^{18}\text{F}]\text{FPyKYNE}$ et $[^{18}\text{F}]\text{FPyZIDE}$ montrent que les rendements sont meilleurs dans le cas de l'utilisation du précurseur nitro- en comparaison avec le précurseur triméthylammonium. Bien que meilleur groupe partant et plus facilement purifiable en HPLC compte tenu d'une grande différence de polarité avec le composé radiofluoré, le triméthylammonium présente de moins bons rendements que le groupement nitro-. Ces résultats peuvent être, en partie, expliqués par la moindre pureté

des précurseurs triméthylammonium puisqu'ils sont utilisés sans purification, mais aussi par la réaction secondaire de formation de [^{18}F]fluorométhane au cours de la réaction de fluoration, qui est en compétition avec la substitution nucléophile aromatique. Ce phénomène a été documenté pour la radiofluoruration du noyau benzénique.¹⁸⁵ D'autres sous-produits radiomarqués sont aussi observés sur le chromatogramme HPLC (voir exemple figure 71 B), ce qui induit une baisse du rendement radiochimique de la réaction de substitution nucléophile aromatique.

b) Réaction de cycloaddition entre [^{18}F]FPyKYNE et [^{18}F]FPyZIDE et les cystéines fonctionnalisées 13 et 15

✓ Click en série azoture : [^{18}F]FPyZIDE/Cystéine-alcyne 15

Pour la cycloaddition catalysée au cuivre entre [^{18}F]FPyZIDE et 15 (Tableau 14), la cinétique de la réaction de cycloaddition a été étudiée en fonction de plusieurs paramètres:

- La nature du catalyseur
- La température de la réaction
- Les quantités de réactifs

La cinétique de réaction a été étudiée dans tous les cas sur 30 minutes avec évaluation de la conversion à 5, 15 et 30 minutes par radioHPLC analytique.

➤ Modification du catalyseur et de la température

Plusieurs systèmes catalytiques peuvent être utilisés pour la réaction de cycloaddition catalysée au cuivre. Les mélanges Cu^+ (souvent CuI)/ascorbate de sodium/base azotée ou Cu^{2+} (souvent CuSO_4 ou $\text{Cu}(\text{OAc})_2$)/ascorbate de sodium sont couramment utilisés, l'ascorbate de sodium agissant comme réducteur dans le milieu. Deux conditions classiques ont été étudiées en parallèle : iodure de cuivre (10 éq. par rapport à la cystéine), *N,N*-diisopropyléthylamine (20 éq.) et ascorbate de sodium (20 éq) ou sulfate de cuivre (5 éq) et ascorbate de sodium (20 éq) dans un mélange de solvant eau/éthanol/acétonitrile/*tert*-butanol.¹¹⁸ L'étude cinétique a été réalisée avec 1 mg de cystéine fonctionnalisée (4,4 μmol) et une quantité de [^{18}F]FPyZIDE d'environ 3 à 10 nmol (déterminée à partir de l'activité molaire). Ces deux réactions ont été effectuées à température ambiante et à 40 °C afin de comparer la vitesse de conversion de [^{18}F]FPyZIDE en [^{18}F]-17 (Figure 72).

Après 5 minutes de réaction à température ambiante, la conversion est plus élevée avec l'iodure de cuivre (54 %) qu'avec le sulfate de cuivre (46 %) mais cette tendance s'inverse avec le temps et la température, contrairement à ce qui a pu être décrit dans de précédents travaux.¹¹⁸ A température ambiante, après 30 minutes, la conversion n'est pas totale quel que soit le système catalytique utilisé (Tableau 14 – entrées 1 et 3). A 40 °C, la réaction catalysée par l'iodure de cuivre donne lieu à la formation d'un produit secondaire très polaire observé en front de chromatogramme provenant soit de la dégradation de

[¹⁸F]FPyZIDE soit plus probablement de la dégradation du produit de cycloaddition. La deuxième hypothèse est d'autant plus plausible puisque le rendement de formation de [¹⁸F]-17 diminue au cours du temps à 40 °C alors qu'il continue de progresser à température ambiante (Tableau 14 – entrées 1 et 2) (Figure 72). C'est le système catalytique sulfate de cuivre/ascorbate de sodium à 40 °C qui donne les meilleurs résultats après 5 minutes de réaction (84 %). Dès 15 minutes, on observe une conversion totale de [¹⁸F]FPyZIDE en [¹⁸F]-17, sans dégradation du produit formé au cours du temps (Tableau 14 – entrée 4).

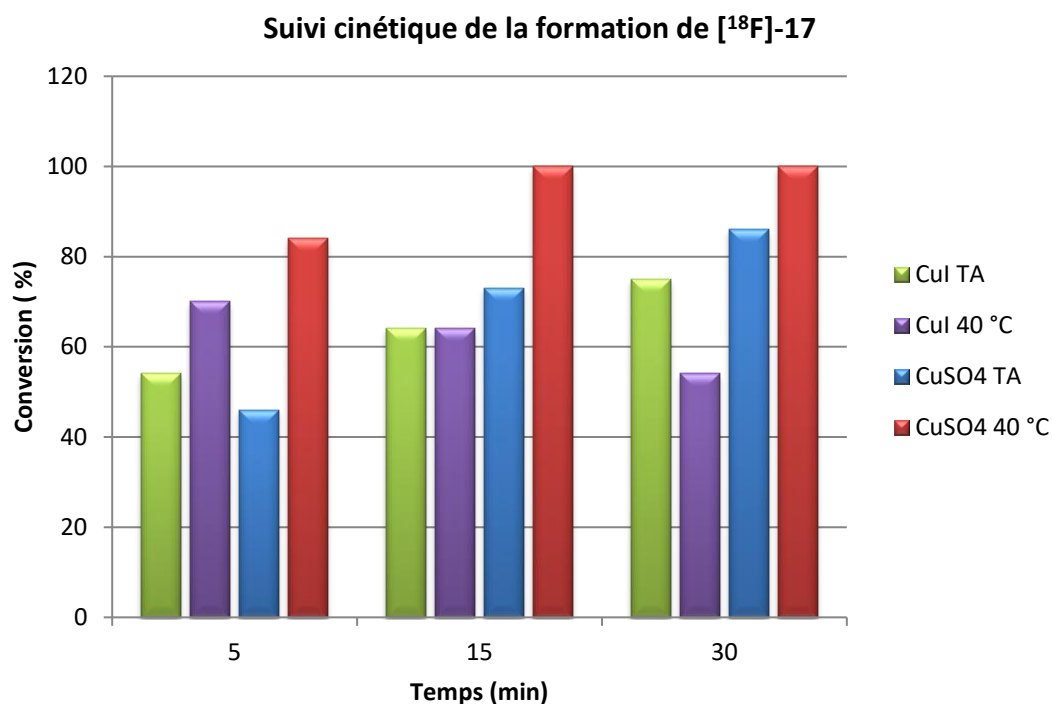
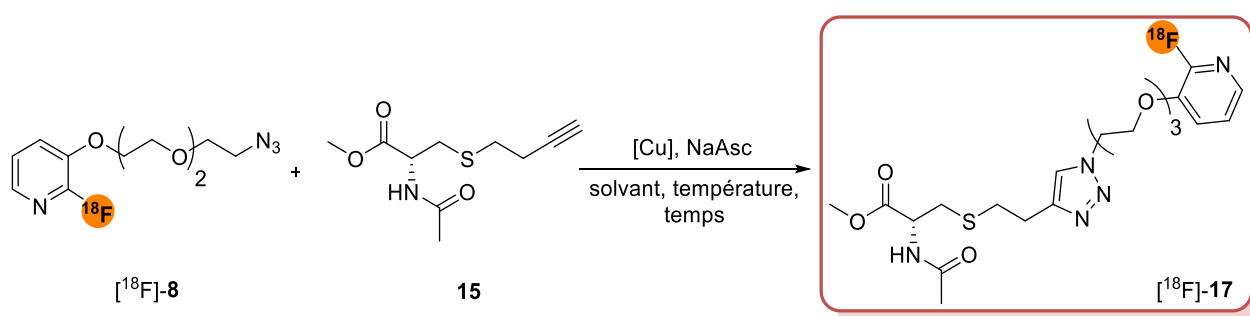


Figure 72. Suivi cinétique de la formation de [¹⁸F]-17 en fonction du catalyseur et de la température



Entrée	Catalyseur	Base	Solvant	Température	Conversion*
1	CuI	DIEA		TA	75 %
2	CuI	DIEA	H ₂ O/EtOH/MeCN/	40 °C	54 %
3	CuSO ₄	/	<i>t</i> -BuOH	TA	86 %
4	CuSO ₄	/		40 °C	100 %

* obtenue après 30 minutes de réaction

Tableau 14. Etude du choix de catalyseur et de la température pour la click avec FPyZIDE

Ces résultats montrent que la cycloaddition catalysée par le sulfate de cuivre avec de l'ascorbate de sodium à 40 °C permet d'obtenir une conversion optimale en vue du marquage de macro-biomolécules avec [¹⁸F]FPyZIDE. La conversion est totale dès 15 minutes de réaction, ce qui est compatible avec la période radioactive du fluor-18, et à des températures ne risquant pas de dégrader les macro-biomolécules.

➤ Modification de la quantité des réactifs

Une seconde étude de suivi cinétique a été réalisée en diminuant la quantité de cystéine fonctionnalisée, avec comme objectif:

- Etudier l'influence du ratio [¹⁸F]FPyZIDE/cystéine fonctionnalisée (qui était en large excès dans la première étude cinétique). En effet, lors du marquage de peptides ou de macro-biomolécules, les quantités mises en réaction sont couramment inférieures à 1 μmol : 0,6 μmol d'un peptide contenant le RGD radiomarké par CuAAC avec un groupement prosthétique [¹⁸F]fluoro-carbohydrate¹¹⁹; 0,2 μmol d'un oligonucléotide radiomarké avec [¹⁸F]-L49¹⁸²; 0,3 μmol d'un peptide dérivé de la bombésine radiomarké avec [¹⁸F]-L106¹⁷⁹.
- Etudier l'influence de la quantité de catalyseur.

La réaction a d'abord été effectuée avec les conditions suivantes : cystéine fonctionnalisée (1 mg, 4,4 μmol), CuSO₄ (5 éq), NaAsc (20 éq) dans un mélange eau/éthanol/acétonitrile/*tert*-butanol à température ambiante puis à 40 °C (Tableau 15 – entrées 1 et 2). La quantité de cystéine a ensuite été divisée par 10 (0,1 mg, 0,4 μmol) (Tableau 15 – entrée 3) puis par 100 (0,01 mg, 44 nmol) (Tableau 15 – entrée 4). Une quantité constante de [¹⁸F]FPyZIDE d'environ 10 nmol (déterminée par l'activité molaire) est utilisée pour chaque essai.

Dans les premières conditions de réaction (Tableau 15 – entrées 1 et 2), la cinétique de réaction observée confirme bien les résultats de la première étude (Figure 73) et les conversions, après 30 minutes, atteignent 82 % à température ambiante et 100 % à 40 °C.

Lorsque la quantité de cystéine fonctionnalisée diminue (augmentation de l'excès de catalyseur), on observe une conversion de 100 % dès 5 minutes de réaction à 40 °C (Figure 73) mais un produit secondaire très polaire observé au front du chromatogramme se forme progressivement entre 15 et 30 minutes, résultant sans doute d'une dégradation du produit de cycloaddition. Cette dernière observation peut être rapprochée de ce qui a été constaté en utilisant CuI/ascorbate de sodium comme catalyseur dans la première étude. Les taux de conversion observés après 30 minutes de réaction ne sont que de 90 % et 95 % (Tableau 15 – entrées 3 et 4).

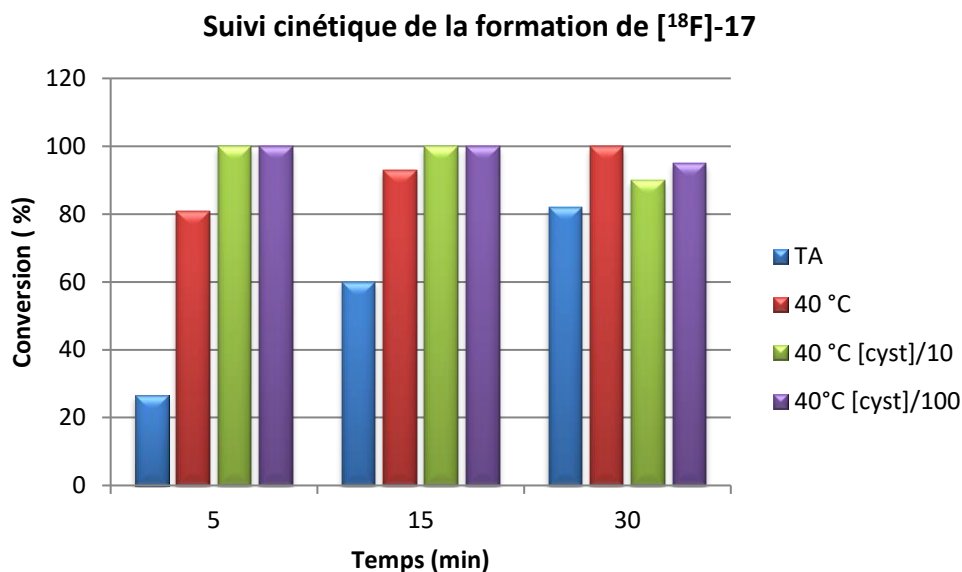


Figure 73. Suivi cinétique de la formation de [¹⁸F]-17 en fonction de la quantité de cystéine

Entrée	Eq. cystéine	Qté CuSO ₄	Qté NaAsc	Solvant	Température	Conversion*
1	1	5	20	H ₂ O/EtOH/	TA	82 %
2	1	5	20		40 °C	100 %
3	0,1	5	20	MeCN/ t-BuOH	40 °C	90 %
4	0,01	5	20		40 °C	95 %

*obtenue après 30 minutes de réaction

Tableau 15. Etude de la quantité de réactifs utilisée pour la click avec FPYZIDE

Ces résultats montrent que la diminution de la quantité de cystéine fonctionnalisée ne limite pas la réaction de cycloaddition. L'augmentation de la quantité de catalyseur influence positivement la cinétique de réaction dans les premières minutes de réaction (conversion totale dès 5 minutes à 40 °C), mais une dégradation progressive, quoique limitée, du produit formé a pu être observée au cours du temps. Ces résultats seront complétés par une étude de la cinétique avec un excès de catalyseur mais à température ambiante ainsi que par une étude cinétique à plus grande dilution de tous les réactifs (diminution de la quantité de cystéine fonctionnalisée et de catalyseur).

✓ Click en série alcyne : [¹⁸F]FPyKYNE/Cystéine-azoture 13

La réaction en série alcyne utilisant [¹⁸F]FPyKYNE est « symétrique » à la réaction en série azoture. La cinétique de réaction sera étudiée dans les conditions suivantes : cystéine fonctionnalisée (1 mg, 4,4 μmol), CuSO₄ (5 éq), NaAsc (20 éq) dans un mélange eau/éthanol/acétonitrile/*tert*-butanol à température ambiante, à 40 °C puis à 70 °C. La quantité de [¹⁸F]FPyKYNE introduite dans chaque essai est d'environ 5 nmol (déterminée par l'activité molaire).

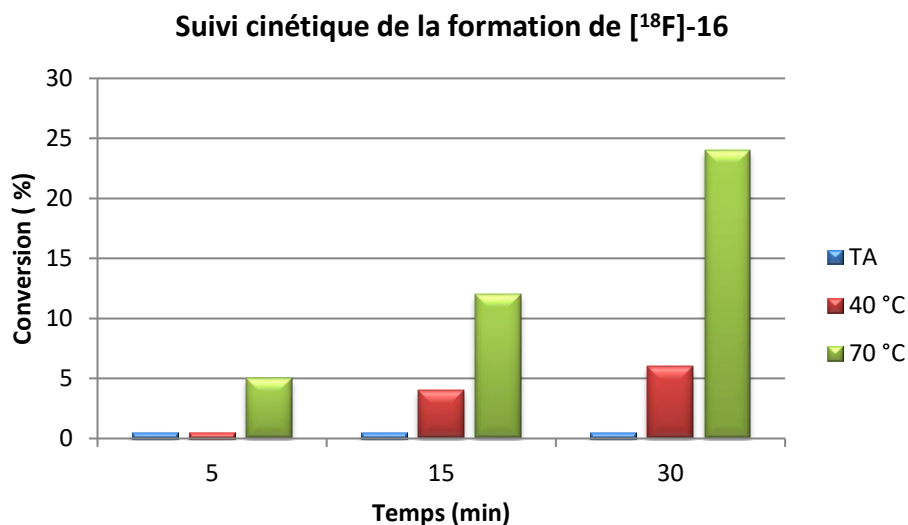
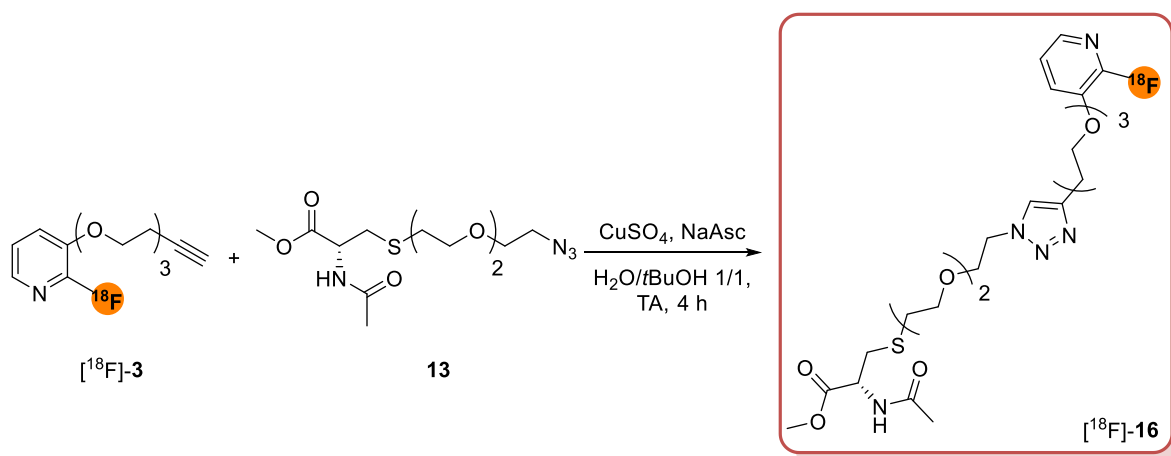


Figure 74. Suivi cinétique de la formation de [¹⁸F]-16 en fonction de la quantité de cystéine



Entrée	Equiv cystéine fonctionnalisée	Equiv CuSO ₄	Equiv NaAsc	Solvant	Température/ temps	Conversion*
1	1	5	20	H ₂ O/EtOH	TA/ 30 min	0 %
2	1	5	20	/MeCN/t-	40 °C/30 min	6 %
3	1	5	20	BuOH	70 °C/30 min	24 %

*obtenue après 30 minutes de réaction

Tableau 16. Etude cinétique de la cycloaddition en série alcyne

De manière tout à fait inattendue, aucune réaction ne se produit à température ambiante, même après 30 minutes de réaction (Tableau 16 – entrée 1) et la conversion reste limitée à 6 % à 40 °C (Tableau 16 – entrée 2) alors qu'elle était quantitative en série azoture (Tableau 15 – entrée 2). La réaction (même stœchiométrie) est alors réalisée à 70 °C. La conversion est meilleure qu'à 40 °C mais la cinétique reste lente (Figure 74) et la formation de [¹⁸F]-16 ne dépasse pas 24 % après 30 minutes de réaction (Tableau 16 – entrée 3). Ces résultats sont d'autant plus surprenants que des analogues de [¹⁸F]FPyKYNE ont déjà été synthétisés et utilisés avec succès dans des réactions de cycloaddition.¹⁷⁷⁻¹⁷⁹ Aucune explication

concernant les faibles rendements observés lors de la réaction de click entre [^{18}F]FPyKYNE et **13** n'a pu être établie.

1.8. Conclusions

Les références froides des groupes prosthétiques FPyKYNE (**3**) et FPyZIDE (**8**) et leurs précurseurs de marquage nitro- **2** et **7** et triméthylammoniums **5** et **10** ont tous été obtenus. Les références des produits cycloadduits par catalyse au cuivre **16** et **17** ont également été préparées.

Par la suite, [^{18}F]FPyKYNE ([^{18}F]-**3**) a été obtenu avec un rendement radiochimique corrigé de la décroissance de 35 et 21 % respectivement avec les précurseurs nitro- et triméthylammonium dans des conditions classiques de fluoration, en présence de $\text{K}[^{18}\text{F}]\text{F}/\text{K}_{222}$, et de K_2CO_3 dans le diméthylsulfoxyde à 160 °C pendant 5 minutes. Dans les mêmes conditions, [^{18}F]FPyZIDE ([^{18}F]-**8**) a été obtenu avec un rendement radiochimique corrigé de la décroissance de 39 et 25 % respectivement à partir des précurseur nitro- et triméthylammonium. Ces derniers ont ensuite été utilisés pour la réaction de cycloaddition catalysée par le Cu (I) avec leurs cystéines fonctionnalisées correspondantes (**13** et **15**). En série azoture ([^{18}F]FPyZIDE), le système catalytique sulfate de cuivre/ascorbate de sodium a donné de meilleurs résultats que iodure de cuivre/ascorbate de sodium/DIEA à 40 °C. Dès 15 minutes, la conversion de [^{18}F]FPyZIDE en [^{18}F]-**17** est totale. Ces résultats (temps et température de réaction) montrent que [^{18}F]FPyZIDE sera un groupe prosthétique adapté au radiomarquage de macro-biomolécules dans des temps de réaction compatibles avec la demi-vie du fluor-18 dans une approche prosthétique classique. En série alcyne, les résultats sont plus contrastés puisque la formation de [^{18}F]-**16** reste médiocre, même à 70 °C. Prolonger le temps de réaction ou augmenter la température de réaction ne paraissent pas être des solutions opportunes, dans le cadre du marquage de macro-biomolécules. [^{18}F]FPyKYNE sera testé à nouveau sur un autre modèle que la cystéine fonctionnalisée que nous avons choisie.

Les composés [^{18}F]FPyKYNE et [^{18}F]FPyZIDE sont d'ores et déjà utilisés pour certaines applications en collaboration avec d'autres laboratoires.

2. Réaction de SPAAC entre un azoture et un cyclooctyne contraint

2.1. Objectifs

La conjugaison par réaction de SPAAC est une bonne alternative à la CuAAC pour des applications biologiques afin de pallier le problème de la toxicité du cuivre. Cette réaction, faisant intervenir un azoture et un alcyne contraint, généralement un dérivé de cyclooctyne, a déjà été utilisée en chimie du fluor-18 pour le marquage de macro-biomolécules (Introduction Chapitre 4. 4.3). Dans la plupart des cas, le fluor-18 est introduit par modification du cyclooctyne et l'azoture est alors porté par la macro-biomolécule. Dans cette partie du projet, nous nous sommes intéressés à la réaction de SPAAC entre le nouveau groupe prosthétique synthétisé pour la CuAAC, [¹⁸F]FPyZIDE et deux cyclooctynes modèles.

[^{19/18}F]FPyZIDE sera engagé dans une réaction de SPAAC avec les deux cyclooctynes modèles : le BCN commercial et le Boc-dibenzocyclooctyne **18** (Figure 75).

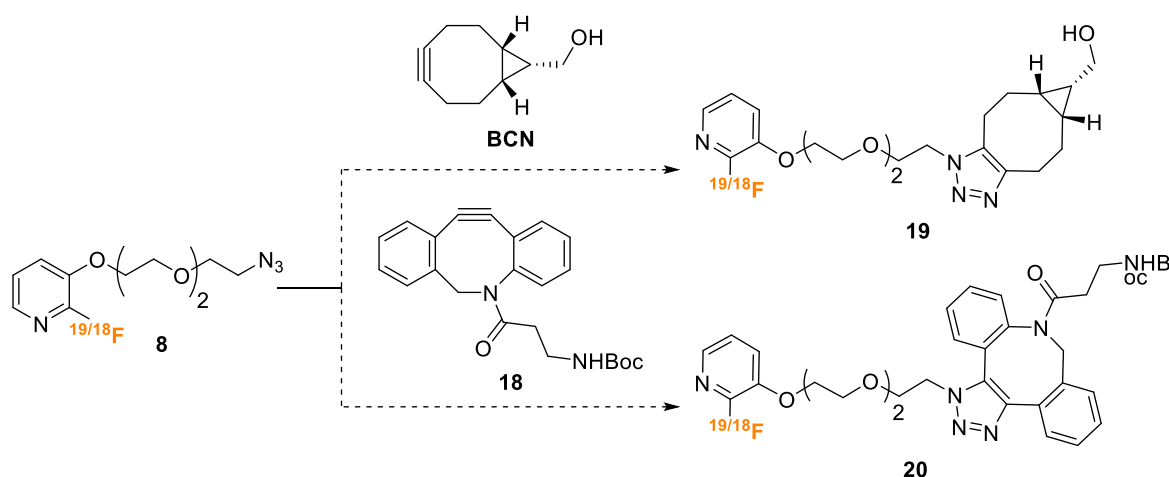


Figure 75. Schéma général de la réaction de SPAAC entre [^{19/18}F]FPyZIDE et des cyclooctynes modèles

2.2. Travaux réalisés

a) Analyse rétrosynthétique

Le composé **18** et les références froides de click entre **FPyZIDE** et les cyclooctynes **BCN** et **18** seront à synthétiser. **FPyZIDE** a déjà été synthétisé pour la réaction de CuAAC (Schéma 5). Le **BCN** est un composé commercial. Le **DBCO-amine** est aussi commercial mais il est très polaire. Afin de le rendre moins polaire, **DBCO-amine** sera protégé par un groupement Boc. Les réactions de click seront ensuite effectuées dans des conditions classiques de SPAAC, c'est-à-dire dans un solvant choisi et sans catalyseur (Schéma 11).^{186,137}

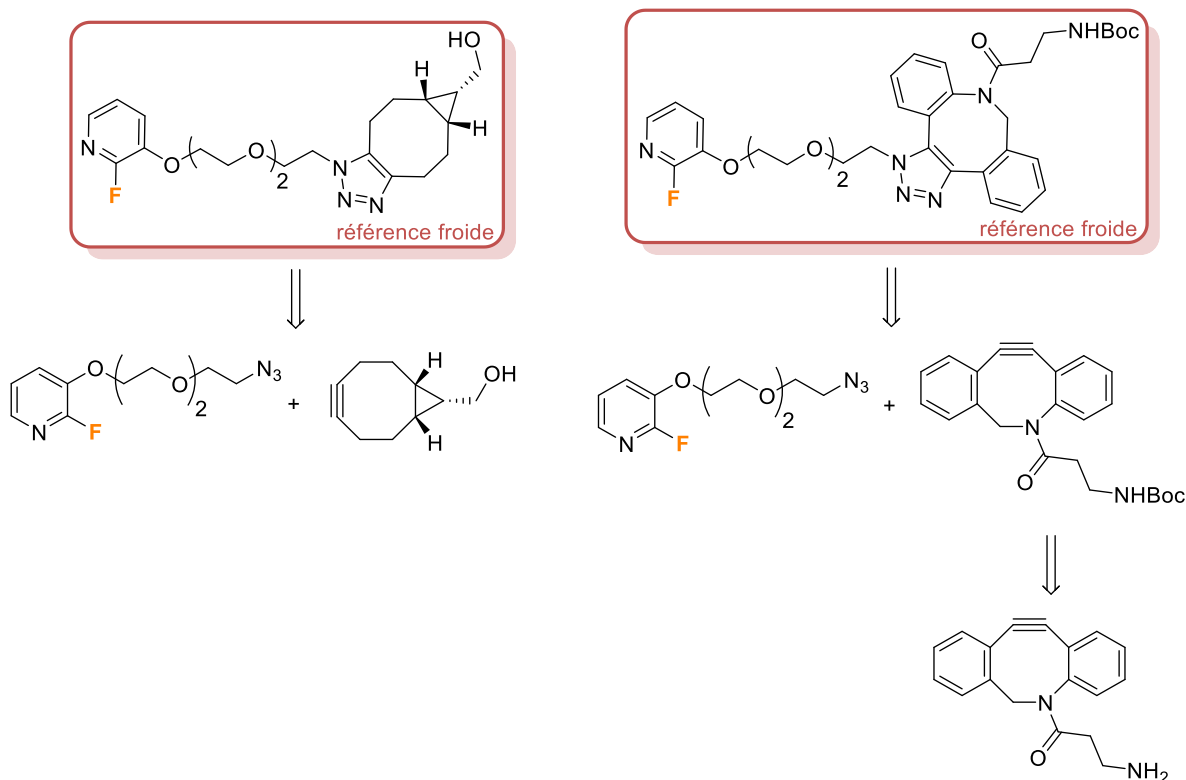


Schéma 11. Rétrosynthèse des références froides pour la réaction de SPAAC

b) Synthèse des références froides et précurseurs

La synthèse du composé Boc-NH-DBCO **18** s'effectue en une étape à partir du composé **DBCO-amine** en utilisant du dicarbonate de di-*tert*-butyle dans le dichlorométhane à température ambiante avec un rendement de 84 % (Schéma 12).

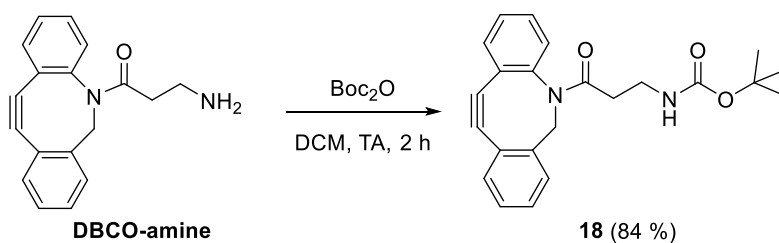


Schéma 12. Synthèse du Boc-NH-DBCO **18**

Les réactions de cycloaddition entre **FPyZIDE** et les cyclooctynes (**BCN** ou **18**) s'effectuent dans le dichlorométhane à température ambiante. Les composés **19** et **20** ont été obtenus avec un rendement de 99 et 62 % respectivement (Schéma 13). Deux régioisomères ont été obtenus dans le cas du composé **20** mais les différentes analyses RMN n'ont pas permis de déterminer la proportion de l'un des régioisomères par rapport à l'autre (pour des raisons de simplification, un seul des deux régioisomères est représenté).

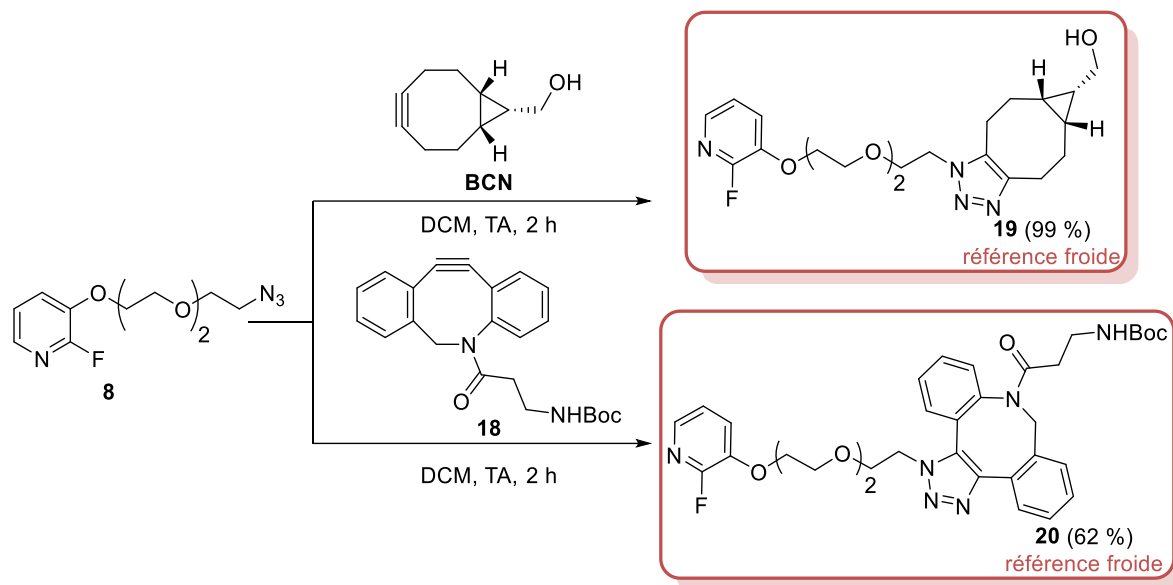


Schéma 13. Réaction de SPAAC entre l'azoture et les deux cyclooctynes

2.3. Radiochimie

Comme pour la CuAAC, $[^{18}\text{F}]\text{FPyZIDE}$ sera radiomarqué au fluor-18 dans les mêmes conditions que précédemment (Schéma 10) puis ce dernier engagé dans la réaction de cycloaddition sans catalyse au cuivre avec les deux cyclooctynes correspondants (Schéma 14).

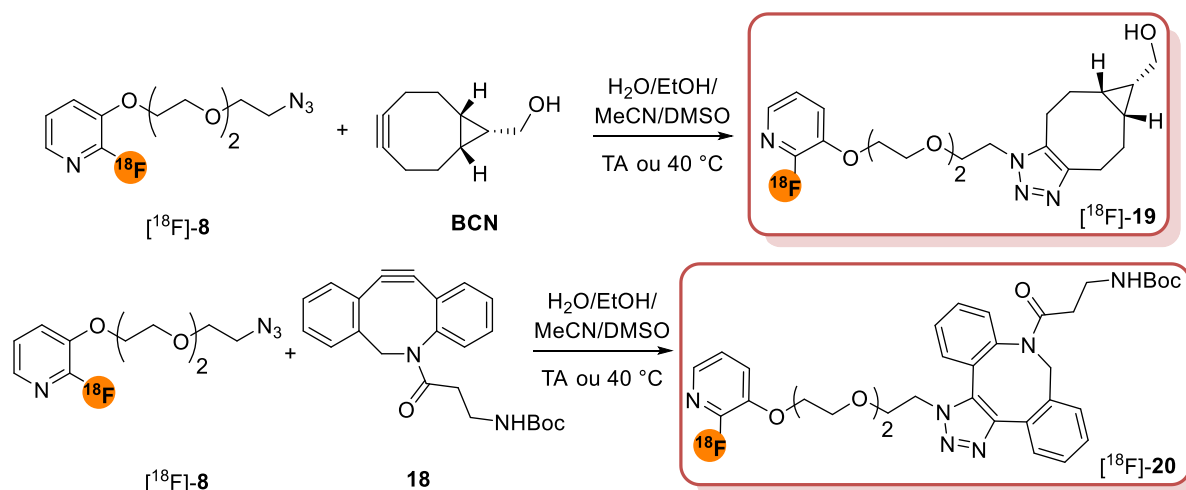


Schéma 14. Synthèse des composés $[^{18}\text{F}]\text{-19}$ et $[^{18}\text{F}]\text{-20}$

Le suivi cinétique de formation des triazoles radiomarqués au fluor-18 à partir de $[^{18}\text{F}]\text{FPyZIDE}$ (3 à 10 nanomoles calculées à partir de l'activité molaire) et du **BCN** (3,3 μmol) et **18** (1,3 μmol) a été étudié dans un mélange eau/éthanol/acétonitrile/diméthylsulfoxyde à température ambiante et à 40 °C (Figure 76 et Figure 77). En série BCN, la conversion de $[^{18}\text{F}]\text{FPyZIDE}$ en $[^{18}\text{F}]\text{-19}$ est lente et ne dépasse pas 17 et 35 % à température ambiante et à 40 °C respectivement, même après 60 minutes de réaction. En série DBCO, la formation de

[¹⁸F]-**20** est beaucoup plus rapide et la conversion est totale après 30 minutes à température ambiante et dès 15 minutes à 40 °C. Les taux de conversion, après 15 minutes de réaction, atteignent 92 et 98 % à température ambiante et à 40 °C respectivement. Aucun produit secondaire n'est observé au cours de la réaction. Ces résultats sont en adéquation avec les constantes de vitesse de réaction habituellement observées en SPAAC avec le BCN (plus lent) et le DBCO (plus rapide).¹³²

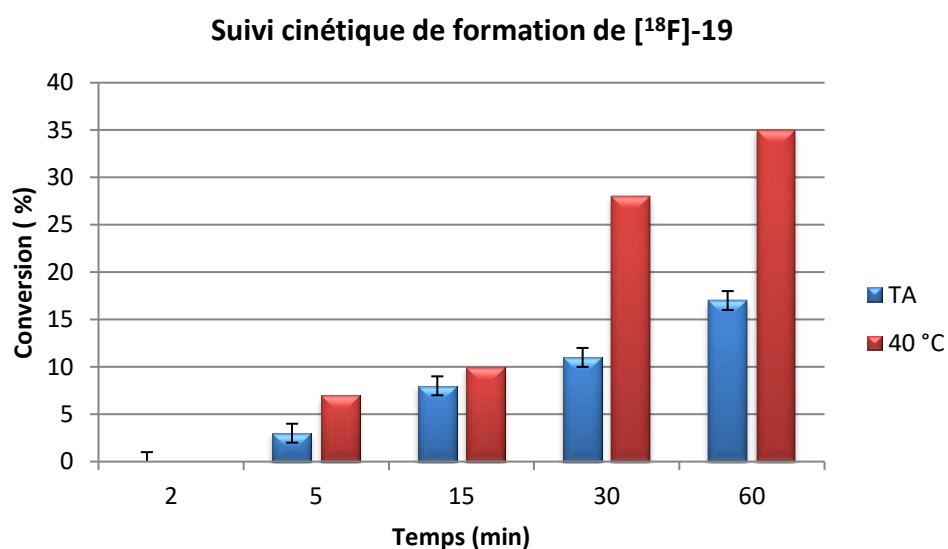


Figure 76. Suivi cinétique de la formation de [¹⁸F]-19 en fonction de la température

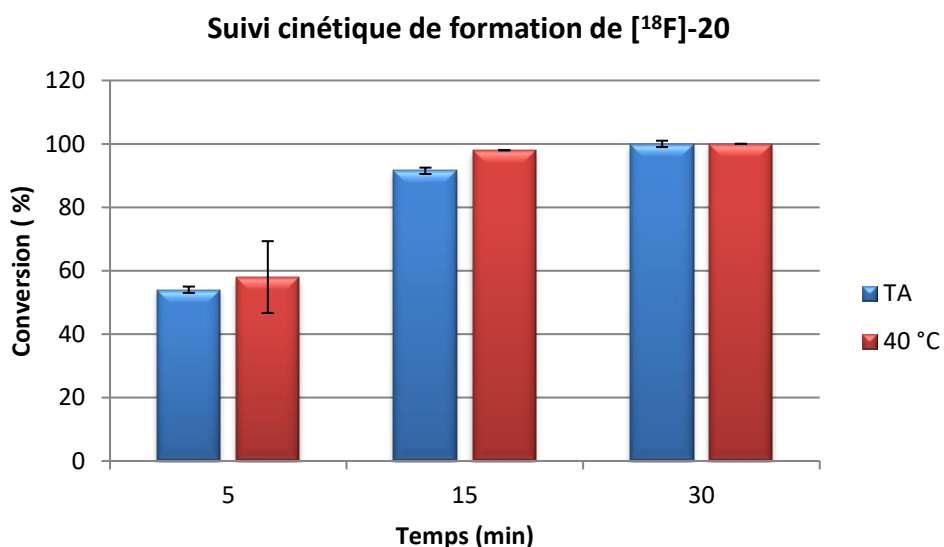


Figure 77. Suivi cinétique de la formation de [¹⁸F]-20 en fonction de la température

En SPAAC, la vitesse de réaction dépend du cyclooctyne contraint utilisé. En effet, la réaction entre [¹⁸F]FPyZIDE et le BCN est 10 à 12 fois moins rapide que la réaction avec le DBCO **18**, respectivement à 40 °C et à température ambiante.

[¹⁸F]FPyZIDE donne des résultats de cycloaddition en SPAAC avec **18** qui sont compatibles avec une utilisation pour le radiomarquage de macro-biomolécules tant en termes de temps de réaction vis-à-vis de la demi-vie du fluor-18 que de conditions réactionnelles à température modérée pour ne pas dénaturer la macro-biomolécule. La vitesse de réaction observée ici en SPAAC est identique à celle observée en CuAAC dans les conditions réactionnelles utilisées.

[¹⁸F]FPyZIDE est donc un groupe prosthétique plurivalent qui pourra être utilisé dans plusieurs types de réaction de cycloaddition en fonction de l'alcyne (terminal ou contraint) que portera la macro-biomolécule à radiomarquer. Ce nouveau groupe prosthétique pourra servir au radiomarquage de macro-biomolécules par CuAAC et SPAAC *in vitro*, mais pourrait également être testé en milieu biologique complexe pour des réactions de radiomarquage par SPAAC.

Le dipolarophile, ayant été modifié d'un alcyne terminal vers un alcyne contraint afin de pallier l'utilisation du cuivre, des modifications du dipôle (azoture) dans la littérature ont été rapportées afin d'augmenter la vitesse de la réaction.

Chapitre 2. Etiquette à motif pyridine pour la radiofluorination directe

La radiofluorination des pyridines a été initiée pour le développement de nouveaux radiotraceurs des récepteurs nicotiniques ($[^{18}\text{F}]$ fluoronicotine¹⁸⁷, $[^{18}\text{F}]$ FA-85380¹⁸⁸) puisque ce motif est présent dans un grand nombre d'entre eux. Le noyau pyridine est un hétérocycle aromatique à 6 chaînons intéressant en radiochimie grâce à sa plus grande réactivité vis-à-vis des substitutions nucléophiles aromatiques. Cette propriété pourrait être mise à profit dans le développement de groupes prosthétiques pour le marquage de macro-biomolécules. Ce chapitre expose une étude méthodologique de fluoration de pyridines substituées dans le but d'identifier une nouvelle étiquette à motif pyridine présentant des conditions de radiomarquage compatibles avec les macro-biomolécules. Un tel groupement permettrait donc un marquage direct de ces dernières, s'ajoutant aux quelques rares autres groupes accepteurs de fluor déjà développés dans ce but (Introduction Chapitre 3. 3.2).

1. Propriétés des pyridines

1.1. Généralités

La pyridine, comme le benzène, est un composé aromatique à 6 électrons. Elle possède un doublet non liant sur l'azote, qui n'intervient pas dans le système d'électrons π . En revanche, la nucléophilie du système d'électrons π , est diminuée par l'effet électroattracteur de l'atome d'azote très électronégatif (Figure 78).¹⁸⁹ Cette propriété confère à la pyridine une diminution de l'énergie de résonance par rapport au benzène. La plus faible énergie des orbitales du système aromatique du noyau pyridine fait de cet hétérocycle un bien meilleur partenaire pour les réactions de substitution nucléophile aromatique que le noyau benzénique.

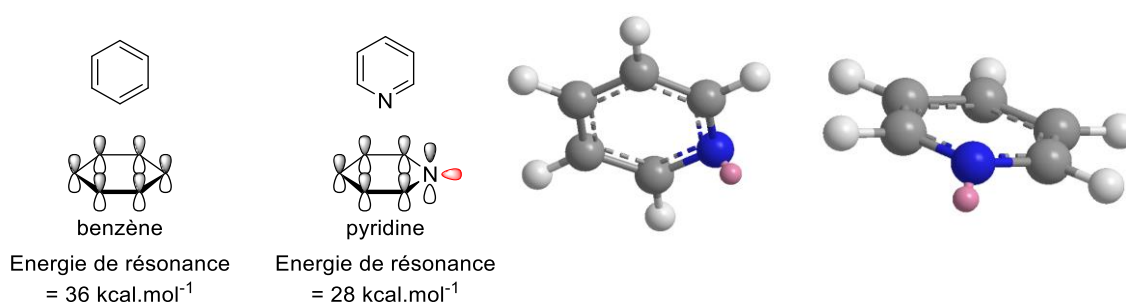


Figure 78. Structure de la pyridine comparée avec celle du benzène

1.2. Substitution nucléophile aromatique sur les pyridines

La pyridine est plus réactive que le benzène, en substitution nucléophile aromatique, en particulier en position α - et γ -. L'intermédiaire de Meisenheimer formé, dans ces positions, est stabilisé par la charge partielle sur l'azote ainsi que par la délocalisation des électrons sur le cycle (Figure 79). Les formes limites pour la substitution en position β - ne conduisent pas à une stabilisation de l'intermédiaire de Meisenheimer et permettent de conclure sur le fait que la substitution nucléophile aromatique en position β - est défavorable.

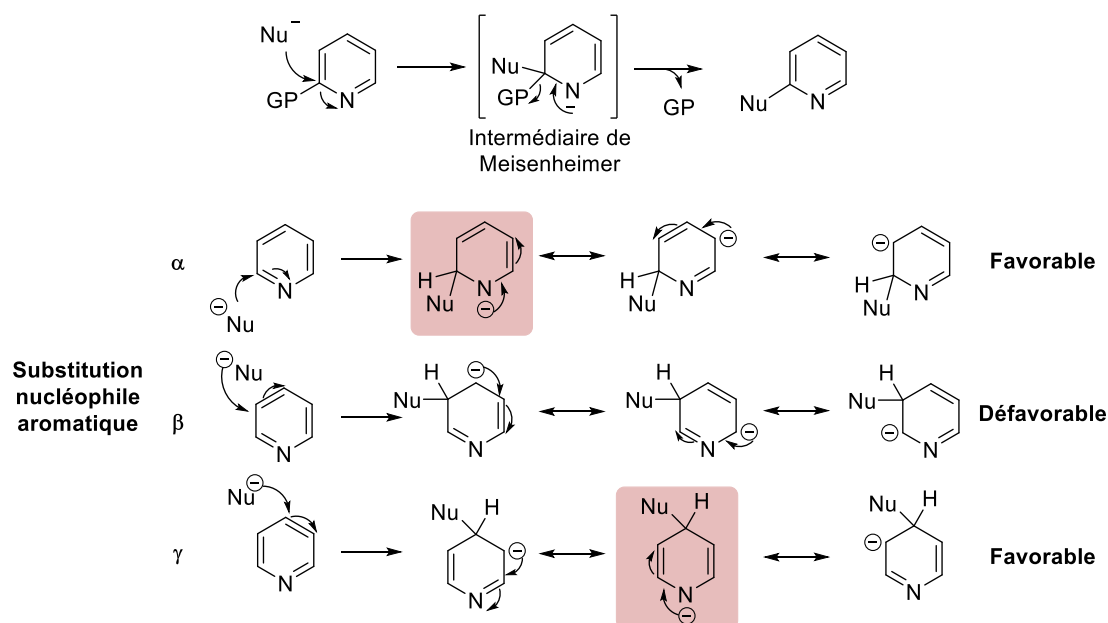


Figure 79. Stabilisation de l'intermédiaire de Meisenheimer lors de la substitution nucléophile aromatique sur la pyridine

1.3. Synthèse des fluoropyridines en radiochimie

Le premier exemple de [¹⁸F]fluoropyridine ([¹⁸F]fluoronicotine) a été développé en 1984 en utilisant du [¹⁸F]fluorure de césium à 210 °C à partir d'un dérivé de 2-bromopyridine **L109** (Figure 80).¹⁹⁰

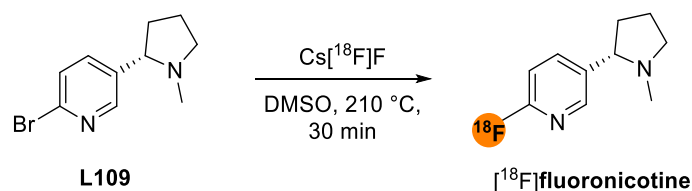
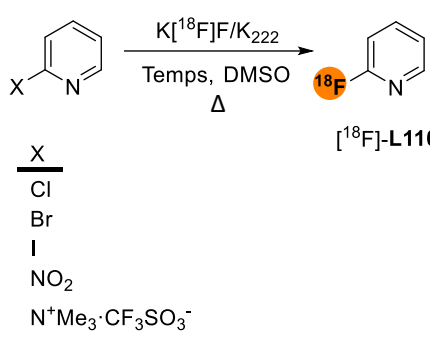


Figure 80. Premier exemple de synthèse de [¹⁸F]fluoronicotine

La réaction de substitution nucléophile aromatique appliquée au fluor-18 sur des pyridines a ensuite été étudiée de manière plus approfondie en 1999 par l'équipe de Dollé en utilisant le complexe activé K[¹⁸F]F/K₂₂₂.³¹ L'impact de chacun des paramètres réactionnels sur la formation de la 2-[¹⁸F]fluoropyridine [¹⁸F]-**L110** a été étudié : l'influence du groupe partant (-Cl, -Br, -I, -NO₂ et -NMe₃⁺.CF₃SO₃⁻), la quantité de précurseur, le type d'activation (chauffage

traditionnel, irradiations micro-ondes et ultrasoniques), le solvant, la température ainsi que le temps de réaction (Figure 81).



	T (°C)	Groupe partant X	Temps de réaction (min)		
			5	10	20
120 °C		Cl, Br, I	0 %	0 %	0 %
		NO ₂	11 %	76 %	82 %
		N ⁺ Me ₃	81 %	87 %	91 %
150 °C		Cl	1 %	3 %	23 %
		Br	1 %	16 %	25 %
		I	0 %	0 %	1 %
		NO ₂	52 %	85 %	92 %
		N ⁺ Me ₃	89 %	89 %	90 %
180 °C		Cl	11 %	28 %	57 %
		Br	56 %	60 %	87 %
		I	2 %	5 %	19 %
		NO ₂	77 %	88 %	89 %
		N ⁺ Me ₃	88 %	91 %	92 %

Figure 81. Influence des précurseurs dans le radiomarquage des pyridines au fluor-18 en position 2

Les meilleurs résultats ont été obtenus à partir des pyridines substituées par un groupement nitro et triméthylammonium où une fluoration très rapide est constatée, et même presque totale après 5 minutes à seulement 120 °C dans le cas du précurseur triméthylammonium. Cette étude a ainsi permis d'identifier ces deux précurseurs, comme étant de bons groupes partants, qui ont ensuite été largement utilisés pour la radiofluoration des pyridines (préparation de [¹⁸F]FPyKYNE et [¹⁸F]FPyZIDE notamment).

a) Utilisation de pyridines comme groupe prosthétique pour le marquage de macro-biomolécules

Plusieurs 2-[¹⁸F]fluoropyridines substituées en position 3- ou 4- de la pyridine ont par la suite été utilisées comme radiotraceurs,¹⁹¹ puis développées comme groupes prosthétiques pour le radiomarquage de macro-biomolécules au fluor-18.¹¹ Cependant, aucune étude n'a à ce jour été réalisée pour évaluer l'impact de substituants électroattracteurs sur la radiofluoration de pyridines, conduisant à une diminution de la température de réaction et donc au développement d'une étiquette à motif pyridine pour le marquage direct de macro-biomolécules.

Un travail similaire à partir d'un noyau benzénique a été décrit en 2009 par le groupe d'Ametamey. Les auteurs ont démontré qu'il était possible de réduire la température de

radiomarquage au fluor-18 à des températures comprises entre 50 et 70 °C grâce à une fonctionnalisation du noyau aromatique par des groupements électroattracteurs, avec des taux de conversion élevés allant de 65 à 89 % (Figure 82).⁶⁹ Ces dérivés ont ensuite été utilisés pour le marquage direct de peptides modèles, par formation d'une liaison amide, à des températures allant de 50 à 90 °C et des conversions plus ou moins élevées selon les peptides choisis.

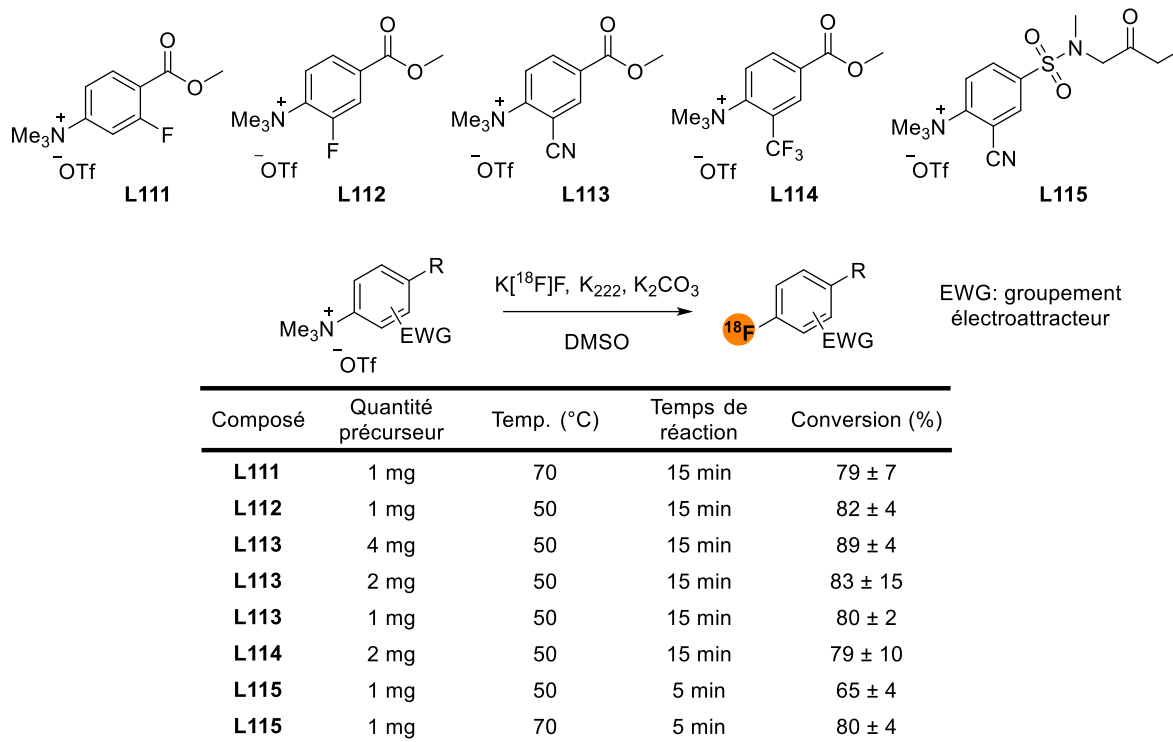


Figure 82. Etude de la température de radiofluoruration sur un cycle benzénique activé

Le dérivé **L113** a ensuite été utilisé comme groupe accepteur de fluor pour le radiomarquage direct de la bombésine.¹⁹² Deux dérivés de bombésine ont été radiomarqués par cette méthode et obtenus avec des rendements de 70 et 51 % respectivement, après seulement 15 minutes de radiosynthèse à 70 °C.

Le groupe d'Olberg a ensuite démontré, en 2010, qu'une pyridine portant un groupement électroattracteur a permis de diminuer la température de fluoruration à 40 °C.^{42,193} L'ester 6- $[^{18}F]$ fluoronicotinique de 2,3,5,6-tétrafluorophényle $[^{18}F]$ F-Py-TFP a été obtenu avec un rendement de 50 % corrigé de la décroissance à 40 °C à partir du triflate de triméthylammonium **L117** (Figure 83). Le triflate de triméthylammonium **L117** a, quant à lui, été obtenu à partir du composé chloré en utilisant de la triméthylamine en solution, suivi d'un échange de contre-ion, plus soluble et plus réactif dans l'acétonitrile que l'équivalent chlorure. Cette pyridine a ensuite été fonctionnalisée pour obtenir $[^{18}F]$ -**L118** dans le cadre du radiomarquage de macro-biomolécules par réaction thiol-Michael.¹⁹⁴

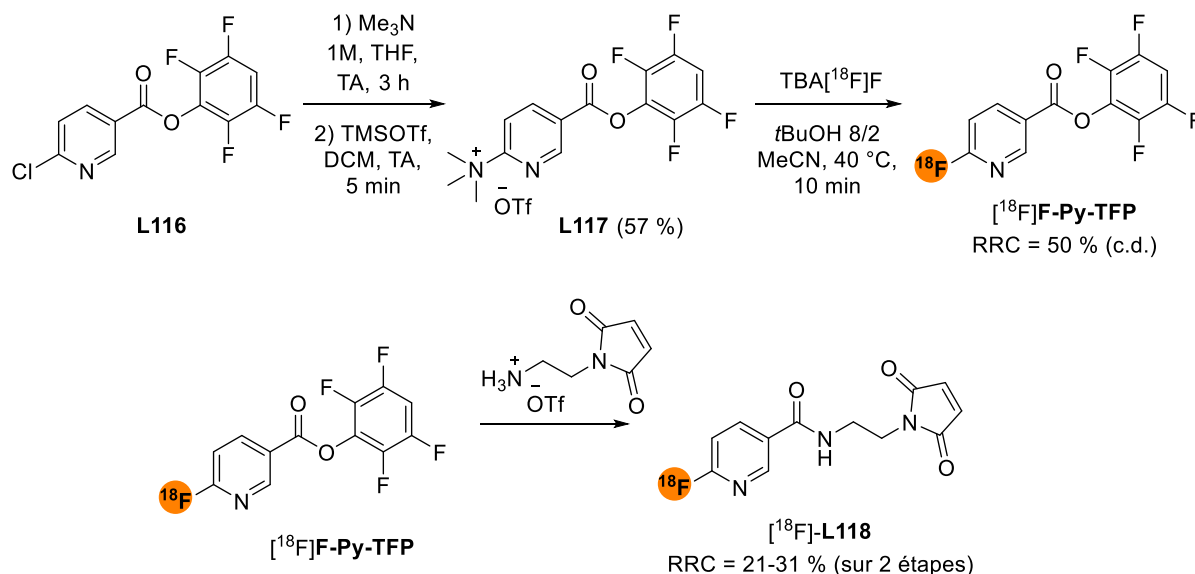


Figure 83. Formation de pyridine fluorée activée à une température de 40 °C

Une étude des conditions de substitution nucléophile de pyridines activées par des groupements électroattracteurs a été développée afin de vérifier si l'hypothèse de diminution de la température se vérifie. Dans ce cas, la molécule pourra être pré-conjuguée sur la macro-biomolécule puis le radiomarquage effectué en une seule étape dans des conditions non destructrices pour la macro-biomolécule.

2. Résultats

2.1. Objectifs

Le radiomarquage direct de macro-biomolécules représente un défi considérable pour lequel il n'existe à ce jour qu'un panel restreint de méthodes (Introduction Chapitre 3). Les avantages de cette approche sont cependant nombreux : une radiosynthèse plus rapide associée à une meilleure compatibilité avec les contraintes liées à l'automatisation, tout en gardant le contrôle de la chimiosélectivité de la fluoration grâce à une fonctionnalisation préalable de l'étiquette à motif pyridine. Le principal obstacle à la mise en place de cette stratégie est la nécessité de disposer de conditions douces pour la fluoration afin de préserver l'intégrité de la structure de la macro-biomolécule à radiomarquer. Les travaux d'Ametamey⁶⁹ et d'Olberg⁴² ont montré que la fluoration d'un noyau aromatique, et particulièrement d'une pyridine, peut avoir lieu à une température modérée qui pourrait être compatible avec cette approche de marquage. L'objet des travaux décrits dans ce chapitre consiste en une étude méthodologique de l'impact de la fonctionnalisation du noyau pyridine sur la réaction de fluoration avec pour but d'identifier un composé présentant le meilleur équilibre entre température de fluoration et bioorthogonalité. Pour cela, la synthèse d'une série de pyridines comportant un nucléofuge en position 2- avec un ou deux groupements électroattracteurs en position 3- et 5- sera traitée, suivi de leur évaluation lors de la réaction de fluoration (Figure 84). Les résultats obtenus permettront la

conception d'une étiquette basée sur le noyau pyridine et optimisée pour une utilisation de marquage direct de macro-biomolécules.

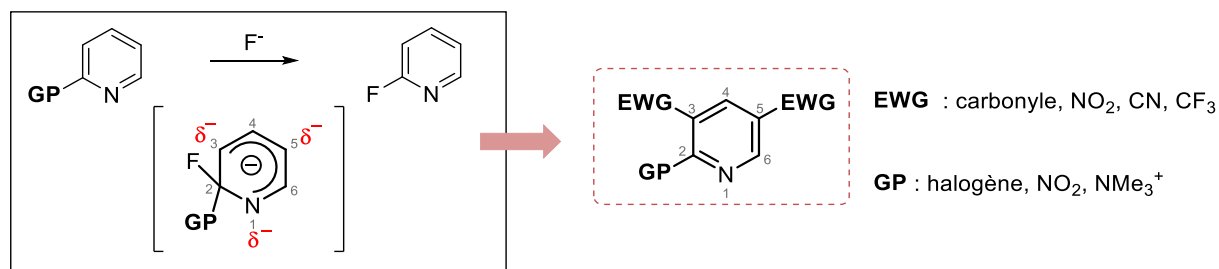


Figure 84. Schéma général des pyridines modèles à synthétiser

Sept pyridines ont été définies selon ces critères en fixant comme nucléofuge le groupement triméthylammonium, considéré comme l'un des plus performants en radiofluoration, ainsi que différents groupements électroattracteurs en position 3- et/ou 5- (Figure 85). Dans chaque cas, la synthèse de l'équivalent fluoré sera étudiée afin de disposer d'une référence froide. Parmi cette série de composés, trois pyridines **21**, **22**, **23** seront substituées par un groupement carbonyle dans différents états d'oxydation et seront comparées entre elles. Un groupement carbonyle est particulièrement indiqué dans ce travail, car il représente un point de fonctionnalisation pour le développement d'une étiquette pour le radiomarquage. L'influence du groupement nitrile, plus électroattracteur que le groupement carbonyle, sera également déterminé avec le dérivé **24**, ainsi qu'avec une pyridine doublement appauvrie **25**. L'impact d'un groupement attracteur par effet inductif sera mesuré avec l'évaluation d'une pyridine **26** substituée par un groupement trifluorométhyle. La synthèse du composé **27** (F-Py-TFP) développé par le groupe d'Olberg sera effectuée conjointement et servira de composé référence avec lequel seront comparées les pyridines **21** à **27**.

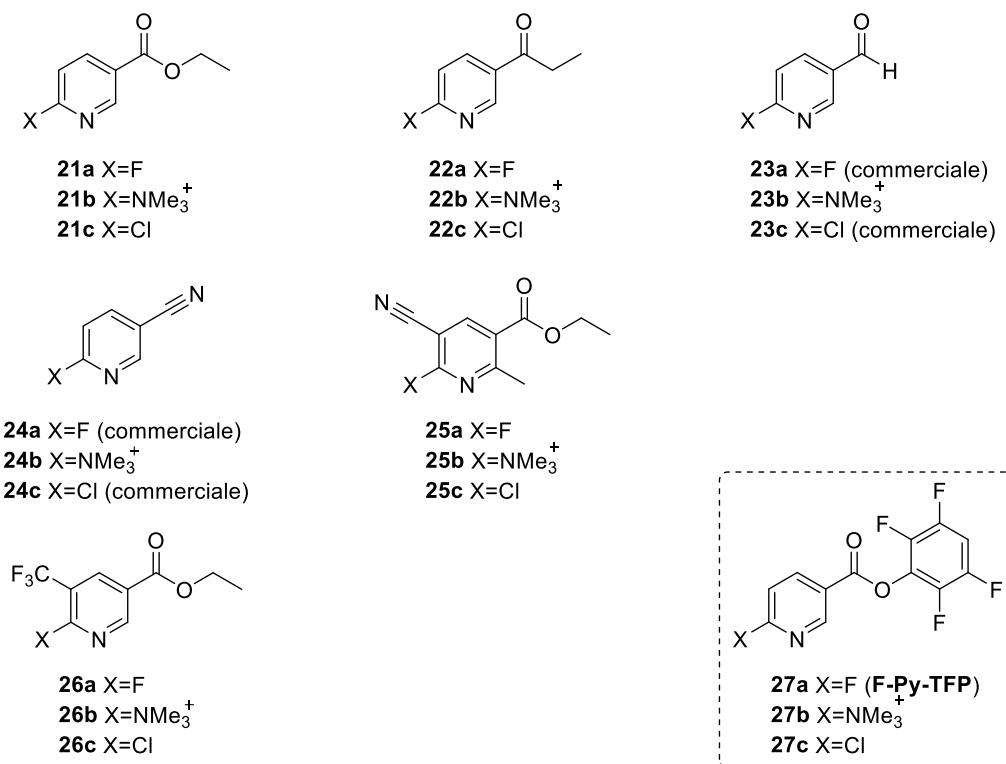


Figure 85. Modèles de fluoropyridines à synthétiser

2.2. Analyse rétrosynthétique

La synthèse des pyridines triméthylammoniums **21b-27b** et des pyridines fluorées **21a-27a** est envisagée à partir de différents précurseurs chloropyridines commerciaux (Figure 86). Ce choix est justifié par l'importante disponibilité commerciale de ce type de dérivés. Dans le cas des pyridines **23** et **24**, les dérivés chlorés et fluorés sont, par ailleurs, tous commerciaux. Les précurseurs triméthylammoniums seront obtenus par substitution du chlore avec de la diméthylamine suivi de la méthylation du produit formé. De manière similaire, les fluoropyridines pourront être obtenues par substitution avec une source de fluor nucléophile.

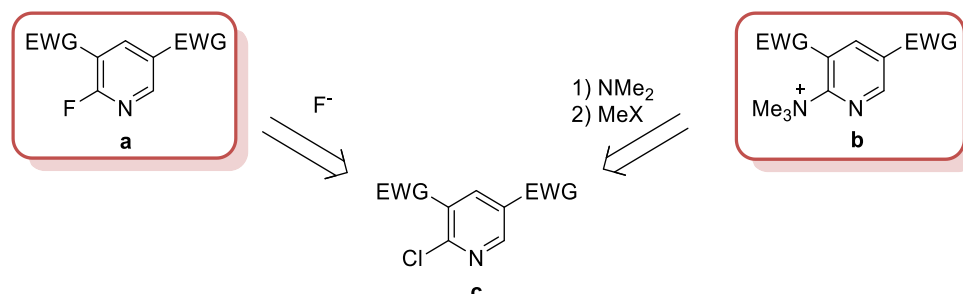


Figure 86. Analyse rétrosynthétique de la formation des pyridines fluorées et triméthylammoniums

2.3. Synthèse des chloro- et fluoropyridines 21-27a et 21-27c

a) Synthèse des pyridines chlorée et fluorée ester d'éthyle 21c et 21a

La pyridine ester chlorée **21c** a été synthétisée à partir de l'acide 6-chloronicotinique commercial en deux étapes avec formation du chlorure d'acyle **28** correspondant avec un rendement global de 44 % (Schéma 15).

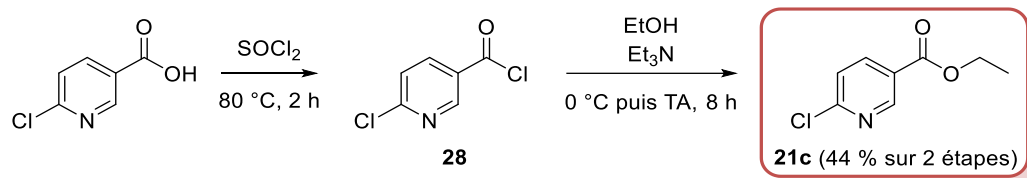
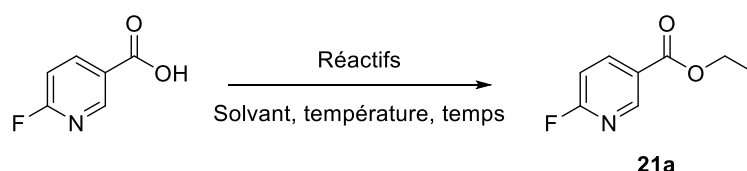


Schéma 15. Formation de l'ester 6-chloronicotinique **21c**

Afin d'obtenir la pyridine fluorée, une estérification similaire a été envisagée à partir de l'acide 6-fluoronicotinique pour former le chlorure d'acyle (Tableau 17 – entrées 1 et 2). Cependant, la substitution étant facilitée en position 2- sur la pyridine, le fluor a été substitué par le chlore dans les deux premiers essais. L'estérification à partir des chlorures d'acyles **28** obtenus n'a donc pas été effectuée. La formation de l'ester d'éthyle 6-fluoronicotinique a ensuite été effectuée en présence d'agents de couplages (Tableau 17 – entrées 3 à 5). Un essai a été effectué sur l'acide carboxylique avec le 1,1'-carbonyldiimidazole (CDI) et de l'éthanol à température ambiante mais n'a pas permis d'obtenir le produit désiré (Tableau 17 – entrée 3). Des essais avec les carbodiimides *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) et 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC) ont ensuite été réalisés à température ambiante mais seules des traces du produit attendu ont été observées avec le DCC (Tableau 17 – entrées 4 et 5).



Entrée	Réactifs	Solvant	Température/temps	Résultat
1	(COCl) ₂	DCM	TA/24 h	<chem>Clc1ccc(C(=O)Cl)cn1</chem> 28
2	SOCl ₂	/	80 °C/2 h	<chem>Clc1ccc(C(=O)Cl)cn1</chem> 28
3	EtOH, CDI, pyridine	MeCN	TA/24 h	Aucune réaction
4	DCC	EtOH	TA/2 h	Traces du produit
5	EtOH, EDC, DMAP	DCM	TA/16 h	Aucune réaction

Tableau 17. Formation de l'ester 6-fluoronicotinique

Ces différentes tentatives d'estérification de l'acide 6-fluoronicotinique n'ayant pas abouties, la synthèse de la fluoropyridine **21a** sera envisagée dans un second temps à partir du précurseur triméthylammonium correspondant, dont la synthèse sera traitée plus loin dans ce chapitre.

b) Synthèse des pyridines chlorée et fluorée fonctionnalisées par un groupement cétone **22c** et **22a**

L'introduction de la fonction cétone sur le noyau 2-chloropyridine a d'abord été envisagée à partir du chlorure d'acyle **28** déjà obtenu. Celui-ci a été impliqué dans une addition avec du bromure d'éthylmagnésium à $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, mais seules des traces du composé **22c** ont été observées (Schéma 16).

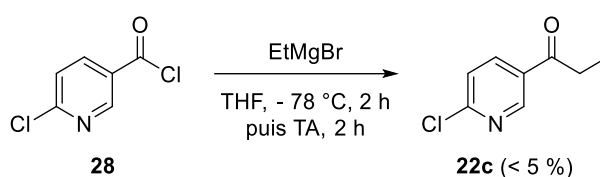


Schéma 16. Synthèse de la pyridine **22c** par addition de bromure d'éthylmagnésium

Une approche similaire a ensuite été testée avec une addition de bromure d'éthylmagnésium à partir d'un amide de Weinreb (*N*-méthoxy-*N*-méthylamide). Cet intermédiaire permet de générer la cétone et non l'alcool tertiaire lorsqu'il est mis en réaction avec un organomagnésien ou un organolithien grâce à la chélation du métal à l'intermédiaire tétraédrique formé après une première addition.

Les amides **29** et **30** ont été préparés au départ des acides 6-chloronicotinique et 6-fluoronicotinique respectivement par réaction de couplage avec l'hydrochlorure de *N,O*-diméthylhydroxylamine décrite dans la littérature avec des rendements respectifs de 66 et 52 % (Schéma 17).¹⁹⁵ Ces composés ont ensuite été engagés dans une réaction d'addition de bromure d'éthylmagnésium à $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ avec une augmentation graduelle de la température. Dans ces conditions, un faible rendement (13 %) a été obtenu à partir de la pyridine chlorée **29** et seules des traces du produit attendu ont été détectées dans le cas de la pyridine fluorée **30**, accompagnées de différents sous-produits non identifiés.

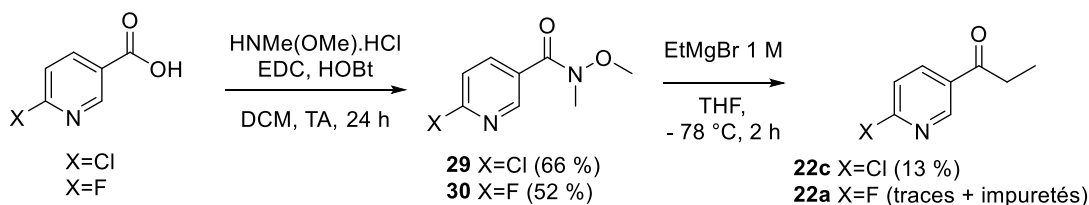


Schéma 17. Addition de bromure d'éthylmagnésium à partir de l'amide de Weinreb correspondant

Par la suite, une réaction de Grignard a été envisagée à partir des aldéhydes chloré et fluoré commerciaux en utilisant le bromure d'éthylmagnésium à $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Schéma 18). Les composés **31** et **32** ont été obtenus avec des rendements respectifs de 74 et 71 %. L'oxydation de

Swern a ensuite été appliquée sur les deux pyridines afin d'obtenir les cétones **22c** et **22a** correspondantes. Dans ces conditions, **22c** a été isolé en utilisant du chlorure d'oxalyle et du DMSO à $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ avec un rendement de 65 %. Seules des traces du produit attendu et de nombreux sous-produits ont pu être observés dans le cas de la formation du composé **22a**. Un autre essai permettant d'obtenir le composé **22a** par oxydation de Parik-Doering a été réalisé en utilisant le complexe de pyridine trioxyde sulfure à température ambiante mais n'a pas permis de préparer le produit désiré. Seul le produit de départ et différents sous-produits fluorés, non identifiés, ont été observés.

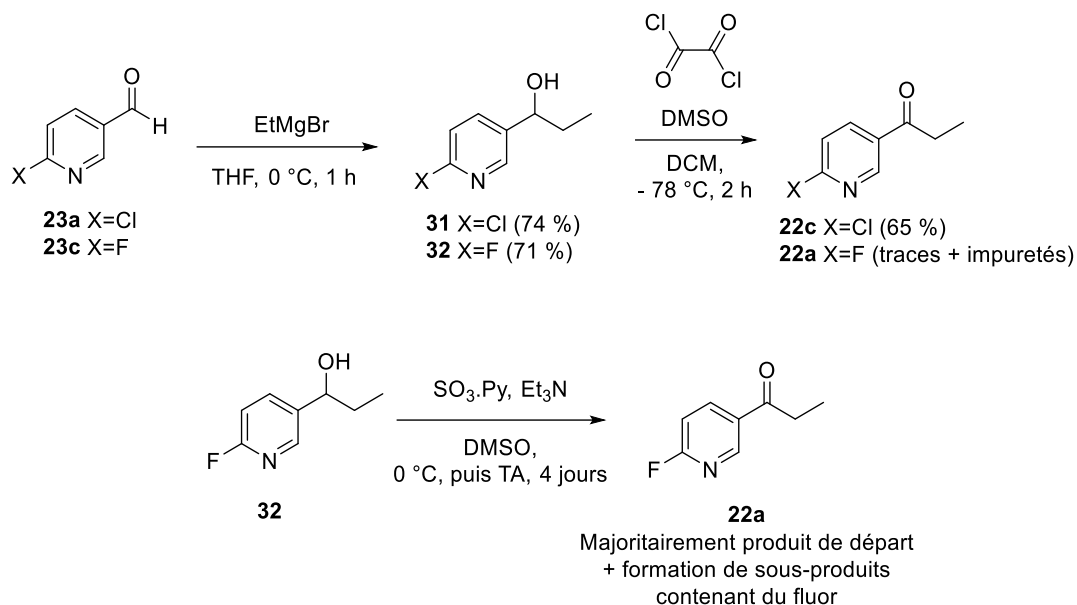


Schéma 18. Formation des pyridines cétone par réactions d'oxydation

La synthèse du dérivé fluoré a ensuite été envisagée par fluoration de la chloropyridine **22c**. Pour cela, celle-ci a été mise à réagir en présence de TBAF pendant 4 heures à température ambiante (Schéma 19). Une conversion partielle en un composé qui n'a pas pu être identifié a été obtenue, mais aucune trace de la fluoropyridine n'a été observée.

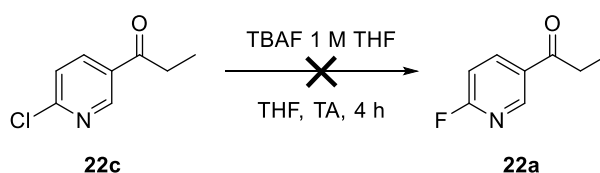
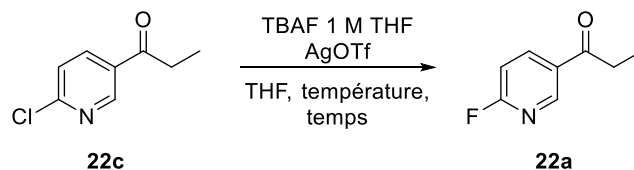


Schéma 19. Essai de fluoration avec du TBAF à partir de la pyridine **22c**

Afin de piéger l'ion chlorure devant se former au cours de la fluoration, pour ainsi faire pencher l'équilibre en faveur de la fluoropyridine, du triflate d'argent a été ajouté dans le but de faire précipiter le chlorure d'argent (Tableau 18). Quelques essais ont été conduits à partir de la chloropyridine **22c** en présence de TBAF sans succès, le produit fluoré attendu n'ayant pas été obtenu.



Entrée	Température	Temps	Résultat
1	TA	4 h	Mélange de plusieurs produits non identifiables
2	TA	16 h	Dégradation
3	50 °C	16 h	Dégradation

Tableau 18. Essais de fluoration en utilisant du triflate d'argent

c) Synthèse des esters de tétrafluorophényle des chloro- et fluoropyridines **27a** et **27c**

La chloro et la fluoropyridine **27c** et **27a** ont été synthétisées par couplage avec le tétrafluorophénol selon les conditions décrites par le groupe d'Olberg.⁴² Les deux composés **27c** et **27a** ont été obtenus avec un rendement de 29 et 66 % respectivement.

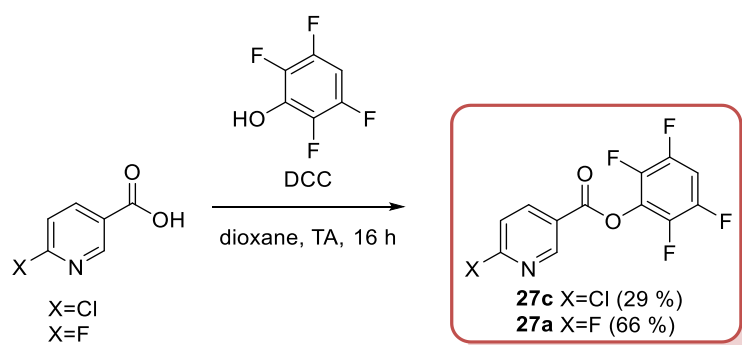


Schéma 20. Synthèse des pyridines **27c** et **27a**

d) Synthèse de la chloro- et fluoropyridines tétra-substituées **25a** et **25c**

La synthèse de la pyridine tétra-substituée chlorée a été reproduite en suivant les conditions du groupe d'Andersen à partir du 3-oxobutanoate d'éthyle et de la 1,1-diméthoxy-*N,N*-diméthylméthanamine commerciaux et impliquant la formation d'une pyridone intermédiaire (Schéma 21).¹⁹⁶

Cette synthèse débute par la formation de l'énamine **33** par réaction de condensation de Knoevenagel entre le 3-oxobutanoate d'éthyle et la 1,1-diméthoxy-*N,N*-diméthylméthanamine à température ambiante. L'énamine formée a ensuite été engagée, sans purification dans une étape de cyclisation avec le 2-cyanoacétamide en présence d'hydrure de sodium dans le tétrahydrofurane à température ambiante. La pyridone **34** a été obtenue avec un rendement de 63 % après deux étapes de synthèse. Ce rendement est cohérent avec celui obtenu dans la littérature, compris entre 50 et 67 %.¹⁹⁶

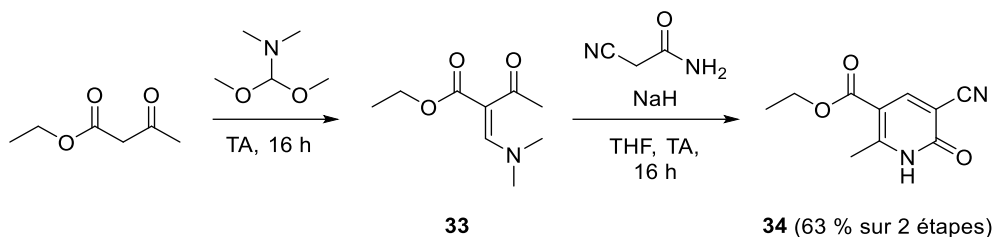


Schéma 21. Synthèse de la pyridone tétra-substituée

Afin d'obtenir la pyridine chlorée correspondante, la pyridone **34** a été impliquée dans une réaction de déoxychloration pour laquelle deux réactifs ont été testés, le trichlorure de phosphoryle et le chlorure de thionyle. Le trichlorure de phosphoryle a permis d'obtenir la chloropyridine **25c** avec un rendement légèrement plus élevé (61 au lieu de 55 %) qu'avec le chlorure de thionyle et moins de sous-produits ont été générés avec ce réactif qui semble donc plus indiqué pour la synthèse de la pyridine **25c** (Schéma 22).¹⁹⁶

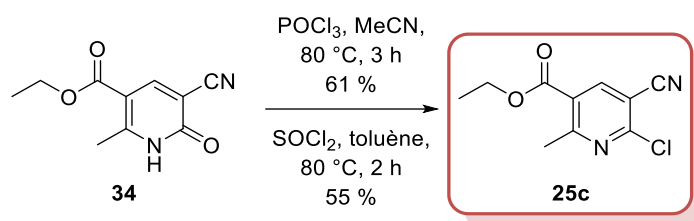


Schéma 22. Formation de la pyridine tétra-substituée chlorée à partir de la pyridone

La synthèse de la fluoropyridine **25a** a ensuite été étudiée à partir de la pyridone **34** dans une approche de déoxyfluoration, de manière similaire à la synthèse de la chloropyridine **25c**. Pour cela, deux réactifs de type aminosulfurane ont été testés, le DAST et le Deoxo-Fluor® (Schéma 23).¹⁹⁷ Aucun de ces deux réactifs n'a permis d'obtenir la fluoropyridine **25a** désirée et seule la pyridone de départ est récupérée à température ambiante. A 40 °C, avec le Deoxo-fluor®, des produits de dégradation ont été observés.

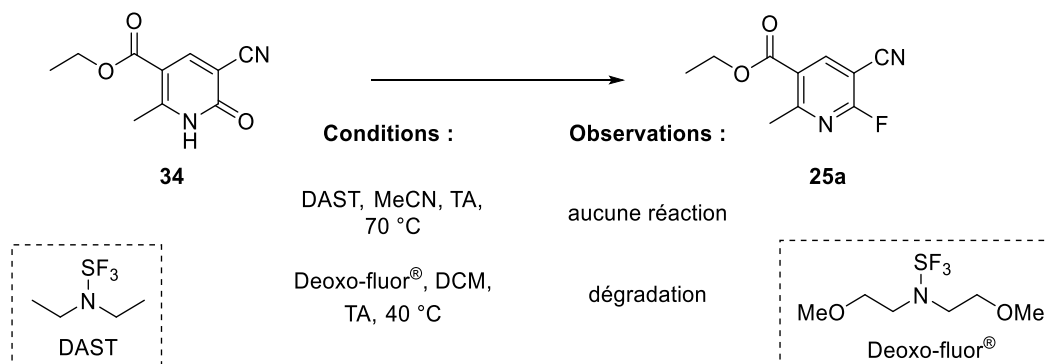
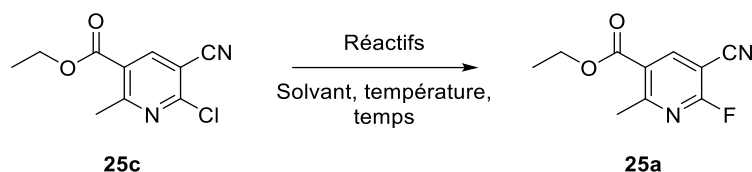


Schéma 23. Essais de fluoration à partir de la pyridone **34**

Des essais de fluoration ont ensuite été effectués sur la pyridine chlorée **25c** avec des sels de fluorures nucléophiles inorganiques ou organiques tels que le fluorure de potassium, le fluorure de césium ou encore le fluorure de tétrabutylammonium (Tableau 19). Les réactions

avec le fluorure de tétrabutylammonium et le fluorure de césium ont conduit soit à la dégradation du composé **25c** soit à la formation d'un mélange de plusieurs sous-produits respectivement (Tableau 19 – entrées 1 et 2). En revanche, aucune réaction n'a été constatée avec le fluorure de potassium après 16 heures à 70 °C (Tableau 19 – entrée 3). La même réaction a été reproduite avec deux cryptants utilisés en chimie du fluor-18, le K₂₂₂ et le 18-crown-6, qui permettent de complexer le potassium, afin d'augmenter la réactivité de l'ion fluorure. Ces réactions n'ont conduit qu'à la dégradation de la chloropyridine **25c** à des températures de 120 et 110 °C respectivement (Tableau 19 – entrées 4 et 5).



Entrée	Réactifs	Solvant	Température	Temps	Résultat
1	TBAF	DMF	70 °C	1,5 jour	Dégradation
2	CsF	DMSO	120 °C	4 heures	Mélange de 3 produits
3	KF	DMSO	70 °C	16 heures	Aucune réaction
4	KF, K ₂₂₂	DMF	TA puis 120 °C	16 heures	Aucune réaction puis dégradation
5	KF, 18-crown-6	NMP	110 °C	4 heures	Dégradation

Tableau 19. Essais de fluoration à partir de la pyridine chlorée **25c**

Récemment, le groupe d'Hartwig a développé une méthode de synthèse de 2-fluoropyridines par substitution aromatique électrophile à partir de difluorure d'argent, dans des conditions douces et avec de très bons rendements.¹⁹⁸ Afin de transposer cette méthode pour la synthèse de la pyridine **25a**, une déshalogénéation réductive de la pyridine **25c** a été réalisée en présence de zinc métallique et de chlorure d'ammonium pour conduire à la pyridine **35** avec un rendement de 36 % (Schéma 24). Celle-ci a ensuite été traitée par du difluorure d'argent dans l'acétonitrile à température ambiante, mais seule la dégradation de la pyridine **35** a été constatée, sans formation du composé attendu.¹⁹⁸

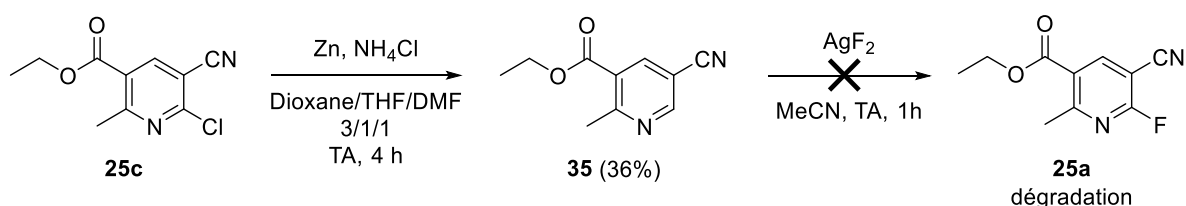


Schéma 24. Déshalogénéation réductive sur la pyridine tétra-substituée puis essai de fluoration avec AgF₂

e) Synthèse des esters d'éthyle des 2-chloro- et 2-fluoro-5-trifluorométhylpyridines **26a** et **26c**

La synthèse de la chloropyridine tétra-substituée **26c** a été reproduite selon la séquence réactionnelle de quatre étapes, décrite par l'équipe de Mulder, à partir de l'acide 6-hydroxynicotinique (Schéma 25).¹⁹⁹ Ce dernier a d'abord été estérifié dans de l'éthanol en présence d'acide sulfurique. L'ester correspondant a ensuite été iodé en position 3- par du *N*-iodosuccinimide pour obtenir le composé **36** avec un rendement de 87 % sur les deux étapes. Ce composé a ensuite été chloré avec du trichlorure de phosphore afin d'obtenir le composé **37** avec un rendement de 96 %.

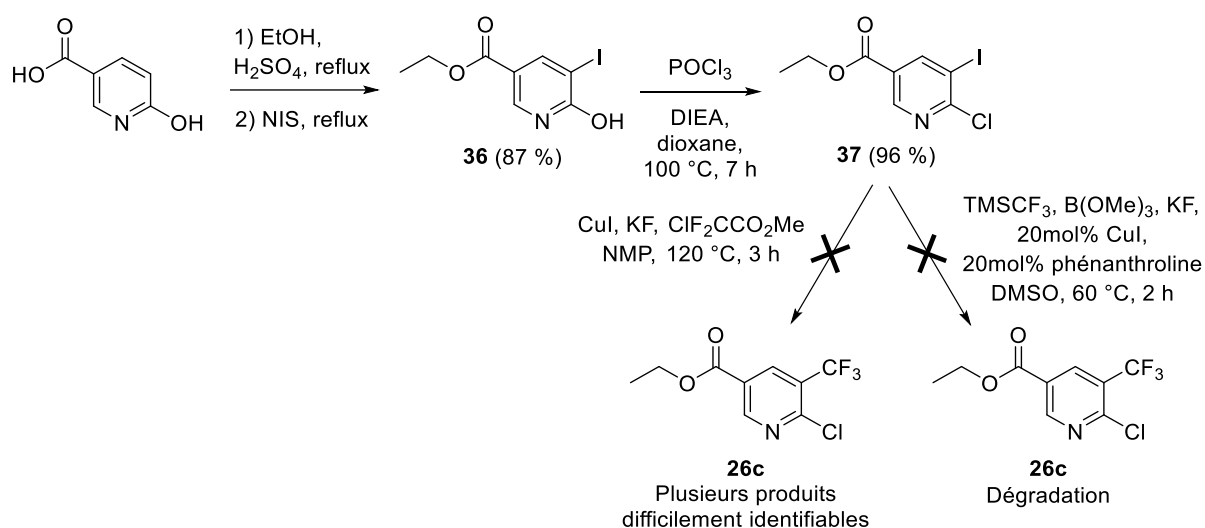


Schéma 25. Synthèse de la chloropyridine tétra-substituée CF₃

L'introduction du groupement trifluorométhyle a ensuite été reproduite selon les conditions décrites à partir du chlorodifluoroacétate de méthyle comme précurseur de difluorocarbène et en présence d'iodure de cuivre (Schéma 25).¹⁹⁹ Cette méthode a permis d'obtenir un mélange de produits, difficilement identifiables et séparables. En effet, dans la littérature, cette réaction, effectuée à grande échelle (kg) pour du développement process, a mené à la formation du produit ainsi qu'à celle de sous-produits, issus soit de la perfluoruration à partir du trifluorométhyle soit de la substitution du chlore par un fluor ou un groupement trifluorométhyle avec des quantités faibles, inférieures à 5 %, déterminées par HPLC (Figure 87).

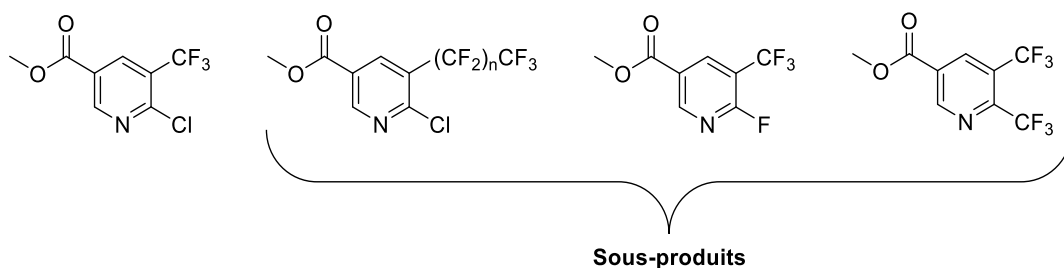


Figure 87. Produit et sous-produits issus de la trifluorométhylation décrite par l'équipe de Mulder¹⁹⁹

Un autre essai avec le réactif de Ruppert-Prakash, le trifluorométhyltriméthylsilane, en présence de fluorure de potassium et de borate de triméthyle à 60 °C, a été effectué (Schéma 25). La réaction n'a pas permis d'obtenir le composé mais seulement une dégradation du produit de départ a été constatée. En raison des difficultés observées lors de la substitution de l'iode par un groupement trifluorométhyle ainsi que la non-formation des autres pyridines fluorées, la synthèse de cette pyridine n'a pas été développée plus amplement lors de la thèse.

La formation des pyridines fluorées ayant été largement étudiées et n'ayant pas donné de résultats encourageants, une stratégie différente sera donc envisagée. En effet, en radiochimie, le radiomarquage de composés triméthylammoniums avec du fluor-18 permet d'obtenir rapidement les composés radiofluorés. Cette méthode pourra donc être appliquée à la formation des pyridines de références après la synthèse des triméthylammoniums effectuée.

f) Conclusion

La majorité des chloropyridines ciblées dans ce travail ont été obtenues. En revanche, la synthèse des fluoropyridines correspondantes s'est montrée particulièrement difficile et aucune d'entre elles n'a pu être obtenue. La suite de cette étude sera dirigée vers la synthèse des précurseurs triméthylammoniums **b**, qui seront ensuite utilisés pour obtenir les fluoropyridines manquantes.

2.4. Synthèse des précurseurs triméthylammoniums **b** à partir des diméthylamines

a) Diméthylamines

Les 2-diméthylaminopyridines ont été formées par substitution du chlore ou du fluor avec de l'hydrochlorure de diméthylamine à 100 °C. Les diméthylaminopyridines **38**, **39**, **40**, et **41** ont été obtenues avec des rendements compris entre 52 et 75 % (Schéma 26).

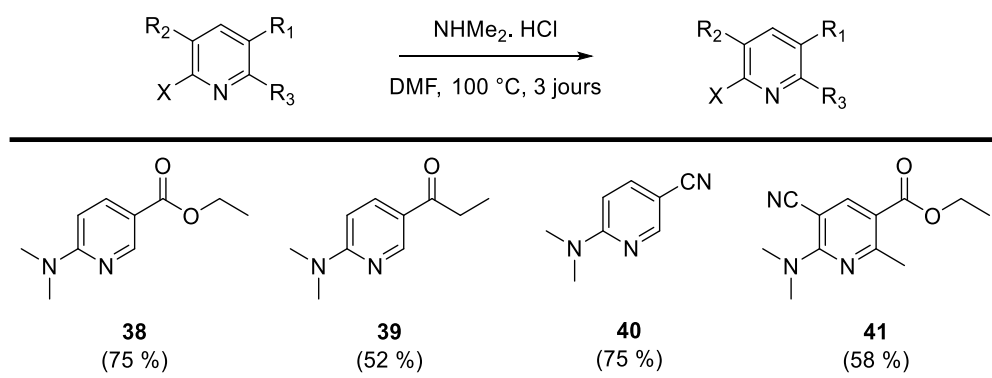
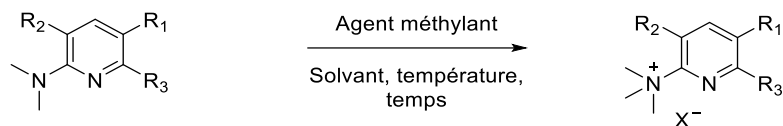


Schéma 26. Synthèse des 2-diméthylaminopyridines

b) Triméthylammoniums

Une fois les quatre diméthylaminopyridines synthétisées, la quaternarisation de ces dernières a été étudiée en utilisant du triflate de méthyle ou de l'iodure de méthyle. Plusieurs conditions ont été testées sur la pyridine tétra-substituée **41**. L'utilisation de triflate de méthyle à température ambiante n'a pas permis d'obtenir le triméthylammonium, seule la présence de produit de départ a pu être observée (Tableau 20 – entrée 1). Ces conditions ont ensuite été effectuées à 40 °C, mais seul un mélange de produits non identifiés a pu être observé (Tableau 20 – entrée 2). Un essai a aussi été effectué avec de l'iodométhane, moins réactif que le triflate de méthyle, à 80 °C mais le produit de départ a été intégralement récupéré (Tableau 20 – entrée 3). La formation de triméthylammonium sur les composés **38** et **39** a aussi été réalisée en utilisant du triflate de méthyle à température ambiante, mais n'a permis d'obtenir qu'un mélange de produits non identifiés (Tableau 20 – entrée 4 et 5). Sur le composé 6-(diméthylamino)nicotinonitrile **40** à température ambiante, aucune réaction n'a été constatée (Tableau 20 – entrée 6).



Entrée	Pyridine	Agent méthylant	Solvant	Température	Temps	Résultat
1	 41	MeOTf	Toluène	TA	2 h	Aucune réaction
2	 41	MeOTf	Toluène	40 °C	2 h	Dégradation/ mélange de produits
3	 41	MeI	Toluène	80 °C	48 h	Aucune réaction
4	 38	MeOTf	Toluène	TA	2 h	Mélange de produits
5	 39	MeOTf	Toluène	TA	2 h	Mélange de produits
6	 40	MeOTf	Toluène	TA	2 h	Aucune réaction

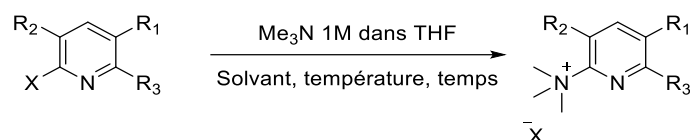
Tableau 20. Formation des triméthylammoniums à partir de la diméthylamine

Ces résultats montrent que la désactivation des pyridines avec des groupements électroattracteurs a un fort impact sur la réactivité des 2-diméthylaminopyridines. En effet, même en ayant recours à un agent alkylant très réactif comme le triflate de méthyle, la quaternarisation de l'amine, électriquement appauvrie par l'importante délocalisation du doublet libre au niveau de ces pyridines, n'a pas pu être effectuée. En tenant compte de cette faible réactivité, une autre stratégie de synthèse des triméthylammoniums ciblés va être étudiée, consistant à exploiter l'appauvrissement électronique de ces pyridines par une substitution des 2-halogéno-pyridines avec de la triméthylamine.

2.5. Synthèse des pyridines fonctionnalisées par un triméthylammonium b par addition de triméthylamine aux 2-halogénoypyridines a ou c

En raison des difficultés observées lors de la formation de l'ammonium quaternaire à partir des diméthylamines, des essais de substitution à partir des composés halogénés par la triméthylamine ont été effectués, en reprenant les conditions décrites par le groupe de Kiesewetter pour la synthèse de la pyridine **27b**, utilisant de la triméthylamine en solution à 1 M dans le tétrahydrofurane.¹⁹⁴

Cette méthode a en premier lieu été reproduite à partir de la pyridine **27c** (Tableau 21 – entrée 1). Contrairement aux résultats décrits¹⁹⁴, l'ammonium **27b** a bien été observé mais il a été accompagné d'une quantité non négligeable de diméthylamine correspondante. Ce sous-produit provient de la déméthylation de l'ammonium formé sans doute par réaction avec la triméthylamine, celle-ci étant présente en large excès (2,7 éq.) dans le milieu réactionnel. Cette réaction a ensuite été testée à partir des acides 6-fluoronicotinonitrile **24a** et 6-chloronicotinonitrile **24c** (Tableau 21 – entrées 2 et 3). Aucune réaction n'a été observée dans ces conditions, seules les halogénoypyridines ont été récupérées en fin de réaction. La température a ensuite été augmentée à 50 °C puis à 100 °C avec la pyridine **24a** et dans ce cas la formation de la diméthylamine correspondante a également été observée, comme dans le cas de la pyridine **27a** (Tableau 21 – entrées 4 et 5). Cependant, avec la chloropyridine **24c** comme précurseur et à 50 °C, la conversion n'était pas totale mais 34 % de produit désiré a pu être obtenu (Tableau 21 – entrée 6).

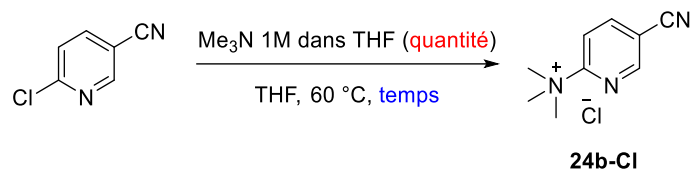


Entrée	Pyridine	Eq. NMe ₃	Solvant	Température/ temps	Résultat
1		2,7	THF	TA/2 h	Produit + composé NMe ₂ + autre composé non identifié
2		1,3	THF	TA/16 h	Aucune réaction
3		1,3	THF	TA/2 h	Aucune réaction
4		1,3	THF	50 °C/4 h	92 % produit de départ + 8 % composé NMe ₂ *
5		1,3	DMF	100 °C/3 h	93 % Composé NMe ₂ + 7 % produit de départ*
6		1,3	THF	50 °C/2 h	66 % produit de départ + 34 % produit*

* Rendements estimés par RMN du brut réactionnel

Tableau 21. Substitution des halogénopyridines par de la triméthylamine

La formation de l'ammonium quaternaire ayant été observée dans le THF à 50 °C, les paramètres réactionnels ont été étudiés plus précisément à partir de la chloropyridine **24c** (Tableau 22). L'importance de la quantité de triméthylamine a d'abord été évaluée après 2 heures de réaction, au-delà de 2,5 équivalents de triméthylamine, peu d'effets bénéfiques ont été constatés (Tableau 22 – entrées 1 à 4). En termes de vitesse de réaction, il semble qu'un optimum soit atteint après 16 heures de réaction à 60 °C en utilisant un équivalent de triméthylamine (Tableau 22 – entrées 5 à 7). Finalement, en ajustant la quantité de triméthylamine à 2 équivalents et après 16 heures de réaction, une conversion presque totale a été constatée avec un très bon rendement de 89 % (Tableau 22 – entrée 9).



Variation	Entrée	Quantité	Temps	Conversion*	Rendement*
Quantité	1	1 éq.	2 h	47 %	26 %
	2	2,5 éq.	2 h	61 %	47 %
	3	5 éq.	2 h	70 %	65 %
	4	10 éq.	2 h	77 %	72 %
Temps	5	1 éq.	6 h	63 %	58 %
	6	1 éq.	16 h	73 %	69 %
	7	1 éq.	24 h	76 %	65 %
Quantité	8	1,5 éq.	16 h	86 %	79 %
	9	2 éq.	16 h	96 %	89 %
	10	2,5 éq.	16 h	97 %	90 %

* Conversions et rendements estimés par RMN dans le DMSO-*d*₆ avec ajout d'hexaméthylbenzène comme étalon interne

Tableau 22. Etude méthodologique de la formation de l'ammonium quaternaire (quantité et temps)

A l'issue de cette étude, il a été constaté que le sel de chlorure d'ammonium **24b-Cl** possède une stabilité limitée dans le DMSO-*d*₆. Le produit semble inchangé pendant quelques heures mais une génération lente de la diméthylamine correspondante **40** a cependant été observée dans le tube RMN (Figure 88). Cette dégradation a ainsi été attribuée au contre-ion chlorure possédant un caractère nucléophile non négligeable.

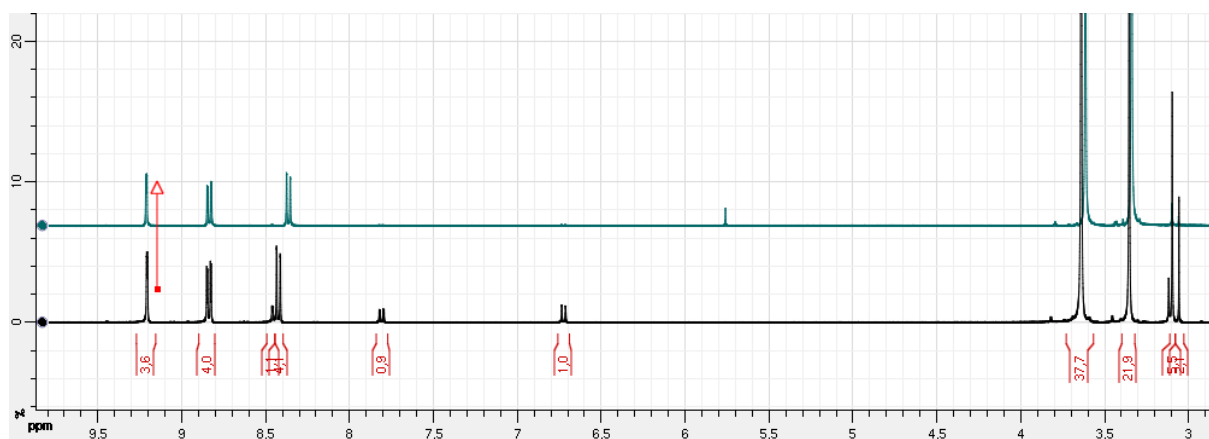


Figure 88. Perte d'un méthyle de la pyridine triméthylammonium **24b-Cl** dans le DMSO

En tenant compte de cette instabilité ainsi que de la très faible solubilité du chlorure d'ammonium **24b-Cl** dans les solvants organiques, le chlore a été échangé par un contre-ion triflate. Pour cela, le chlorure d'ammonium **24b-Cl** a été traité par du triflate de triméthylsilyle dans des conditions similaires à celles utilisées par le groupe de Kiesewetter.¹⁹⁴ Le triflate d'ammonium **24b-OTf** a ainsi été obtenu avec un rendement de 93 % (Schéma 27).

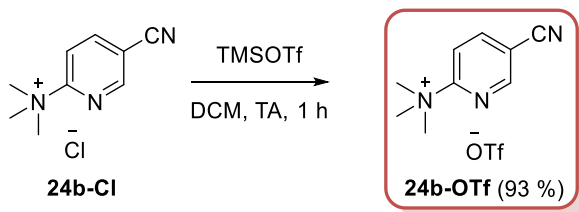
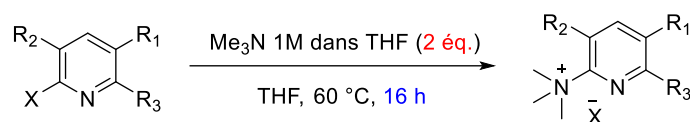


Schéma 27. Changement de contre-ion de la pyridine triméthylammonium **24b-Cl**

De bons résultats ayant été obtenus avec la pyridine **24c** pour la synthèse du triméthylammonium correspondant, cette méthode a ensuite été appliquée aux autres chloropyridines préparées précédemment. Les résultats obtenus sur les pyridines chlorées ou fluorée **21c**, **22c**, **25c** et **24a** ont abouti à la formation de la diméthylamine (Tableau 23 – entrée 1) ou à un mélange de produits (Tableau 23 – entrées 2 et 4) souvent difficiles à identifier. Dans le cas de la 6-fluoronicotinonitrile **24a**, seul du produit de départ est récupéré avec de nombreuses impuretés (Tableau 23 – entrée 3).



Entrée	Halogéno-pyridine	Produit obtenu
1	 21c	80 % composé diméthylamine + 20 % produit de départ*
2	 22c	Mélange de produits (dont produit de départ)
3	 24a	Produit de départ + impuretés
4	 25c	Mélange de produits (dont produit de départ)

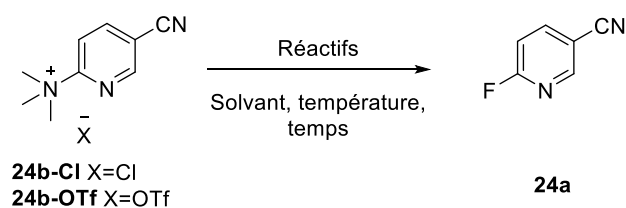
* Rendements estimés par RMN du brut réactionnel

Tableau 23. Application de la méthode de formation de triméthylammonium aux autres pyridines

Ces résultats peuvent s'expliquer par la nucléophilie du chlore, ce dernier pouvant substituer un des méthyles du triméthylammonium formé.

a) Evaluation de la fluoruration de la pyridine 24a

Les premiers essais de fluoruration non-radioactive ont été effectués à partir du chlorure d'ammonium **24b-Cl** et du triflate d'ammonium **24b-OTf**, les seuls précurseurs ammoniums qui ont pu être obtenus au cours de cette étude. Pour cela, plusieurs sels de fluor ont été testés comme sources de fluor nucléophile à partir de ces deux substrats (Tableau 24). Un premier essai a été réalisé avec le composé **24b-Cl** en présence de fluorure de tétrabutylammonium à température ambiante (Tableau 24 – entrée 1). Aucune réaction n'a été constatée après 16 heures. La température a ensuite été augmentée à 40 °C et seul un mélange de produits de dégradation ne montrant pas d'incorporation de fluor a été obtenu. Lorsque les mêmes conditions ont été utilisées pour la fluoruration du sel de triflate **24b-OTf**, 83 % de formation du produit désiré a été observée à température ambiante, accompagné d'une dégradation partielle du substrat (Tableau 24 – entrée 2). L'utilisation d'un solvant moins dissociant comme le THF n'a pas permis d'obtenir ce même résultat, dans ce cas seul un mélange de produits a été observé (Tableau 24 – entrée 3). Avec le fluorure de césium, 31 % de la pyridine fluorée a été obtenu selon une conversion incomplète (Tableau 24 – entrée 4).



Entrée	Pyridine	Réactif	Solvant	Température	Temps	Résultat
1	24b-Cl	TBAF 1 M THF	DMSO	TA puis 40 °C	24 h	Mélange de produits
2	24b-OTf	TBAF 1 M THF	DMSO	TA	16 h	83 % produit + sous-produits*
3	24b-OTf	TBAF 1 M THF	THF	TA	16 h	Mélange de produits
4	24b-OTf	CsF	DMSO	TA	16 h	31 % de produit + produit de départ*

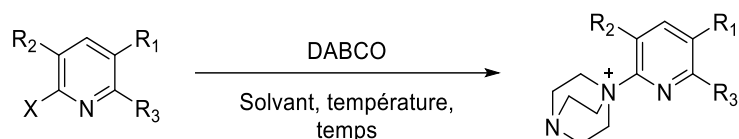
* Rendements estimés par RMN du brut réactionnel

Tableau 24. Fluoruration à partir du triméthylammonium

Ces résultats préliminaires sont très encourageants, malgré les difficultés liées à la synthèse des ammoniums quaternaires. Ces premiers essais montrent que la fluoruration à température modérée, ici température ambiante, est compatible avec les précurseurs ciblés dans ce travail. D'autres stratégies de synthèse ont également été envisagées afin de surmonter les difficultés rencontrées jusqu'ici pour obtenir les ammoniums des pyridines appauvries.

2.6. Stratégie alternative : synthèse des ammoniums quaternaires dérivés du DABCO

Le groupe de Shi a montré qu'il était possible de substituer une 2-chloropyridine par le 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO), amine tricyclique particulièrement nucléophile, afin d'effectuer une substitution régiosélective de cette dernière.²⁰⁰ Cette réactivité pourrait être mise à profit dans le cadre de notre étude où il serait particulièrement intéressant d'évaluer la fluoration aromatique d'ammoniums à base de DABCO dérivés des pyridines présentées dans ce chapitre. Pour cela, la pyridine tétra-substituée **25c**, la plus électrodéficente, et donc a priori la plus réactive de cette étude, a été mise en présence de DABCO dans le DMF ou le dichlorométhane à température ambiante. Dans ces conditions, l'ammonium ciblé semble se former très rapidement mais subit l'addition de l'ion chlorure pour former la pipérazine **42** ainsi qu'un autre sous-produit non identifié (Tableau 25 – entrées 1 et 2). La même observation a été faite dans le cas des pyridines **21c** et **24c**, où les pipérazines **43** et **44** ont été obtenues avec un rendement de 38 % et 15 % respectivement, uniquement accompagnées des chloropyridines **21c** et **24c** de départ (Tableau 25 – entrées 3 et 4). Cette réaction a ensuite été appliquée à la fluoropyridine commerciale **24a** afin d'éviter l'addition de l'ion chlorure, plus nucléophile que le fluorure, à température ambiante puis à 45 °C. Un mélange de produits a été observé, mais aucune présence de groupement DABCO ou de pipérazine n'a été identifié (Tableau 25 – entrées 5 et 6). Un dernier essai en utilisant du triflate d'argent pour faire précipiter le chlore au fur et à mesure de la réaction a été réalisé sur la pyridine **24c** à température ambiante mais aucune réaction n'a été observée dans ce cas (Tableau 25 – entrée 7).



Entrée	Pyridine	AgOTf	Solvant	Température/ temps	Résultat
1		/	DMF	TA/2 h	 42 (72 %)
2		/	DCM	TA/1 h	 42 + sous-produits non identifiés
3		/	DMF	TA puis 45 °C/ 2 h	 43 (38 %)
4		/	THF	TA/16 h	 44 (15 %)
5		/	DCM	TA/2 h	Mélange de produits non identifiés
6		/	DCM	45 °C/5 h	Mélange de produits non identifiés
7		Oui	THF	TA/2 h	Aucune réaction

Tableau 25. Essais de synthèse d'ammoniums dérivés du DABCO sur les différentes pyridines

Ces résultats démontrent une forte influence du contre-ion sur les ammoniums dérivés du DABCO des pyridines de cette étude. L'ion chlorure issu de la substitution des chloropyridines par le DABCO est trop nucléophile et non compatible avec ces ammoniums, ce qui est également en accord avec les observations faites lors de la synthèse des triméthylammoniums **b** à partir des chloropyridines. Pour cette raison, une dernière stratégie a été évaluée consistant à échanger le précurseur chloropyridine par un dérivé

permettant d'obtenir un contre-ion inerte, compatible avec des ammoniums de pyridines électrodéficientes.

2.7. Stratégie alternative : Synthèse des ammoniums quaternaires à partir de 2-triflyloxyypyridines

Le groupement triflate est un excellent groupement partant lors d'une substitution nucléophile et l'ion trifluorométhanesulfonate produit est en conséquence très peu réactif. Il s'agirait ainsi d'un bon compromis pour la synthèse d'ammoniums à partir des pyridines décrites dans ce chapitre, qui devraient ainsi être plus stables et plus solubles dans les solvants organiques que les sels d'ammoniums chlorés. Le choix de ce type de dérivés est d'autant plus judicieux que la synthèse des 2-triflyloxyypyridines peut être réalisée à partir des pyridones correspondantes par réaction avec de l'anhydride triflique. Disposant de la pyridone **34** obtenue lors de la synthèse de chloropyridine **25c**, cette stratégie a été évaluée sur ce type de pyridine pour laquelle le triméthylammonium correspondant n'avait pas pu être obtenu.

La 2-triflyloxyypyridine **45** a ainsi été obtenue en une étape avec un rendement de 80 % à partir de la pyridone **34** correspondante. (Schéma 28).²⁰¹



Schéma 28. Formation du composé triflate sur la pyridine tétra-substituée

Un essai de formation du triméthylammonium a ensuite été effectué en utilisant de la triméthylamine à température ambiante (Schéma 29). La réaction a été suivie par LC-MS et une formation totale du produit attendu a eu lieu après seulement 5 minutes à température ambiante. L'analyse RMN du brut réactionnel dans le DMSO-*d*₆ a montré cependant la présence de plusieurs composés.

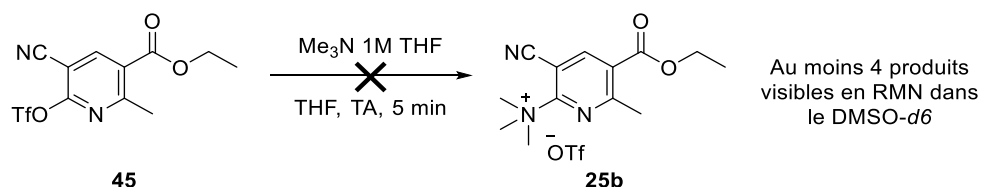


Schéma 29. Formation du triméthylammonium à partir de la pyridine tétra-substituée triflate **45**

L'échantillon analysé en LC-MS, préparé dans un mélange eau/MeCN 1/1, a été réinjecté après 24 et 48 heures afin de caractériser la stabilité de l'ammonium. Une hydrolyse lente du triméthylammonium **25b** ($M^+ = 248 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) semble avoir eu lieu, et deux composés ont

majoritairement été détectés, correspondant au produit d'hydrolyse de l'ester **46** ($M^+ = 220 \text{ g.mol}^{-1}$) et au produit de substitution avec de l'eau **47** ($M+H^+ = 207 \text{ g.mol}^{-1}$).

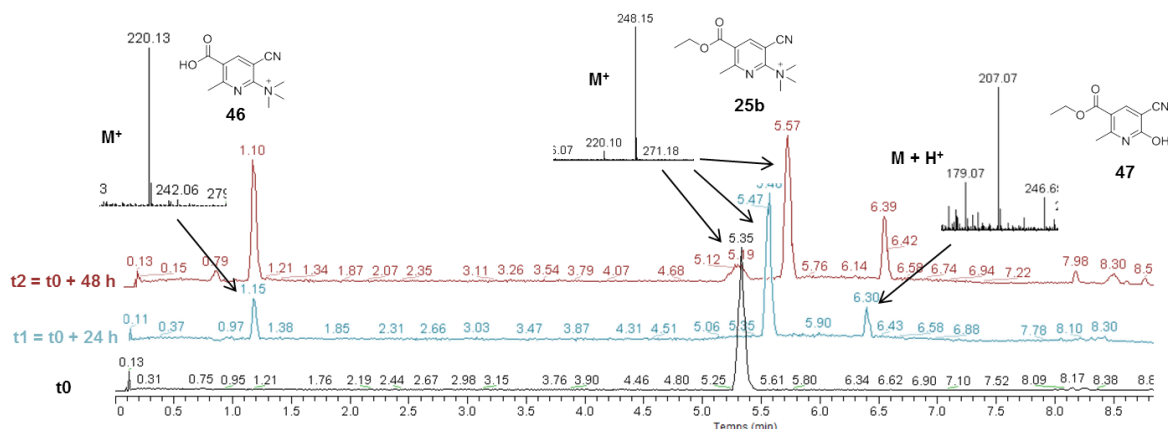


Figure 89. Evolution de la réaction de formation du triméthylammonium sur la pyridine **25c**

La formation, très rapide, du composé triméthylammonium **25b** à partir du composé triflate **45** est un résultat encourageant pour la suite du projet bien que sa très forte réactivité n'ait pas permis d'isoler le composé. Ces résultats préliminaires semblent valider cette approche qui permettrait de déverrouiller la synthèse des ammoniums sur les pyridines **21-26b** en vue de l'étude de la réaction de fluoruration sur les différentes pyridines modèles de ce projet.

3. Conclusion et perspectives

Le noyau pyridine est un groupement très utilisé en radiochimie car il permet une radiofluoruration par SNAr dans des conditions de température modérées avec généralement de très bons rendements d'incorporation. L'ambition de ce travail a été d'étudier de manière approfondie la substitution de ce noyau pour définir quelles limites pouvaient être atteintes dans les conditions de radiofluoruration et si celles-ci étaient compatibles avec un marquage de macro biomolécules en une seule étape (Schéma 30).

Cette étude s'est néanmoins heurtée à de nombreuses difficultés dans la préparation des précurseurs de type ammoniums quaternaires et des références non radioactives. L'importante électrodéfiance des pyridines choisies a conduit soit à des composés trop peu réactifs dans le cas des diméthylamines, soit à des dérivés de grande réactivité avec la dégradation des ammoniums formés. Bien que toutes les chloropyridines **c** aient été synthétisées, seuls deux sels d'ammonium ont été obtenus. Aucune référence froide n'a pu être obtenue hormis les deux fluoropyridines commerciales. Les premiers résultats pour la fluoruration de ces espèces sont pourtant très prometteurs, car il a été possible de mettre en évidence la fluoruration à température ambiante du sel d'ammonium **24b-OTf**, possédant le contre-ion triflate. Ce potentiel pourrait finalement être exploré grâce aux résultats obtenus à la fin de ce travail, avec une stratégie de synthèse de triflates d'ammoniums qui semble compatible avec les pyridines conçues pour cette étude, à partir d'un précurseur substitué

par un triflate. La réactivité de celui-ci pourra également être directement évaluée en fluoration aromatique.

Une autre approche pourrait également être abordée à partir de travaux récents concernant la synthèse d'ammonium de trifluoroacétate à partir de pyridines *N*-oxydes.²⁰² Un accès facile et efficace aux précurseurs de radiofluoration permettra *in fine* d'évaluer l'impact des groupements électroattracteurs sur le marquage de pyridines et d'aboutir à une nouvelle étiquette à motif pyridine pour le marquage de macro-biomolécules.

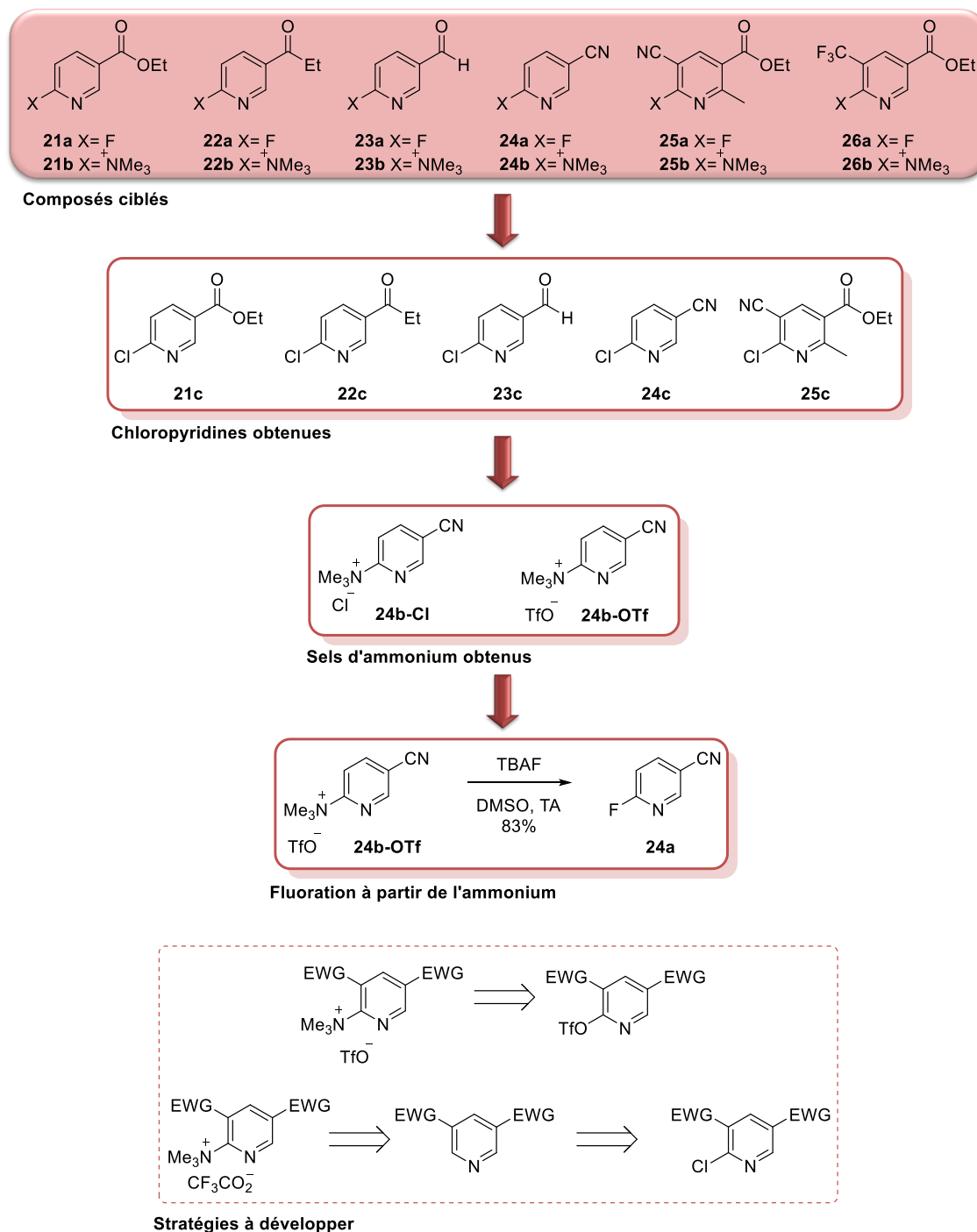


Schéma 30. Résumé des composés ciblés obtenus lors de cette étude de fluoration de pyridines électrodéficientes

Chapitre 3. Nouvelle réaction de click contrainte en chimie du fluor-18

La chimie click contrainte, non catalysée au cuivre, permet de réaliser des cycloadditions 1,3-dipolaires entre un cyclooctyne et un azoture. Cependant, la vitesse de réaction de cette dernière est environ 100 fois inférieure à celle de la chimie click catalysée au cuivre, en dépit de la contrainte induite par le cycle du cyclooctyne. La modification du « dipôle » peut être une option pour accélérer la vitesse de cycloaddition. Des réactions de SPAAC ont été effectuées avec des nitriles ou des oxydes de nitriles. Ces derniers ne sont pas suffisamment stables, c'est pourquoi l'utilisation de composés mésoioniques dipolaires et notamment le plus connu et le plus utilisé, la sydnone, est une option intéressante.

1. Les sydnones

1.1. Généralités

Les composés mésoioniques sont définis comme des hétérocycles dipolaires à 5 chaînons. Le terme « mésoionique » a été choisi comme la contraction de « mésomère » et de « ionique ». Les composés mésoioniques sont des dipôles possédant plusieurs formes mésomères et ne pouvant être représentés autrement que chargés, c'est le cas des sydnones (Figure 90).²⁰³

Les sydnones, découvertes en 1935 par Earl et Mackney sont les composés mésoioniques les plus utilisés du fait de leur relative stabilité et de leur synthèse aisée.²⁰⁴ De plus, les sydnones, en tant que pharmacophores, possèdent des propriétés anti-dépressives, antibactériennes, analgésiques, antimalariales et anti-inflammatoires.²⁰⁵⁻²⁰⁷ Elles sont également utilisées comme précurseurs de pyrazoles, noyaux hétérocycliques très présents dans les composés bioactifs, obtenus après cycloaddition avec des alcynes. En pratique, la sydnone la plus utilisée est la *N*-phényle sydnone.²⁰⁸

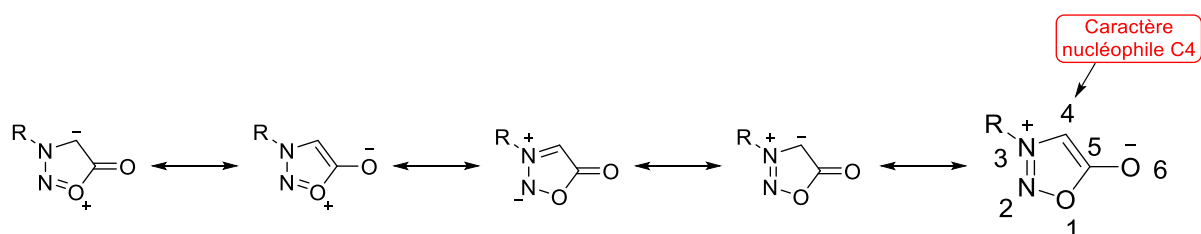


Figure 90. Représentation des formes mésomères de la sydnone

La position C4 de la sydnone est nucléophile et permettra donc de substituer les sydnones dans cette position.

1.2. Synthèse et fonctionnalisation des sydnones

La synthèse des sydnones s'effectue en deux étapes à partir des acides aminés *N*-substitués **L119**. La première étape consiste en la nitrosylation de l'acide aminé, effectuée avec du nitrite de sodium en conditions acides dans de l'eau, puis la cyclodéshydratation du *N*-nitroso- α -amino acide **L120** avec de l'anhydride acétique ou trifluoroacétique pour donner la sydnone **L121** (Figure 91), composé très stable y compris à température ambiante.^{204,209}

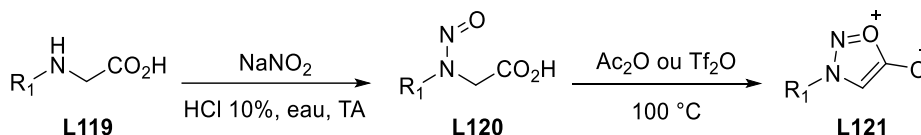


Figure 91. Schéma général de la synthèse des sydnones

Le caractère nucléophile du carbone C4 et l'acidité du proton correspondant permettent la fonctionnalisation dans cette position, soit par substitution électrophile aromatique soit par déprotonation puis addition d'un électrophile. Plusieurs types de réactions directes sont possibles telles que les acylations, les halogénations, les lithiations ou encore les réactions de Grignard (Figure 92). Ces deux dernières permettent d'introduire d'autres fonctions sur les sydnones telles que des carboxyles ou des amides. A partir des dérivés halogénés, des réactions de Sonogashira ou de Suzuki-Miyaura sont aussi possibles pour fonctionnaliser la sydnone.

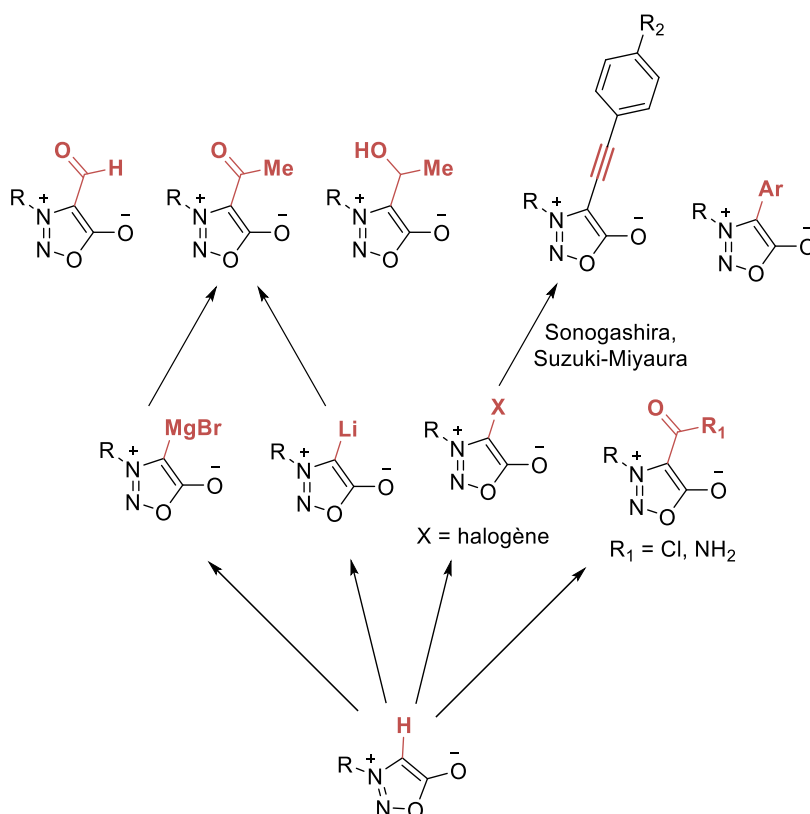


Figure 92. Généralités sur les substitutions en position C4 de la sydnone

Seule l'halogénéation des sydnones sera étudiée en détails puisqu'elle sera nécessaire pour la formation de la sydnone modèle utilisée par la suite.

1.3. Halogénéation des sydnones

Comme décrit précédemment, les sydnones peuvent être engagées dans des réactions de substitution électrophile aromatique sur le carbone C4. Les réactions d'halogénéation ont été largement décrites dans la littérature, en particulier la bromation et la chloration. L'équipe de Dumitraşcu a synthétisé des 4-halo sydnones (chlore, brome, iode) en utilisant de l'acide acétique en présence d'acétate de sodium, comme tampon, et la source appropriée d'halogène, soit le dichlore, le dibrome ou encore le monochlorure d'iode (Figure 93 1).^{210,211}

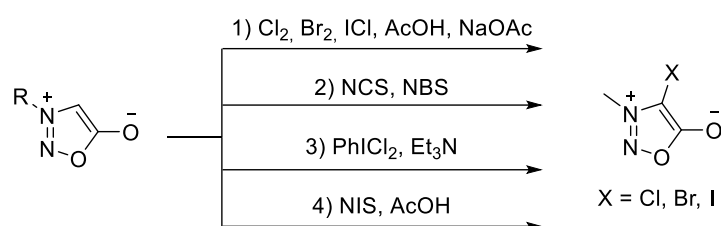


Figure 93. Réactions d'halogénéation des sydnones

L'utilisation du *N*-chlorosuccinimide et du *N*-bromosuccinimide a aussi été décrite pour la chloration et la bromation de la sydnone en position C4 par l'équipe de Turnbull et Ito (Figure 93 2).²¹² Dans cette même publication, le groupe a décrit une réaction de chloration en utilisant le dichloriodobenzène avec la triéthylamine avec de très bons rendements (Figure 93 3). Récemment, Turnbull *et al.* ont démontré une nouvelle possibilité d'iodation des sydnones avec du *N*-iodosuccinimide dans l'acide acétique en quelques heures à température ambiante (Figure 93 4).²¹³ Ce n'est qu'en 2016 que Taran *et al.* ont décrit la synthèse de sydnones fluorées pour la première fois. Ils ont étudié cette réaction avec une approche directe à partir de la 4-*H*-sydnone en utilisant des bases fortes (BuLi, LDA, HMDSLi, EtMgBr, *t*BuOK) et un agent électrophile de fluoration (Selectfluor®, NFSI, fluoropyridin-1-ium tétrafluoroborates), sans résultat.²¹⁴ A partir de travaux sur la fluoration des aryles par les équipes de Ritter et de Sanford,^{215,216} l'équipe de Taran a par la suite décrit la synthèse de sydnones fluorées à partir d'un complexe de palladium sur la sydnone, lui-même obtenu à partir du 4-bromosydnone **L122** ou du 4-iodosydnone **L123**.

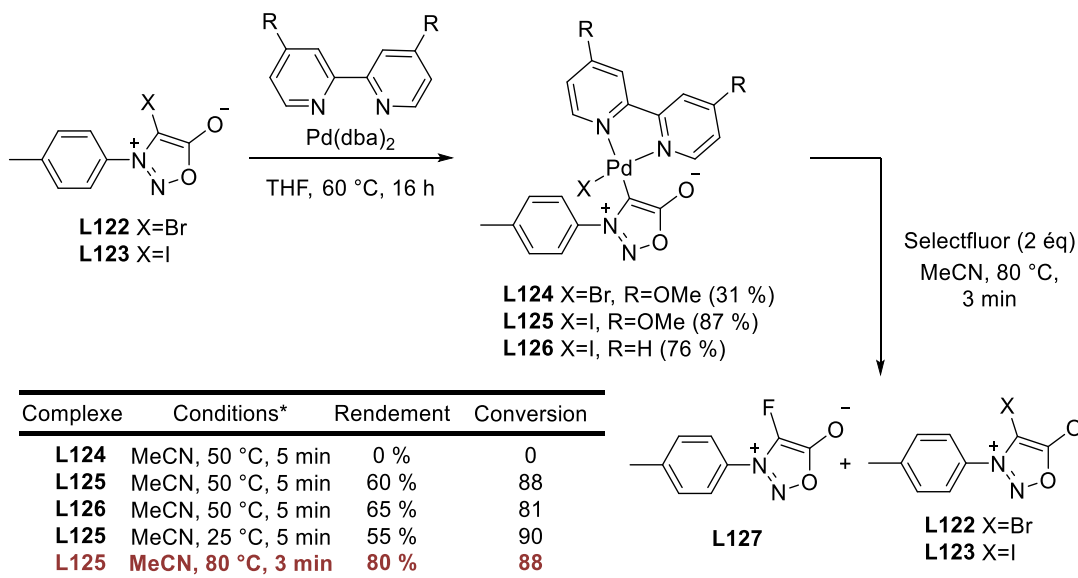


Figure 94. Réactions de fluoration en C4 des sydnones

Après optimisation, ce complexe de palladium a permis d'obtenir la sydnone fluorée **L127** en position 4 par fluoration électrophile en utilisant le Selectfluor®. Le choix du complexe de palladium a lui aussi été étudié et seul un complexe avec un ligand de type 2,2'-bipyridine a permis d'obtenir le composé fluoré. Le meilleur résultat a été obtenu avec le composé **L125**, en chauffant à 80 °C dans l'acétonitrile pendant trois minutes.

1.4. Réactions de cycloadditions avec les sydnones

L'une des principales applications des sydnones est la réaction de cycloaddition avec les alcynes. Les sydnones réagissent par voie thermique avec les alcynes dans une réaction de cycloaddition [3+2] conduisant à un intermédiaire bicyclique, qui évolue, par rétro-Diels-Alder vers la formation d'un pyrazole et de dioxyde de carbone. (Figure 95).

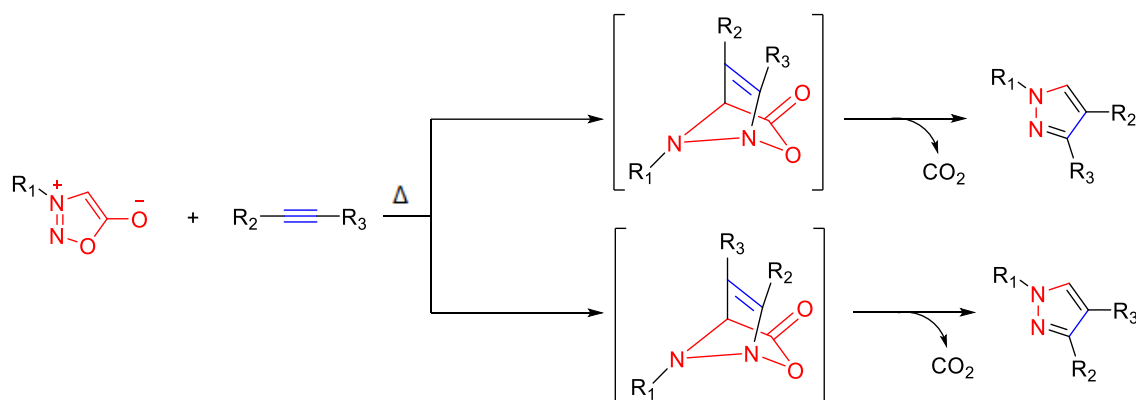


Figure 95. Réaction de cycloaddition [3+2] - rétrocycloaddition de Diels Alder sydnone-alkyne

La réaction de cycloaddition 1,3 dipolaire avec les sydnones a été effectuée en 1962 pour la première fois par l'équipe de Huisgen.²¹⁷ Il a alors été montré que cette réaction de cycloaddition avec les sydnones peut être effectuée avec une grande diversité de structures

dérivées de l'alcyne (acétylène, alcool, acétal, acyle, ester). Cette réaction est très intéressante mais elle demande une température réactionnelle élevée et n'est pas régiosélective, elle est donc très peu utilisée pour former les pyrazoles.

Les pyrazoles sont des composés très intéressants puisqu'ils sont présents dans de nombreuses molécules biologiquement actives, ce qui explique l'engouement des réactions de cycloadditions avec les sydnone. ²¹⁸⁻²²⁰ Les sydnone ont d'ores et déjà été engagées dans des réactions de cycloaddition avec différents alcynes. L'inconvénient majeur de cette réaction réside dans la formation de deux régioisomères à l'issue de la cycloaddition (Figure 95). C'est la raison pour laquelle la régiosélectivité a été étudiée en fonction des groupements substituants l'alcyne. L'équipe de Padwa a été l'une des premières à étudier cette régiosélectivité en utilisant le propiolate de méthyle et en modifiant les substituants en position N3 et C4 de la sydnone (Figure 96). ²²¹

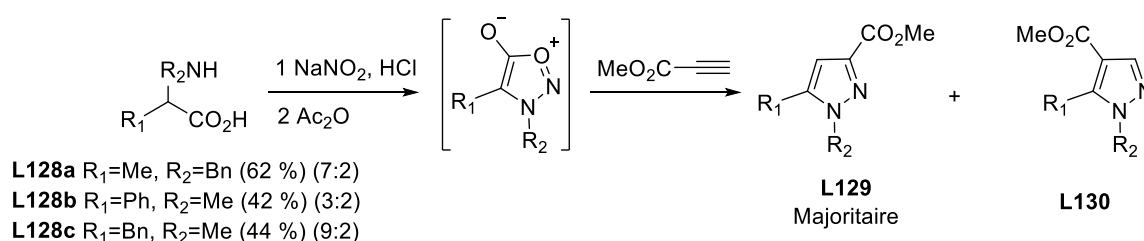


Figure 96. Etude de la régiosélectivité de la cycloaddition alcyne-sydnone

Cependant, les résultats ne sont pas suffisamment satisfaisants en termes de rendements mais surtout de régiosélectivité, bien qu'ils montrent que le composé 3,5-disubstitué **L129** est toujours majoritaire.

Par la suite, le groupe de Wong a démontré qu'en modifiant le groupement ester de l'alcyne terminal, la régiosélectivité augmente avec l'encombrement stérique du groupement ester (Figure 97). ²²² Le composé diphenylméthyle propiolate permet même de réaliser la cycloaddition avec une régiosélectivité totale.

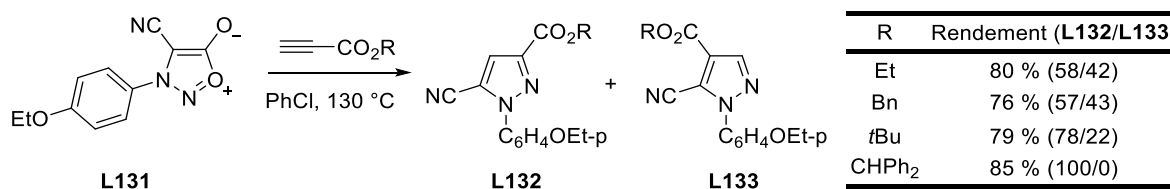


Figure 97. Etude de la régiosélectivité en fonction du groupement ester de l'alcyne vrai

La substitution du propiolate de méthyle par des fonctions acétal, aldéhyde ou encore alcool a été étudiée par le groupe de Fariña qui décrit une régiosélectivité moyenne, et au contraire en faveur de l'autre régioisomère. ²²³

D'autres études, remplaçant l'ester par d'autres substituants tels que les sulfones ²²⁴, les trifluorométhyles ²²⁵, les boronates ^{226,227} et les silyles ²²⁸ ont permis d'augmenter la

régiosélectivité de la réaction de manière quasiment totale. Quelques exemples de synthèses de pyrazoles avec des sydnones aboutissant à une régiosélectivité totale sont présentés dans la figure 98.

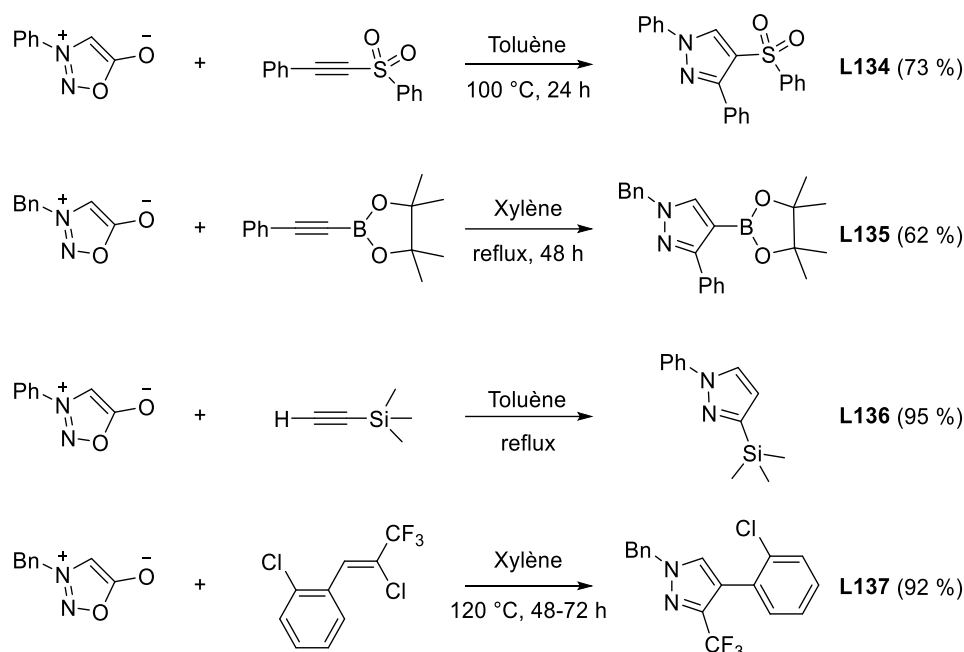


Figure 98. Exemples de synthèses de pyrazoles avec la sydnone et d'autres substituants régiosélectives

La cycloaddition entre les sydnones et les alcynes a connu un regain d'intérêt avec les travaux de Taran *et al.*, en 2013, qui ont mis au point un criblage à haut débit impliquant 11 dipôles, 8 dipolarophiles et 31 métaux de transition dans le but d'identifier de nouvelles réactions chimiosélectives et biocompatibles.²²⁹ Cette étude a abouti à l'identification d'un système catalytique pour la réaction de cycloaddition sydnone-alkyne. Une étude plus précise de cette réaction entre la sydnone **L138** et l'alkyne **L139**, catalysée au cuivre I en présence d'un ligand phénantroline **L142-L143**, a permis d'obtenir une régiosélectivité totale en faveur du pyrazole anti (Figure 99). En effet, seul le produit 1,4-disubstitué **L140** est obtenu majoritairement, contrairement à la version thermique, étudiée jusqu'à présent. De plus, la réaction peut être réalisée, à température beaucoup plus faible que précédemment, voire même à température ambiante. Cette réaction est désormais appelée réaction CuSAC (Copper-catalyzed Sydnone-Alkyne Cycloaddition) par modification du terme CuAAC habituel.

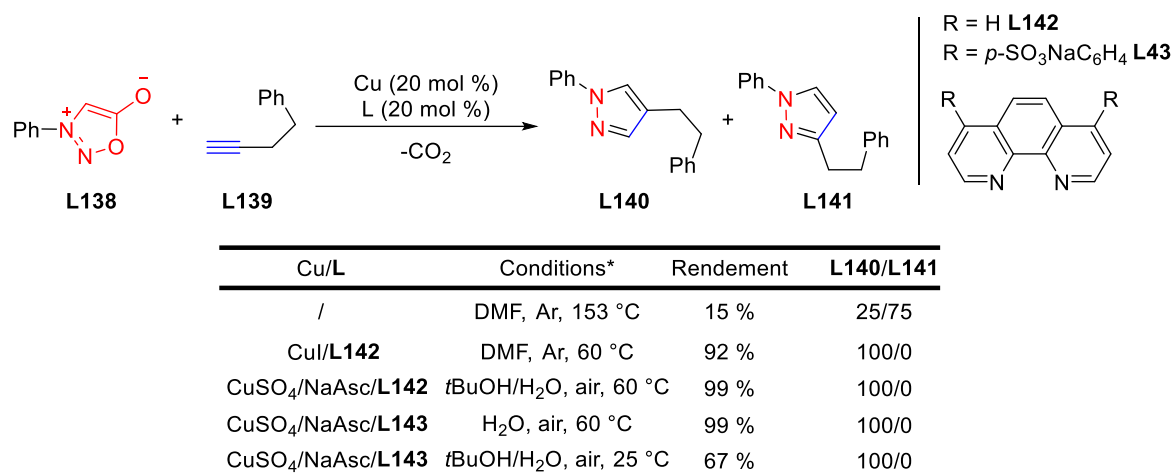


Figure 99. Réaction entre la phényle-sydnone et le benzyle-alcyne catalysée au cuivre

Cette étude a ensuite été étendue à divers substrats et a permis d'obtenir régiosélectivement des pyrazoles 1,4-disubstitués avec des rendements compris entre 61 et 99 %. L'utilisation de cette réaction pour de futures applications en bioconjugaison a été démontrée en utilisant une protéine modèle. L'albumine sérique bovine (BSA) a été fonctionnalisée avec une sydnone, puis cette dernière a été engagée dans une réaction de CuSAC avec un alcyne dansylé. La cycloaddition a eu lieu sur 75 % des sydnones présentes sur la BSA.

Le mécanisme probable de la réaction, sur la base du mécanisme de CuAAC, peut expliquer l'augmentation de réactivité ainsi que la régiosélectivité totale grâce à la bicatalyse au cuivre (Figure 100).²³⁰

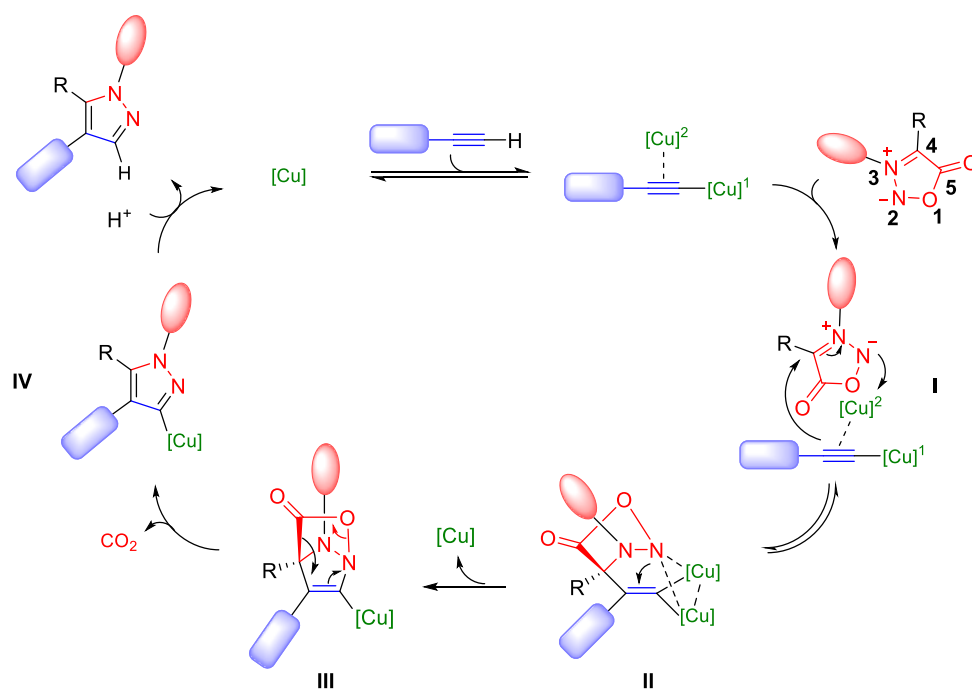


Figure 100. Mécanisme proposé pour la CuSAC²³⁰

Comme pour la réaction de CuAAC classique (Introduction Chapitre 4. 3.2), l'acétylure de cuivre se coordine au N2 de la sydnone permettant l'attaque nucléophile du carbone β sur le C4 de la sydnone pour former l'intermédiaire **II**. Cette étape créant une liaison covalente C-C est sensible aux conditions stériques et électroniques du groupement R. En effet, les groupements encombrants ou les groupements électroattracteurs, qui font décroître la nucléophilie du N2, peuvent entraîner la faible ou non formation de cet intermédiaire. La fermeture du cycle (intermédiaire **III**), puis la rétro-Diels-Alder permettent ensuite d'obtenir le composé intermédiaire **IV**. Enfin, la protonation du composé permet de libérer le pyrazole 1,4 disubstitué attendu et de régénérer le catalyseur au cuivre.

1.5. Cycloaddition sur les alcynes contraints

La modification de l'alcyne vers un alcyne contraint, dans la réaction de CuAAC classique, a permis d'éliminer la catalyse au cuivre. Cependant, la constante de vitesse de ces réactions reste plus faible comparativement aux constantes de vitesse obtenues avec la réaction de CuAAC. C'est pourquoi la réaction de SPAAC classique a été étendue vers une réaction non catalysée au cuivre, la chimie click contrainte avec les sydnones, autrement appelée la SPSAC (Strain Promoted Sydnone-Alkyne Cycloaddition).

Cette dernière a été développée pour la première fois par l'équipe de Chin en 2014, impliquant la réaction de click entre la *N*-phényle sydnone **L138** et le BCN (Figure 101).²³¹

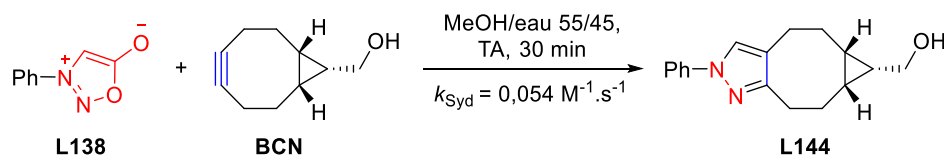


Figure 101. Cycloaddition contrainte entre la phényle sydnone et le BCN

La constante de vitesse de la réaction a été étudiée avec une quantité de BCN de 10 à 80 fois supérieure à la quantité de sydnone, dans un mélange 55/45 de méthanol et d'eau, ce qui ramène la vitesse de réaction à une équation cinétique de pseudo 1^{er} ordre avec une valeur obtenue de $0,054 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. L'équipe de Chin a appliqué cette réaction à la conjugaison de deux protéines, l'une fonctionnalisée avec BCN et la seconde, fluorescente, avec une phényle sydnone.

Par la suite, Taran *et al.* ont étudié l'influence de la substitution de la sydnone sur la réaction de cycloaddition avec le BCN.²³² L'équipe ayant effectué ses travaux presque simultanément avec l'équipe de Chin, une comparaison de vitesse de réaction entre l'azoture et la sydnone a aussi été étudiée. Les réactions ont été effectuées avec seulement un léger excès de **BCN** (1,5 éq.) par rapport à la sydnone dans des conditions compatibles pour une application en bioconjugaison soit dans un mélange PBS 0,1 M/DMSO 9/1 (Figure 102). Les constantes de vitesse indiquent que la phényle sydnone **L138** réagit 4 fois moins rapidement que l'azoture de benzyle **L145** lors de la cycloaddition avec le BCN.

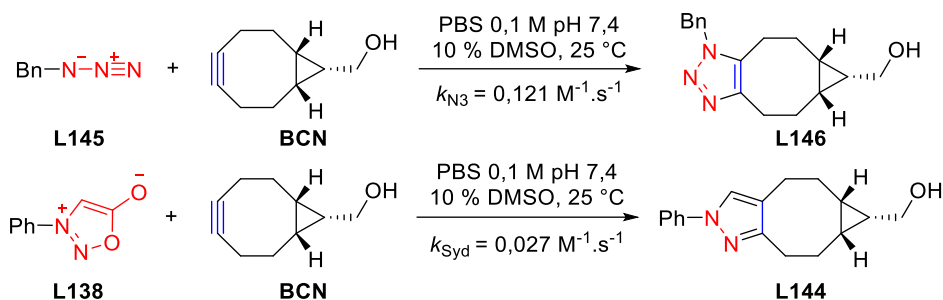
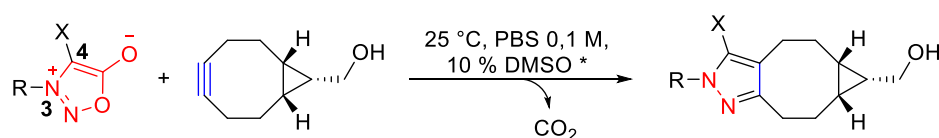


Figure 102. Cycloaddition contrainte entre le benzyle azoture versus la phényle syndnone et le BCN

L'équipe a ensuite étudié l'impact de la substitution de la syndnone à la fois en position N3 et C4 afin d'augmenter la vitesse de réaction (Figure 103). C'est l'un des avantages de la syndnone par rapport à l'azoture, puisque ce dernier ne peut être modifié qu'en une seule position.



Molécule	R	X	k_{Syd} ($\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)
L147	CH ₃	H	No reaction
L148	CH ₂ CO ₂ H	H	No reaction
L149	<i>p</i> OMeC ₆ H ₄	H	0,006 ± 0,001
L150	<i>p</i> MeC ₆ H ₄	H	0,032 ± 0,001
L138	C ₆ H ₅	H	0,027 ± 0,002
L151	<i>p</i> CO ₂ HC ₆ H ₄	H	0,059 ± 0,001
L152	<i>p</i> CF ₃ C ₆ H ₄	H	0,199 ± 0,002
L153	<i>p</i> NO ₂ C ₆ H ₄	H	0,289 ± 0,012
L154	C ₆ H ₅	CH ₃	0,018 ± 0,002
L155	C ₆ H ₅	C ₆ H ₅	0,027 ± 0,001
L156	C ₆ H ₅	CF ₃	0,008 ± 0,001
L157	C ₆ H ₅	CN	0,003 ± 0,001
L158	C ₆ H ₅	Cl	0,872 ± 0,034
L159	C ₆ H ₅	Br	0,592 ± 0,021
L160	C ₆ H ₅	I	0,306 ± 0,008
L161	<i>p</i> CO ₂ HC ₆ H ₄	Br	0,798 ± 0,065
L162	<i>p</i> CO ₂ HC ₆ H ₄	Cl	1,593 ± 0,034

* Réactions effectuées à une concentration de 100 μM de syndnone et 100 μM de BCN

Figure 103. Etude de la di-substitution de la syndnone pour la réaction de SPSAC

De manière similaire à la cycloaddition CuSAC avec des alcynes terminaux, cette étude a démontré que les syndnones fonctionnalisées par un groupement alkyle en position N3 ne réagissent pas avec les alcynes contraints. L'influence de la densité électronique du noyau aromatique sur la vitesse de réaction a été mise en évidence. Les *N*-aryles syndnones possédant un groupement électroattracteur fort tel que **L151**, **L152** et **L153** réagissent 10 fois plus rapidement que la *N*-phényle syndnone **L138**. La plus importante différence de vitesse de réaction est obtenue en présence d'un halogène en position C4 de la syndnone. En

effet, la présence du chlore sur la molécule **L158** permet d'augmenter la vitesse de réaction d'un facteur 30 par rapport à la *N*-phényle sydnone **L138**. Les deux effets ont été cumulés, mais la chloro-sydnone avec le *p*-nitro phényle n'a pas pu être isolée. Seule la sydnone avec le groupement acide carboxylique sur l'aryle et le chlore en position C4 **L162** a été obtenue. Cette nouvelle sydnone a permis d'augmenter la vitesse de réaction, rendant dans ce cas la SPSAC 13 fois plus rapide que la SPAAC classique. Le groupe acide carboxylique a permis sa conjugaison avec une protéine modèle, l'albumine de sérum bovin (BSA), puis cette dernière a été couplée par réaction de SPSAC avec le BCN préalablement fonctionnalisé avec un fluorophore. La cycloaddition a eu lieu sur plus de 85 % des chloro-sydnones présentes sur la BSA après 5 minutes contre seulement 60 % après 30 minutes pour la sydnone non chlorée. Avec les résultats obtenus pour les molécules **L158**, **L159** et **L160**, une corrélation entre l'électronégativité de l'halogène et l'augmentation croissante de la vitesse de réaction peut être établie, bien que ce ne soit pas la seule raison.

Une étude élaborée par l'équipe de Murphy a permis de montrer que la réaction de SPSAC avec un dibenzocyclooctyne (DIBAC) permettait d'augmenter la vitesse de réaction d'un facteur 20 par rapport au BCN.²³³

Le groupe de Taran a étudié la cycloaddition de cette dernière avec divers substrats en série alcyne terminal pour la CuSAC mais aussi en série alcyne contrainte pour la SPSAC.²¹⁴ Trois alcynes contraints (BCN, DIBAC et TMTH) ont été choisis pour l'étude cinétique. La réaction entre la fluoro-sydnone et les différents alcynes a permis d'obtenir des constantes de vitesse comprises entre 42 et 12000 M⁻¹.s⁻¹ (Figure 104). Pour le **BCN**, la cinétique obtenue reste dans les ordres de grandeur d'une CuAAC classique alors que pour les cyclooctynes **DIBAC** et **TMTH**, les constantes de vitesse dépassent celles de la CuAAC classique.

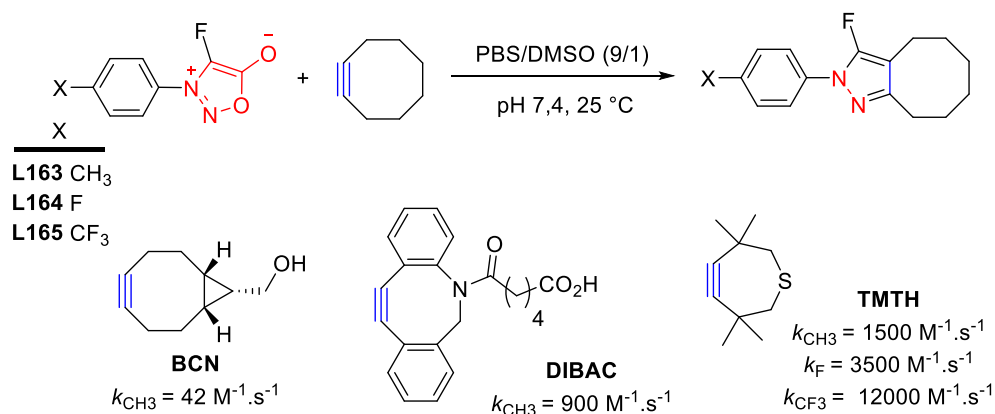


Figure 104. Etude de la vitesse de réaction de SPSAC entre la fluoro-sydnone et différents alcynes contraints

La réaction entre la fluoro-sydnone **L164** et le **TMTH** a lieu avec une constante de vitesse d'environ 10⁴, ce qui correspond à la plus grande constante de vitesse obtenue pour la réaction de click impliquant un alcyne contraint.

Cette fluoro-sydnone a ensuite été utilisée comme groupe prosthétique dans le cadre d'une preuve de concept pour un futur radiomarquage de macro-biomolécules. La molécule a été marquée au fluor-18 dans les mêmes conditions que celles utilisées lors de la fluoration non-radioactive, avec le [^{18}F]Selectfluor[®] en tant qu'agent de fluoration électrophile.

Le [^{18}F]Selectfluor[®] est préparé à partir du fluor moléculaire F_2 (Figure 105). Cependant, l'activité molaire de [^{18}F] F_2 , due à l'introduction de F_2 non radioactif lors de sa préparation, ne permet pas d'obtenir le [^{18}F]Selectfluor[®] avec une bonne activité molaire. Le groupe de Solin a donc développé une méthode de formation du [^{18}F] F_2 permettant d'obtenir de meilleures activités molaires.^{16,234} Pour cela, les ions [^{18}F]fluorures sont préparés dans les conditions classiques, par irradiation d'eau enrichie en oxygène-18 (Équation 2). Après activation classique sous forme de complexe $\text{K}[^{18}\text{F}]\text{F}/\text{K}_{222}$, le [^{18}F]fluorométhane est obtenu par substitution nucléophile des ions [^{18}F]fluorures sur l'iodure de méthyle. Enfin, le [^{18}F] F_2 est obtenu par échange isotopique, en utilisant le [^{18}F] CH_3F comme source de fluor radioactif, et un flux gazeux de F_2 soumis à une décharge électrique dans une chambre réactionnelle. Cette méthode permet d'obtenir le [^{18}F] F_2 avec une activité molaire plus élevée ($> 55 \text{ GBq} \cdot \mu\text{mol}^{-1}$).

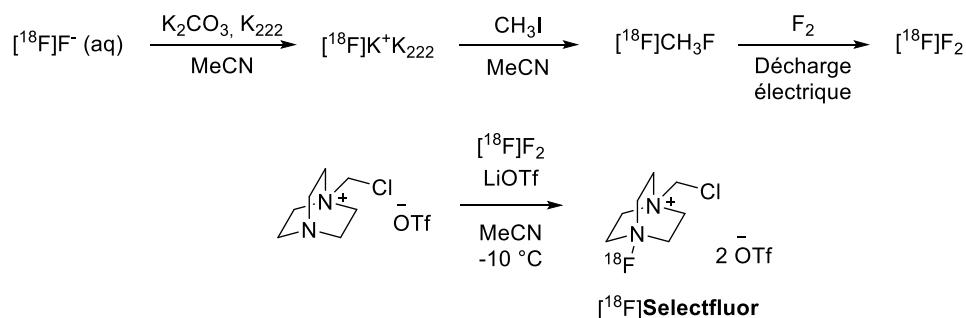


Figure 105. Préparation du [^{18}F] F_2 avec une activité spécifique élevée

La fluoration du composé **L125** a donc été effectuée avec du [^{18}F]Selectfluor[®] dans l'acétone pendant 5 minutes à $50\text{ }^\circ\text{C}$ (Figure 106). Le composé [^{18}F]-**L127** a été obtenu avec un rendement radiochimique de 7,5 %, non corrigé de la décroissance. La réaction de click entre ce dernier et le BCN a permis d'obtenir le pyrazole [^{18}F]-**L166** à température ambiante en 5 minutes avec un rendement radiochimique de 98 % lors de cette dernière étape.

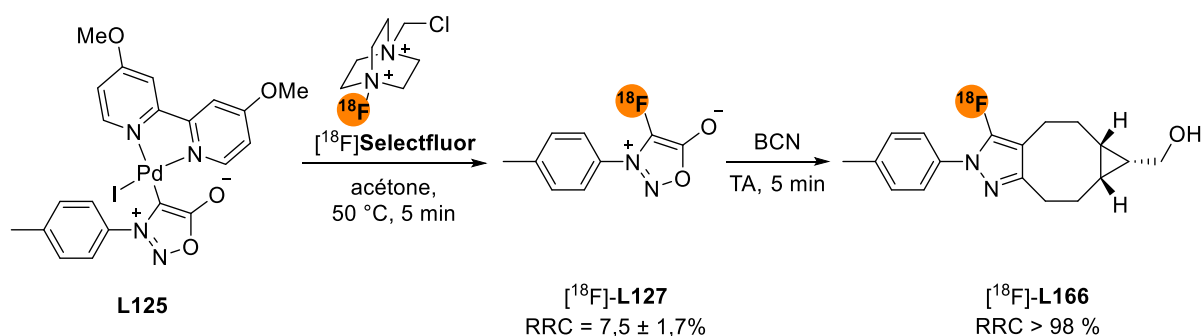


Figure 106. Préparation et utilisation de la fluoro-sydnone en tant que groupe prosthétique

Les conditions de réaction, au cours de ces deux étapes, (température modérée et réaction rapide) permettent d'envisager que la fluoro-sydnone pourrait être un très bon groupe prosthétique pour le marquage de macro-biomolécules. Néanmoins, la formation du [^{18}F]Selectfluor[®] s'effectue à partir de fluor moléculaire [^{18}F]F₂ et l'application générale de cette méthode sera restreinte aux quelques laboratoires qui possèdent l'équipement nécessaire à la formation du fluor moléculaire avec une bonne activité molaire.

2. Synthèse des deux réactifs pour la réaction de SPSAC

2.1. Objectifs

Les réactions de cycloaddition entre les cyclooctynes et les sydnone sont des réactions prometteuses quant à la vitesse de réaction entre les deux entités. Elles pourront être utilisées comme réaction de conjugaison pour le marquage de protéines au fluor-18 avec un groupe prosthétique adapté comme cela a déjà été démontré pour le marquage fluorescent de la BSA²³² mais pourraient également servir dans des stratégies d'imagerie par pré-ciblage. Des composés cyclooctynes, **BCN** et **DBCO**, fonctionnalisés pour l'introduction du fluor-18, permettant cette réaction de click, seront alors synthétisés. La réaction de cycloaddition sur une sydnone modèle sera étudiée. A plus long terme, une étude d'imagerie *in vivo* par pré-ciblage sera initiée en utilisant un anticorps fonctionnalisé avec une sydnone et l'un des cyclooctynes radiomarqués comme effecteur radioactif (Figure 107).

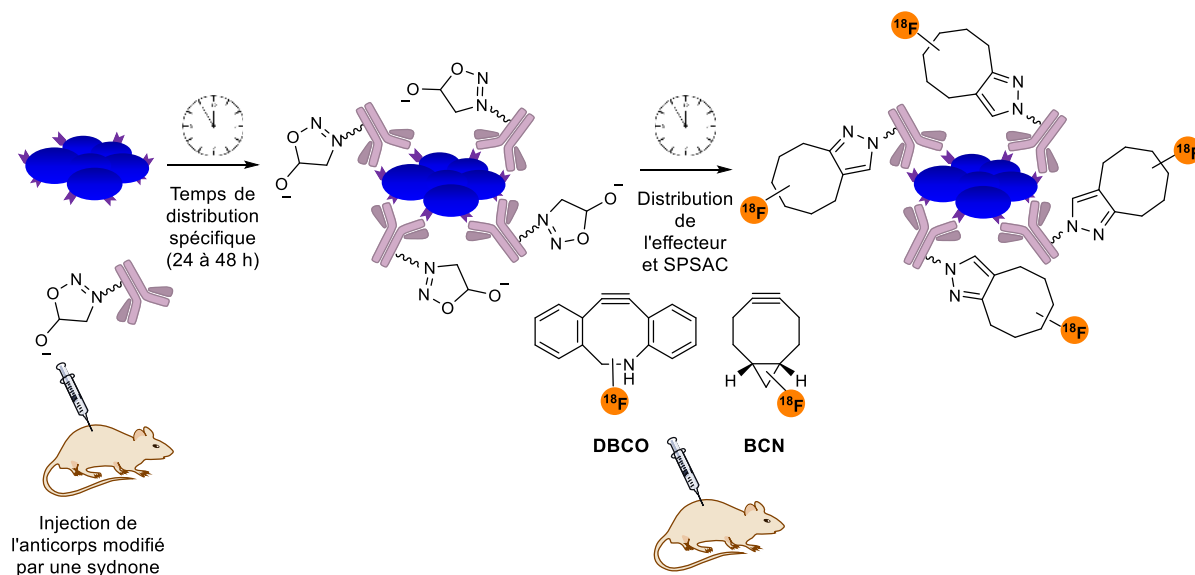


Figure 107. Dérivés de cyclooctynes pour l'application *in vivo* de radiomarquage d'anticorps par stratégie de "pré-ciblage"

2.2. Synthèse du BCN fluoré

a) Analyse rétrosynthétique

Dans la littérature, la fonctionnalisation du **BCN** s'effectue toujours par acylation de l'alcool dans un premier temps, puis par obtention d'un carbamate en réagissant avec une amine dans un second temps (Schéma 31).¹³³

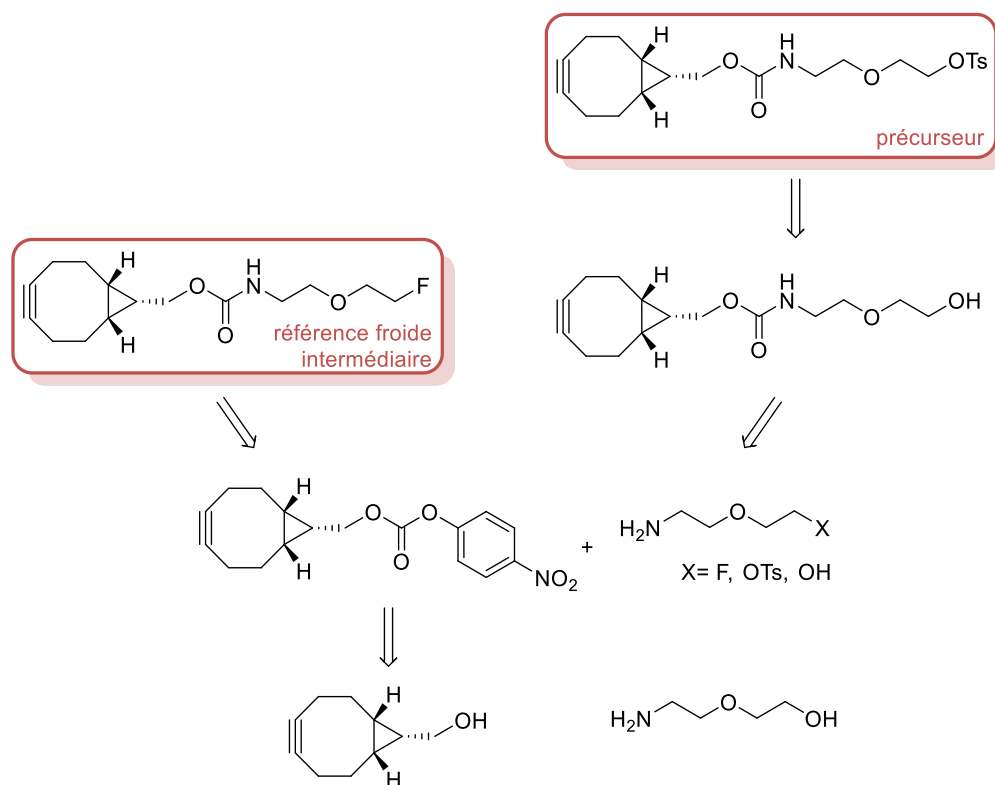


Schéma 31. Analyse rétrosynthétique pour la fonctionnalisation amide-PEG du cyclooctyne

La référence froide et le précurseur seront synthétisés à partir du **BCN** commercial, fonctionnalisé en carbonate activé, à l'aide de chloroformate de 4-nitrophényle, et de la chaîne PEG fluorée ou tosylée respectivement.

b) Synthèse du précurseur et de la référence froide intermédiaire

La fonctionnalisation du cyclooctyne a donc été réalisée grâce à l'utilisation de chloroformate de 4-nitrophényle et de pyridine dans le dichlorométhane à température ambiante pour obtenir **46** avec un rendement de 53 % (Schéma 32).

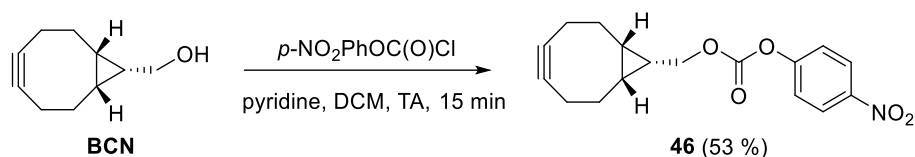


Schéma 32. Activation du cyclooctyne **BCN**

Le cyclooctyne ainsi activé pourra ensuite réagir avec la chaîne PEG-amine adaptée pour former soit le précurseur de radiomarquage, soit la référence froide. Deux options de synthèse pour le couplage seront menées en parallèle :

- préparation des chaînes PEG tosylée et fluorée dans un premier temps puis conjugaison avec **46** pour obtenir le précurseur et la référence froide,
- couplage avec la chaîne amino-PEG alcool commerciale puis tosylation et/ou fluoration de cette dernière pour obtenir la référence froide et le précurseur.

La première voie de synthèse consiste en la préparation des chaînes PEG. Un premier essai de fluoration sur la chaîne amino-PEG alcool commerciale a été effectué en utilisant le Deoxo-fluor[®] dans le dichlorométhane à 0 °C (Schéma 33). Le composé attendu **47** a été formé mais n'a pas pu être isolé des nombreux autres sous-produits générés lors de la réaction.

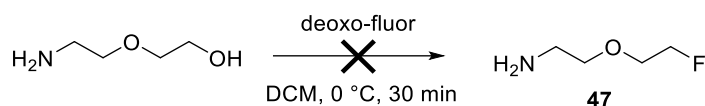


Schéma 33. Fluoration de la chaîne amino-PEG alcool

L'amine libre de la chaîne PEG commerciale a pu favoriser la formation de sous-produits avec le Deoxo-fluor[®] (composé très réactif) et a donc d'abord été protégée par un groupement Boc avant la tosylation avec l'alcool en utilisant le dicarbonate de di-*tert*-butyle dans le dichlorométhane à température ambiante pour former le composé **48** avec un rendement de 99 % (Schéma 34). Cette protection permettra aussi d'éviter les problèmes de ditosylation de la chaîne et la formation de la morpholine tosylée. En effet, un essai de formation du composé **47** par tosylation, puis action du TBAF, a conduit à la ditosylation de la chaîne amino-PEG alcool, puis à la formation de la morpholine tosylée par réaction intramoléculaire en présence du TBAF, basique.

L'alcool du composé **48** a ensuite été tosylé en utilisant le chlorure de tosyloyle, la *N,N*-diisopropyléthylamine et la 4-diméthylaminopyridine dans le dichlorométhane à température ambiante pour donner le composé **49** avec un rendement de 80 % afin d'étudier deux méthodes de fluoration, soit à partir de la chaîne PEG alcool **48** soit à partir du composé tosylé **49**.

Une première méthode de fluoration à partir du composé **49** a été effectuée et a permis d'obtenir le composé fluoré **50** avec 44 % de rendement en utilisant le fluorure de tétrabutylammonium dans le tétrahydrofurane à température ambiante.

Une seconde méthode de fluoration a été réalisée à partir de l'alcool libre **48** en utilisant le Deoxo-fluor[®] dans le dichlorométhane à 0 °C pour obtenir **50** avec un rendement de 32 %.

Les rendements de réaction obtenus avec le Deoxo-fluor[®] et le TBAF sont faibles. En effet, le Deoxo-fluor[®] étant une espèce très réactive et bien que la réaction ait été effectuée à 0 °C, la formation de sous-produits n'a pas été minimisée, le produit a donc été obtenu en

mélange avec le réactif de départ et de nombreux sous-produits. Un reste de réactif de départ et la formation de sous-produits ont aussi été observés avec le TBAF, composé basique, qui a pu entraîner une réaction d'élimination du tosylate lors de la réaction de fluoration. La méthode de fluoration à partir de la chaîne PEG tosylée **49** nécessitant deux étapes permet d'obtenir un rendement global de 39 %, à peine plus élevé que celui obtenu avec la fluoration directe. La méthode de fluoration directe, bien que générant plus de sous-produits sera donc préférée pour la suite de la synthèse. Le composé fluoré **50** a été ensuite déprotégé en utilisant de l'acide trifluoroacétique à température ambiante afin de récupérer le composé **47** avec un rendement de 93 %.

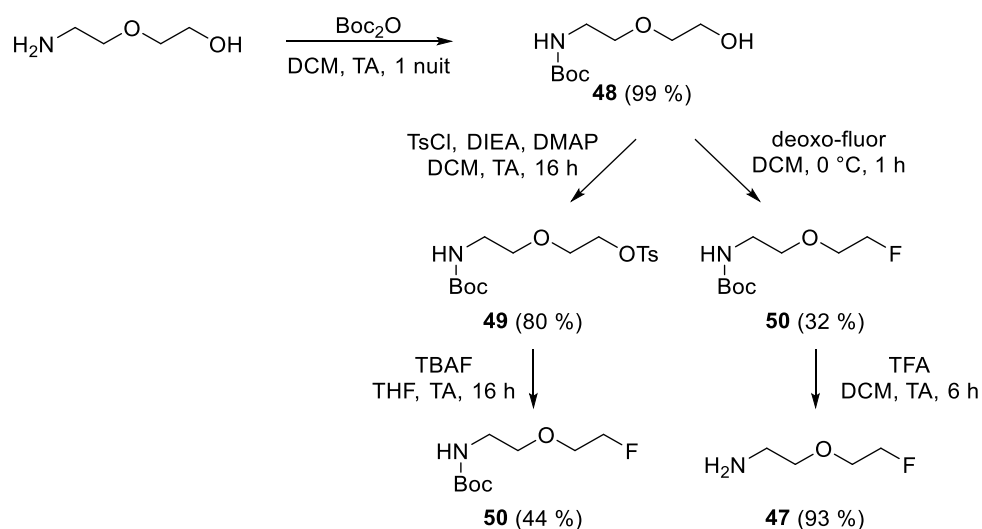


Schéma 34. Synthèse des deux chaînes tosylée et fluorée après protection par le groupement Boc

En parallèle de la préparation de **47**, et compte tenu des problèmes de cyclisation observés, le précurseur tosylé sera préparé par réaction de **46** avec la chaîne amino-PEG alcool puis tosylation. En effet, l'hypothèse est faite que le carbamate, moins réactif que l'amine primaire, n'entraînera pas la cyclisation intramolécule.

Le produit **51** a été obtenu avec un rendement de 82 % en utilisant de la triéthylamine dans le diméthylformamide à température ambiante (Schéma 35).

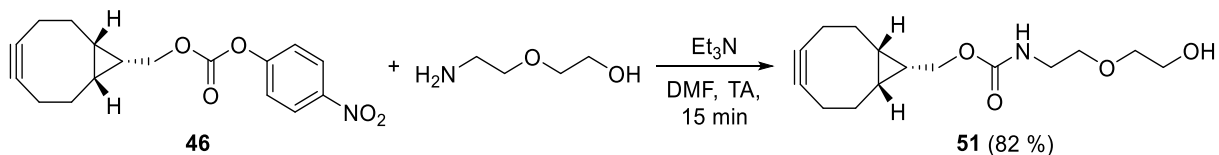


Schéma 35. Substitution nucléophile entre le cyclooctyne activée et la chaîne PEG

La tosylation du composé **51** dans les mêmes conditions que pour former **49** (Schéma 34) a été testée mais n'a abouti qu'à la formation d'un mélange de produits.

La formation d'un mélange de produits lors de la tosylation de **51** d'une part et la formation de la morpholine lors de la tosylation de la chaîne d'autre part ont conduit à un allongement de la longueur de la chaîne PEG afin de pallier les problèmes de formation de cycle à 6 chaînons.

Le choix de la longueur de cette chaîne polyéthylène glycol a donc été revu et un chaînon éthyloxy- supplémentaire a été ajouté afin de limiter les risques de cyclisation. Les deux molécules suivantes **52** et **53** ont ainsi été choisies pour la suite du projet (Schéma 36).

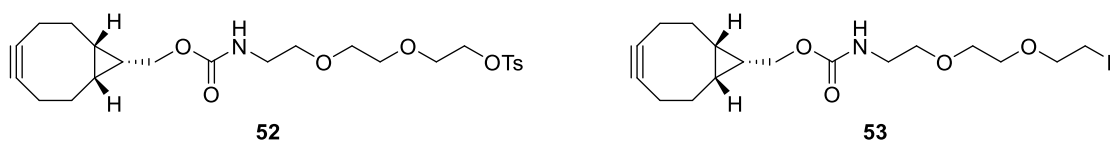


Schéma 36. Nouveaux précurseurs et référence froide pour la SPSAC

La synthèse des chaînes PEG a tout d'abord été réalisée. Pour cela, le composé **11** synthétisé lors du développement de **FPyZIDE** (Résultats et discussion Chapitre 1. 1.4. b) a été réutilisé dans cette synthèse. La chaîne triéthylène glycol amine **54** a donc été synthétisée à l'aide d'une hydrogénation catalytique au palladium sur charbon à partir de la chaîne azoture **11** avec un rendement de 62 % (Schéma 37). La tosylation de l'alcool n'a pas été réalisée sur la chaîne PEG **54** directement, afin de pallier le risque de réaction intermoléculaire et donc d'oligomérisation de la chaîne. La tosylation sera donc effectuée après la conjugaison avec le cyclooctyne.

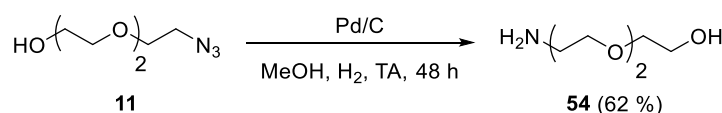


Schéma 37. Formation puis hydrogénation de la chaîne PEG alcool

En parallèle, un essai de formation de la chaîne PEG fluorée a été effectué de manière directe à partir de la chaîne PEG amino-alcool **54** en utilisant le Deoxo-fluor® à 0 °C. Cependant, la formation de plusieurs produits a été observée, et la difficulté de séparation n'a pas permis de conclure sur l'obtention du produit fluoré lors de cette synthèse (Schéma 38 A). Dans les mêmes conditions de fluoration, à partir de la chaîne PEG azoture **11**, le composé fluoré **56** a été obtenu avec un rendement de seulement 37 %, comparable aux résultats obtenus pour la fluoration directe de **48** (Schéma 38 B). L'hydrogénation au palladium sur charbon du composé **56** a ensuite permis d'obtenir la chaîne PEG amino-fluorée **55** avec un rendement de 20 % (Schéma 38 C).

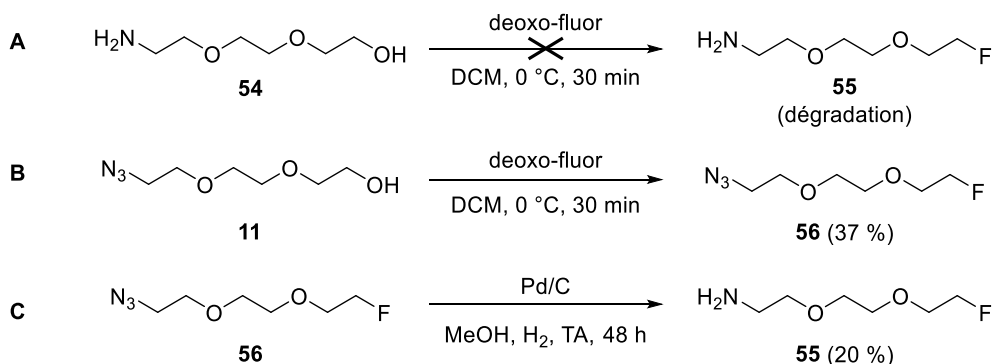


Schéma 38. Fluoration et hydrogénation des chaînes azoture triéthylèneglycol

Les deux chaînes **54** et **55** ayant été obtenues, la réaction d'amidation avec le cyclooctyne activé **46** pour former la liaison carbamate a donc été étudiée (Schéma 39). Pour former le précurseur, le cyclooctyne **46** activé, a été mis en solution avec **54** et de la triéthylamine dans le diméthylformamide à température ambiante.

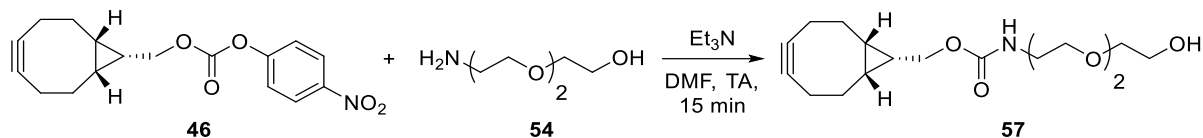


Schéma 39. Formation de la liaison amide entre la chaîne PEG alcool et la cyclooctyne

Un seul produit a bien été formé puis isolé. Cependant, l'analyse RMN du produit purifié montrait une sur-intégration au niveau des protons de la chaîne PEG par rapport au cyclooctyne. L'hypothèse de la formation d'un sous-produit entre le carbonate du composé **46** et l'alcool libre de la chaîne PEG **54** a été envisagée. Ce dernier a donc été protégé avant la conjugaison avec le cyclooctyne. L'alcool de la chaîne PEG azoture **11** a été protégé par un groupement silylé à l'aide de *tert*-butyl diméthylchlorosilane, et d'imidazole. Le produit **58** a été obtenu avec un rendement de 70 % (Schéma 40).²³⁵ L'hydrogénolyse du groupement azoture a ensuite permis d'obtenir le composé **59** dans les mêmes conditions que précédemment avec un rendement de 33 %. La réaction avec le BCN activé **46** a ensuite été effectuée afin d'obtenir le composé **60** avec un rendement de 73 %. L'alcool a ensuite été déprotégé pour obtenir **57** en utilisant deux méthodes de déprotection des groupements silylés différentes : avec du HF.pyridine ou du fluorure de tétrabutylammonium (Schéma 40).

Dans les deux conditions de déprotection, un produit a été obtenu présentant à nouveau une sur-intégration des protons pour la chaîne PEG comparativement à ceux du cyclooctyne en RMN. Néanmoins, **57** issu de la déprotection avec du fluorure de tétrabutylammonium a ensuite été tosylé sans purification afin de tester les conditions réactionnelles malgré la présence de fluorure de tétrabutylammonium résiduel. Cette réaction n'a abouti qu'à une dégradation du produit de départ.

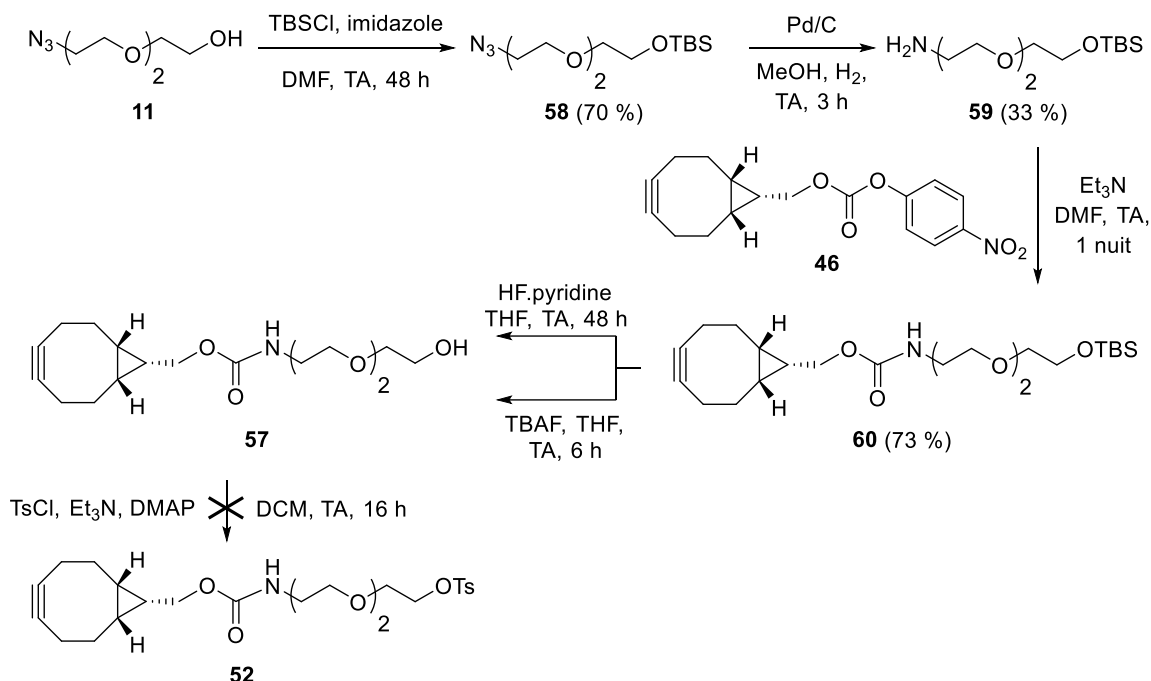


Schéma 40. Protection de l'alcool puis réaction de substitution nucléophile avec le cyclooctyne

Lors de l'étape de la formation de **60**, malgré la protection de l'alcool, le spectre RMN présentait aussi des intégrations trop élevées de chaîne PEG par rapport au cyclooctyne alors que seul un composé semblait avoir été formé après analyse par CCM dans plusieurs mélanges d'éluants. Afin d'identifier si le problème provenait de la chaîne PEG **54**, la réaction d'amidation a aussi été effectuée avec la chaîne PEG fluorée **55** (Schéma 41). Le composé **53** souhaité n'a pas été obtenu. La RMN du proton du produit purifié présentait elle aussi une sur-intégration de la chaîne PEG par rapport au cyclooctyne.

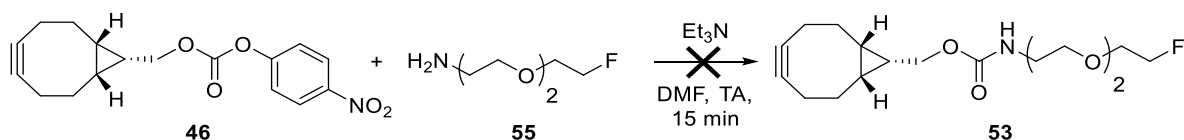


Schéma 41. Formation de la liaison carbamate entre la chaîne PEG fluorée et la cyclooctyne

Une analyse LC-MS sur **53** a finalement pu mettre en évidence la formation d'un produit avec une masse de $[M+H]^+ = 462 \text{ g.mol}^{-1}$ ($[M+Na]^+ = 484 \text{ g.mol}^{-1}$) correspondant au carbamate **61** d'une amine secondaire portant deux fois la chaîne PEG fluorée (Schéma 42). Ces analyses LC-MS n'avaient malheureusement pas pu être effectuées en routine précédemment.

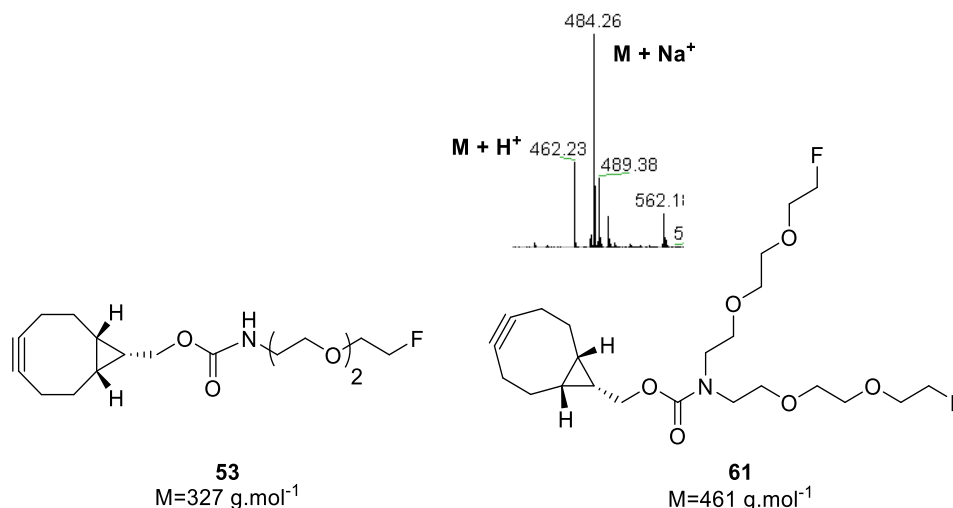


Schéma 42. Formation de la liaison amide avec la double chaîne PEG déterminée par analyse LC-MS

Ces analyses par LC-MS ont permis de montrer la formation d'amine secondaire durant la réaction de réduction de l'azoture. Cette réaction secondaire a été mise en évidence à quelques reprises dans la littérature.²³⁶⁻²³⁸ Un mécanisme réactionnel a été décrit afin d'expliquer la formation de cette amine secondaire.²³⁶ Le complexe de palladium peut faciliter l'abstraction du proton en α - par l'azote terminal de l'azoture provoquant une expulsion de diazote. L'imine résultante, grâce à l'atmosphère d'hydrogène, est ensuite hydrogénée pour former l'amine primaire. La réaction s'arrête à l'amine primaire ou l'imine s'additionne sur l'amine primaire dès la formation de cette dernière pour obtenir l'aminal. La deuxième réaction étant plus rapide, l'aminal est donc formé. Après élimination, l'imine *N*-substituée, ainsi formée, est hydrogénée conduisant ainsi à l'amine secondaire.

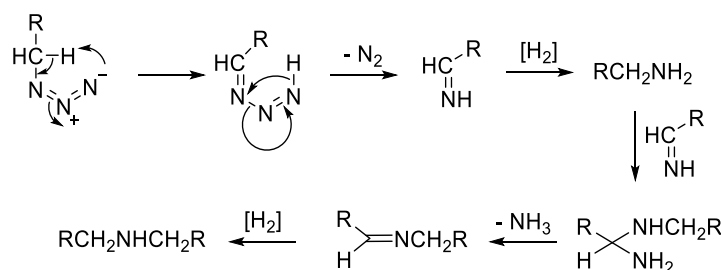


Figure 108. Mécanisme de formation de l'amine secondaire lors de l'étape de réduction

Finalement, les composés **55**, **54** et **56** supposément synthétisés n'ont pas été obtenus mais correspondent aux composés **62**, **63** et **64** respectivement (Schéma 43). Ceci explique la sur-intégration des signaux de la chaîne PEG en RMN du proton par rapport au produit, qui n'était finalement pas due à la présence d'un sous-produit. L'ensemble des produits obtenus (**62**, **63** et **64**) étant symétriques, la simple analyse RMN du proton de routine n'a pas permis de déceler l'erreur de structure.

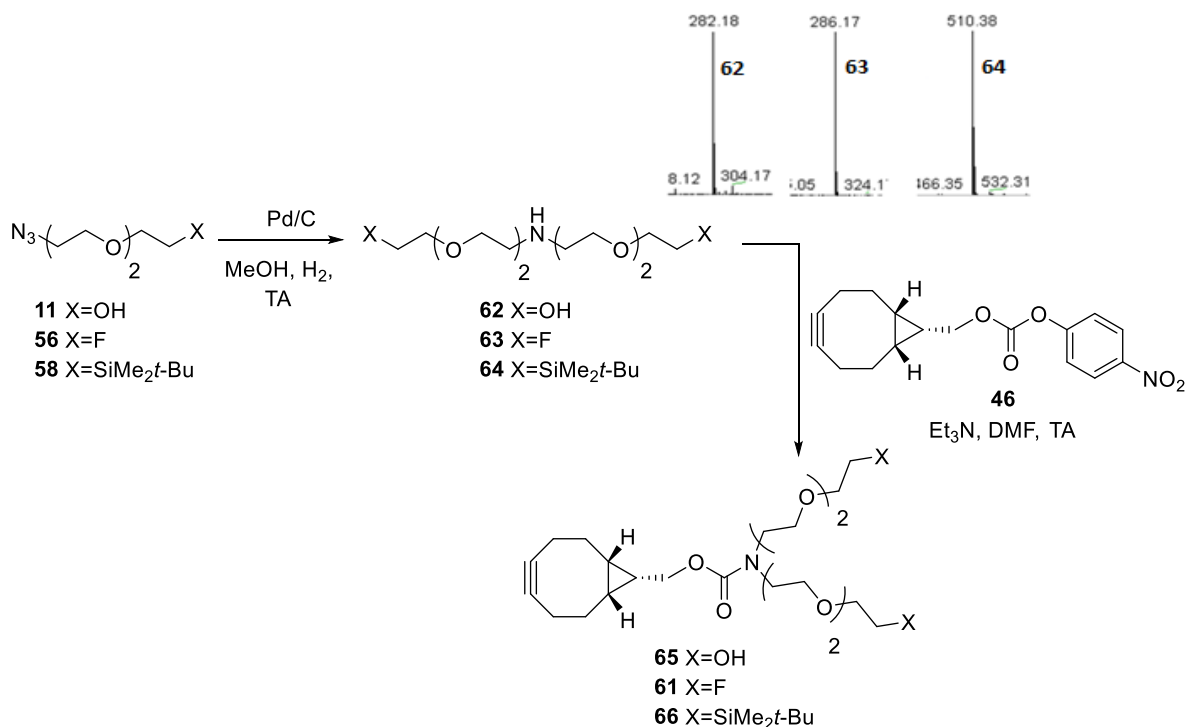


Schéma 43. Synthèse des molécules finalement obtenues après hydrogénation de l'azoture

Une autre méthode classique de réduction de l'azoture en amine précédemment décrite, la réduction de Staudinger, a donc été utilisée (Figure 35 A).

Les voies de synthèse modifiées du précurseur et de la référence froide ont été conduites en parallèle (Schéma 44). La synthèse des amines **54** et **55** a été réalisée par réaction de Staudinger en utilisant la triphénylphosphine dans le tétrahydrofur à température ambiante avec un rendement de 89 et 99 % respectivement. Ces chaînes PEG ont ensuite été introduites par substitution nucléophile sur le cyclooctyne activé **46** dans les mêmes conditions qu'auparavant, pour former l'alcool **57** et la référence froide **53** avec un rendement de 83 et 64 % respectivement. Le cyclooctyne **57** a ensuite été tosylé pour obtenir le précurseur **52** avec un rendement de 40 %.

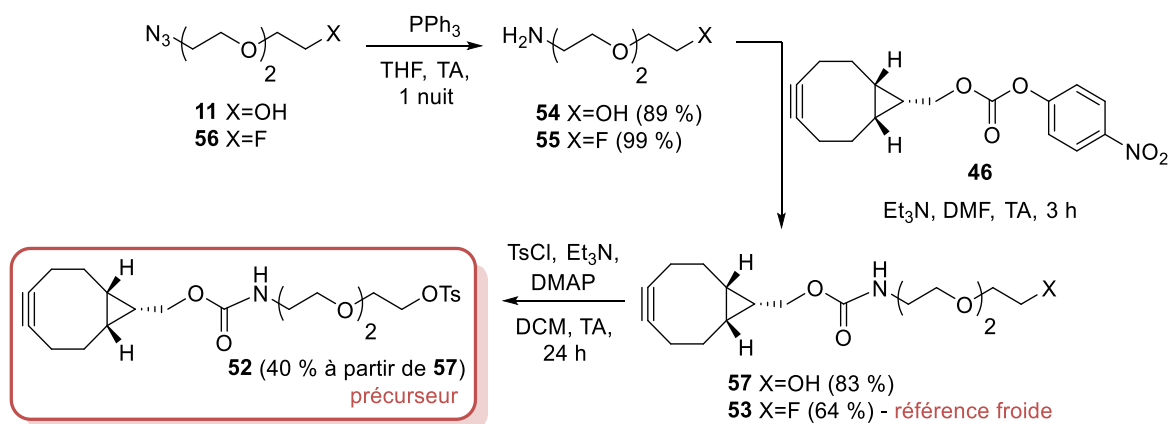


Schéma 44. Synthèse révisée du précurseur et de la référence froide dérivés du BCN

2.3. Synthèse du DBCO fluoré

Dans un second temps, le précurseur et la référence froide, dérivés du **DBCO-amine**, ont été synthétisés.

a) Analyse rétrosynthétique

Comme pour le **BCN**, une chaîne polyéthylène glycol va être introduite par formation d'un amide sur le **DBCO-amine**. La référence froide et le précurseur seront synthétisés en parallèle (Schéma 45).

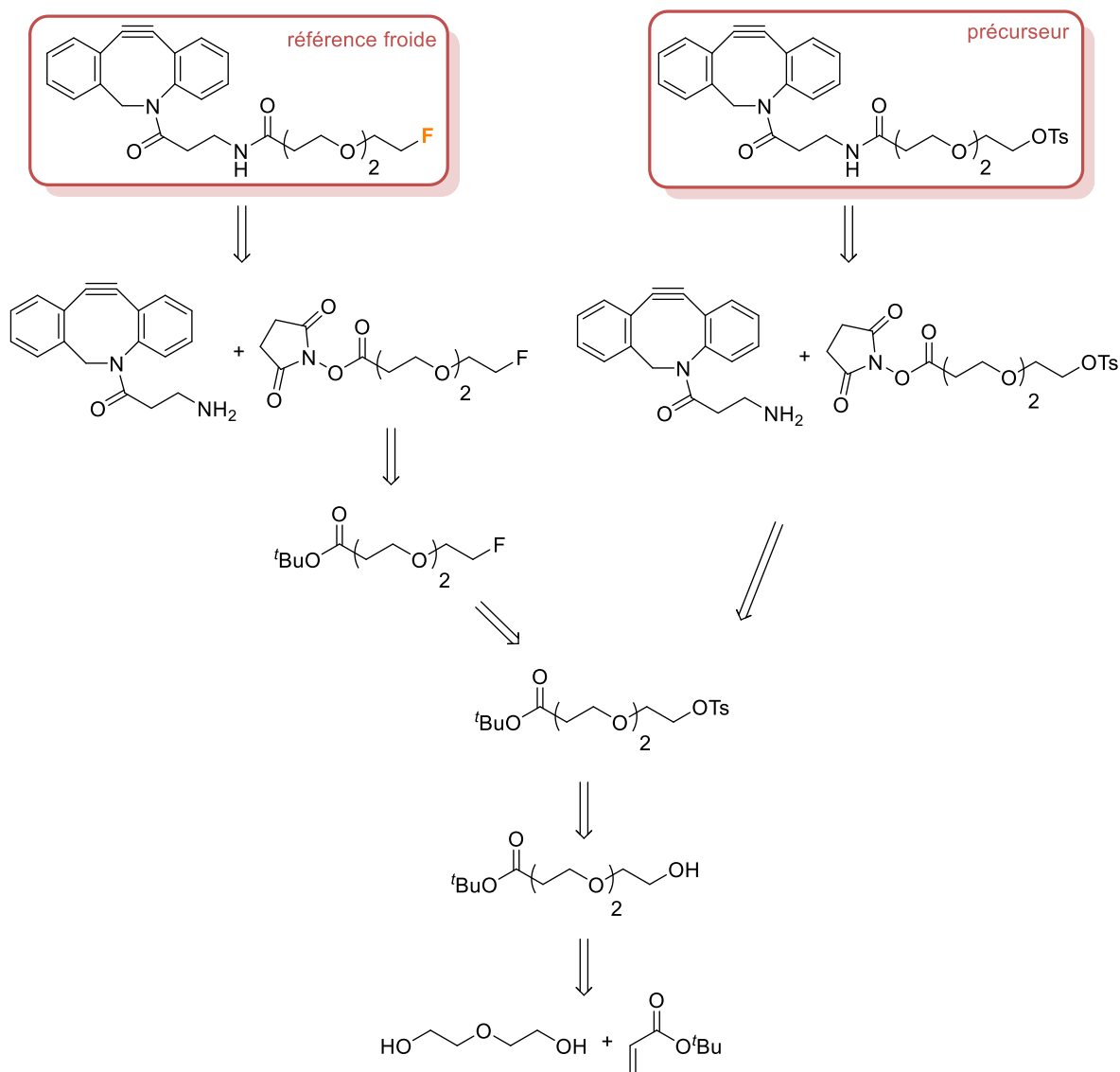


Schéma 45. Analyse rétrosynthétique pour le groupe prosthétique de référence et le précurseur du DBCO

La référence et le précurseur seront synthétisés par réaction de couplage entre le **DBCO-amine** commercial et les chaînes PEG fonctionnalisées activées par le *N*-hydroxysuccinimide. Ces chaînes seront synthétisées à partir des chaînes tosylée et fluorée respectivement. La chaîne PEG avec l'alcool correspondant sera quant à elle synthétisée par addition de Michael entre le diéthylène glycol et le *tert*-butyl acrylate commerciaux.

b) Synthèse du précurseur et du groupe prosthétique de référence

La chaîne PEG **67** a été préparée par addition de Michael entre le diéthylène glycol et le *tert*-butyl acrylate commerciaux dans le tétrahydrofurane avec de l'hydrure de sodium, à température ambiante pour former le composé **67** avec un rendement de 56 % (Schéma 46). Le rendement modéré obtenu peut être expliqué par la formation du composé disubstitué correspondant malgré l'utilisation d'un excès de triéthylène glycol (3,5 éq. pour 1 d'acrylate).

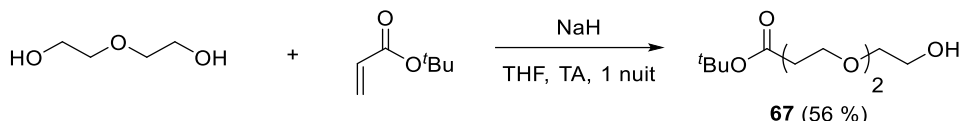


Schéma 46. Addition de Michael pour former la chaîne PEG **67**

Le composé **67** a ensuite été tosylé en utilisant le chlorure de tosylate, la triéthylamine et la DMAP dans le dichlorométhane à température ambiante pour obtenir le composé **68** avec un rendement de 87 % (Schéma 47). Ce dernier a ensuite été fluoré en utilisant le fluorure de tétrabutylammonium dans le tétrahydrofurane à 50 °C afin de récupérer le composé **69** avec un rendement de 39 %.

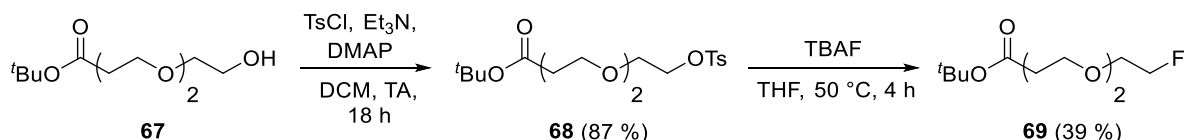


Schéma 47. Tosylation et fluoration de la chaîne PEG

Les deux chaînes (**68** et **69**) ont ensuite été déprotégées en utilisant de l'acide trifluoroacétique dans le dichlorométhane à température ambiante pour obtenir les composés **70** et **71** sans purification (Schéma 48). Avant la réaction avec l'amine du **DBCO-amine**, l'acide carboxylique du composé **71** a été activé en utilisant le *N*-hydroxysuccinimide, le *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide dans le dichlorométhane à température ambiante pour former **72** avec un rendement sur deux étapes de 43 %. La chaîne fluorée **73** a été obtenue dans les mêmes conditions que pour **72** mais en utilisant du 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide à la place du *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide à température ambiante avec un rendement de 32 %.

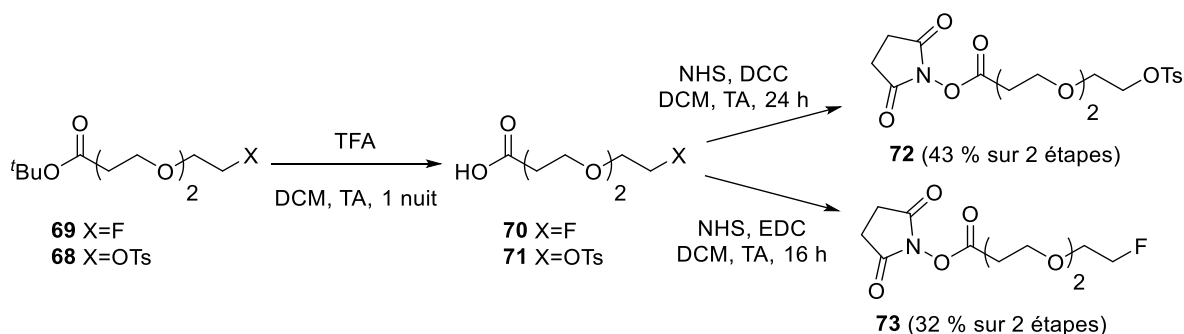


Schéma 48. Formation du succinimide pour la réaction avec l'amine du **DBCO-amine**

Le composé **L120a** a été synthétisé à partir de la *N*-phénylglycine **L119a**, de nitrite de sodium, de HCl concentré à 10 % dans de l'eau à température ambiante pendant 40 minutes. Après filtration, et lavage au méthanol, le composé **L120a** a été mis en solution dans de l'anhydride acétique et agité à 100 °C pour obtenir la *N*-phénylsydnone **L138** avec un rendement de 49 %. Ce dernier a ensuite été chloré en utilisant du *N*-chlorosuccinimide dans l'acide acétique à température ambiante pour donner le composé **L158** utilisé pour la SPSAC avec un rendement de 65 %.

2.5. Synthèse des références froides

Les réactifs de cycloaddition étant obtenus, les réactions de SPSAC entre les deux cyclooctynes, **53** et **75**, et la sydnone modèle **L158** ont ensuite été réalisées dans le dichlorométhane à température ambiante pour donner les composés **76** et **77** avec des rendements respectifs de 82 et 69 % (Schéma 52). Dans le cas de la synthèse du composé **77**, deux régioisomères ont été obtenus avec un rapport 2 :1 mais les analyses RMN n'ont pas permis d'attribuer lequel était majoritaire par rapport à l'autre (pour des raisons de simplification, un seul régioisomère est représenté).

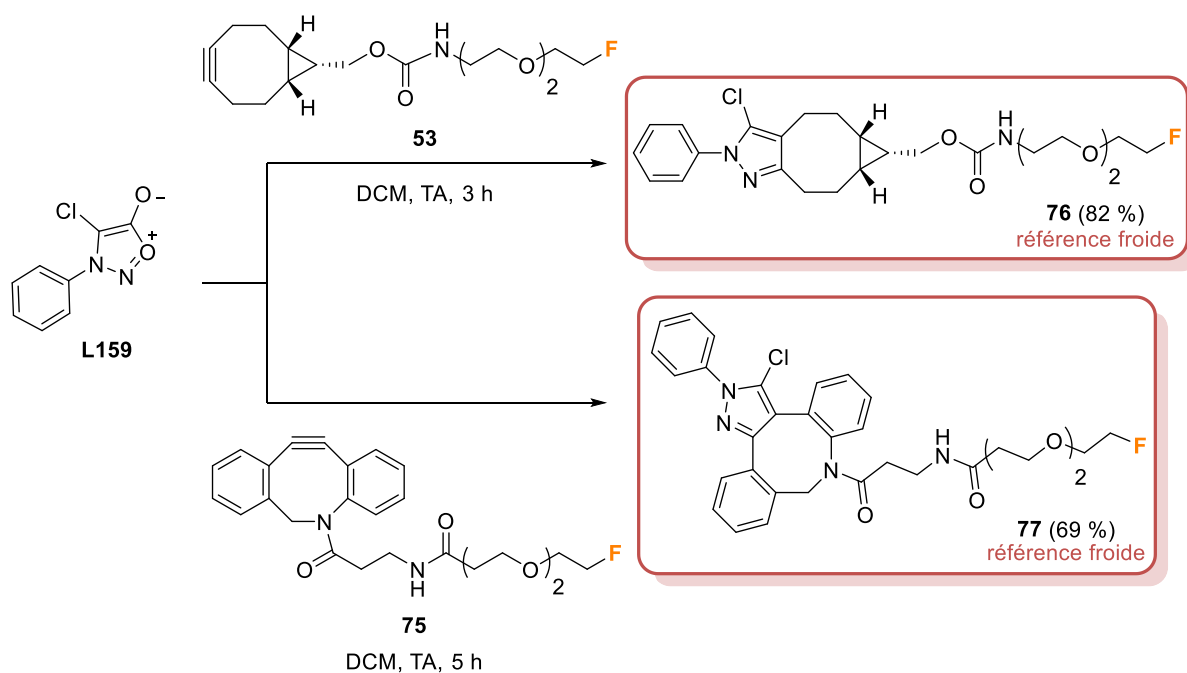


Schéma 52. Réaction de SPSAC entre la sydnone et les deux cyclooctynes

Les références froides finales **76** et **77** ainsi que les précurseurs de radiomarquage tosylés respectifs **52** et **74** étant obtenus, le marquage au fluor-18 a pu être effectué.

2.6. Radiochimie

a) Radiomarquage de [¹⁸F]-53 et [¹⁸F]-76

Les composés [¹⁸F]-53 et [¹⁸F]-75 ont été préparés dans des conditions standards de radiofluoration en utilisant 4 à 5 mg des précurseurs respectifs, **52** ou **74**, et le complexe de fluor-18 activé K[¹⁸F]F/K₂₂₂ dans l'acétonitrile à 90 °C pendant 15 minutes (Schéma 52). Comme pour les composés [¹⁸F]FPyZIDE ou [¹⁸F]FPyKYNE, le brut réactionnel est pré-purifié sur une cartouche d'alumine neutre (SepPak® Alumina N™) avant la purification finale en HPLC phase inverse sur colonne semi-préparative Zorbax® SB-C18 en utilisant une phase mobile composée d'eau et d'acétonitrile. Les composés [¹⁸F]-53 et [¹⁸F]-75, après purification, ont été reformulés dans un mélange eau/éthanol en vue de leur utilisation dans la réaction de SPSAC avec la sydnone modèle **L158**.

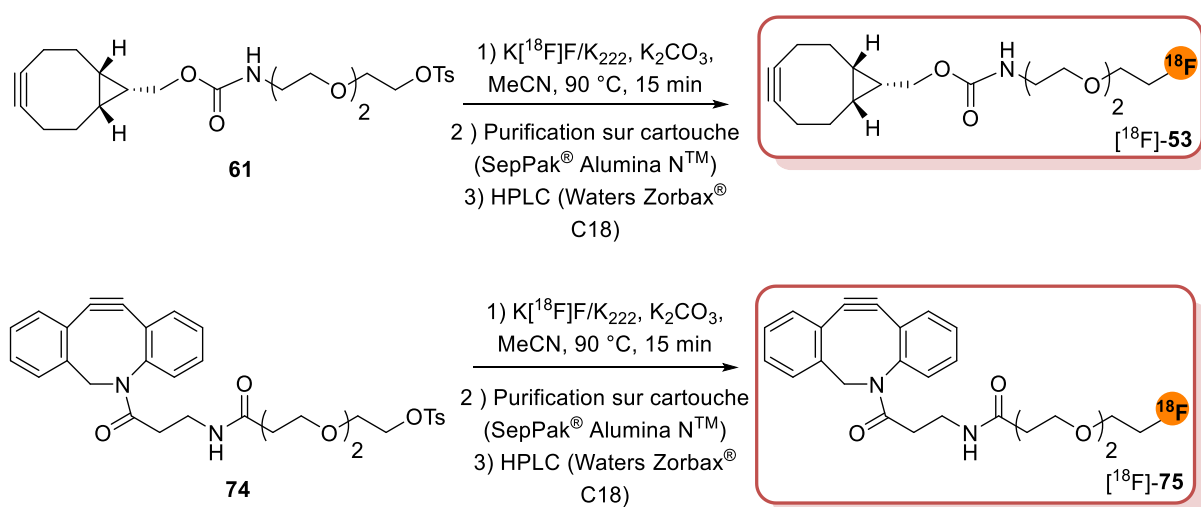


Schéma 53. Radiomarquage des composés [¹⁸F]-53 et [¹⁸F]-75

Composé	Rendement*	Pureté	AM
[¹⁸ F]-53	18 %	> 95 %	Non déterminée
[¹⁸ F]-75	33 %	> 95 %	

*Les rendements sont corrigés de la décroissance.

Tableau 26. Rendements et pureté radiochimique des composés [¹⁸F]-53 et [¹⁸F]-75

b) Etude cinétique de la cycloaddition entre [¹⁸F]-53 ou [¹⁸F]-75 et la sydnone L158

La cinétique de la réaction de cycloaddition entre [¹⁸F]-53 ou [¹⁸F]-75 et la sydnone **L158** a été suivie sur 30 minutes et à deux températures, température ambiante et 40 °C (Schéma 52). Chaque réaction comprenant 1,6 à 2 μmol de sydnone **L158** et environ 10 nmol de [¹⁸F]-53 ou [¹⁸F]-75 (quantité moyenne estimée sur la base des activités molaires habituelles des radiotraceurs) dans un mélange eau/éthanol/acétonitrile a été réalisée en duplicat. La conversion observée a été déterminée à partir des chromatogrammes analytiques en

comparant la surface des pics radioactifs correspondants à $[^{18}\text{F}]\text{-53}$ et $[^{18}\text{F}]\text{-76}$ (BCN/sydnone) d'une part et $[^{18}\text{F}]\text{-75}$ et $[^{18}\text{F}]\text{-77}$ (DBCO/sydnone) d'autre part.

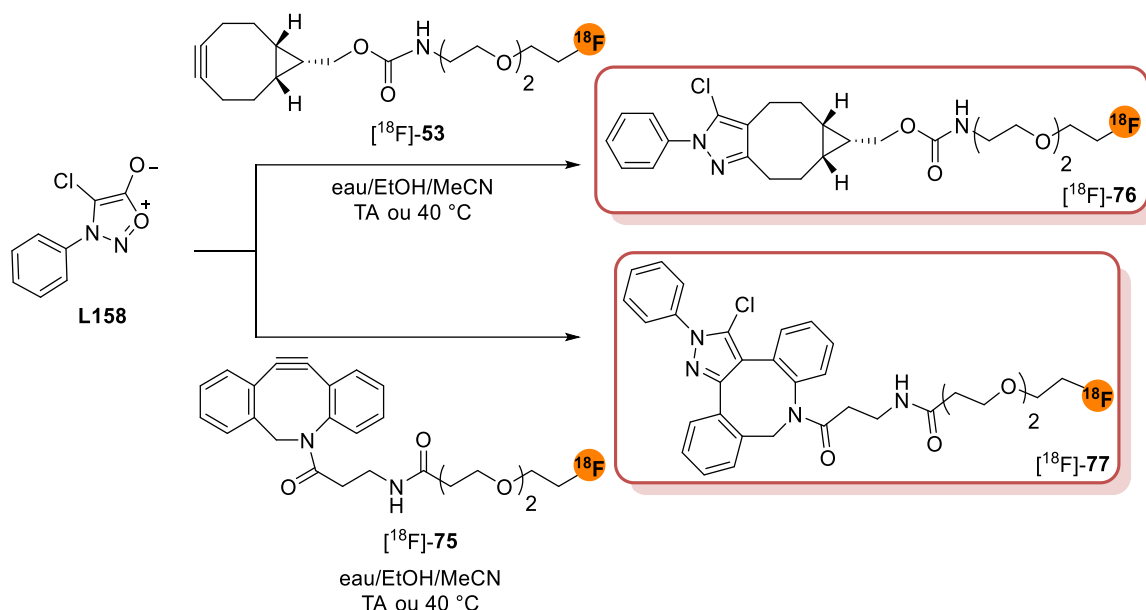


Schéma 54. Réactions de formation des composés $[^{18}\text{F}]\text{-76}$ et $[^{18}\text{F}]\text{-77}$

A température ambiante, les cinétiques de formation de $[^{18}\text{F}]\text{-76}$ et $[^{18}\text{F}]\text{-77}$ sont très semblables passant d'environ 55 % après 5 minutes de réaction à une conversion totale après 30 minutes. A 40 °C, la formation de $[^{18}\text{F}]\text{-77}$ est très légèrement plus rapide après 5 minutes que celle de $[^{18}\text{F}]\text{-76}$. Après 15 minutes, la conversion est pratiquement totale dans les deux cas (97 %) et devient totale après 30 minutes de réaction (Figure 20). Comme cela a été observé pour toutes les autres réactions de cycloaddition présentées dans cette thèse, l'augmentation de température permet d'accélérer la réaction.

Suivi cinétique de formation de $[^{18}\text{F}]\text{-76}$ et de $[^{18}\text{F}]\text{-77}$

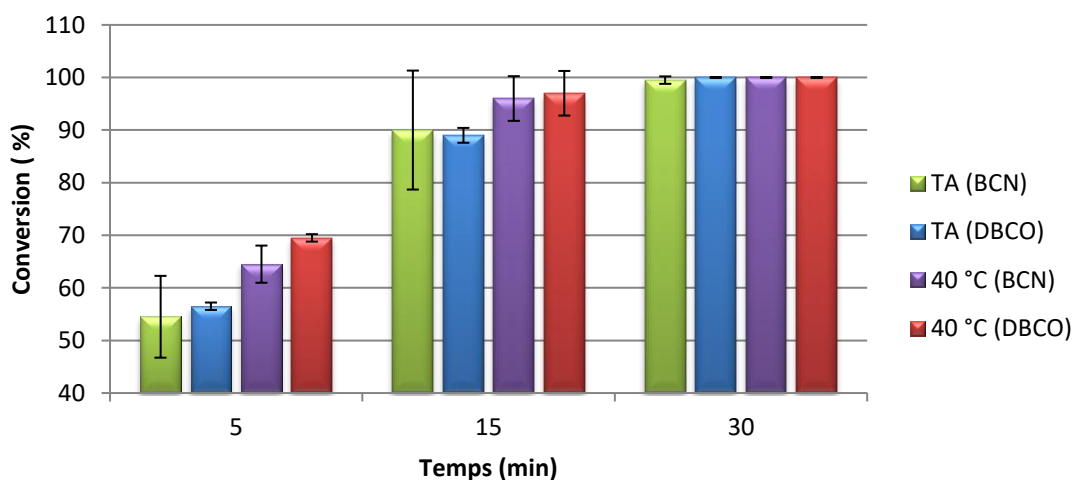


Figure 20. Suivi cinétique de la formation de $[^{18}\text{F}]\text{-76}$ et de $[^{18}\text{F}]\text{-77}$ en fonction de la température

3. Conclusions

Cette étude cinétique de la réaction de SPSAC montre que la formation du produit de cycloaddition est rapide (compatible avec la demi-vie du fluor-18) et dans des conditions réactionnelles adaptées aux macro-biomolécules (température modérée et milieu aqueux).

Sur l'ensemble des réactions de cycloaddition étudiées dans cette thèse (CuAAC, SPAAC et SPSAC) pour des applications de radiomarquage de macro-biomolécules avec du fluor-18, les observations principales sont :

- La formation la plus rapide d'un produit de cycloaddition est observée en CuAAC avec un très large excès de CuSO₄/ascorbate de sodium à 40 °C. En effet, dans ces conditions, la conversion du groupe prosthétique ([¹⁸F]FPyZIDE) est totale dès 5 minutes mais des produits de dégradation apparaissent rapidement. La CuAAC nécessitant une catalyse au cuivre, cette approche peut être utilisée seulement pour le marquage *in vitro* de macro-biomolécules mais ne peut pas être utilisée dans une optique de radiomarquage direct *in vivo* par pré-ciblage.
- A température ambiante, les cinétiques observées des réactions de SPAAC (DBCO/azoture) et de SPSAC (DBCO/sydnone ou BCN/sydnone) sont équivalentes et indiquent une conversion du groupe prosthétique ([¹⁸F]FPyZIDE, [¹⁸F]-76 ou [¹⁸F]-77) d'au moins 90 % dès 15 minutes de réaction. La réaction de CuAAC semble un peu plus lente puisque la conversion du [¹⁸F]FPyZIDE n'est que de 75 %.
- A 40 °C, toutes les cycloadditions permettent une conversion de plus de 90 % du groupement prosthétique dès 15 minutes de réaction sauf dans le cas de la SPAAC impliquant [¹⁸F]FPyZIDE et BCN.
- Les cinétiques observées des réactions de SPAAC impliquant [¹⁸F]FPyZIDE et BCN ou de CuAAC impliquant [¹⁸F]FPyKYNE et **13** restent les plus lentes bien que cela soit tout à fait inattendu dans le cas de la CuAAC.

En conclusion, la réaction de CuAAC est tout à fait adaptée au radiomarquage de macro-biomolécules au fluor-18 *in vitro*, comme cela a largement été démontré dans la littérature.⁸⁷ Pour un radiomarquage directement *in vivo*, les réactions de SPAAC, impliquant un dérivé de DBCO et un azoture, ou de SPSAC, impliquant une sydnone et un dérivé de cyclooctyne pourraient présenter un intérêt ainsi qu'une alternative à la réaction tétrazine/*trans*-cyclooctène qui souffre du risque d'isomérisation de l'alcène et de la faible stabilité des tétrazines. Les réactifs de cycloaddition [¹⁸F]FPyZIDE, [¹⁸F]-53 et [¹⁸F]-75, préparés au cours de cette thèse pourront être évalués en SPAAC et en SPSAC *in vivo* pour un radiomarquage de protéines (ou d'anticorps). La bioorthogonalité de la réaction pourra tout d'abord être testée dans un milieu réactionnel complexe tel que du plasma sanguin ou un milieu de culture cellulaire.

Chapitre 4. Marquage enzymatique

Pour répondre au défi d'un radiomarquage de macro-biomolécules efficace, bioorthogonal et compatible *in vivo*, le marquage enzymatique semble être une option intéressante. En effet, les marquages (souvent dénommés « tagging ») par réaction enzymatique sont très sélectifs et ont lieu avec des constantes de vitesse comparables, voire supérieures, à celles des réactions de click tétrazine/*trans*-cyclooctène (Figure 34). De plus, des applications de marquage direct *in vivo* ont déjà été décrites avec certaines étiquettes chimiques et pourraient être appliquées au fluor-18 et à l'imagerie TEP.

Le développement de sondes moléculaires pour visualiser et comprendre l'environnement et les interactions cellulaires (voies de signalisation et processus chimiques) est un défi majeur en biochimie. L'une des possibilités pour créer de telles sondes et réaliser de telles études est de marquer sélectivement les protéines d'intérêt à l'aide de sondes fluorescentes.

1. Etiquetage de protéines

1.1. Protéines auto-fluorescentes

Les protéines auto-fluorescentes (AFPs, auto-fluorescent proteins) sont très utilisées comme fluorophores pour de nombreuses applications biologiques. En 1994, la protéine fluorescente verte (GFP, green fluorescent protein) a été utilisée comme « étiquette fluorescente » (ou protéine « rapporteur ») par le groupe de Chalfie afin d'étudier l'expression de gènes et la localisation de protéines.²³⁹ Chalfie, Shimomura et Tsien ont même obtenu le prix Nobel de chimie en 2008 pour la découverte et les applications liées à la GFP. Cette dernière est une protéine, composée de 238 acides aminés, repliée spontanément lors de sa biosynthèse pour former un chromophore fluorescent par réarrangement et oxydation d'une séquence sérine-tyrosine-glycine (Figure 109).²⁴⁰

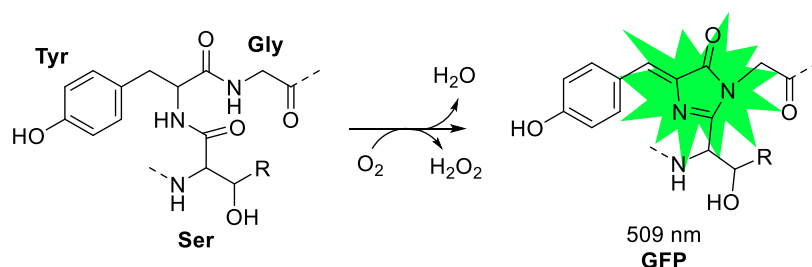


Figure 109. Formation du fluorophore GFP

De manière générale, la protéine auto-fluorescente est co-exprimée (ou encore exprimée en fusion) avec une protéine d'intérêt pour effectuer un marquage cellulaire. La protéine de fusion est obtenue en ajoutant la séquence d'ADN codant pour la protéine auto-fluorescente, à la séquence codant pour la protéine d'intérêt. Cette construction

couramment utilisée en biologie moléculaire est connue sous le nom de gène rapporteur. Après expression complète du gène, la fluorescence atteste de la présence de la protéine d'intérêt. Ces protéines auto-fluorescentes sont intéressantes mais limitées par une seule longueur d'onde d'absorption et d'émission déterminées par le fluorophore spontanément formé. La GFP a donc, par la suite, été modifiée à plusieurs reprises afin, par exemple, de changer les longueurs d'ondes d'absorption et d'émission et d'augmenter son intensité pour obtenir un panel de réactifs utilisables pour différentes applications biologiques.^{241,242} Bien que les protéines auto-fluorescentes soient de moins bons fluorophores que les fluorophores synthétiques, car moins brillants et moins stables,^{242,243} leur utilisation est fréquente. En effet, le fait qu'il soit possible de coder génétiquement les AFPs et de les fusionner à d'autres protéines cellulaires par simple modification génétique a permis de multiplier les nombreuses applications effectuées avec ces dernières. Néanmoins, leur taille (environ 200 résidus) peut aussi être un problème puisqu'elles peuvent interférer avec les fonctions des protéines auxquelles elles sont fusionnées.²⁴⁴

1.2. Etiquetage chimique de protéines d'intérêt

Grâce au succès des AFPs, les chimistes ont développé de nouvelles approches permettant de combiner les avantages des procédés génétiques avec le potentiel offert par les sondes synthétiques.

Cette nouvelle approche s'appelle l'étiquetage chimique (chemical tagging). Techniquement, cette approche est similaire à celle utilisée pour marquer les protéines d'intérêt avec les protéines fluorescentes : un plasmide permet de coder génétiquement pour la fusion entre la protéine d'intérêt et l'étiquette (tag) qui est un polypeptide ou une enzyme. Les cellules ainsi transfectées expriment la protéine de fusion et suite à une incubation avec un fluorophore, ce dernier se lie ou se conjugue à l'étiquette polypeptidique. L'étiquette chimique assure la spécificité de la réaction mais est plus petite, plus robuste et permet d'utiliser un panel plus large de fluorophores. Afin d'être utilisée pour des applications en biochimie, cette étiquette doit remplir plusieurs critères :

- La ligation entre l'étiquette et le fluorophore doit être rapide et quantitative, y compris à faible concentration des deux réactifs.
- La ligation doit être bioorthogonale, c'est-à-dire que l'étiquette doit se lier à sa cible (le fluorophore) de manière sélective par rapport au milieu cellulaire.
- La modification du fluorophore ne doit pas influencer les paramètres de vitesse et de sélectivité de la réaction de ligation.
- Le fluorophore substrat de l'étiquette doit posséder une bonne perméabilité cellulaire et une toxicité minimale.

Ces étiquettes chimiques peuvent être divisées en quatre catégories :

- Etiquette polypeptidique à reconnaissance directe du fluorophore (Figure 110 A),
- Etiquette polypeptidique duale à reconnaissance/réaction avec un fluorophore bifonctionnel (Figure 110 B),
- Etiquette enzymatique fusionnée (Figure 110 C),
- Etiquette polypeptidique et catalyse enzymatique secondaire (Figure 110 D).

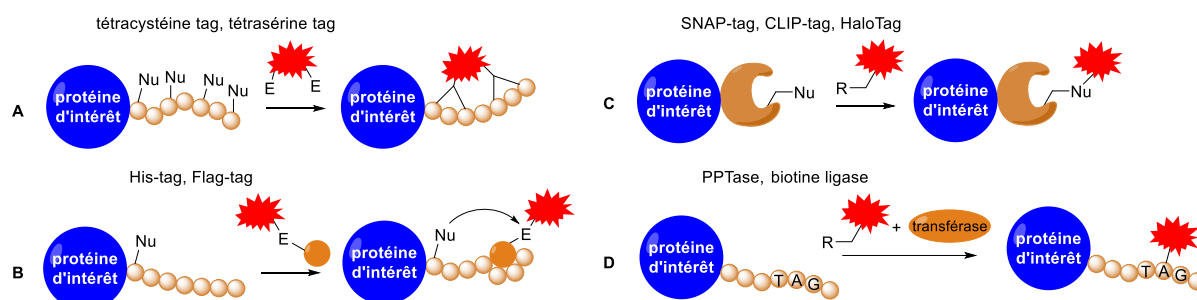


Figure 110. Familles du marquage de protéines par utilisation d'une étiquette²⁴⁵

1.3. Motifs de reconnaissance peptidiques

a) Etiquette de reconnaissance peptidique directe

La première utilisation d'étiquette chimique, FIAsh (Fluorescein arsenical helix binder), a été développée par le groupe de Tsien en 1998 (Figure 110 A et Figure 111).²⁴⁶ Cette étiquette chimique est composée d'un court peptide de 15 acides aminés contenant une tétracystéine espacée par deux autres acides aminés (CCXXCC), souvent la paire proline-glycine (CCPGCC). Le fluorophore ciblant cette étiquette comporte deux atomes d'arsenic, permettant sa liaison par chélation avec deux atomes de soufre de deux cystéines de l'étiquette et la fluorescence augmente lors de la conjugaison. Des dérivés de FIAsh en utilisant d'autres fluorophores ont ensuite été synthétisés mais les étiquettes fluorescéine FIAsh et résorufine ReAsH (Resorufin arsenical helix binder) restent les plus utilisées (Figure 111).²⁴⁷

Ces sondes traversent les barrières cellulaires et permettent donc un marquage intracellulaire. En revanche, elles ne sont pas très spécifiques en raison du marquage possible des macro-biomolécules riches en thiols présentes dans la cellule. De plus, la présence du biarsenic sur le fluorophore est cytotoxique et donc problématique pour une application *in vivo*.²⁴⁸

Des dérivés à base de tétrasérine de type (SSPGSS) ont aussi été synthétisés par la suite afin de contourner le problème lié à l'excès de thiols présents dans le milieu. La première, et la plus utilisée, a été développée par l'équipe de Halo en 2009, le RhoBo, rhodamine modifiée par deux groupements acides boroniques qui se lient aux sérines de l'étiquette portée par la protéine d'intérêt (Figure 111).²⁴⁹

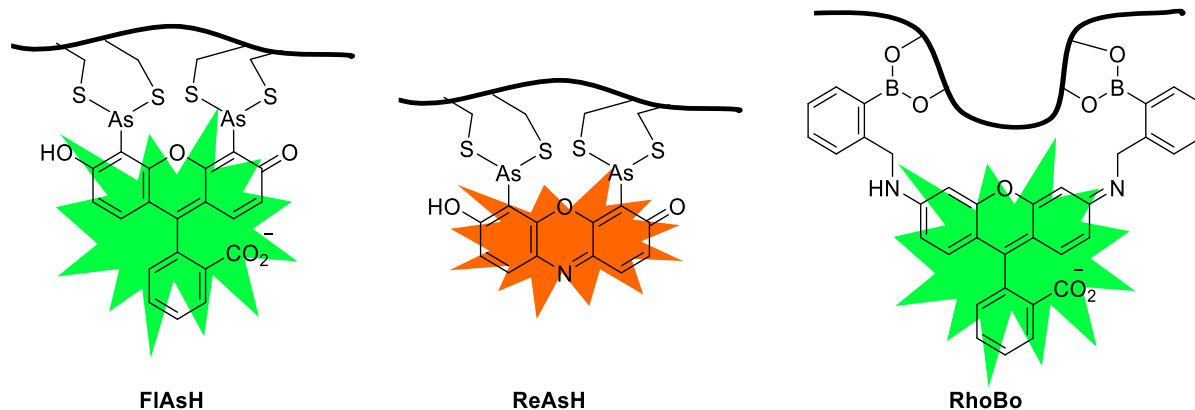


Figure 111. Schéma de motifs à reconnaissance peptidique

b) Sondes bifonctionnelles

Une série de composés a été développée par le groupe de Hamachi pour un marquage de la protéine en deux temps reposant sur une étiquette peptidique polyhistidine (Figure 110 B). L'étiquette peptidique polyhistidine est utilisée pour la purification de protéines recombinantes : codée avec la protéine d'intérêt, elle permet sa purification sur des colonnes d'affinité contenant du nickel. La préparation de sondes bifonctionnelles est une adaptation de cette technique.

Ces composés possèdent un site de reconnaissance de la protéine (un complexe de Nickel II) et un groupement réactif (Figure 112 A). La reconnaissance du fluorophore avec l'étiquette intervient par coordination du complexe de nickel avec les groupements imidazoles des histidines. Par effet de proximité, la molécule se lie ensuite de manière covalente par substitution du groupement arylsulfonyle du substrat fluorescent avec un groupement imidazole d'une histidine adjacente (Figure 112 B). Après réaction, la partie contenant le site de reconnaissance est relarguée. Cette stratégie a été appliquée aux motifs His-Tag (reconnaissance et liaison sur des histidines) et Flag-Tag (reconnaissance par des acides aspartiques et liaison sur une lysine).^{250,251} Ces sondes permettent un marquage sélectif mais avec une vitesse de réaction lente qui peut limiter son utilisation *in vivo*.

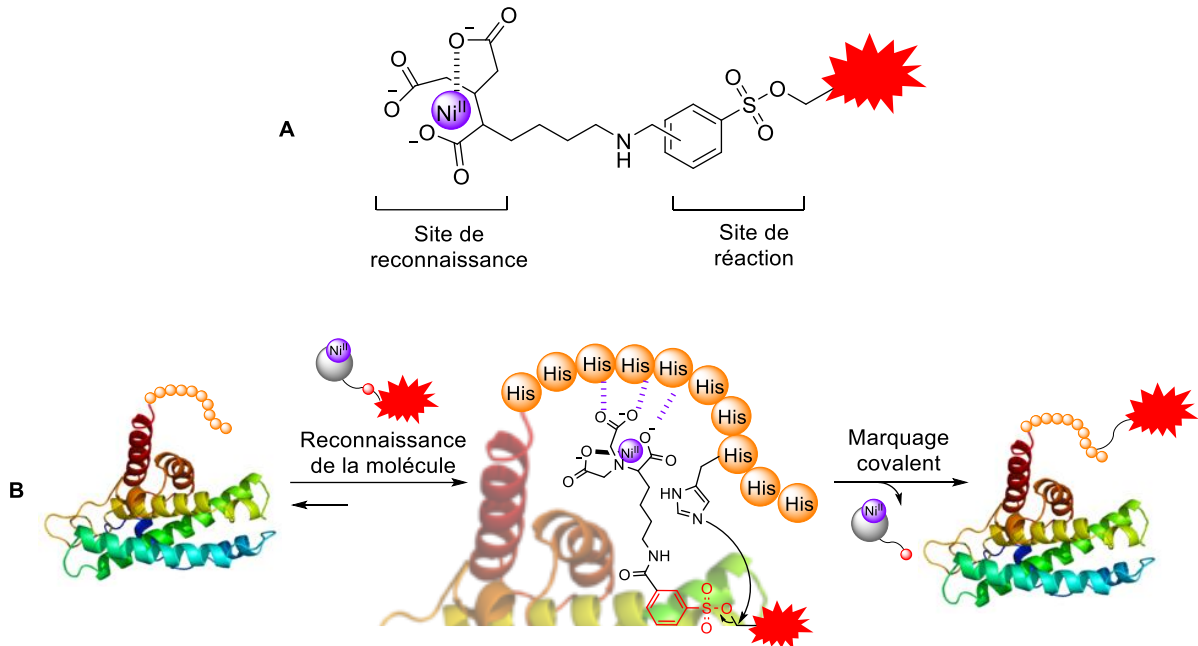


Figure 112. A) Schéma général de la molécule complexée au Nickel et B) Formation de la protéine de fusion pour le His-tag
 Pour contourner les limites de sélectivité observées avec les petites étiquettes peptidiques, notamment dans le cas des étiquettes CCXXCC, des étiquettes reposant sur une liaison par voie enzymatique ont alors été développées.

1.4. Étiquettes enzymatiques

Ces systèmes d'étiquetage sont formés par fusion d'une protéine cible avec une enzyme qui reconnaît un substrat spécifique (Figure 110 C).

a) SNAP-tag

L'équipe de Johnsson a introduit en 2003 une nouvelle approche à base d'enzyme, le SNAP-tag (Figure 113).²⁵² La stratégie SNAP-tag dérive d'une modification de l'enzyme de réparation de l'ADN humain, l'AGT (*O*⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase). L'AGT « sauvage » a pour objectif de réparer les lésions mutagènes et cytotoxiques de l'ADN qui résultent de l'alkylation de la *O*⁶-benzylguanine. La réparation a lieu sur des résidus guanosines, alkylés en position 6-oxo, par transfert du groupement alkyle sur une cystéine réactive. Par mimétisme avec ce mécanisme de réparation de l'ADN, le SNAP-tag est obtenu par fusion d'une protéine d'intérêt avec cette enzyme qui reconnaît spécifiquement un dérivé *O*⁶-benzyle de la guanine. L'enzyme catalyse la substitution du groupement *O*⁶-benzylguanine par une cystéine créant ainsi une liaison covalente entre l'enzyme et le fluorophore. Le SNAP-tag est une protéine monomérique de 182 résidus (20 kDa) qui permet de marquer de manière efficace les cellules vivantes²⁵³

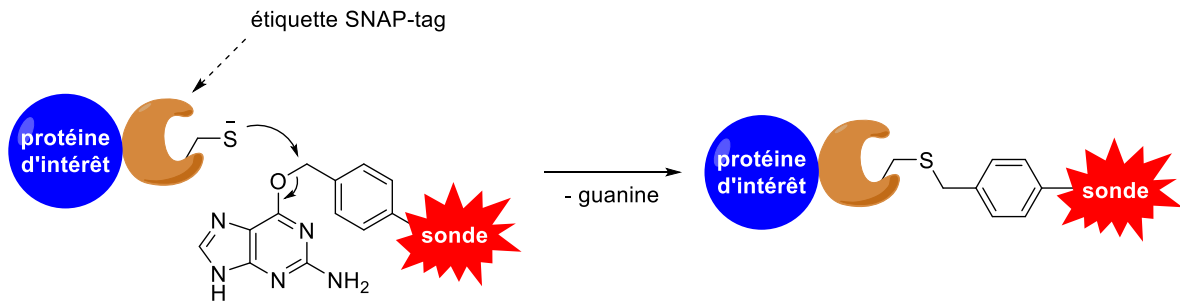


Figure 113. Mécanisme pour le marquage de molécules avec l'utilisation de l'étiquette enzymatique SNAP-tag

Le SNAP-tag a déjà été utilisé comme étiquette pour des marquages de protéines de fusion exprimées dans différents compartiments cellulaires tels que le cytosol, le noyau, le réticulum endoplasmique et la mitochondrie.^{254,255} Quelques exemples d'applications de l'outil SNAP-tag seront détaillés dans : Résultats et discussion Chapitre 4. 2.

b) CLIP-tag

Le SNAP-tag a par la suite été modifié par l'équipe de Johnsson en 2008 pour créer le CLIP-tag.²⁵⁶ En utilisant la même stratégie que pour le SNAP-tag, le CLIP-tag est formé à partir d'une AGT modifiée reconnaissant de manière spécifique les dérivés de cytosine *O*-benzylée. De manière analogue au SNAP-tag, après reconnaissance du substrat par l'enzyme, le benzyle est transféré sur la cystéine du site actif et permet le marquage d'une protéine d'intérêt par l'intermédiaire d'une *O*-benzylcytosine portant un fluorophore.

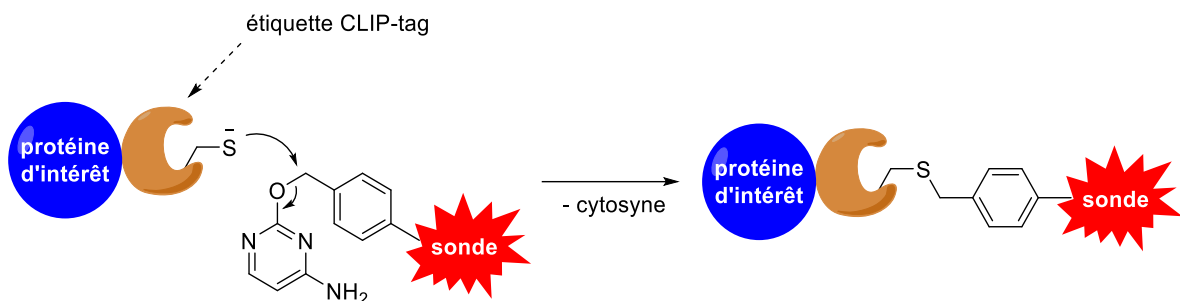


Figure 114. Mécanisme pour le marquage de molécules avec l'utilisation de l'étiquette enzymatique CLIP-tag

c) HaloTag

Le HaloTag est une modification de l'haloalcane déhalogénase qui réagit de manière covalente avec des chloroalcanes, notamment avec le 1-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)-6-chlorohexane commercial, préalablement conjugués avec un fluorophore.²⁵⁷ Comme pour les deux autres étiquettes, la réaction est spécifique, a lieu rapidement y compris dans des conditions physiologiques et est irréversible. Des applications en imagerie cellulaire ont été décrites pour analyser divers processus moléculaires.²⁵⁸

d) TMP-tag

Les groupes de Cornish et de Sheetz ont développé en 2005 une sonde à partir de la dihydrofolate réductase d'*E. Coli* (eDHFR) modifiée.²⁵⁹ Cette dernière se lie de manière non

covalente à la 2,4-diamino-5-(3,4,5-triméthoxybenzyle) pyrimidine plus connue sous le nom de triméthoprime (TMP), antibiotique servant à bloquer le développement de bactéries, qui est préalablement conjuguée avec une sonde fluorescente. La TMP peut être modifiée en modulant les positions méthoxy, tout en conservant une bonne affinité avec l'eDHFR, et différentes sondes peuvent aussi être utilisées.²⁶⁰ Un dérivé de TMP a été obtenu pour former une liaison covalente par addition de Michael entre l'eDHFR, modifiée par une cystéine à sa surface, et la TMP, fonctionnalisée par un acrylamide (Figure 115).²⁶¹ Cette sonde a été utilisée pour le marquage de protéines intracellulaires.

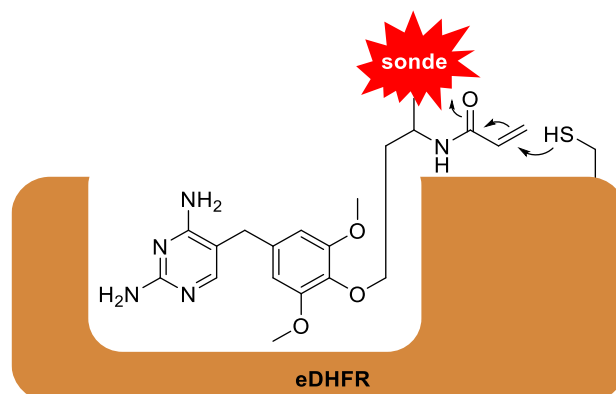


Figure 115. Marquage par formation d'une liaison covalente entre l'eDHFR et la triméthoprime par addition de Michael

1.5. Etiquette polypeptidique et catalyse enzymatique secondaire

Dans cette approche, une enzyme naturelle permet de lier la sonde à une petite séquence de reconnaissance de la protéine d'intérêt (Figure 110 **D**). Ces enzymes reconnaissent une gamme variée de substrats dérivés de leur substrat spécifique, ce qui en fait un bon outil d'étiquetage de protéines. L'enzyme catalysant la ligation du substrat n'étant pas fusionnée au polypeptide de reconnaissance, il n'est pas nécessaire d'exprimer une protéine de fusion avec une enzyme de haut poids moléculaire comme c'est le cas avec les étiquettes enzymatiques fusionnées.

Ces étiquettes permettent un marquage plus rapide et spécifique qu'avec les étiquettes de reconnaissance. L'exemple avec la biotine ligase d'*E. coli* est présenté ci-dessous (Figure 116).

BirA permet le transfert d'une biotine ou d'un isostère de biotine, comme la cébiotine portant une fonction cétone, sur une lysine d'un peptide accepteur de 15 acides aminés. Le marquage de la protéine d'intérêt se fait dans un deuxième temps par ligation sur la fonction cétone. D'autres biotines ligases peuvent aussi reconnaître des biotines portant une fonction alcyne ou azoture, qui permettra par réaction de CuAAC d'introduire la sonde dans un deuxième temps.^{262,263}

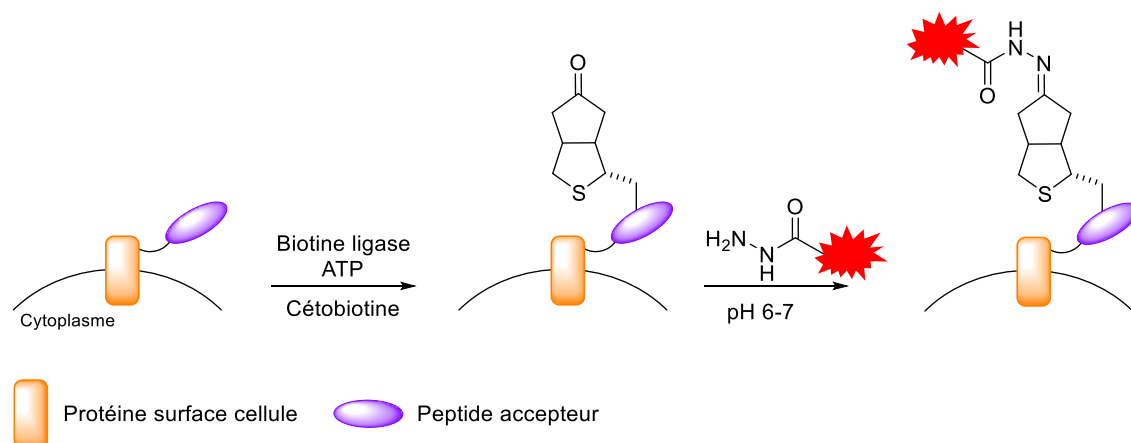


Figure 116. Principe de marquage d'un peptide accepteur par transfert de biotine catalysé par une enzyme

1.6. Résumé et comparaison des différentes étiquettes

Les différentes étiquettes présentées ci-dessus permettent de marquer des macro-biomolécules avec des fluorophores avec des constantes de vitesse variées (Tableau 27).²⁴⁵

Méthode de marquage	Vitesse ($M^{-1}.s^{-1}$)
Tétracycline	10^4-10^5
SNAP-tag	3.10^4
CLIP-tag	10^3
HaloTag	3.10^6
TMP-tag	10-100
CuAAC	10-100
TCO/Tet	210-2800

Tableau 27. Constantes de vitesse des différentes étiquettes existantes dans la littérature

Les réactions de marquage réalisées par ces étiquettes sont intéressantes puisque leurs constantes de vitesse sont bien plus élevées que celles des réactions de chimie click telles que la CuAAC ou encore tétrazine/*trans*-cyclooctène. Le SNAP-tag est une étiquette pertinente pour le marquage rapide de la protéine d'intérêt. Son substrat, la O^6 -benzylguanine peut être modifiée pour un radiomarquage au fluor-18. Les avantages de l'étiquette enzymatique SNAP-tag sont les suivants :

- Une meilleure spécificité en comparaison avec la reconnaissance enzymatique directe,
- Un bon compromis parmi toutes les étiquettes enzymatiques fusionnées puisque seul le HaloTag est plus rapide mais ce dernier requiert l'utilisation d'un dérivé chloré, ce qui pourra être un inconvénient lors du marquage au fluor-18 puisque le fluor pourrait substituer le chlore,
- L'application *in vivo*. Les systèmes catalysés par une enzyme (Biotine ligase) sont plus compliqués à mettre en œuvre et ne peuvent être utilisés *in vivo* mais seulement *in vitro*,

- Une constante de vitesse élevée, potentiellement compatible avec les quantités de substrat marqué au fluor-18 (de l'ordre de la nmole) qui pourraient être injectées pour un marquage *in vivo*. Elle est 300 fois supérieure par rapport à la CuAAC et de 10 fois par rapport à tétrazine/*trans*-cyclooctène.

De nombreuses applications ont déjà été décrites en imagerie de fluorescence avec cette étiquette enzymatique et certaines d'entre elles sont détaillées dans le paragraphe suivant.

2. Applications

2.1. Applications *in vitro*

La majorité des applications du SNAP-Tag se fait dans le cadre d'imagerie fluorescente *in vitro* afin d'étudier le fonctionnement ou le temps de demi-vie de protéines mais aussi les interactions protéine-protéine ou encore protéine-drogue.^{264,265}

Les étiquettes chimiques (SNAP-tag, CLIP-tag, HaloTag etc.), qui sont orthogonales entre elles, peuvent être utilisées dans une application dite « multicolore » avec deux fluorophores différents afin d'étudier plusieurs protéines en même temps.^{266,267} Ci-dessous, sont présentées plusieurs applications de l'étiquette SNAP-tag avec plusieurs types de fluorophores mais aussi une application pseudo-« multicolore ».

a) Substrats fluorescents standards

La première application *in vitro* du SNAP-tag a été effectuée, par l'équipe de Johnsson en 2003, avec différents dérivés de benzylguanine afin de comparer la constante de vitesse de réaction par rapport à la benzylguanine de référence (6-*O*-méthylguanine).²⁵² Avec le dérivé BGBT, une constante de vitesse de $600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ a été observée, en comparaison avec celle de la benzylguanine de référence ($k = 3000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Ces résultats ont démontré que l'utilisation de dérivés de BG substitués en position 4 du groupement benzyle par un fluorophore pouvait permettre de marquer une protéine d'intérêt en utilisant le SNAP-tag, *in vitro*.

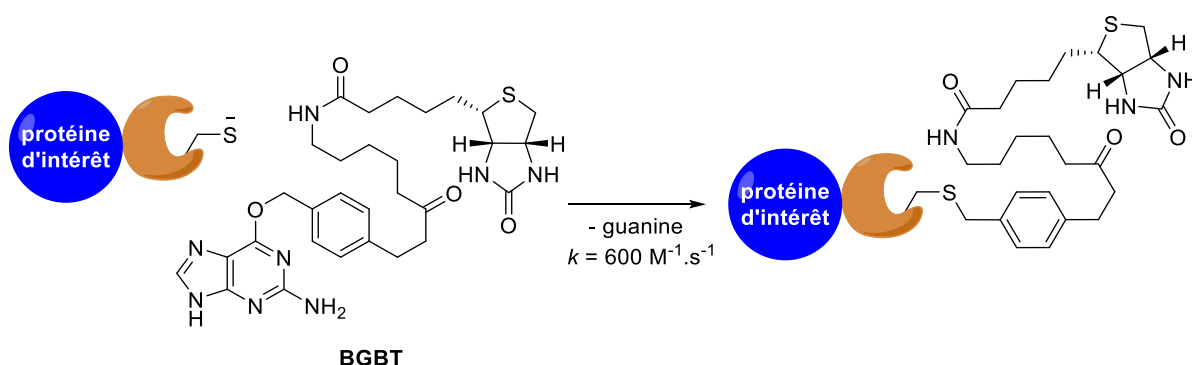


Figure 117. Exemple de marquage *in vitro* avec un dérivé de benzylguanine

b) Substrats fluorescents clivables

La technologie SNAP-Tag s'avère d'une grande utilité pour étudier les protéines membranaires et notamment les mécanismes d'endocytose. En effet, des cellules adéquatement transfectées peuvent exprimer à leur surface des protéines de fusion contenant le SNAP-tag et être marquée par incubation avec des substrats fluorescents. Le marquage fluorescent permet ensuite d'étudier les mécanismes d'endocytose ou de recyclage de ces protéines membranaires. Néanmoins, les protéines qui ne seraient pas internalisées généreront un signal fluorescent non spécifique. Pour pallier ce problème, un agent fluorescent contenant une liaison disulfure **L167**, qui peut être réduite, entre la benzylguanine et le fluorophore a donc été développé.²⁶⁸ L'excès de fluorophore à la surface de la cellule est éliminé grâce à un agent réducteur ne passant pas la membrane cellulaire.

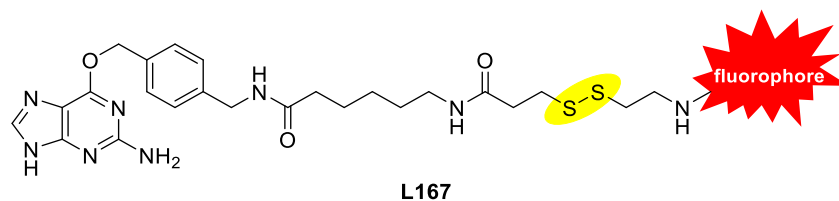


Figure 118. Molécule avec liaison disulfure pour le clivage du fluorophore

c) Application multicolore

Les interactions protéine-protéine jouent un rôle important dans la plupart des processus biologiques. Une technique permettant de détecter ces interactions a été développée en utilisant une construction moléculaire possédant deux substrats de deux étiquettes différentes connectées par un fluorophore. Cette molécule est composée d'une benzylguanine (BG), substrat du SNAP-tag, d'une benzylcytosine (BC), substrat du CLIP-tag et d'une cyanine (Cy₅) comme fluorophore et lien entre les deux substrats pour former une construction de type BG-Cy₅-BC (Figure 11).²⁶⁹

Par transfection dans des cellules de mammifère, les protéines de fusions X-SNAP et Y-CLIP (où X et Y sont les protéines d'intérêt) sont exprimées. Les cellules sont ensuite détruites dans des conditions douces afin de ne pas dénaturer les protéines. Le lysat cellulaire ainsi obtenu est incubé avec le substrat bifonctionnel BG-Cy₅-BC. Si les protéines interagissent entre elles, il y a alors une proximité spatiale et les deux étiquettes vont réagir avec le substrat bifonctionnel et former le complexe de plus haut poids moléculaire qui sera détecté sur le gel d'électrophorèse sous forme d'une bande unique. En revanche, si les deux protéines d'intérêt n'interagissent pas ensemble, elles vont chacune réagir avec leur substrat spécifique mais le complexe ne sera pas obtenu et chaque protéine sera détectée par une bande individuelle sur le gel d'électrophorèse (Figure 119 – gel d'électrophorèse). C'est la cyanine qui permet de détecter les protéines sur le gel d'électrophorèse.

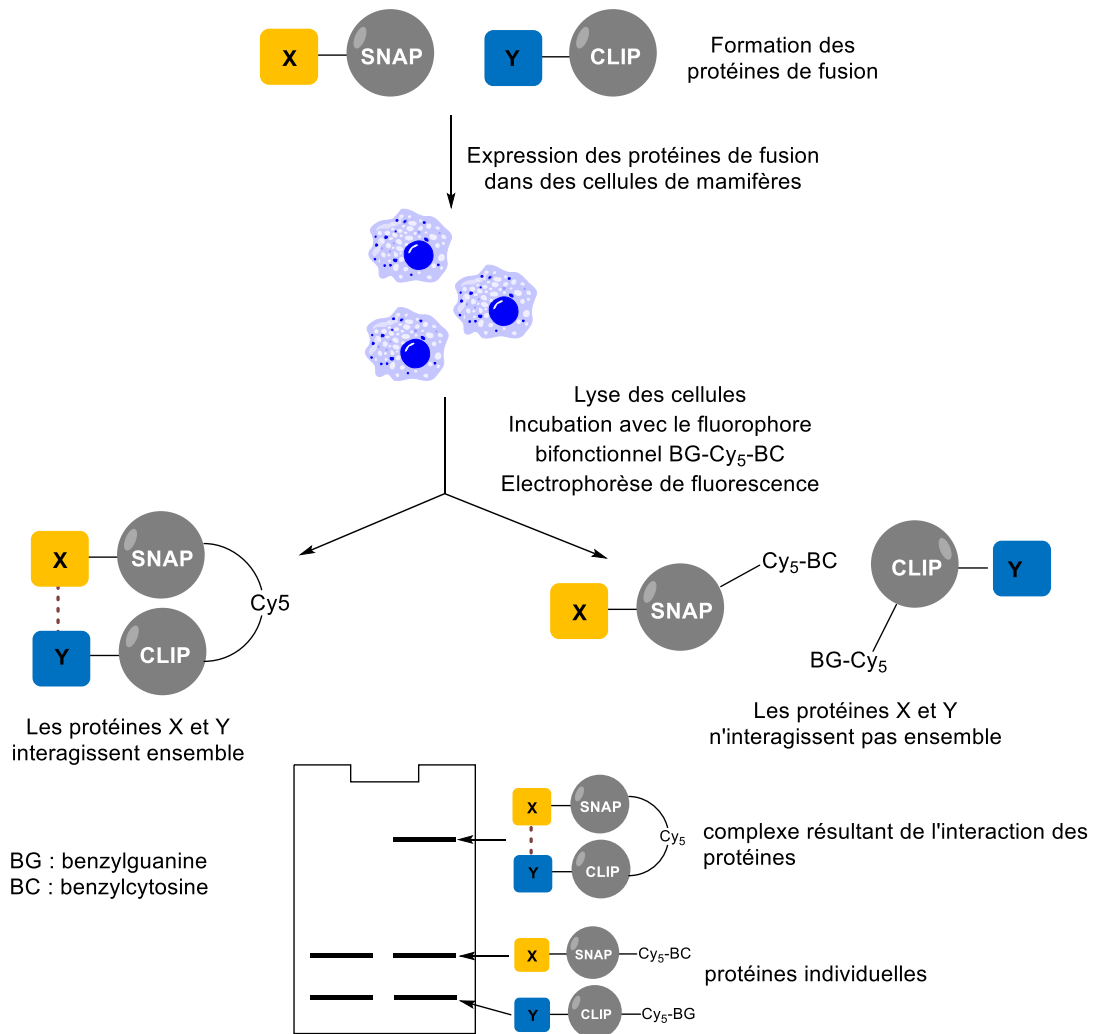


Figure 119. Principe d'utilisation d'étiquettes « multicolores » pour l'étude d'interactions protéine-protéine

2.2. Applications *in vivo*

L'équipe de Johnsson a publié une application détaillée du SNAP-tag pour le marquage *in vivo*.²⁷⁰ Premièrement, une expérience a permis de générer des souris transgéniques par transfection virale d'ovocytes exprimant le SNAP-tag fusionné au glycosylphosphatidylinositol (GPI), glycolipide membranaire qui permet l'ancrage de plusieurs protéines. La fonctionnalité du SNAP-tag a ensuite été vérifiée :

- *In vitro* par incubation de dérivés fluorescents de BG sur des cultures primaires de cellules prélevées sur ces souris et sur des souris sauvages. Seules les cellules issues des souris transfectées donnent un signal fluorescent par microscopie de fluorescence.
- *In vivo* par injection de dérivés fluorescents de BG des souris transfectées. L'analyse par électrophorèse de fluorescence a permis de démontrer l'incorporation de la fluorescence dans presque tous les organes sauf le cerveau puisque les dérivés de la BG ne passent pas la barrière hémato-encéphalique contrairement à la O⁶-BG.

Ces résultats ont ensuite été transposés à l'imagerie non-invasive *in vivo* en transfectant des cellules tumorales de cancer mammaire murin avec la même protéine de fusion GPI-SNAP-tag. Des cellules tumorales mutantes et des cellules tumorales sauvages ont ensuite été implantées chez la souris. L'injection du dérivé fluorescent de BG montre une accumulation du fluorophore spécifiquement dans les cellules mutées et non dans les cellules sauvages. Ensuite, afin de trouver les conditions permettant d'obtenir le meilleur rapport signal sur bruit, les souris ont été injectées avec des doses de 4, 10 ou 15 nM et imagées à plusieurs temps. L'injection à 4 nM permet d'obtenir le meilleur rapport signal sur bruit puisque le signal est très intense dans les cellules tumorales alors qu'avec des concentrations plus élevées, le bruit de fond est plus important. Ce résultat est très encourageant pour une utilisation de cette étiquette en imagerie TEP puisque les quantités de fluorophores utilisées par Johnson sont de l'ordre de grandeur des quantités de radiotraceurs utilisées en TEP.

2.3. Applications pour l'imagerie TEP au fluor-18

La majorité des applications de la technologie SNAP-tag a été réalisée avec des fluorophores pour l'imagerie de fluorescence. A ce jour, aucune transposition de cette technologie n'a été décrite pour le radiomarquage de macro-biomolécules au fluor-18.

Cependant, les groupes de Vaidyanathan²⁷¹ en 2000 et de Schirmmacher²⁷² en 2002 ont décrit des dérivés de benzylguanine marqués au fluor-18 afin d'étudier la corrélation entre l'expression de l'AGT et l'efficacité thérapeutique de certaines chimiothérapies. L'activité de ces protéines réparatrices de l'ADN peut être altérée dans certains cancers. L'imagerie TEP, en utilisant ces dérivés marqués au fluor-18, pourrait permettre d'obtenir des informations sur le stade du cancer mais aussi sur l'efficacité thérapeutique des agents alkylants utilisés en chimiothérapie.

Le groupe de Vaidyanathan a synthétisé un composé radiomarké au fluor-18 [¹⁸F]FBA à partir du précurseur triméthylammonium **L7** (Figure 120). Après l'introduction du fluor-18, une étape de réduction de l'aldéhyde en alcool a été effectuée pour obtenir [¹⁸F]-**L168**, avec un rendement radiochimique de 50 %. Une étape de conjugaison avec la BG **L169** ou **L170** a permis d'obtenir la benzylguanine désirée [¹⁸F]-**L171** avec une conversion de 40 % observée en HPLC. La radiofluoration ne pouvait être effectuée directement sur la BG puisque le benzyle devait être activé (groupement aldéhyde) pour pouvoir permettre la substitution nucléophile aromatique. En dépit de rendements de radiosynthèse acceptables, cette procédure multi-étape reste relativement inadaptée vis-à-vis du temps de demi-vie du fluor-18 et de sa possibilité d'automatisation.

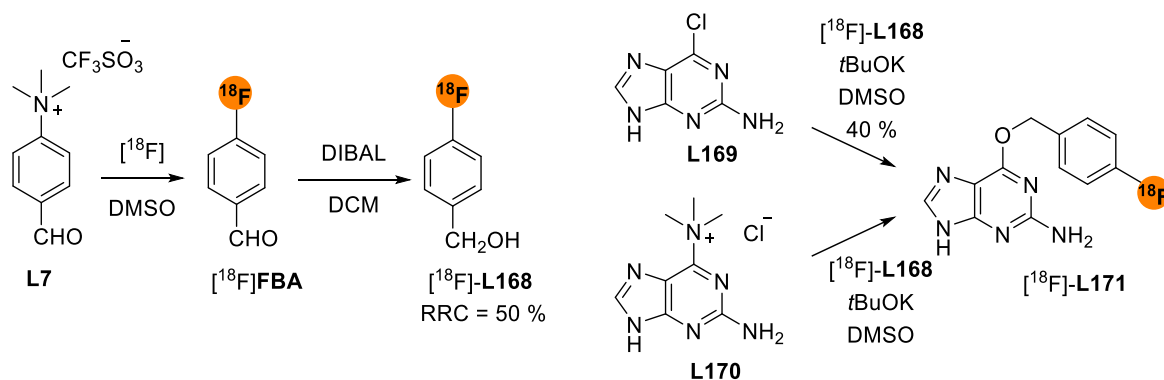


Figure 120. Synthèse d'un dérivé de benzylguanine pour une application *in vivo* avec le SNAP-tag

Le groupe de Schirmacher a développé un dérivé glucosidique de benzylguanine pour mesurer l'activité de l'AGT dans le tissu tumoral.

Le composé $[^{18}\text{F}]$ -L173 a été préparé à partir d'un précurseur 2-chloropyridine. Dans son approche, Schirmacher a tiré parti de la meilleure réactivité de la pyridine en substitution nucléophile aromatique ce qui a permis de simplifier le nombre d'étapes après la radiofluoruration, en comparaison avec le substrat développé par Vaidyanathan. Une déprotection, en 2 étapes, a ensuite été effectuée, sur le composé radiomarqué. Le rendement corrigé de la décroissance obtenu est seulement de 5 %, ce qui reste modeste. Dans ce type de substitution nucléophile, le chlore n'est d'une part pas le meilleur groupe partant et la température de réaction (100 °C) n'est peut-être pas suffisamment élevée. De plus, les auteurs incriminent également une possible gêne stérique du groupement glucose perbenzylé.

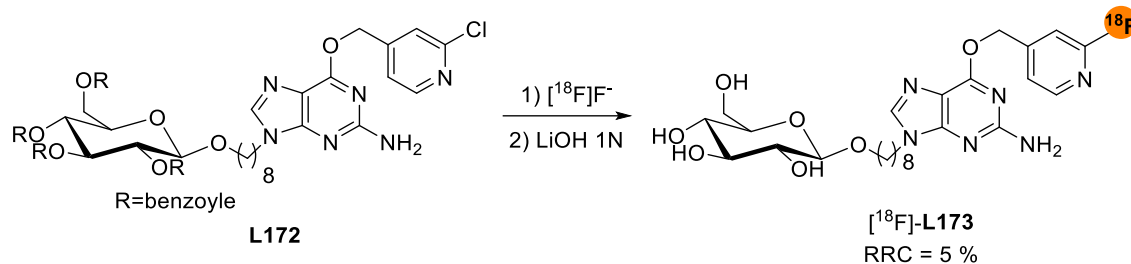


Figure 121. Synthèse d'un dérivé glucosidique de benzylguanine pour la détermination de la quantité d'AGT

Aucune application *in vivo* des composés $[^{18}\text{F}]$ -L171 ou $[^{18}\text{F}]$ -L173 n'a été décrite à ce jour. Seules des expériences de binding *in vitro* sur l'AGT humaine purifiée ont été réalisées démontrant que ces composés présentaient des constantes d'inhibition (IC_{50}) supérieures à 1 μM . De telles valeurs paraissent élevées pour pouvoir utiliser ces composés en imagerie TEP sur l'AGT sauvage.

3. Synthèse de dérivés de benzylguanine pour une application du SNAP-tag au fluor-18

3.1. Objectifs

Dans le cadre de marquage direct de macro-biomolécules au fluor-18 pour de futures applications *in vivo*, le SNAP-tag, grâce à ses propriétés, est donc une étiquette intéressante.

Le marquage au fluor-18 d'un substrat du SNAP-tag et son application au radiomarquage de protéines *in vivo* n'ont jusqu'à présent pas été décrits. Un dérivé de benzylguanine marquant au fluor-18 et donc substrat du SNAP-tag, sera synthétisé. D'après les résultats décrits dans la littérature, le SNAP-tag peut interagir avec une grande variété de substrats *O*⁶-benzylguanine, la fonctionnalisation du groupement benzyle ne semble pas impacter significativement la ligation enzymatique du substrat à la protéine.

Les pyridines, grâce à leur réactivité, permettent un marquage rapide au fluor-18 (Résultats et discussion Chapitre 2. 1.3. a) et sont donc des composés intéressants en radiochimie. Un dérivé de benzylguanine contenant une fluoropyridine sera donc synthétisé (Figure 122) ainsi que deux précurseurs classiques pour la radiochimie des fluoropyridines, le nitro- et le triméthylammonium.

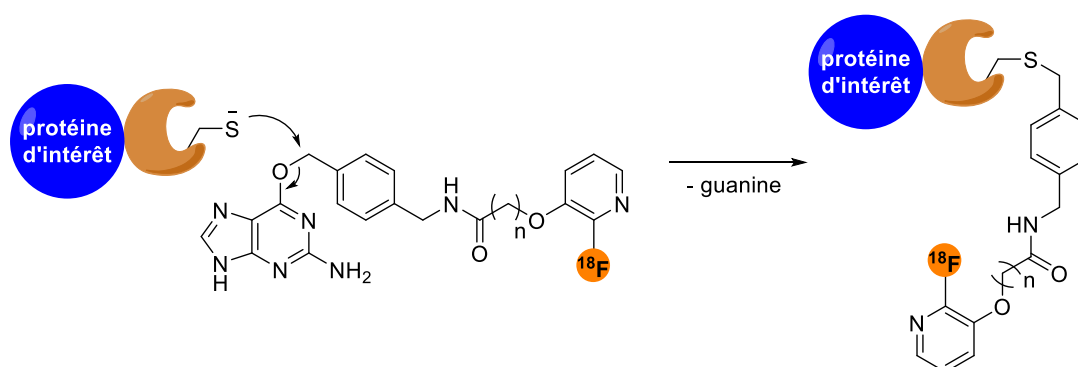


Figure 122. Schéma général de l'utilisation du SNAP-tag en radiochimie

3.2. Synthèse de la référence froide et des précurseurs de radiomarquage

a) Analyse rétrosynthétique

Les deux précurseurs et la référence froide seront synthétisés par acylation de la *O*⁶-(4-(aminométhyl)benzyl)guanine avec un acide comportant un groupement radiomarquable et le dérivé fluoré, nitro- ou triméthylammonium correspondant (Schéma 55). La fluoro- et la nitro-pyridines activées seront obtenues à partir d'acide 2-chloroacétique ou d'acide 3-chloropropanoïque et de 3-hydroxy-2-fluoropyridine et 3-hydroxy-2-nitropyridine respectivement. Le composé triméthylammonium sera quant à lui synthétisé de la même manière à partir de la 3-hydroxy-2-diméthylaminopyridine puis

méthylé à la dernière étape avant la formation de l'amide afin de limiter les problèmes de manipulation et de purification avec le sel de triméthylammonium.

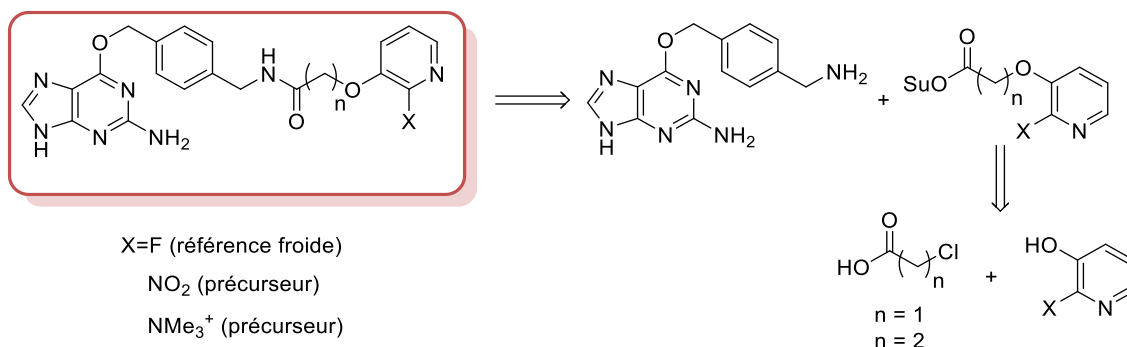


Schéma 55. Analyse rétrosynthétique de la référence froide et des précurseurs pour le SNAP-Tag

b) Préparation des acides 2((2-fluoro-/nitro-/diméthylaminopyridin-3-yl)oxy) carboxyliques

Les acides carboxyliques, dérivés des 3-hydroxypyridines, seront synthétisés en deux étapes à partir d'hydroxypyridines commerciales ou de la diméthylaminopyridine, précédemment synthétisé (Schéma 56).

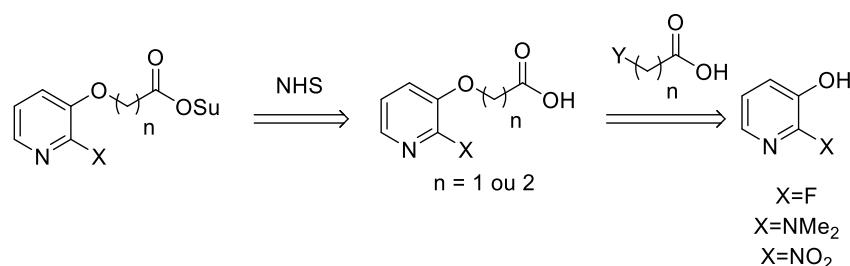
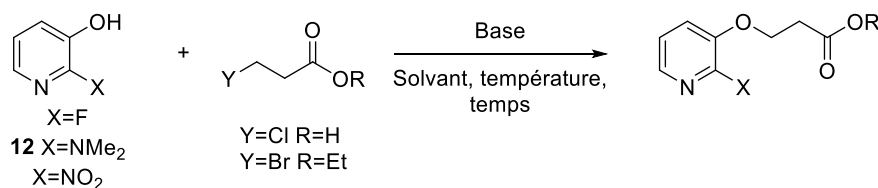


Schéma 56. Schéma de synthèse des pyridines avant conjugaison avec la BG

Plusieurs essais ont été effectués pour la réaction de *O*-alkylation entre les 3-hydroxypyridines et des dérivés d'acide propanoïque. La réaction de *O*-alkylation entre **12** ou la 3-hydroxy-2-fluoropyridine commerciale et l'acide 3-chloropropanoïque avec du carbonate de potassium et de l'iodure de sodium à 70 °C n'a pas permis d'obtenir le composé désiré (Tableau 28 – entrée 1 et 2). L'utilisation de l'iodure de sodium permet de substituer d'abord le chlore ou le brome par l'iode par réaction de Finkelstein afin d'augmenter la réactivité de l'acide. Seul l'acide 3-(acryloyloxy)propanoïque **78** a été observé, obtenu suite à une réaction d'estérification intermoléculaire de l'acide 3-chloropropanoïque suivi d'une élimination. D'autres conditions ont été testées pour la réaction de **12** avec l'acide en présence d'hydroxyde de sodium dans l'eau à température ambiante pendant 6 heures mais seules la pyridine et un produit d'élimination ont été isolés (Tableau 28– entrée 3). La réaction a aussi été effectuée avec du 3-bromopropanoate d'éthyle dans les mêmes conditions à température ambiante puis à 70 °C pendant une nuit (Tableau 28 – entrée 4). Par analyse CCM, seuls les réactifs de départ étaient encore présents. Un essai avec la 3-hydroxy-2-nitropyridine et l'hydrure de sodium a aussi été

effectué à température ambiante puis à 80 °C mais aucune conversion n'a été constatée par analyse CCM et RMN (Tableau 28 – entrée 5).



Entrée	Pyridine	Acide	Réactifs	Solvant	Température /temps	Résultat
1			K_2CO_3 , NaI	DMF	70 °C/1 nuit	*
2			K_2CO_3 , NaI	DMF	70 °C/1 nuit	*
3			NaOH	Eau	TA/6 h	+ pyridine
4			K_2CO_3 , NaI	DMF	TA, 70 °C/1 nuit	Pas de réaction
5			NaH	DMF	TA, 80 °C/1 nuit	Pas de réaction

* Structures déterminées par spectrométrie de masse

Tableau 28. Essais pour la réaction de *O*-alkylation entre l'hydroxypyridine et l'acide propanoïque

La réaction intermoléculaire de l'acide sur lui-même étant plus rapide que la *O*-alkylation, d'autres conditions ont aussi été testées, notamment la réaction d'addition 1,4 entre le 3-pyridinol **12** et l'acide acrylique protégé par un groupement *tert*-butyle avec de l'hydrure de sodium à température ambiante mais la réaction a seulement permis de récupérer les réactifs de départ (Schéma 57).

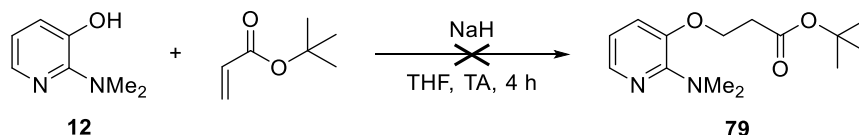


Schéma 57. Essai de *O*-alkylation avec l'acide acrylique

Une étude de fonctionnalisation des pyridines par *O*-alkylation avec les acétates halogénés a ensuite été effectuée à partir de **12**. La réaction avec de l'acide chloroacétique en présence de soude à température ambiante n'a pas permis d'obtenir le composé (Tableau 29 – entrée 1). Dans les mêmes conditions que précédemment, en utilisant du bromoacétate d'éthyle en

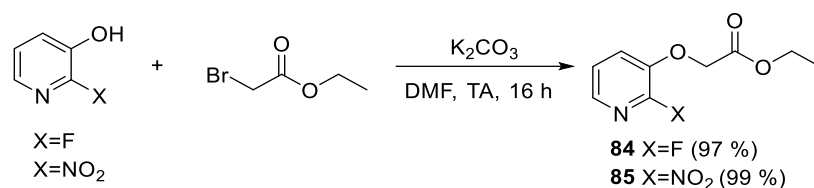


Schéma 58. Synthèse des pyridines fluoro- et nitro- alkylées

Les esters **82**, **84** et **85** ont ensuite été saponifiés avant réaction avec le dérivé de benzylguanine. La saponification a été effectuée pour les trois pyridines avec de l'hydroxyde de sodium dans un mélange THF/eau 19/1 (Schéma 59). Les trois pyridines **86**, **87** et **81** ont été obtenues avec des rendements de 98 à 99 %.

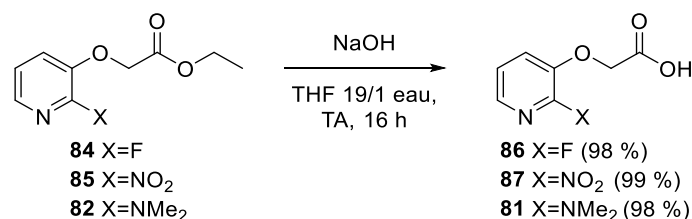


Schéma 59. Saponification des composés pyridiniques

c) Synthèse de la référence froide fluorée et du précurseur nitro-

La 2-fluoropyridine **86** et la 2-nitropyridine **87** ont été activées par un groupement hydroxybenzotriazole avant la formation de la liaison amide avec la O⁶-(4-(aminométhyl)benzyl)guanine en utilisant de l'EDC dans le dichlorométhane à température ambiante (Schéma 60). Les composés **88** et **89** ont été obtenus avec des rendements respectifs de 62 et 42 % sans purification supplémentaire.

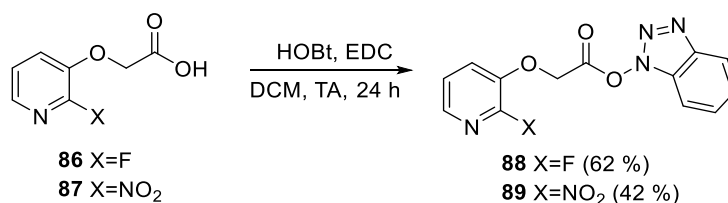


Schéma 60. Formation des esters activés de la fluoro- et la nitro- pyridine

La fluoropyridine **88** et la nitropyridine **89** fonctionnalisées par un hydroxybenzotriazole ont été mises en solution dans du diméthylformamide avec la O⁶-(4-(aminométhyl)benzyl)guanine commerciale pendant 16 heures à température ambiante (Schéma 61). Les deux dérivés de benzylguanine **90** et **91** ont été obtenus avec des rendements respectifs de 56 et 84 %.

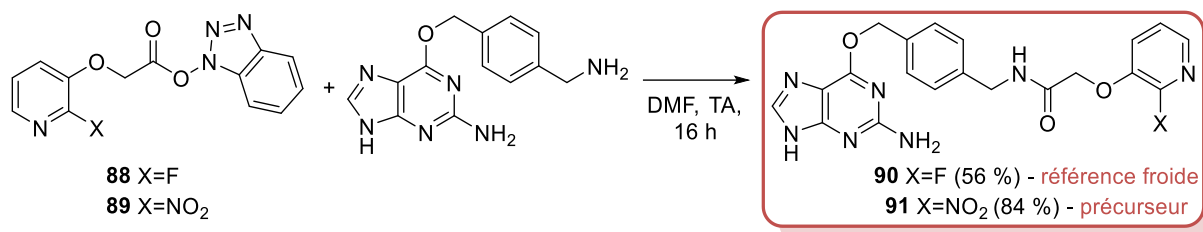


Schéma 61. Formation des dérivés de benzylguanines fluor et nitro-

d) Synthèse du précurseur ammonium quaternaire

Le précurseur acide carboxylique triméthylammonium sera préparé par saponification de l'ester de benzyle correspondant (Schéma 62). Cet ammonium quaternaire sera lui-même obtenu par réaction du triflate de méthyle sur la diméthylamine, précédemment synthétisée (Tableau 29 – entrée 4).

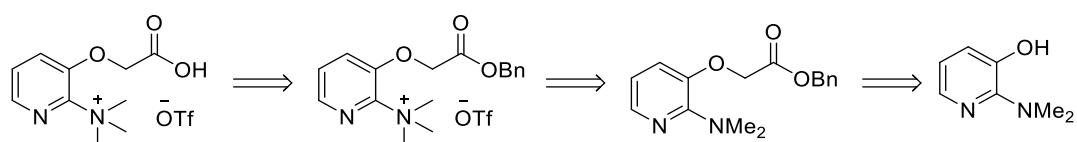


Schéma 62. Analyse rétrosynthétique de la préparation du précurseur ammonium quaternaire

La quaternarisation de l'amine a donc été effectuée dans les conditions classiques avec du triflate de méthyle dans le toluène à partir du composé **83** (Schéma 63). Le produit **92** a été formé mais un produit secondaire était présent en quantité égale dans le brut réactionnel correspondant à l'ester d'éthyle **82**. Plusieurs essais de précipitation ont été effectués sur le même lot successivement avec différents solvants (éther de diéyle, heptane, acétate d'éthyle). La formation du produit secondaire **82** peut être expliquée par la formation d'acide triflique lors de la consommation du triflate de méthyle et de l'ajout d'acétate d'éthyle lors de la précipitation. Afin de pallier ce problème, les conditions réactionnelles ont été adaptées en ajoutant du bicarbonate de sodium en large excès pour éliminer l'acide triflique formé. Ces conditions ont permis d'obtenir **92** avec un rendement de 92 %.

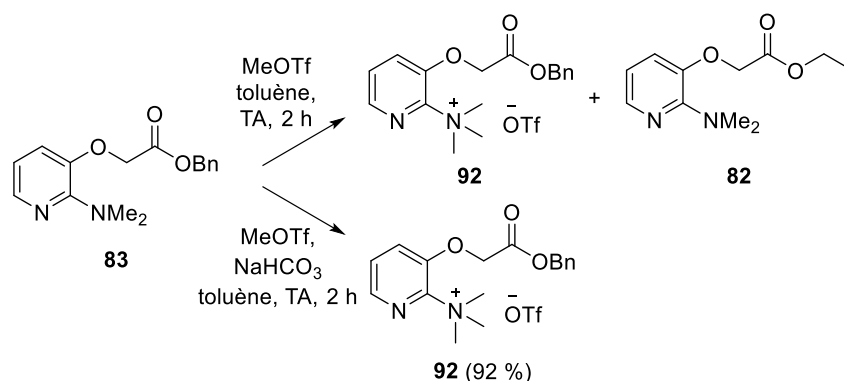


Schéma 63. Synthèse de l'ammonium quaternaire benzylé

Le composé **92** a ensuite été déprotégé pour effectuer la formation de la liaison amide avec la benzylguanine (Schéma 64). Deux approches ont été utilisées : la saponification avec l'hydroxyde de sodium et l'hydrogénation catalytique au palladium. Les deux méthodes ont permis d'obtenir le composé **93** mais des sous-produits ont été observés dans le cas de la saponification alors que l'hydrogénolyse a permis d'obtenir le composé sans purification. Le composé **93** a finalement été obtenu avec un rendement de 48 % par hydrogénation.

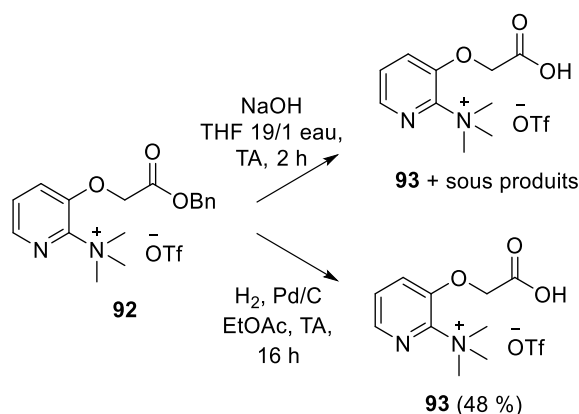


Schéma 64. Préparation du précurseur acide carboxylique **93**

La formation du précurseur triméthylammonium dérivé de benzylguanine entre **93** et la BG est en cours.

La radiochimie sur les dérivés de benzylguanine n'a pas encore été réalisée et fera l'objet d'une étude ultérieure.

4. Conclusion

En vue de l'application de la technologie SNAP-Tag pour le radiomarquage de macro-biomolécules, la synthèse d'un substrat de l'enzyme dérivé de la O⁶-(4-(aminométhyl)benzyl)guanine marquable au fluor-18 a été réalisée. Nous disposons à ce jour de la référence froide **90** et de son précurseur nitro- **91** qui pourra être utilisé pour la préparation du substrat radioactif [¹⁸F]-**90**. Après radiomarquage, la réaction enzymatique sera tout d'abord testée *in vitro* avec une protéine de fusion modèle pour déterminer des conditions de réaction qui seront ensuite transposables au radiomarquage direct *in vivo* de protéines de fusion par étiquette SNAP-Tag.

Conclusion et perspectives

L'objectif de ces travaux de thèse a consisté en l'élaboration de nouvelles stratégies de radiomarquage de macro-biomolécules au fluor-18 dans le cadre de futures applications *in vivo*.

Le radiomarquage des macro-biomolécules, nécessitant des conditions douces (température modérée, pH proche du pH physiologique) n'est pas compatible avec les conditions standards de marquage au fluor-18 et la courte durée de demi-vie de cet isotope dans certains cas ($t_{1/2} = 109,8$ minutes). C'est pourquoi, de nouvelles méthodes ont été développées afin de pallier ce problème. L'utilisation d'une « approche prosthétique », qui consiste à marquer dans un premier temps un synthon bifonctionnel, possédant à la fois un site permettant le radiomarquage au fluor-18 et une fonction réactive permettant la conjugaison à la macro-biomolécule dans un deuxième temps, est d'ores et déjà largement employée pour le marquage de macro-biomolécules. De nouveaux groupes prosthétiques ont été développés et d'autres approches plus novatrices ont été explorées pour un marquage *in vivo*.

Cette thèse a été construite en quatre parties, en suivant un ordre croissant à la fois de vitesse de réaction mais aussi de bioorthogonalité, c'est-à-dire de sélectivité vis-à-vis de la cible, dans le but d'un radiomarquage *in vivo* par pré-ciblage (Figure 123).

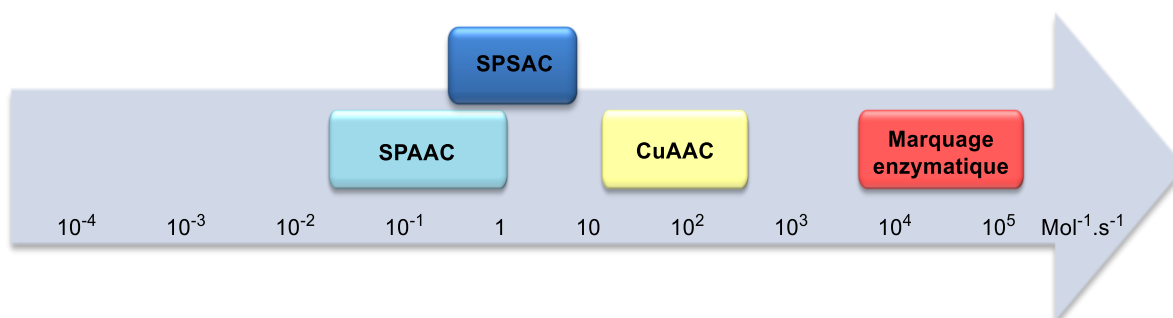


Figure 123. Ordres de grandeur des constantes de vitesse des réactions utilisées dans ce projet de thèse

1. Cycloaddition catalysée au cuivre

Dans un premier temps, par le biais d'une approche prosthétique, de nouveaux dérivés de fluoropyridines fonctionnalisés par une fonction alcyne ou azoture, afin d'effectuer une réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire classique avec une macro-biomolécule fonctionnalisée, ont été développés. Deux fluoropyridines **FPyKYNE 3**, fonctionnalisée par un alcyne, et **FPyZIDE 8**, fonctionnalisée par un azoture, ainsi que deux précurseurs pour chacune des pyridines ont été synthétisés (Tableau 30). La réaction de click pour obtenir les références froides a ensuite été effectuée sur des cystéines modèles afin d'obtenir les composés **16** et **17**. Le radiomarquage de [¹⁸F]FPyKYNE et [¹⁸F]FPyZIDE a été réalisé et a permis d'obtenir de meilleurs rendements radiochimiques avec les précurseurs nitro-, avec 35 et 39 % corrigés de la décroissance, respectivement.

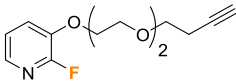
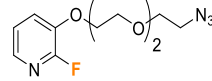
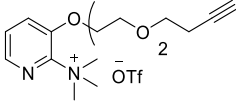
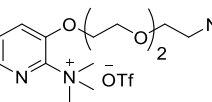
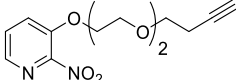
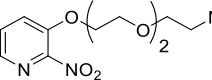
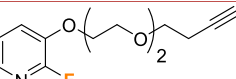
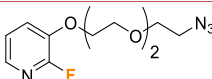
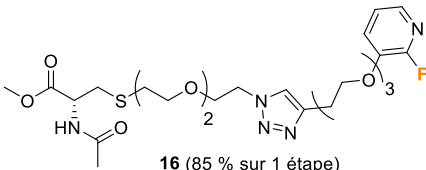
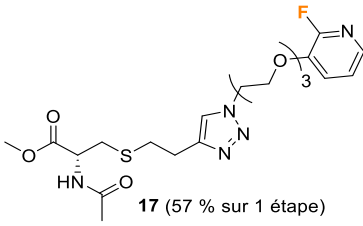
	FPyKYNE	FPyZIDE
Références froides	 3 (10 % sur 3 étapes)	 8 (29 % sur 3 étapes)
Précurseurs	 5 (8 % sur 5 étapes)	 10 (25 % sur 5 étapes)
	 2 (33 % sur 2 étapes)	 7 (44 % sur 4 étapes)
Composé radiomarqué	 3 (35 % c.d. à partir NO ₂) (21 % c.d. à partir NMe ₃ ⁺)	 8 (39 % c.d. à partir NO ₂) (25 % c.d. à partir NMe ₃ ⁺)
Références froides finales	 16 (85 % sur 1 étape)	 17 (57 % sur 1 étape)

Tableau 30. Tableau récapitulatif des groupes prosthétiques obtenus pour la réaction de CuAAC

Des études cinétiques pour la formation des composés de cycloaddition ont été réalisées avec [¹⁸F]FPyKYNE et [¹⁸F]FPyZIDE à température ambiante, puis à 40 °C avec des valeurs de conversion relevées après 5, 15 et 30 minutes. Avec [¹⁸F]FPyKYNE, le composé [¹⁸F]-**16** a été obtenu avec une conversion maximale de 24 % à 70 °C, après 30 minutes de réaction. Pour [¹⁸F]FPyZIDE, plusieurs systèmes catalytiques (CuI/DIEA/NaAsc et CuSO₄/NaAsc), ainsi qu'un excès de cuivre et d'ascorbate de sodium, ont été étudiés à température ambiante, puis à 40 °C. La meilleure conversion a été obtenue avec 500 et 2000 équivalents de sulfate de cuivre et d'ascorbate de sodium respectivement à 40 °C pour obtenir [¹⁸F]-**17** avec un rendement de 100 % après 5 minutes de réaction.

Ces composés ne pourront cependant pas être utilisés, dans le cadre du radiomarquage *in vivo* par pré-ciblage, à cause de la présence de cuivre nécessaire pour catalyser la réaction.

La réaction de chimie click contrainte (SPAAC), permettant d'éviter l'utilisation du cuivre, a été appliquée avec le composé [¹⁸F]FPyZIDE (**8**) et deux cyclooctynes modèles **BCN** et **18**. Les composés de référence ont été obtenus avec des rendements respectifs de 99 et 62 %.

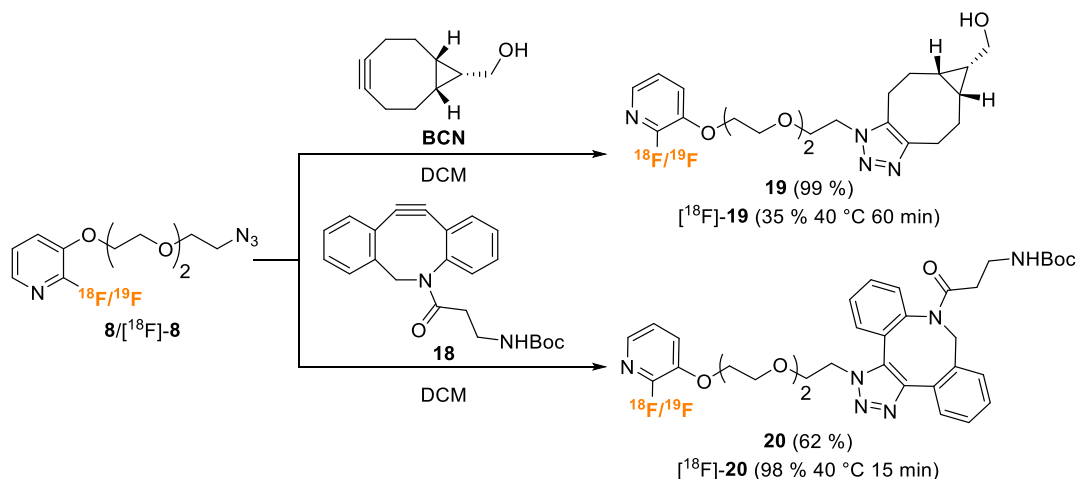


Figure 124. Réaction de SPAAC entre **8** et deux cyclooctynes

Le radiomarquage ainsi qu'une étude de cinétique de la réaction de cycloaddition entre le composé radiomarqué ^{18}F FPyZIDE (**8**) et **BCN** ou **18** ont permis d'obtenir les composés ^{18}F -**19** et ^{18}F -**20** avec des rendements respectifs de 35 et 98 % après 60 et 15 minutes à 40 °C. Les résultats sont en accord avec ceux de la littérature, avec une cycloaddition plus rapide dans le cas du DBCO par rapport au BCN (Figure 47).

En conclusion, le composé ^{18}F FPyZIDE (**8**), synthétisé dans cette première étude, est un composé pluri-valent qui pourra permettre le radiomarquage de macro-biomolécules fonctionnalisées soit par un alcyne terminal soit par un cyclooctyne.

Les pyridines, comme celles présentes dans les composés **3** et **8**, sont des composés très utilisés comme groupements prosthétiques, puisque plus réactives vis-à-vis de la substitution nucléophile aromatique en position α -, que leurs analogues benzènes, et donc permettant une meilleure introduction du fluor-18 dans cette position. L'augmentation de la réactivité de ces dernières, par des groupements électroattracteurs, pourrait alors permettre un adoucissement (température notamment) des conditions de réaction requises pour l'introduction du fluor-18.

2. Etude méthodologique de radiomarquage de pyridines

Dans un deuxième temps, une étude méthodologique sur la réactivité des pyridines vis-à-vis de la radiofluoruration a été initiée. Le but étant de préparer des pyridines substituées suffisamment réactives pour pouvoir les conjuguer à la macro-biomolécule avant le radiomarquage au fluor-18. Ceci permettrait alors le radiomarquage d'une macro-biomolécule en une seule étape. Au vu de résultats antérieurs sur le noyau benzénique ou pyridine portant des groupements électroattracteurs, la température de radiomarquage a pu être abaissée jusqu'à 40 °C. Sept pyridines (Figure 125) ont alors été imaginées pour effectuer cette étude, avec différents groupements électroattracteurs (ester, cétone, aldéhyde, nitrile, tétrafluorophényle, trifluorométhyle), présents individuellement ou en

combinaison. De nombreuses difficultés de synthèse tant pour la préparation des références froides que celle des précurseurs n'ont pas permis de conclure cette étude à ce jour.

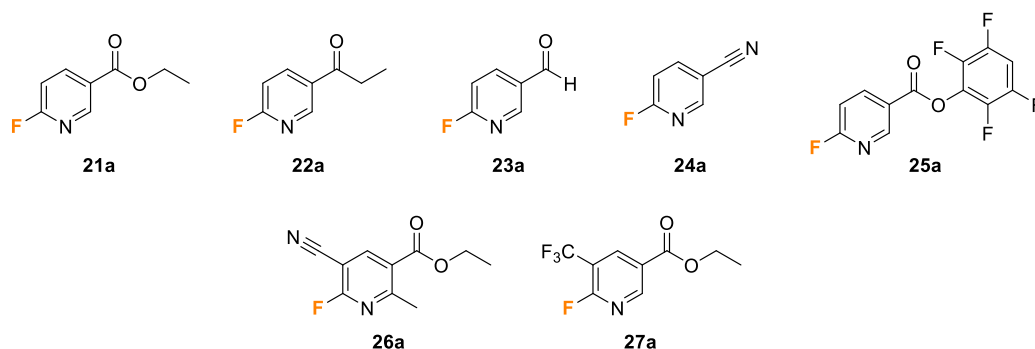


Figure 125. Pyridines modèles utilisées pour l'étude méthodologique des conditions de radiomarquage

3. Cycloaddition contrainte, sans catalyse au cuivre

Dans une troisième partie, de nouveaux groupes prosthétiques ont été synthétisés pour une conjugaison par réaction de cycloaddition en chimie click contrainte. La réaction de SPAAC classique, bioorthogonale, mais pas suffisamment rapide pour un potentiel marquage *in vivo* par pré-ciblage a été modifiée en utilisant une chloro-sydnone, composé mésoionique à 5 chaînons, permettant d'accélérer la réaction de SPAAC classique d'un facteur 7.²³² Deux dérivés fluorés de cyclooctynes du BCN (**53**) et du DBCO (**76**) ont alors été synthétisés puis, par réaction de chimie click contrainte (SPSAC) avec une chloro-sydnone modèle, ont permis d'obtenir les composés de références désirés **77** et **78** avec des rendements respectifs de 82 et 69 % (Figure 126). Les précurseurs tosyloxy de ces deux cyclooctynes ont été synthétisés et le radiomarquage au fluor-18 réalisé afin d'obtenir les composés [¹⁸F]-**53** et [¹⁸F]-**76** avec des rendements respectifs de 18 et 33 %.

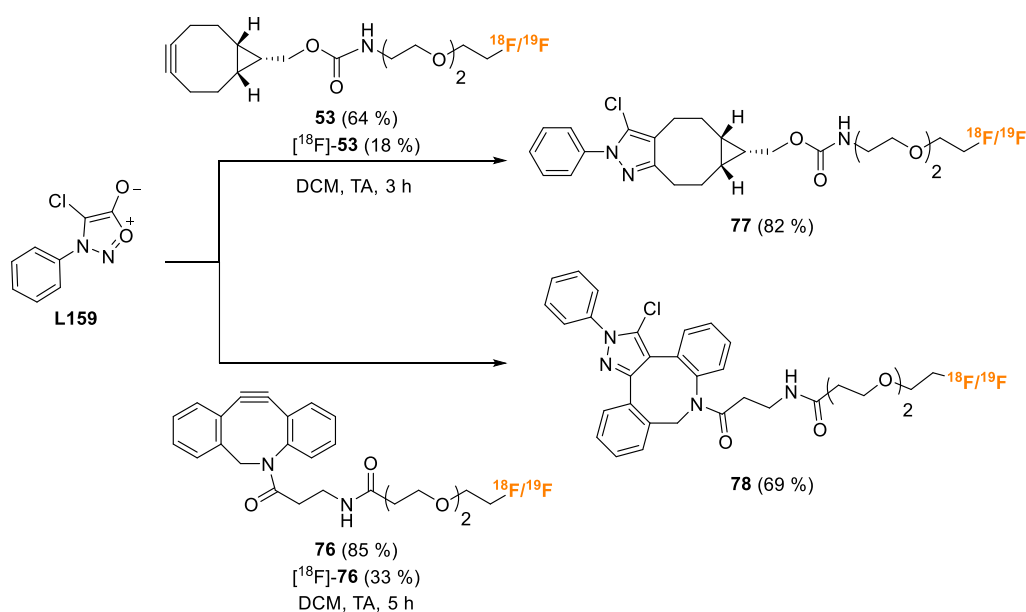


Figure 126. Groupes prosthétiques obtenus dans le cadre d'un marquage *in vivo* par pré-ciblage

Des études cinétiques à température ambiante et à 40 °C, avec des valeurs de conversion relevées à 5, 15 et 30 minutes, ont permis d'obtenir les composés [¹⁸F]-**77** et [¹⁸F]-**78** avec de très bons rendements. A température ambiante, les conversions étaient presque identiques atteignant en moyenne 55 et 100 % après 5 et 30 minutes respectivement. A 40 °C, la vitesse de réaction est initialement légèrement plus rapide pour [¹⁸F]-**76** que pour [¹⁸F]-**53**, puis totale pour les deux après 15 minutes de réaction.

Dans un objectif de vitesse et de bioorthogonalité croissantes, caractéristique déjà validée par la réaction de chimie click contrainte avec les sydnones, une méthode de marquage enzymatique, plus rapide que les réactions de chimie click classiques a ensuite été envisagée.

4. Marquage enzymatique

Un marquage enzymatique avec une étiquette chimique, le SNAP-tag a été exploré. Le SNAP-tag dérive d'une modification de l'enzyme de réparation de l'ADN humain, l'AGT (*O*⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase), et permet d'effectuer un marquage sélectif et rapide d'une protéine d'intérêt. Le SNAP-tag est obtenu en utilisant cette enzyme modifiée, fusionnée à une protéine d'intérêt, pour former une protéine de fusion, qui reconnaît spécifiquement un dérivé *O*⁶-benzyle guanine. Un dérivé fluoré de la *O*⁶-(4-(aminométhyl)benzyl)guanine a alors été synthétisé afin de pouvoir appliquer cette technique de marquage de protéines, très utilisée en imagerie de fluorescence, à la radiochimie du fluor-18.

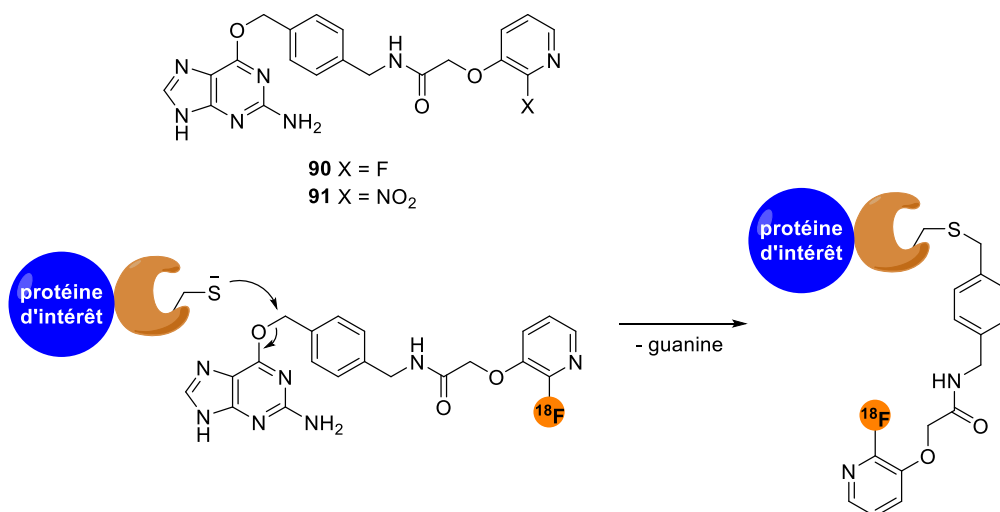


Figure 127. Synthèse d'un dérivé fluoré de *O*-benzyle guanine pour une application au fluor-18

Un premier essai de radiofluoration a été effectué avec le précurseur nitro- mais n'a pas permis d'obtenir des résultats satisfaisants. D'autres essais de radiochimie seront effectués, à la fois sur le précurseur nitro- et triméthylammonium.

5. Perspectives

Les méthodes et outils pour le radiomarquage prosthétique par CuAAC ou SPAAC développés dans ce travail de thèse seront appliqués à des peptides ou des protéines afin de démontrer leur utilisation pour des applications en imagerie *in vivo*. L'étude méthodologique sur le radiomarquage des pyridines sera poursuivie. Quant au marquage direct d'anticorps au fluor-18, n'accédant à leurs cibles qu'après un temps relativement long (24 à 48 heures), il n'est pas envisageable du fait de la courte demi-vie de ce dernier. Une stratégie de pré-ciblage sera alors envisagée pour pallier ce problème. Cette méthode consiste en l'injection d'un anticorps préalablement modifié dans un premier temps, puis après un temps de distribution suffisamment long pour laisser le temps à l'anticorps d'accéder à sa cible, à injecter « l'effecteur » contenant le radionucléide qui se fixera par réaction chimique ou enzymatique (Figure 58). La réaction de SPSAC pourrait être adaptée à une telle situation en fonctionnalisant l'anticorps avec une sydnone et en utilisant un effecteur radioactif de type cyclooctyne. L'approche enzymatique SNAP-Tag pourrait également être envisagée en réalisant la production recombinante de l'anticorps fusionné avec le SNAP et en utilisant un dérivé radiomarqué de la benzylguanine comme effecteur radioactif.

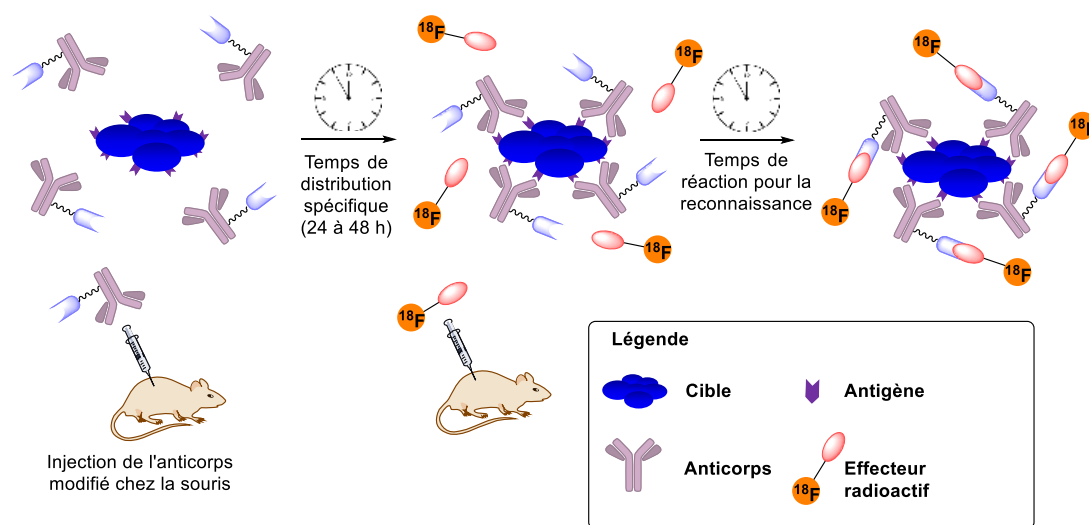


Figure 128. Stratégie de marquage d'anticorps par pré-ciblage

Experimental part

1. Organic synthesis

1.1. General information

All reactions sensitive to air and moisture were carried out under argon in dried glassware.

Reactants and solvents: Chemicals were purchased from Sigma-Aldrich, Acros and Fluorochem and used without further purification. Anhydrous solvents: 1,4-dioxane, acetonitrile, DCM, DMF, DMSO, THF, MeOH used without further purification. For every compounds, mass or volume (g, L), quantity (mol) and equivalents (eq) were given.

Purifications: Column chromatography were carried out on silica gel (Merck Kieselgel 60, grading 0.63-0.20 mm)[®] Rf (grading 35-70 μm).

Analysis:

Reactions were monitored by TLC carried out on silica gel 0,60F₂₅₄ (60 F254, Merck) using UV light (254 or 365 nm) as visualizing agent and 1 % ethanolic ninhydrin solution or a basic KMnO₄ aqueous solution as developing agent.

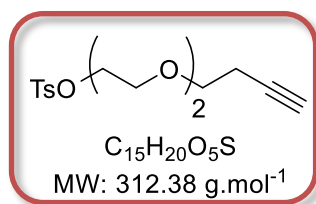
¹H NMR (400 MHz), ¹³C NMR (100 MHz) were measured on a Bruker Avance 400 MHz spectrometer at 23 °C. Proton and carbon chemical shifts (δ) are reported in parts per million (ppm) downfield from tetramethylsilane and are referenced to the proton resonance of the hydrogenated residue of the deuterated solvents CDCl₃ (CHCl₃, δ = 7.26 ppm), MeOD-*d*₄ (CHD₂OH, δ = 3.31 ppm), DMF-*d*₇ (DMF-*d*₆, δ = 8.03, 2.92, 2.75 ppm) or DMSO-*d*₆ (DMSO-*d*₅, δ = 2.50 ppm) for ¹H-NMR and the carbon resonance of CDCl₃ (δ = 77.2 ppm), MeOD-*d*₄ (δ = 49.0 ppm), DMF-*d*₇ (DMF-*d*₇, δ = 163.2, 34.9, 29.8 ppm), or DMSO-*d*₆ (δ = 49.0 ppm) for ¹³C-NMR. For ¹H-NMR, data are presented as follows: chemical shift, multiplicity (s: singlet; d: doublet; t: triplet; q: quadruplet; quint.: quintuplet; dd: doublet of doublet, dt: doublet of triplet; tp: triplet of doublet; ddd: doublet of doublet of doublet; m: multiplet; dm: doublet of multiplet; br. s: broad singlet, br. d: broad doublet), coupling constants (*J* in Hertz) and integration. For ¹³C-NMR, data are presented as follows: chemical shift, multiplicity (s: singlet; d: doublet; dm: doublet of multiplet), coupling constants (*J* in Hertz) and integration.

Melting points (Mp) were obtained on an electrothermal melting point apparatus IA9200 and are reported in °C.

The mass spectra (MS) were measured on a Thermo Electron (Les Ulis, France) Ion Trap LCQ Deca XP+ spectrometer (ESI+).

1.2. Experimental procedures

2-(2-(But-3-yn-1-yloxy)ethoxy)ethyl tosylate (**1**)



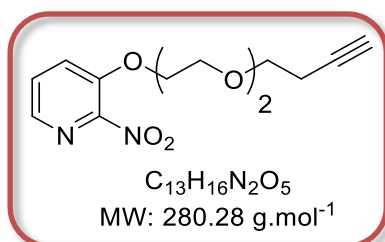
To a solution of 3-butyn-1-ol (216 μ L, 2.85 mmol, 1 eq) in anhydrous DMF (45 mL) were added sodium hydride (82 mg, 3.42 mmol, 1.2 eq) and diethylene glycol ditosylate (2.36 g, 5.71 mmol, 2 eq) under argon. The mixture was stirred 2 days at room temperature under argon, then water was added (80 mL) and the resulting mixture was filtered in order to recover starting material. The filtrate was then extracted with DCM (40 mL). The organic layers were combined, washed once with a saturated solution of sodium bicarbonate (40 mL), dried over Na_2SO_4 and concentrated under vacuum. The crude residue was purified by column chromatography (DCM/acetone 100/0 \rightarrow 95/5) to afford **1** (410 mg, 46 %) as a light yellow oil.

R_f (DCM/acetone 99/1): 0.28.

¹H NMR (CDCl₃; 400 MHz): δ 7.80 (d, ³J=8.4 Hz, 2H); 7.34 (d, ³J=8.4 Hz, 2H); 4.16 (t, ³J=4.8 Hz, 2H); 3.70 (t, ³J=4.8 Hz, 2H); 3.61-3.55 (m, 6H); 2.46 (td, ³J=6.8 Hz, ⁴J=2.8 Hz, 2H); 2.45 (s, 3H); 1.97 (t, ⁴J=2.8 Hz, 1H).

¹³C NMR (CDCl₃; 100 MHz): δ 144.7 (C); 132.9 (C); 129.8 (2xCH); 127.9 (2xCH); 81.1 (C); 70.5 (CH₂); 70.2 (CH₂); 69.3 (CH); 69.2 (CH₂); 69.2 (CH₂); 68.6 (CH₂); 21.6 (CH₃); 19.7 (CH₂).

3-(2-(2-(But-3-yn-1-yloxy)ethoxy)ethoxy)-2-nitropyridine (**2**)



To a solution of 3-hydroxy-2-nitropyridine (286.6 mg, 2.05 mmol, 1.3 eq) in anhydrous DMF (15 mL) was added sodium hydride (64.2 mg, 2.68 mmol, 1.7 eq). The mixture was stirred 1 hour at room temperature under argon and a solution of **1** (491 mg, 1.57 mmol, 1 eq) in DMF (2 mL) was added to the mixture. The solution was stirred 16 hours at 70 °C. After cooling at room temperature, water was added (50 mL) and the resulting solution was extracted three times with EtOAc (3x15 mL). The organic layers were combined, washed

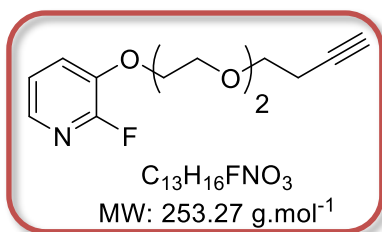
twice with sodium hydroxide 0.1 M (2x20 mL), once with water (20 mL), once with brine (20 mL), dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. The crude residue was purified by column chromatography (heptane/EtOAc 80/20 → 50/50) to afford **2** (311 mg, 71 %) as a light yellow oil.

Rf (heptane/EtOAc 1/1): 0.17.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.09 (dd, ³J=4.4 Hz, ⁴J=0.8 Hz, 1H); 7.60 (dd, ³J=7.6 Hz, ⁴J=0.8 Hz, 1H); 7.52 (dd, ³J=8.4 Hz, ⁴J=4.8 Hz, 1H); 4.30 (t, ³J=4.4 Hz, 2H); 3.89 (t, ³J=4.8 Hz, 2H); 3.70 (dd, ³J=6.4 Hz, ⁴J=3.6 Hz, 2H); 3.66 (m, 4H); 2.46 (td, ³J=6.8 Hz, ⁴J=2.4 Hz, 2H); 1.96 (t, ³J=2.8 Hz, 1H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 149.6 (C); 147.8 (C); 139.9 (CH); 129.0 (CH); 124.9 (CH); 81.8 (C); 71.5 (CH₂); 71.5 (CH₂); 70.8 (CH); 70.4 (CH₂); 69.8 (CH₂); 69.5 (CH₂); 20.2 (CH₂).

3-(2-(2-(But-3-yn-1-yloxy)ethoxy)ethoxy)-2-fluoropyridine (**3**)



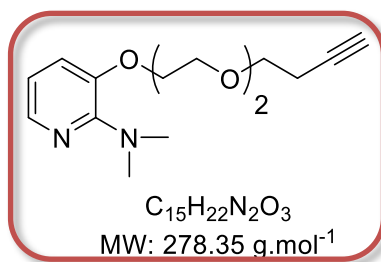
To a solution of **2** (150 mg, 0.54 mmol, 1 eq) in anhydrous DMF (15 mL) was added TBAF 1 M in THF (1.23 mL, 1.23 mmol, 2.3 eq) under argon. The reaction was stirred 2 days at 70 °C. After cooling at room temperature, water (50 mL) was added and the resulting solution was extracted three times with EtOAc (3x15 mL). The organic layers were combined, washed twice with sodium hydroxide 0.1 M (2x15 mL), once with water (15 mL), once with brine (15 mL), dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. The crude residue was purified by column chromatography (heptane/EtOAc 70/30) to afford **3** (63 mg, 47 %) as a yellow oil.

Rf (heptane/EtOAc 1/1): 0.37.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.74 (ddd, ³J=4.8 Hz, ⁴J=1.2 Hz, ⁴J_{H-F}=1.2 Hz, 1H); 7.32 (ddd, ⁴J_{H-F}=9.6 Hz, ³J=8.4 Hz, ⁴J=1.2 Hz, 1H); 7.09 (dd, ³J=8.4 Hz, ³J=4.8 Hz, 1H); 4.21 (t, ³J=4.8 Hz, 2H); 3.88 (t, ³J=4.8 Hz, 2H); 3.74-3.71 (m, 2H); 3.75-3.64 (m, 4H); 2.47 (td, ³J=6.8 Hz, ⁴J=2 Hz, 2H); 1.84 (t, ⁴J=2 Hz, 1H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 154.1 (C, d, ¹J_{C-F}=237 Hz); 142.4 (C, d, ²J_{C-F}=25 Hz); 137.8 (CH, d, ³J_{C-F}=13 Hz); 123.7 (CH, d, ³J_{C-F}=4 Hz); 121.8 (CH, d, ⁴J_{C-F}=4 Hz); 81.4 (C); 71.1 (CH₂); 70.5 (CH₂); 69.6 (CH); 69.3 (CH₂); 69.2 (CH₂); 58.9 (CH₂); 19.9 (CH₂).

3-(2-(2-(But-3-yn-1-yloxy)ethoxy)ethoxy)-*N,N*-dimethylpyridin-2-amine (4)



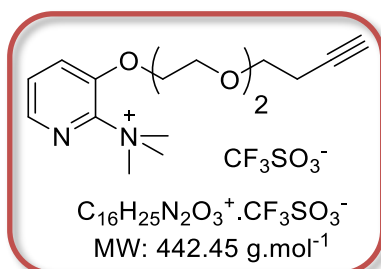
3 (150 mg, 0.59 mmol, 1 eq) and $NHMe_2$ 33 % in EtOH were mixed in EtOH (9 mL). The mixture was stirred 16 hours at 100 °C. After cooling at room temperature, water (30 mL) was added and the resulting solution was extracted three times with EtOAc (3x20 mL). The organic layers were combined and washed with brine (20 mL), dried over Na_2SO_4 and concentrated under vacuum. The crude residue was purified by column chromatography (DCM/acetone 100/0 → 95/5) to afford **4** (133 mg, 81 %) as a light yellow oil.

Rf (DCM/acetone 95/5): 0.51.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.84 (dd, ³J=4.8 Hz, ⁴J=1.4 Hz, 1H); 7.00 (dd, ³J=7.6 Hz, ⁴J=1.4 Hz, 1H); 6.71 (dd, ³J=7.6 Hz, ³J=4.8 Hz, 1H); 4.14-4.10 (m, 2H); 3.88 (t, ³J=4.8 Hz, 2H); 3.70-3.67 (m, 2H); 3.66-3.65 (m, 2H); 3.64-3.59 (m, 2H); 2.99 (s, 6H); 2.47 (td, ³J=6.8 Hz, ⁴J=2.4 Hz, 2H); 1.84 (t, ⁴J=2.4 Hz, 1H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 153.2 (C); 145.5 (C); 139.0 (CH); 118.9 (CH); 115.4 (CH); 81.1 (C); 70.6 (CH₂); 70.3 (CH₂); 69.6 (CH); 69.3 (CH₂); 69.2 (CH₂); 58.9 (CH₂); 40.9 (2xCH₃); 19.8 (CH₂).

3-(2-(2-(But-3-yn-1-yloxy)ethoxy)ethoxy)-*N,N,N*-trimethylpyridin-2-aminium (5)



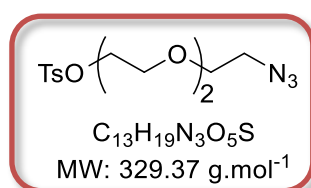
To a solution of **4** (50 mg, 0.18 mmol, 1 eq) in toluene (3 mL) was added methyl trifluoromethanesulfonate at 0 °C. The mixture was stirred 2 hours at room temperature, then toluene was removed under vacuum to afford **5** (48 mg, 91 %) as a brown oil without further purification.

Rf (DCM/MeOH 95/5): 0.08.

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 8.09 (dd, $^3J=4.2$ Hz, $^4J=1.2$ Hz, 1H); 7.67 (dd, $^3J=8.4$ Hz, $^4J=1.2$ Hz, 1H); 7.58 (dd, $^3J=8.4$ Hz, $^3J=4.2$ Hz, 1H); 4.44 (t, $^3J=4.2$ Hz, 2H); 3.98-3.95 (m, 2H); 3.74 (s, 9H); 3.72-3.68 (m, 2H); 3.64-3.62 (m, 4H); 3.57 (t, $^3J=6.8$ Hz, 2H); 2.42 (td, $^3J=6.8$ Hz, $^4J=2.8$ Hz, 1H).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ 147.3 (C); 142.8 (C); 138.9 (CH); 128.5 (CH); 124.9 (CH); 120.4 (C, d, $^1J_{\text{C-F}}=317.9$ Hz); 81.4 (CH); 70.4 (CH_2); 70.2 (CH_2); 69.4 (CH); 69.2 (CH_2); 68.8 (CH_2); 58.8 (CH_2); 54.2 ($3\times\text{CH}_3$); 19.6 (CH_2).

2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethyl tosylate (**6**)



To a solution of triethylene glycol di(p-toluenesulfonate) (2.8 g, 6.11 mmol, 1 eq) in anhydrous DMF (140 mL), was gradually added 0.2 eq. of sodium azide (318 mg, 4.88 mmol, 1 eq) every 2 hours. The mixture was stirred 16 hours at room temperature under Argon, then water (200 mL) was added. The resulting solution was extracted twice with EtOAc (2x100 mL) and the organic layers were combined, washed twice with water (2x100 mL), twice with sodium bicarbonate (2x50 mL) and once with brine (50 mL), dried over Na_2SO_4 and concentrated under vacuum. The crude residue was purified by column chromatography (heptane/EtOAc 80/20 \rightarrow 70/30) to afford **6** (905 mg, 45 %) as a yellow oil.

To a solution of **11** (8.00 g, 45.66 mmol, 1 eq) in anhydrous DCM (40 mL) was added TsCl (9.58 g, 50.23 mmol, 1.1 eq), Et_3N (7.00 mL, 50.23 mmol, 1.1 eq) and DMAP (0.56 g, 4.57 mmol, 0.1 eq). The mixture was stirred 16 hours at room temperature, then a solution of saturated NH_4Cl (40 mL) was added and the resulting mixture was extracted twice with DCM (2x50 mL). The organic layers were combined, dried over Na_2SO_4 and concentrated under vacuum to afford **6** (1.37 g, 73 %) as a pale yellow oil.

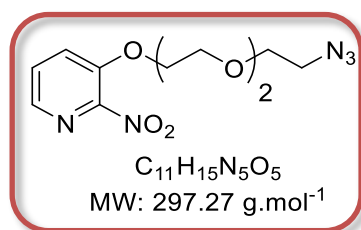
Rf (heptane/EtOAc 1/1): 0.27.

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.77 (d, $^3J=8.4$ Hz, 2H); 7.32 (d, $^3J=8.4$ Hz, 2H); 4.14 (t, $^3J=4.8$ Hz, 2H); 3.68 (t, $^3J=4.8$ Hz, 2H); 3.62 (t, $^3J=5.1$ Hz, 2H); 3.59-3.55 (m, 4H); 3.34 (t, $^3J=5.1$ Hz, 2H); 2.42 (s, 3H).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ 144.8 (C); 132.9 (C); 129.7 (2xCH); 127.9 (2xCH); 70.7 (CH_2); 70.5 (CH_2); 70.0 (CH_2); 69.2 (CH_2); 68.7 (CH_2); 50.6 (CH_2); 21.5 (CH_3).

LCMS (ESI): m/z : 352 [$\text{M}+\text{Na}$]⁺.

3-(2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)-2-nitropyridine (7)



To a solution of 3-hydroxy-2-nitropyridine (191.6 mg, 1.37 mmol, 1.5 eq) in anhydrous DMF (15 mL) was added potassium carbonate (252 mg, 1.83 mmol, 2 eq). The mixture was stirred 20 min at room temperature under argon and a solution of **6** (300 mg, 0.912 mmol, 1 eq) in DMF (5 mL) was added to the mixture. The solution was stirred 16 hours at 90 °C. After cooling at room temperature, water was added (50 mL) and the resulting solution was extracted twice with EtOAc (2x20 mL). The organic layers were combined and washed twice with sodium hydroxide 0.1 M (2x30 mL), once with water (20 mL), once with HCl 1 M (20 mL), once with brine (20 mL), dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. The crude residue was purified by column chromatography (heptane/EtOAc 80/20 -> 50/50) to afford **7** (248 mg, 92 %) as a white powder.

Mp: 50-53 °C.

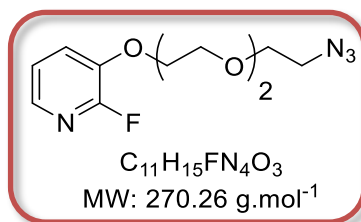
Rf (heptane/EtOAc 1/1): 0.14.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.09 (dd, ³J=4.4 Hz, ⁴J=1.0 Hz, 1H); 7.59 (dd, ³J=8.4 Hz, ⁴J=1.0 Hz, 1H); 7.52 (dd, ³J=8.4 Hz, ⁴J=4.4 Hz, 1H); 4.30 (t, ³J=4.4 Hz, 2H); 3.90 (t, ³J=4.8 Hz, 2H); 3.71 (dd, ³J=6.4 Hz, ⁴J=3.6 Hz, 2H); 3.66 (m, 4H); 3.38 (t, ³J=5.2 Hz, 2H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 149.1 (C); 147.2 (C); 139.3 (CH); 128.5 (CH); 124.3 (CH); 71.0 (CH₂); 70.5 (CH₂); 69.9 (CH₂); 69.7 (CH₂); 69.2 (CH₂); 50.6 (CH₂).

LCMS (ESI): *m/z*: 320 [M+Na]⁺.

3-(2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)-2-fluoropyridine (8)



To a solution of **7** (150 mg, 0.51 mmol, 1 eq) in anhydrous DMF (10 mL) was added TBAF 1 M in THF (1.16 mL, 1.16 mmol, 2.3 eq) under argon. The mixture was stirred 16 hours at 70 °C. After cooling at room temperature, water (30 mL) was added and the resulting solution was extracted three times with EtOAc (3x15 mL). The organic layers were combined, washed twice with sodium hydroxide 0.1 M (2x10 mL), once with water (10 mL), once with brine

(10 mL), dried over Na_2SO_4 and concentrated under vacuum. The crude residue was purified by column chromatography (heptane/EtOAc 70/30) to afford **8** (90 mg, 66 %) as a yellow oil.

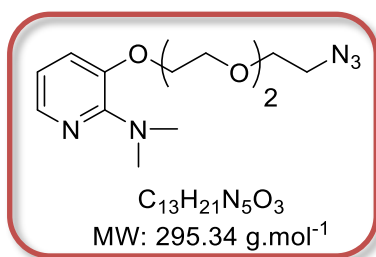
Rf (heptane/EtOAc 1/1): 0.42.

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.75 (ddd, $^3J=4.8$ Hz, $^4J=1.6$ Hz, $^4J_{\text{H-F}}=1.6$ Hz, 1H); 7.33 (ddd, $^4J_{\text{H-F}}=10.1$ Hz, $^3J=7.6$ Hz, $^4J=1.6$ Hz, 1H); 7.10 (dd, $^3J=7.6$ Hz, $^3J=4.8$ Hz, 1H); 4.21 (t, $^3J=4.8$ Hz, 2H); 3.90 (t, $^3J=4.8$ Hz, 2H); 3.76-3.74 (m, 2H); 3.70-3.67 (m, 4H); 3.39 (t, $^3J=4.8$ Hz, 2H).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ 153.8 (C, d, $^1J_{\text{C-F}}=237.0$ Hz); 142.1 (C, d, $^2J_{\text{C-F}}=25.3$ Hz); 137.6 (CH, d, $^3J_{\text{C-F}}=13.3$ Hz); 123.3 (CH, d, $^3J_{\text{C-F}}=4.3$ Hz); 121.6 (CH, d, $^4J_{\text{C-F}}=4.3$ Hz); 70.9 (CH_2); 70.6 (CH_2); 70.0 (CH_2); 69.4 (CH_2); 69.0 (CH_2); 50.6 (CH_2).

LCMS (ESI): m/z : 271 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3-(2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)-*N,N*-dimethylpyridin-2-amine (**9**)



8 (50 mg, 0.185 mmol, 1 eq) and NHMe_2 33 % in EtOH were mixed in EtOH (5 mL, large excess), then the mixture was stirred 16 hours at 100 °C. After cooling at room temperature, the solvent was removed under vacuum. The crude residue was purified by column chromatography (toluene/EtOAc 50/50) to afford **9** (48 mg, 88 %) as a yellow oil.

To a solution of **12** (1.260 g, 18.24 mmol, 1.5 eq) in anhydrous DMF (30 mL) were added K_2CO_3 (1.680 g, 24.32 mmol, 2 eq) and **6** (2.000 g, 6.079 mmol, 1 eq). The mixture was stirred 16 hours at 90 °C. After cooling at room temperature, the solvent was removed under vacuum. The crude residue was purified by column chromatography (toluene/EtOAc 50/50) to afford **9** (1.017 g, 57 %) as a yellow oil.

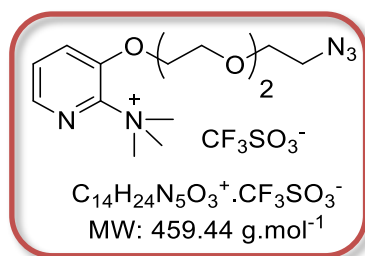
Rf (heptane/EtOAc 1/1): 0.33.

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.84 (dd, $^3J=4.8$ Hz, $^4J=1.2$ Hz, 1H); 7.01 (dd, $^3J=7.6$ Hz, $^4J=1.2$ Hz, 1H); 6.72 (dd, $^3J=7.6$ Hz, $^3J=4.8$ Hz, 1H); 4.13 (t, $^3J=4.8$ Hz, 2H); 3.90 (t, $^3J=4.8$ Hz, 2H); 3.74-3.71 (m, 2H); 3.68-3.65 (m, 4H); 3.38 (t, $^3J=4.8$ Hz, 2H); 3.00 (s, 6H).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ 150.2 (C); 142.4 (C); 136.1 (CH); 116.0 (CH); 112.3 (CH); 67.7 (CH_2); 67.6 (CH_2); 67.0 (CH_2); 66.6 (CH_2); 64.6 (CH_2); 47.6 (CH_2); 37.7 ($2\times\text{CH}_3$).

LCMS (ESI): m/z : 296 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3-(2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)-*N,N,N*-trimethylpyridin-2-aminium (10)



To a solution of **9** (60 mg, 0.20 mmol, 1 eq) in toluene (3 mL) was added methyl trifluoromethanesulfonate at 0 °C. The mixture was stirred 2 hours at room temperature, then toluene was removed under vacuum to afford **10** (100 mg, 100 %) as a brown oil without further purification.

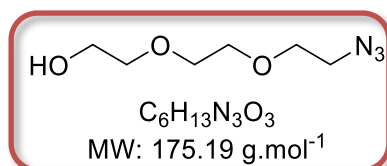
Rf (DCM/MeOH 95/5): 0.19.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.09 (dd, ³J=4.4 Hz, ⁴J=1.2 Hz, 1H); 7.67 (dd, ³J=8.4 Hz, ⁴J=1.2 Hz, 1H); 7.58 (dd, ³J=8.4 Hz, ³J=4.4 Hz, 1H); 4.43 (t, ³J=4 Hz, 2H); 3.97 (t, ³J=4 Hz, 2H); 3.74 (s, 9H); 3.73-3.69 (m, 2H); 3.66-3.58 (m, 4H); 3.37 (t, ³J=4.8 Hz, 2H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 147.3 (C); 142.9 (C); 139.0 (CH); 128.4 (CH); 124.7 (CH); 120.6 (C, d, ¹J_{C-F}=318.0 Hz); 70.5 (CH₂); 70.4 (CH₂); 69.8 (CH₂); 69.4 (CH₂); 68.5 (CH₂); 54.2 (3xCH₃); 50.6 (CH₂).

LCMS (ESI): m/z: 310 [M]⁺.

2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethan-1-ol (11)



Compound **11** was synthesized according to a reported procedure.¹⁸⁴

To a solution of 2-(2-(2-chloroethoxy)ethoxy)ethan-1-ol (4.31 mL, 29.65 mmol, 1 eq) in anhydrous DMF (25 mL) was added sodium azide (3.85 g, 59.30 mmol, 2 eq). The mixture was stirred 5 hours at 100 °C. After cooling at room temperature, water (50 mL) was added and the resulting solution was extracted twice with DCM (2x30 mL). The organic layers were combined, washed with brine (30 mL), dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum to afford **11** (5.72 g, 100 %) as a pale yellow oil.

To a solution of 2-(2-(2-chloroethoxy)ethoxy)ethan-1-ol (4.31 mL, 29.65 mmol, 1 eq) in H₂O (25 mL) was added sodium azide (3.85 g, 59.30 mmol, 2 eq). The mixture was stirred 1 day at 75 °C. After cooling at room temperature, water was removed under vacuum and co-

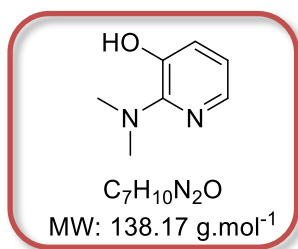
evaporated three times with toluene. The resulting solution was recovered in Et₂O (50 mL) and filtered. The filtrate was concentrated under vacuum to afford **11** (5.22 g, 91 %) as a colourless oil.

Rf (DCM/MeOH 9/1): 0.63.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 3.75-3.59 (m, 10H); 3.39 (t, ³J=4.8 Hz, 2H); 2.50 (br. s, 1H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 72.4 (CH₂); 70.5 (CH₂); 70.2 (CH₂); 69.9 (CH₂); 61.6 (CH₂); 50.5 (CH₂).

2-(Dimethylamino)-3-hydroxypyridine (**12**)



To a solution of 2-amino-3-hydroxypyridine (2.00 g, 18.1 mmol, 1 eq) in MeCN (30 mL) were successively added a 36 % aqueous formaldehyde solution (13.9 mL, 181 mmol, 10 eq), acetic acid (1.04 mL, 18.1 mmol, 1 eq) and NaBH₃CN (3.42 g, 54.5 mmol, 3 eq) at 0 °C and the resulting mixture was stirred 72 hours at room temperature. A saturated solution of NaHCO₃ (50 mL) was added and the mixture was extracted with EtOAc (3x40 mL). The organic layers were combined, dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. The crude residue was purified by column chromatography (heptane/EtOAc 90/10 → 70/30) to afford **12** (1.82 g, 72 %) as a white solid.

Mp: 51.0-53.2 °C.

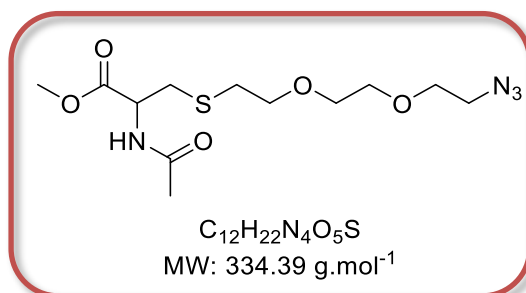
Rf (heptane/EtOAc 1/1): 0.49.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.89 (dd, ³J=4.8 Hz, ⁴J=1.6 Hz, 1H); 7.15 (dd, ³J=8.0 Hz, ⁴J=1.6 Hz, 1H); 6.94 (dd, ³J=8.0 Hz, ³J=4.8 Hz, 1H); 5.38 (br. s, 1H); 2.78 (s, 6H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 152.9 (C); 145.6 (C); 139.0 (CH); 121.7 (CH); 120.4 (CH); 42.2 (2xCH₃).

LCMS (ESI): m/z: 139 [M+H]⁺.

Methyl *N*-acetyl-S-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethyl)cysteinate (13)



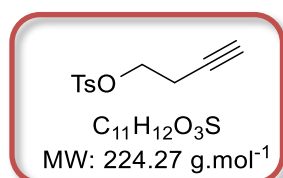
To a solution of *N*-acetyl-*L*-cysteine methyl ester (177 mg, 1.00 mmol, 1 eq) in anhydrous DMF (1 mL) were added **6** (329 mg, 1.00 mmol, 1 eq) and K₂CO₃ (166 mg, 1.20 mmol, 1.2 eq). The mixture was stirred 4 hours at 50 °C. After cooling at room temperature the mixture was concentrated under vacuum and co-evaporated twice with heptane/toluene 1/1 (2x5 mL). The crude residue was purified by column chromatography (heptane/EtOAc 65/35 → 60/40) to afford **13** (244 mg, 73 %) as a colourless oil.

Rf (heptane/acetone 1/1): 0.37.

¹H NMR (CDCl₃; 400 MHz): δ 6.54 (d, ³J=7.6 Hz, 1H); 4.83 (dt, ³J=7.6 Hz, ³J=5.2 Hz, 1H); 3.77 (s, 3H); 3.70-3.62 (m, 8H); 3.40 (t, ³J=5.2 Hz, 2H); 3.05 (split quartet AB, ²J=13.5 Hz, ³J=5.2 Hz, 2H); 2.79-2.67 (m, 2H); 2.05 (s, 3H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 171.2 (C); 169.8 (C); 71.0 (CH₂); 70.5 (CH₂); 70.3 (CH₂); 69.9 (CH₂); 52.5 (CH); 52.2 (CH₃); 50.6 (CH₂); 34.5 (CH₂); 32.2 (CH₂); 23.0 (CH₃).

But-3-yn-1-yl tosylate (14)



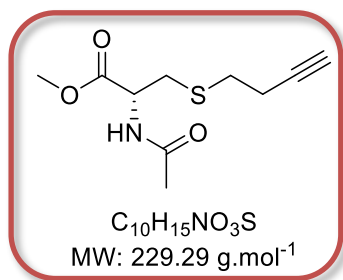
To a solution of 3-butyn-1-ol (1.08 mL, 14.27 mmol, 1 eq) in DCM (40 mL) was added p-toluenesulfonyl chloride (3.27 g, 17.12 mmol, 1.2 eq) and triethylamine (5.78 mL, 42.80 mmol, 3 eq). The mixture was stirred 2 days at room temperature under argon. Water was added (20 mL). The resulting solution was extracted three times with DCM (3x15 mL). The organic layers were combined and washed three times with HCl 1 M (3x20 mL), twice with water (2x20 mL), dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. The crude residue was purified by column chromatography (heptane/EtOAc 90/10) to afford but-3-yn-1-yl tosylate (2.54 g, 79 %) as a light yellow oil.

Rf (heptane/EtOAc 7/3): 0.51.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.80 (d, $^3J=8.0$ Hz, 2H); 7.35 (d, $^3J=8.0$ Hz, 2H); 4.10 (t, $^3J=6.8$ Hz, 2H); 2.55 (dt, $^3J=6.8$ Hz, $^4J=2.4$ Hz, 2H); 2.45 (s, 3H); 1.97 (t, $^4J=2.4$ Hz, 1H).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ 145.0 (C); 132.6 (C); 129.9 (2xCH); 127.8 (2xCH); 78.4 (C); 70.7 (CH); 67.5 (CH₂); 21.5 (CH₃); 19.3 (CH₂).

Methyl *N*-acetyl-*S*-(but-3-yn-1-yl)cysteinate (**15**)



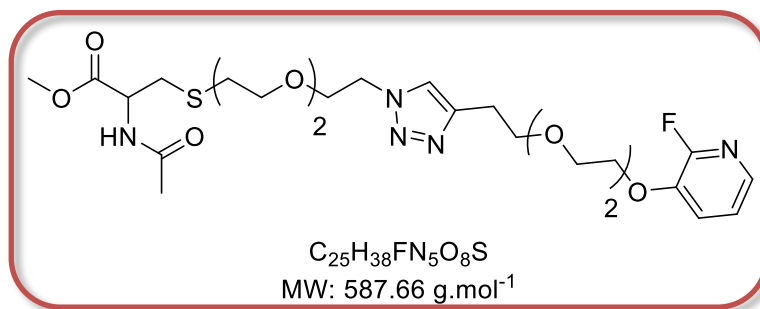
To a solution of *N*-acetyl-*L*-cysteine methyl ester (500 mg, 2.82 mmol, 1 eq) in anhydrous DMF (30 mL) were added sodium hydride (81 mg, 3.39 mmol, 1.2 eq) and but-3-yn-1-yl tosylate (759mg, 3.39 mmol, 1.2 eq). The mixture was stirred 1.5 day at room temperature under argon, then water (50 mL) was added and the resulting solution was extracted three times with EtOAc (3x30 mL). The organic layers were combined, washed with sodium hydroxide 0.1 M (20 mL), once with water (20 mL), once with brine (20 mL), dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. The crude residue was purified by column chromatography (DCM 100 %) to afford **15** (348 mg, 54 %) as a pale yellow oil.

R_f (DCM/acetone 95/5): 0.23.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 6.40 (d, $^3J=7.4$ Hz, 1H); 4.82 (dt, $^3J=7.4$ Hz, $^3J=5.0$ Hz, 1H); 3.76 (s, 3H); 3.04 (split quartet AB, $^2J=13.5$ Hz, $^3J=5.0$ Hz, 2H); 2.67 (t, $^3J=7.2$ Hz, 2H); 2.45 (td, $^3J=7.2$ Hz, $^4J=2.8$ Hz, 2H); 2.04 (s, 3H); 2.02 (t, $^4J=2.8$ Hz, 1H).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ 171.2 (C); 170.1 (C); 82.1 (C); 69.7 (CH); 52.5 (CH); 51.8 (CH₃); 33.9 (CH₂); 31.2 (CH₂); 22.8 (CH₃); 19.6 (CH₂).

LCMS (ESI): *m/z*: 230 [M+H]⁺, 252 [M+Na]⁺.

Methyl N-acetyl-S-(2-(2-(2-(4-(2-(2-(2-((2-fluoropyridin-3-yl)oxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)ethoxy)ethoxy)ethyl)cysteinate (16)

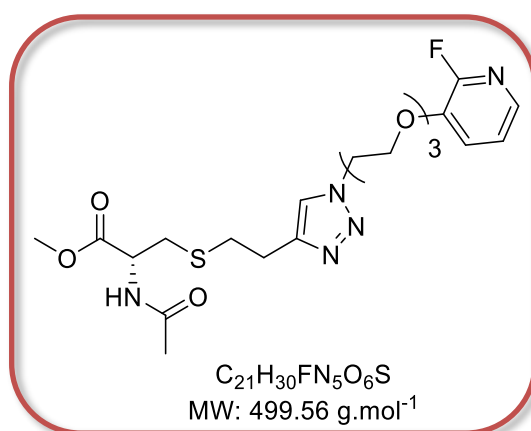
To a solution of **13** (33 mg, 0.10 mmol, 1 eq) and FPyKYNE (25 mg, 0.10 mmol, 1 eq) in *t*BuOH (0.5 mL) was added a solution of CuSO₄ in water (1.6 mg in 0.5 mL, prepared from a larger solution). Sodium ascorbate (40 mg, 0.20 mmol, 2 eq) was then added and the mixture was stirred 4 hours at room temperature. The mixture was concentrated, then the residue dissolved in DCM (5 mL) and added to a saturated solution of NH₄Cl (5 mL). The aqueous layer was extracted twice with DCM (2x5 mL). The organic layers were combined, dried over Na₂SO₄ and concentrated and the crude residue was purified by column chromatography (DCM/MeOH 97.5/2.5 → 95/5) to afford **16** (50 mg, 85 %) as a colourless oil.

R_f (toluene/EtOAc 1/5): 0.30.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.75 (dt, ³J=4.8 Hz, ⁴J=1.6 Hz, 1H); 7.57 (s, 1H); 7.33 (ddd, *J*_{H-F}=9.6 Hz, ³J=7.8 Hz, ⁴J=1.6 Hz, 1H); 7.10 (dd, ³J=7.8 Hz, ³J=4.8 Hz, 1H); 6.62 (d, ³J=7.8 Hz, 1H); 4.82 (dt, ³J=7.8 Hz, ³J=5.2 Hz, 1H); 4.50 (t, ³J=5.2 Hz, 2H); 4.21 (t, ³J=4.4 Hz, 2H); 3.89-3.85 (m, 4H); 3.78-3.71 (m, 4H); 3.76 (s, 3H); 3.66-3.56 (m, 8H); 3.08-2.98 (m, 4H); 2.76-2.65 (m, 2H); 2.04 (s, 3H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 171.2 (C); 169.9 (C); 153.8 (C, d, ¹J_{C-F}=237.8 Hz); 144.8 (C); 142.1 (C, d, ²J_{C-F}=25.9 Hz); 137.6 (CH, d, ³J_{C-F}=13.0 Hz); 123.4 (CH, d, ³J_{C-F}=3.8 Hz); 122.8 (C); 121.7 (CH, d, ⁴J_{C-F}=3.8 Hz); 70.8 (2xCH₂); 70.4 (CH₂); 70.2 (2xCH₂); 70.1 (CH₂); 69.5 (CH₂); 69.4 (CH₂); 69.0 (CH₂); 52.6 (CH); 52.2 (CH₃); 50.0 (CH₂); 34.6 (CH₂); 32.3 (CH₂); 26.4 (CH₂); 23.0 (CH₃).

Methyl *N*-acetyl-S-(2-(1-(2-(2-(2-((2-fluoropyridin-3-yl)oxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)ethyl)-L-cysteinate (17)



To a solution of **8** (58.9 mg, 0.22 mmol, 1 eq) in a mixture solution of H₂O/tBuOH 1/1 (5 mL) were added **15** (50.0 mg, 0.22 mmol, 1 eq), CuSO₄ (3.5 mg, 0.022 mmol, 0.1 eq) and sodium ascorbate (86.4 mg, 0.44 mmol, 2 eq) successively to the solution. The mixture was stirred 6 hours at room temperature, concentrated, then DCM (5 mL) and a saturated solution of NH₄Cl (10 mL) were added and the resulting solution was extracted twice with DCM (2x5 mL). The organic layers were combined, dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. The crude residue was purified by column chromatography (DCM/MeOH 100/0 -> 98/2) to afford **17** (62 mg, 57 %) as a pale yellow oil.

Rf (toluene/MeOH 8/2): 0.39.

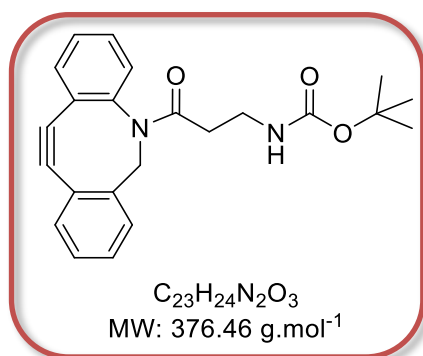
¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.74 (dt, ³J=4.8 Hz, ⁴J=1.6 Hz, 1H); 7.53 (s, 1H); 7.31 (ddd, *J*_{H-F}=9.6 Hz, ³J=8.0 Hz, ⁴J=1.6 Hz, 1H); 7.10 (dd, ³J=8.0 Hz, ³J=4.8 Hz, 1H); 6.68 (d, ³J=7.8 Hz, 1H); 4.81 (dt, ³J=7.8 Hz, ³J=5.0 Hz, 1H); 4.50 (t, ³J=5.0 Hz, 2H); 4.18 (t, ³J=4.8 Hz, 2H); 3.87-3.82 (m, 4H); 3.73 (s, 3H); 3.69-3.66 (m, 2H); 3.62-3.59 (m, 2H); 2.99-2.97 (m, 2H); 2.95-2.91 (m, 2H); 2.86-2.83 (m, 2H); 2.04 (s, 3H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 171.2 (C); 170.0 (C); 153.8 (C, d, ¹J_{C-F}=237.0 Hz); 142.0 (C, d, ²J_{C-F}=25.9 Hz); 137.7 (CH, d, ³J_{C-F}=13.0 Hz); 128.7 (CH); 123.3 (CH, d, ³J_{C-F}=4.6 Hz); 121.7 (CH, d, ⁴J_{C-F}=3.8 Hz); 70.8 (CH₂); 70.5 (CH₂); 69.5 (CH₂); 69.4 (CH₂); 69.0 (CH₂); 52.6 (CH₃); 52.0 (CH); 50.2 (CH₂); 34.0 (CH₂); 32.2 (CH₂); 25.9 (CH₂); 23.0 (CH₃).

LCMS (ESI): *m/z*: 500 [M+H]⁺, 522 [M+Na]⁺.

One CH on ¹³C NMR spectra is not distinguishable and could not be correctly assigned.

***N*-(3-Boc-aminopropionyl)-5,6-dihydro-11,12-didehydrodibenzo[*b,f*]azocine (18)**



To a solution of **DBCO-amine** (20 mg, 0.07 mmol, 1 eq) in anhydrous DCM (1 mL) was added di-*tert*-butyl dicarbonate (32 mg, 0.14 mmol, 2 eq). The mixture was stirred 2 hours at room temperature and then concentrated under vacuum. Due to the rest of Boc₂O, the crude residue was purified by column chromatography (heptane/EtOAc 90/10 → 70/30) to afford **18** (22mg, 84 %) as a pale yellow oil.

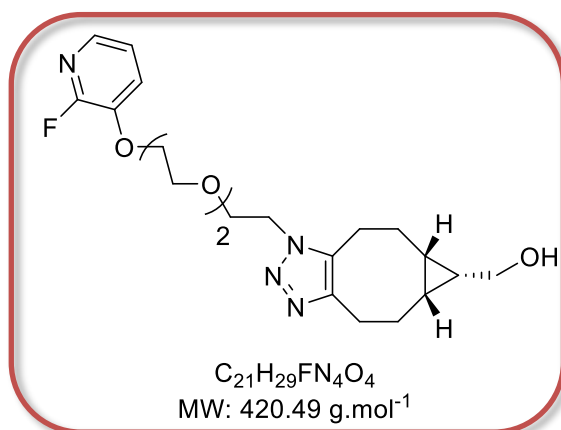
Rf (heptane/EtOAc 1/1): 0.42.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.67 (d, ³J=7.2 Hz, 1H); 7.40-7.27 (m, 7H); 5.14 (d, ²J=14.0 Hz, 1H); 3.69 (d, ²J=14.0 Hz, 1H); 3.26-3.08 (m, 2H); 2.48 (ddd, ²J=16.4 Hz, ³J=7.6 Hz, ³J=4.0 Hz, 1H); 1.93 (ddd, ²J=16.4 Hz, ³J=6.0 Hz, ³J=4.0 Hz, 1H); 1.38 (s, 9H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 172.2 (C); 155.8 (C); 151.1 (C); 147.9 (C); 132.0 (CH); 129.0 (CH); 128.5 (CH); 128.4 (CH); 128.2 (CH); 127.8 (CH); 127.1 (CH); 125.6 (CH); 122.9 (C); 122.5 (C); 114.9 (C); 107.6 (C); 78.9 (C); 55.4 (CH₂); 36.4 (CH₂); 35.0 (CH₂); 28.3 (3xCH₃).

LCMS (ESI): *m/z*: 377 [M+H]⁺, 399 [M+Na]⁺.

((5aR,6S,6aS)-1-(2-(2-(2-((2-fluoropyridin-3-yl)oxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-1,4,5,5a,6,6a,7,8-octahydrocyclopropa[5,6]cycloocta[1,2-d][1,2,3]triazol-6-yl)methanol (19)



To a solution of **8** (11 mg, 0.04 mmol, 1 eq) in anhydrous DCM (0.2 mL) was added (1*R*,8*S*,9*S*)-bicyclo[6.1.0]non-4-yn-9-ylmethanol (5.9 mg, 0.04 mmol, 1 eq). The mixture was stirred 4 hours at room temperature, then solvent was removed under vacuum. The crude residue was purified by column chromatography (heptane/acetone 100/0 → 30/70) to afford **19** (16 mg, quant.) as a colourless oil.

Rf (heptane/acetone 1/1): 0.23.

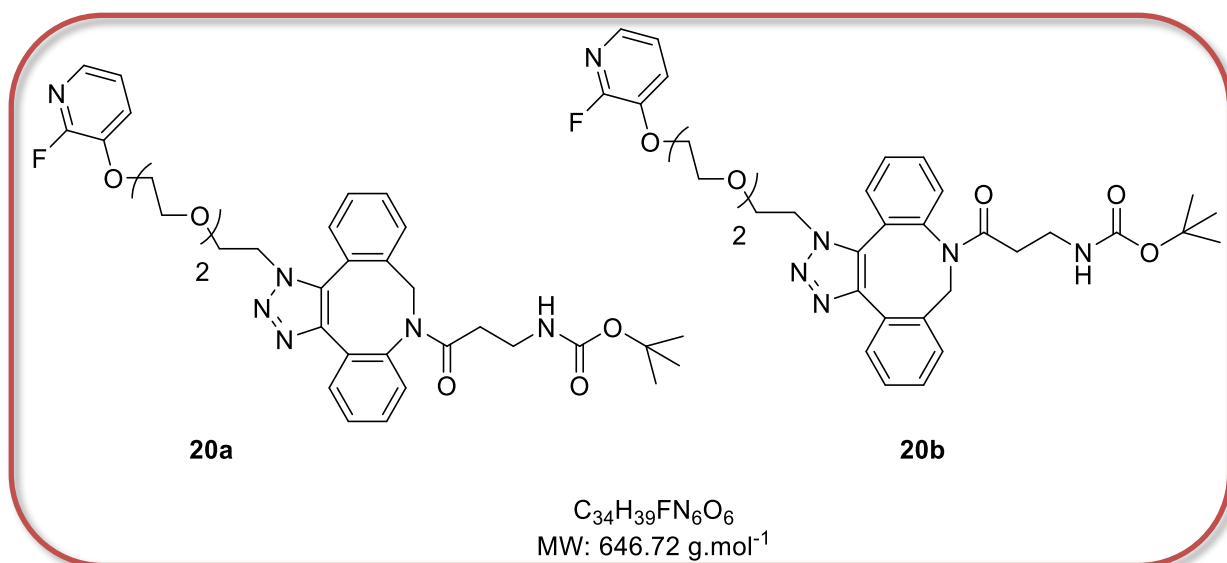
¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.74 (ddd, ³*J*=4.8 Hz, ⁴*J*=1.6 Hz, *J*_{H-F}=1.6 Hz, 1H); 7.31 (ddd, *J*_{H-F}=10.0 Hz, ³*J*=7.6 Hz, ⁴*J*=1.6 Hz, 1H); 7.11 (ddd, ³*J*=7.6 Hz, ³*J*= 4.8 Hz, *J*_{H-F}=0.4 Hz, 1H); 4.40 (td, ³*J*=5.0 Hz, *J*_{H-F}=2.0 Hz, 2H); 4.17 (t, *J*=5.0 Hz, 2H); 3.86-3.79 (m, 4H); 3.77-3.54 (m, 6H); 3.10 (ddd, ²*J*=15.6 Hz, ³*J*=8.0 Hz, ⁴*J*=3.6 Hz, 1H); 2.99 (ddd, ²*J*=16.0 Hz, ³*J*=7.2 Hz, ⁴*J*=3.2 Hz, 1H); 2.84 (ddd, ²*J*=15.6 Hz, ³*J*=9.2 Hz, ⁴*J*=3.6 Hz, 1H); 2.69 (ddd, ²*J*=16.0 Hz, ³*J*=10.4 Hz, ⁴*J*=3.2 Hz, 1H); 2.29-2.16 (m, 2H); 1.60-1.46 (m, 2H); 1.18 (q^t, ³*J*=8.4 Hz, 1H); 1.09-0.94 (m, 2H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 153.8 (C, d, ¹*J*_{C-F}=237 Hz); 144.5 (C); 142.1 (C, d, ²*J*_{C-F}=25.0 Hz); 137.6 (CH, d, ³*J*_{C-F}=13.0 Hz); 134.3 (C); 123.2 (CH, d, ³*J*_{C-F}=3.8 Hz); 121.7 (CH, d, ⁴*J*_{C-F}=3.8 Hz); 70.8 (CH₂); 70.5 (CH₂); 70.2 (CH₂); 69.4 (CH₂); 68.9 (CH₂); 59.7 (CH₂); 47.8 (CH₂); 25.9 (CH₂); 23.0 (CH₂); 22.8 (CH₂); 22.3 (CH₂); 21.2 (CH); 19.9 (CH); 19.5 (CH).

LCMS (ESI): *m/z*: 421 [M+H]⁺.

tert-Butyl (3-(1-(2-(2-(2-((2-fluoropyridin-3-yl)oxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-1,9-dihydro-8H-dibenzo[b,f][1,2,3]triazolo[4,5-d]azocin-8-yl)-3-oxopropyl)carbamate (20a)/

tert-Butyl (3-(3-(2-(2-(2-((2-fluoropyridin-3-yl)oxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-3,9-dihydro-8H-dibenzo[b,f][1,2,3]triazolo[4,5-d]azocin-8-yl)-3-oxopropyl)carbamate (20b)



To a solution of **18** (9.4 mg, 0.02 mmol, 1 eq) in anhydrous DCM (0.2 mL) was added **8** (7.0 mg, 0.02 mmol, 1 eq). The mixture was stirred 5 hours at room temperature, then solvent was removed under vacuum. The crude residue was purified by column chromatography (DCM/MeOH 100/0 → 98/2) to afford **20** and **20b** (10 mg, 62 %) as a pale yellow oil.

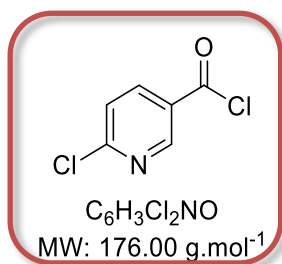
Rf (DCM/MeOH 95/5): 0.51.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): 7.77-7.28 (m, 14H); 7.21-6.98 (m, 8H); 6.07 (d, ²J=16.4 Hz, 2H); 5.09 (t, ³J=5.8 Hz, 1H); 5.03 (t, ³J=5.8 Hz, 1H); 4.68-3.57 (m, 26H); 3.18-3.02 (m, 4H); 2.07-1.93 (m, 2H); 1.77-1.66 (m, 2H); 1.40 (s, 18H).

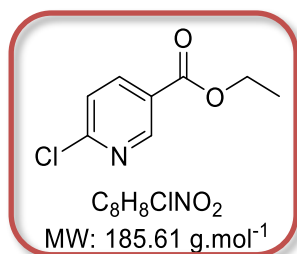
The ¹H NMR signals of compounds **20a** and **20b** are not all distinguishable.

The ¹³C NMR signals of compounds **20a** and **20b** are not all distinguishable and could not be correctly assigned.

LCMS (ESI): m/z: 647 [M+H]⁺, 669 [M+Na]⁺.

6-Chloronicotinoyl chloride (28)

$SOCl_2$ (5 mL) was directly added to the solid 6-chloronicotinic acid (1.00 g, 6.37 mmol, 1 eq). The mixture was stirred 2 hours at 80 °C. After cooling at room temperature, $SOCl_2$ was removed under vacuum to afford 6-chloronicotinoyl chloride (quant.) as a pale yellow oil.

Ethyl 6-chloronicotinate (21c)

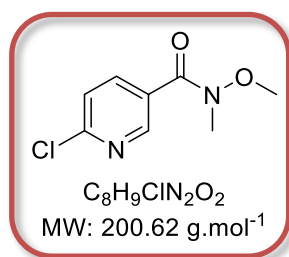
To a solution of Et_3N (0.89 mL, 6.37 mmol, 1 eq) in EtOH (30 mL) at 0 °C was slowly added 6-chloronicotinoyl chloride (1.12 g, 6.37 mmol, 1 eq). The mixture was stirred 6 hours at room temperature, then solvent was removed under vacuum, water (40 mL) was added and the resulting solution was extracted twice with EtOAc (2x30 mL). The organic layers were combined, washed with 10 % $NaHCO_3$ aqueous solution (30 mL), dried over Na_2SO_4 and concentrated under vacuum. The crude residue was purified by column chromatography (heptane/EtOAc 80/20) to afford **21c** (0.97 g, 82 %) as a yellow oil.

Rf (heptane/EtOAc 1/1): 0.59.

1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 8.98 (d, $^4J=2.4$ Hz, 1H); 8.23 (dd, $^3J=8.4$ Hz, $^4J=2.4$ Hz, 1H); 7.40 (d, $^3J=8.4$ Hz, $^4J=2.4$ Hz, 1H); 4.40 (q, $^3J=7.2$ Hz, 2H); 1.39 (t, $^3J=7.2$ Hz, 3H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz): δ 164.3 (C); 155.5 (C); 151.1 (CH); 139.5 (CH); 125.2 (C); 124.0 (CH); 61.7 (CH₂); 14.2 (CH₃).

6-Chloro-*N*-methoxy-*N*-methylnicotinamide (29)



To a solution of 6-chloronicotinic acid (100 mg, 0.71 mmol, 1 eq) and *N,O*-dimethyl hydroxylamine hydrochloride (104 mg, 1.06 mmol, 1.5 eq) in DCM (3 mL) were added EDC (0.25 mL, 1.42 mmol, 2 eq) and HOBT (192 mg, 1.42 mmol, 2 eq). The mixture was stirred 1 day at room temperature, then water (5 mL) was added and a white precipitate was formed. The resulting filtrate was extracted twice with EtOAc (2x5 mL). The organic layers were combined, dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. The crude residue was purified by column chromatography (DCM/acetone 100/0 -> 90/10) to afford **29** (84 mg, 66 %) as a yellow oil.

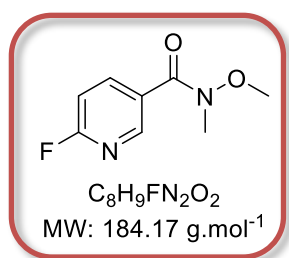
To a solution of 6-chloronicotinic acid (250 mg, 1.59 mmol, 1 eq) and *N,O*-dimethyl hydroxylamine hydrochloride (233 mg, 2.39 mmol, 1.5 eq) in DCM (4 mL) were added DIEA (0.55 mL, 3.19 mmol, 2 eq) and diethylcyanophosphonate (0.48 mL, 3.19 mmol, 2 eq). The mixture was stirred 6 hours at room temperature, then DCM (10 mL) was added and the resulting solution was extracted twice with NaHCO₃ (2x10 mL), dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. The crude residue was purified by column chromatography (DCM/acetone 100/0 -> 96/4) to afford **29** (267 mg, 84 %) as a yellow oil.

R_f (DCM/MeOH 9/1): 0.68.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.74 (d, ⁴J=2.4 Hz, 1H); 8.00 (dd, ³J=8.4 Hz, ⁴J=2.4 Hz, 1H); 7.37 (d, ³J=8.4 Hz, 1H); 3.54 (s, 3H); 3.37 (s, 3H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 166.1 (C); 153.3 (C); 149.6 (CH); 139.0 (C); 128.4 (CH); 123.7 (CH); 61.3 (CH₃); 33.0 (CH₃).

6-Fluoro-*N*-methoxy-*N*-methylnicotinamide (30)



To a solution of 6-fluoronicotinic acid (100 mg, 0.71 mmol, 1 eq) and *N,O*-dimethyl hydroxylamine hydrochloride (104 mg, 1.06 mmol, 1.5 eq) in DCM (3 mL) were added EDC

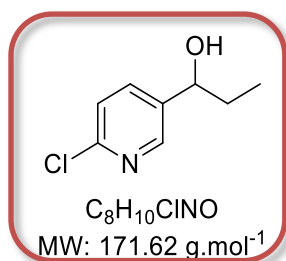
(0.25 mL, 1.42 mmol, 2 eq) and HOBT (192 mg, 1.42 mmol, 2 eq). The mixture was stirred 1 day at room temperature, then water (5 mL) was added and the resulting solution was extracted twice with EtOAc (2x5 mL). The organic layers were combined, washed with brine (5 mL), dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. The crude residue was purified by column chromatography (DCM/MeOH 97/3) to afford **30** (68 mg, 52 %) as a yellow oil.

Rf (DCM/acetone 9/1): 0.56.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.65 (d, ⁴J=2.0 Hz, 1H); 8.18 (ddd, ³J=8.4 Hz, ⁴J_{H-F}=7.6 Hz, ⁴J=2.0 Hz, 1H); 6.97 (dd, ³J=8.4 Hz, ³J_{H-F}=2.8 Hz, 1H); 3.55 (s, 3H); 3.39 (s, 3H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 166.0 (C); 164.2 (C, d, ¹J_{C-F}=242 Hz); 148.5 (CH, d, ³J_{C-F}=15 Hz); 141.9 (CH, d, ³J_{C-F}=8.6 Hz); 127.6 (C, d, ⁴J_{C-F}=4.7 Hz); 109.0 (CH, d, ²J_{C-F}=37 Hz); 61.2 (CH₃); 33.0 (CH₃).

1-(6-Chloropyridin-3-yl)propan-1-ol (**31**)



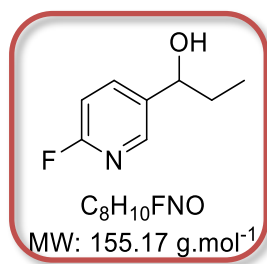
To a solution of 6-chloronicotinaldehyde (250 mg, 1.77 mmol, 1 eq) in anhydrous THF (10 mL) was added EtMgBr 1 M in THF (2.13 mL, 2.13 mmol, 1.2 eq) at 0 °C. The mixture was stirred 1 hour at 0 °C, then HCl 1 M (3 mL) was added and the mixture was extracted twice with EtOAc (2x15 mL). The organic layers were combined, dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. The crude residue was purified by column chromatography (heptane/EtOAc 100/0 -> 70/30) to afford **31** (224 mg, 74 %) as a colourless oil.

Rf (heptane/EtOAc 1/1): 0.49.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.33 (d, ⁴J=2.4 Hz, 1H); 7.67 (dd, ³J=8.4 Hz, ⁴J=2.4 Hz, 1H); 7.31 (d, ³J=8.4 Hz, 1H); 4.67 (t, ³J=6.0 Hz, 1H); 2.10 (br. s, 1H); 1.87-1.69 (m, 2H); 0.93 (t, ³J=7.6 Hz, 3H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 150.1 (C); 147.5 (CH); 139.0 (C); 136.7 (CH); 124.1 (CH); 72.6 (CH); 31.9 (CH₂); 9.7 (CH₃).

1-(6-Fluoropyridin-3-yl)propan-1-ol (**32**)



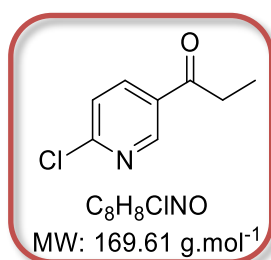
To a solution of 6-fluoronicotinaldehyde (100 mg, 0.80 mmol, 1 eq) in anhydrous THF (3 mL) was added EtMgBr 1 M in THF (0.96 mL, 0.96 mmol, 1.2 eq) at 0 °C. The mixture was stirred 1 hour at 0 °C, then HCl 1 M (1 mL) was added. After warming at room temperature, the mixture was extracted twice with EtOAc (2x5 mL). The organic layers were combined, dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. The crude residue was purified by column chromatography (heptane/EtOAc 100/0 → 60/40) to afford **32** (88 mg, 71 %) as a colourless oil.

Rf (heptane/EtOAc 8/2): 0.16.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.14 (d, ⁴J=2.4 Hz, 1H); 7.80 (ddd, ³J=8.4 Hz, ⁴J_{H-F}=7.5 Hz, ⁴J=2.4 Hz, 1H); 6.90 (dd, ³J=8.4 Hz, ³J_{H-F}=2.4 Hz, 1H); 4.66 (t, ³J=6.4 Hz, 1H); 2.20 (br. s, 1H); 1.85-1.69 (m, 2H); 0.91 (t, ³J=7.2 Hz, 3H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 163.0 (C, d, ¹J_{C-F}=237.0 Hz); 145.3 (CH, d, ³J_{C-F}=13.7 Hz); 139.0 (CH, d, ³J_{C-F}=7.6 Hz); 137.5 (C, d, ⁴J_{C-F}=3.8 Hz); 109.3 (CH, d, ²J_{C-F}=37.3 Hz); 72.7 (CH); 31.9 (CH₂); 9.8 (CH₃).

1-(6-Chloropyridin-3-yl)propan-1-one (**22c**)



To a solution of oxalyl chloride (148 μL, 1.75 mmol, 1.5 eq) in anhydrous DCM (12 mL) was added DMSO (332 μL, 4.68 mmol, 4 eq) at -78 °C. The mixture was stirred 30 min at -78 °C, then **31** (200 mg, 1.17 mmol, 1 eq) was added dropwise. The mixture was stirred 2 hours at -78 °C, then Et₃N (3 mL) was added and mixture stirred 30 min more at -78 °C, then water (20 mL) was added. After warming at room temperature, the mixture was extracted twice with DCM (2x15 mL). The organic layers were combined, washed with NaHCO₃ (15 mL), dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. The crude residue was purified by column

chromatography (heptane/EtOAc 100/0 -> 70/30) to afford **22c** (128 mg, 65 %) as a white solid.

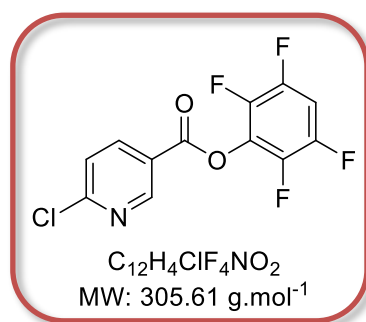
Mp: 84-89 °C.

Rf (heptane/EtOAc 1/1): 0.63.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.94 (d, ⁴J=2.4 Hz, 1H), 8.19 (dd, ³J=8.4 Hz, ⁴J=2.4 Hz, 1H); 7.44 (d, ³J=8.4 Hz, 1H); 3.00 (q, ³J=7.2 Hz, 2H); 1.24 (t, ³J=7.2 Hz, 3H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 198.2 (C); 155.4 (C); 149.7 (CH); 137.9 (CH); 130.9 (C); 124.5 (CH); 32.2 (CH₂); 7.7 (CH₃).

2,3,5,6-Tetrafluorophenyl 6-chloronicotinate (**27c**)



Compound **27c** was synthesized according to a reported procedure.⁴²

To a solution of 6-chloronicotinic acid (400 mg, 2.55 mmol, 1 eq) in dioxane (14 mL) were added 2,3,5,6-tetrafluorophenol (423.0 mg, 2.55 mmol, 1 eq) and DCC (525.7 mg, 2.55 mmol, 1 eq). The mixture was stirred 2 days at room temperature, then filtered, washed with Et₂O (20 mL). The filtrate was recovered and concentrated under vacuum. The crude residue was purified by column chromatography (heptane/EtOAc 100/0 -> 70/30) to afford **27c** (225 mg, 30 %) as a white powder.

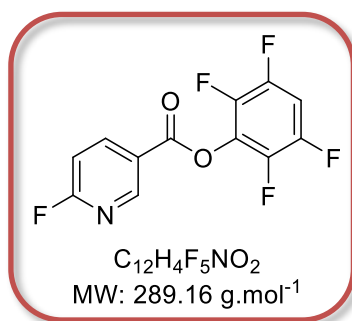
Mp: 103-106 °C.

Rf (heptane/EtOAc 1/1): 0.75.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 9.18 (d, ⁴J=2.4 Hz, 1H); 8.40 (dd, ³J=8.4 Hz, ⁴J=2.4 Hz, 1H); 7.54 (d, ³J=8.4 Hz, 1H); 7.09 (m, 1H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 160.6 (C); 157.4 (C); 151.9 (CH); 146.0 (2xC, d, ¹J_{C-F}=247.5 Hz); 140.6 (2xC, dm, ¹J_{C-F}=247.5 Hz); 140.3 (CH); 129.1 (C); 124.7 (CH); 122.3 (C); 103.8 (C, t, ²J_{C-F}=22.1 Hz).

2,3,5,6-Tetrafluorophenyl 6-fluoronicotinate (27a)



Compound **27a** was synthesized according to a reported procedure.⁴²

To a solution of 6-fluoronicotinic acid (50 mg, 0.36 mmol, 1 eq) in dioxane (2 mL) were added 2,3,5,6-tetrafluorophenol (58.9 mg, 0.36 mmol, 1 eq) and DCC (73.2 mg, 0.36 mmol, 1 eq). The mixture was stirred 2 days at room temperature, then filtered, washed with hot heptane (10 mL). The filtrate was recovered and concentrated under vacuum. The crude residue was purified by column chromatography (heptane/EtOAc 90/10 -> 50/50) to afford **27a** (80 mg, 78 %) as a white powder.

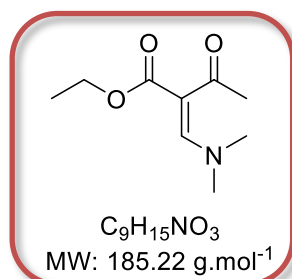
Mp: 68-72 °C.

Rf (heptane/EtOAc 1/1): 0.77.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 9.09 (d, ⁴J=2.4 Hz, 1H); 8.57 (ddd, ³J=8.4 Hz, ⁴J_{H-F}=7.2 Hz, ⁴J=2.4 Hz, 1H); 7.14 (dd, ³J=8.4 Hz, ³J_{H-F}=2.4 Hz, 1H); 7.09 (tt, ³J_{H-F}=9.9 Hz, ⁴J_{H-F}=7.0 Hz, 1H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 166.6 (C, d, ¹J_{C-F}=247.7 Hz); 160.3 (C); 151.5 (CH, d, ³J_{C-F}=16.8 Hz); 146.0 (2xC, dm, ¹J_{C-F}=247.7); 143.4 (C, d, ³J_{C-F}=9.9 Hz); 140.6 (2xC, dm, ¹J_{C-F}=248.4); 129.1 (C); 121.8 (C, d, ⁴J_{C-F}=3.8 Hz); 110.2 (CH, d, ²J_{C-F}=37.4 Hz); 103.8 (CH, t, ²J_{C-F}=22.1 Hz).

Ethyl (E)-2-((dimethylamino)methylene)-3-oxobutanoate (33)

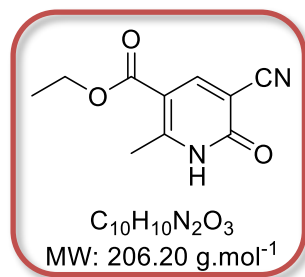


Compound **33** was synthesized according to a reported procedure.¹⁹⁶

Ethyl 3-oxobutanoate and 1,1-dimethoxy-*N,N*-dimethylmethanamine were mixed together. The mixture was stirred 16 hours at room temperature, then co-evaporated three times with toluene to afford **33**.

Rf (heptane/EtOAc 1/1): 0.37.

Ethyl 5-cyano-2-methyl-6-oxo-1,6-dihydropyridine-3-carboxylate (**34**)



Compound **34** was synthesized according to a reported procedure.¹⁹⁶

2-Cyanoacetamide (7.76 g, 92.4 mmol, 1 eq) was dissolved in THF (50 mL) and NaH (2.44 g, 101.6 mmol, 1 eq) was added with THF (40 mL). The mixture was stirred 2 hours at room temperature, then, **33** (17.1 g, 92.4 mmol, 1 eq) was added in THF (100 mL). The mixture was stirred 16 hours at room temperature, then acetic acid was added until pH=6. The solvent was evaporated and HCl 1 M (50 mL) was added. The precipitate formed was filtered and washed with toluene (10 mL) and ether (20 mL) to afford **34** as a light pink solid (12.0 g, 63 %).

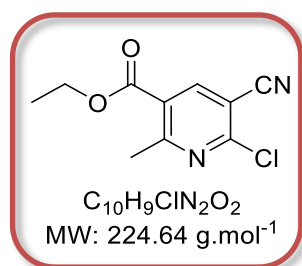
Mp: 295-297 °C.

Rf (dichloromethane/MeOH 9/1): 0.52.

¹H NMR (DMF-*d*₇, 400 MHz): δ 8.92 (s, 1H); 7.58 (s, 1H); 4.30 (q, ³*J*=7.2 Hz, 2H); 2.74 (s, 3H); 1.33 (t, ³*J*=7.2 Hz, 3H).

¹³C NMR (DMF-*d*₇, 100 MHz): δ 164.3 (C); 164.2 (C); 162.7 (C); 157.3 (C); 144.6 (CH); 117.9 (C); 107.9 (C); 60.6 (CH₂); 18.7 (CH₃); 13.8 (CH₃).

Ethyl 6-chloro-5-cyano-2-methylnicotinate (25c)



Compound **25c** was synthesized according to a reported procedure.¹⁹⁶

To a solution of **34** (200 mg, 0.97 mmol, 1 eq) in MeCN (3 mL) was added POCl₃ (297.6 mg, 1.94 mmol, 2 eq). The mixture was stirred 3 hours at 80 °C. After cooling at room temperature, solvent was removed under vacuum, then the residue was co-evaporated twice with toluene (10 mL). The crude residue was purified by column chromatography (heptane/EtOAc 50/50) to afford **25c** (133 mg, 61 %) as a yellow solid.

To a solution of **34** (200 mg, 0.97 mmol, 1 eq) in MeCN (3 mL) was added SOCl₂ (0.21 mL, 2.91 mmol, 3 eq). The mixture was stirred 3 hours at 80 °C. After cooling at room temperature, solvent was removed under vacuum, then the residue was co-evaporated twice with toluene (10 mL). The crude residue was purified by column chromatography (heptane/EtOAc 70/30) to afford **25c** (119 mg, 55 %) as a yellow solid.

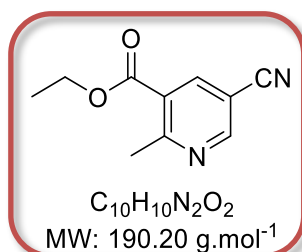
Mp: 67-69 °C.

Rf (heptane/EtOAc 1/1): 0.68.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.49 (s, 1H); 4.41 (q, ³J=7.2 Hz, 2H); 2.90 (s, 3H); 1.42 (t, ³J=7.2 Hz, 3H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 165.2 (C); 163.6 (C); 153.6 (C); 144.6 (CH); 124.6 (C); 114.0 (C); 108.0 (C); 62.2 (CH₂); 25.1 (CH₃); 14.1 (CH₃).

Ethyl 5-cyano-2-methylnicotinate (35)



To a solution of ethyl **25c** (500 mg, 2.23 mmol, 1 eq) in dioxane/THF/DMF 3/1/1 (25 mL) were added NH₄Cl (179.1 mg, 3.35 mmol in 1mL of water, 1.5 eq) and zinc solid (11675 mg, 8 eq) in 4 times every 2 hours. The mixture was stirred 16 hours at room temperature, then

filtered through a pad of Celite. The clear filtrate of organic layer was washed with water (40 mL) and brine (40 mL), dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. The crude residue was purified by column chromatography (heptane/EtOAc 100/0 -> 80/20) to afford **35** (161 mg, 38 %) as a white solid.

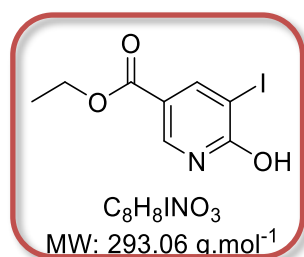
Mp: 49-53 °C.

Rf (heptane/EtOAc 1/1): 0.64.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.84 (d, ⁴J=2.0 Hz, 1H); 8.44 (d, ⁴J=2.2 Hz, 1H); 4.39 (q, ³J=7.2 Hz, 2H); 1.41 (t, ³J=7.2 Hz, 3H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 164.5 (C); 164.2 (C); 153.6 (CH); 141.4 (CH); 125.8 (C); 115.9 (C); 107.4 (C); 62.1 (CH₂); 25.2 (CH₃); 14.1 (CH₃).

Ethyl 6-hydroxy-5-iodonicotinate (**36**)



Compound **36** was synthesized according to a reported procedure.¹⁹⁹

To a solution of 6-hydroxynicotinic acid (1.50 g, 7.19 mmol, 1 eq) in EtOH (9 mL) was added H₂SO₄ (86.3 μL, 10.8 mmol, 1.5 eq). The mixture was stirred 16 hours to reflux. The mixture was then cooled and *N*-iodosuccinimide (2.91 g, 8.63 mmol, 1.2 eq) was added to the mixture. The mixture was stirred 2 hours to reflux. After cooling at room temperature, a solution of 10 % of Na₂SO₃ was added (30 mL) and the resulting solution was extracted twice with EtOAc (2x20 mL). The organic layers were combined, dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. The mixture was dissolved in toluene (20 mL), and filtered to afford **36** (2.75 mg, 87 %) as a pale yellow solid.

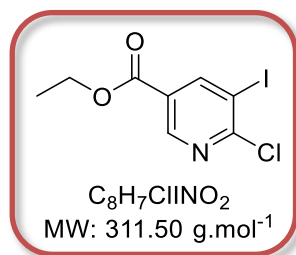
Mp: 153-157 °C.

Rf (DCM/MeOH 95/5): 0.44.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.63 (d, ⁴J=2.4 Hz, 1H); 8.30 (d, ⁴J=2.4 Hz, 1H); 4.34 (q, ³J=7.2 Hz, 2H); 1.37 (t, ³J=7.2 Hz, 3H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 162.7 (C); 149.8 (CH); 149.8 (CH); 139.7 (C); 112.8 (C); 90.1 (C); 61.4 (CH₂); 14.2 (CH₃).

Ethyl 6-chloro-5-iodonicotinate (**37**)



Compound **37** was synthesized according to a reported procedure.¹⁹⁹

To a solution of **36** (2.00 g, 3.41 mmol, 1 eq) in dioxane (40 mL) were added DIEA (0.88 g, 3.41 mmol, 1 eq) and POCl₃ (1.27 mL, 6.83 mmol, 2 eq) slowly. The mixture was stirred 4 hours at 100 °C. After cooling at room temperature, solvent was removed under vacuum, then EtOAc was added and the mixture was extracted with NaHCO₃ (50 mL) in order to quench POCl₃ and the aqueous layer was washed with EtOAc (40 mL). The organic layers were combined, dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. The residue was purified by recrystallization in toluene to afford **37** (1.02 mg, 96 %) as a brown solid.

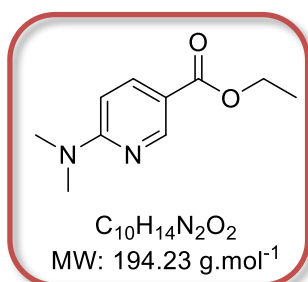
Mp: 89-92 °C.

Rf (DCM/MeOH 95/5): 0.86.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.93 (d, ⁴J=2.0 Hz, 1H); 8.71 (d, ⁴J=2.0 Hz, 1H); 4.42 (q, ³J=7.2 Hz, 2H); 1.41 (t, ³J=7.2 Hz, 3H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 163.1 (C); 158.4 (C); 149.7 (CH); 149.4 (CH); 126.0 (C); 94.3 (C); 62.0 (CH₂); 14.2 (CH₃).

Ethyl 6-(dimethylamino)nicotinate (**38**)



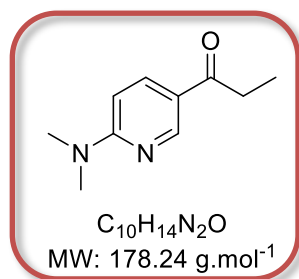
To the solid **21c** (130 mg, 0.77 mmol, 1 eq) was added NHMe₂.HCl (75 mg, 0.92 mmol, 1.2 eq). The mixture was stirred 3 days at 100 °C. After cooling at room temperature, water (10 mL) was added and the resulting solution was extracted twice with EtOAc (2x10 mL). The organic layers were combined, washed with brine (10 mL), dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. The crude residue was purified by column chromatography (heptane/EtOAc 90/10) to afford **38** (102 mg, 75 %) as a yellow oil.

Rf (heptane/EtOAc 7/3): 0.34.

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 8.80 (d, $^4J=2.2$ Hz, 1H); 7.99 (dd, $^3J=9.2$ Hz, $^4J=2.2$ Hz, 1H); 6.45 (d, $^3J=9.2$ Hz, 1H); 4.31 (q, $^3J=6.8$ Hz, 2H); 3.15 (s, 6H); 1.35 (t, $^3J=6.8$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ 166.2 (C); 160.6 (C); 150.9 (CH); 138.1 (CH); 113.8 (C); 104.5 (CH); 60.3 (CH_2); 38.1 ($2\times\text{CH}_3$); 14.4 (CH_3).

1-(6-(Dimethylamino)pyridin-3-yl)propan-1-one (39)



To a solution of **22c** (100 mg, 0.89 mmol, 1 eq) in anhydrous DMF (3 mL) was added $\text{NHMe}_2\cdot\text{HCl}$ (58 mg, 1.07 mmol, 1.2 eq). The mixture was stirred 3 days at 100 °C, then water (10 mL) was added and the resulting solution was extracted twice with EtOAc (2×10 mL). The organic layers were combined, washed with brine (10 mL), dried over Na_2SO_4 and concentrated under vacuum. The crude residue was purified by column chromatography (heptane/EtOAc 100/0 \rightarrow 70/30) to afford **39** (55 mg, 52 %) as a white solid.

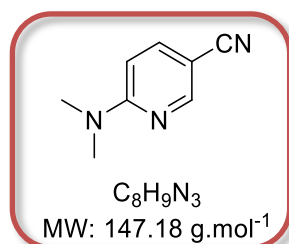
Mp : 59.2-63.2 °C.

Rf (heptane 1/1 EtOAc): 0.57.

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 8.78 (d, $^4J=2.4$ Hz, 1H); 8.02 (dd, $^3J=8.8$ Hz, $^4J=2.4$ Hz, 1H); 6.50 (d, $^3J=8.8$ Hz, 1H); 3.17 (s, 6H); 2.88 (q, $^3J=7.6$ Hz, 2H); 1.20 (t, $^3J=7.6$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ 198.3 (C); 160.5 (C); 150.3 (CH); 136.7 (CH); 121.2 (C); 104.9 (CH); 38.0 ($2\times\text{CH}_3$); 31.0 (CH_2); 8.5 (CH_3).

6-(Dimethylamino)nicotinonitrile (40)



6-Fluoronicotinonitrile (250 mg, 2.05 mmol, 1 eq) and $\text{NHMe}_2\cdot\text{HCl}$ (201 mg, 2.45 mmol, 1.2 eq) were mixed together. The mixture was stirred 3 days at 100 °C. After cooling at room

temperature, water (10 mL) was added and the resulting solution was extracted twice with EtOAc (2x10 mL). The organic layers were combined, washed with brine (10 mL), dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. The crude residue was purified by column chromatography (heptane/EtOAc 90/10 -> 70/30) to afford **40** (225 mg, 75 %) as a white solid.

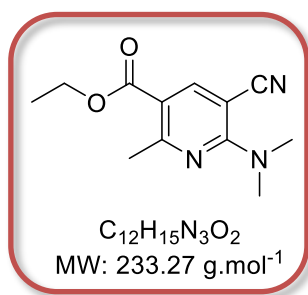
Mp: 65-68 °C.

Rf (heptane/EtOAc 7/3): 0.24.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.39 (d, ⁴J=2.0 Hz, 1H); 7.57 (dd, ³J=8.8 Hz, ⁴J=2.0 Hz, 1H); 6.47 (d, ³J=8.8 Hz, 1H); 3.14 (s, 6H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 159.5 (C); 152.6 (CH); 139.2 (CH); 119.0 (C); 105.1 (CH); 95.1 (C); 37.9 (2xCH₃).

Ethyl 5-cyano-6-(dimethylamino)-2-methylnicotinate (**41**)



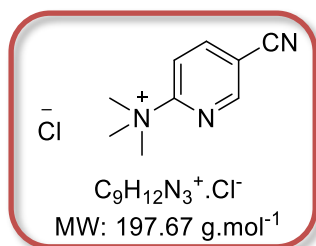
To a solution of **25c** (50 mg, 0.22 mmol, 1 eq) in anhydrous DMF (2 mL) was added NHMe₂.HCl (21.8 mg, 0.27 mmol, 1.2 eq). The mixture was stirred 3 days at 100 °C. After cooling at room temperature, water (10 mL) was added and a precipitate (starting material) was recovered by filtration. The filtrate was then extracted twice with EtOAc (2x10 mL). The organic layers were combined, washed with brine (10 mL), dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. The crude residue was purified by column chromatography (heptane/EtOAc 80/20) to afford **41** (30 mg, 58 %) as a white solid.

Mp: 95-99 °C.

Rf (heptane/EtOAc 1/1): 0.69.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.31 (s, 1H); 4.28 (q, ³J=7.2 Hz, 2H); 3.35 (s, 6H); 2.69 (s, 3H); 1.35 (t, ³J=7.2 Hz, 3H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 164.8 (C); 164.2 (C); 157.9 (C); 148.0 (CH); 118.9 (C); 113.4 (C); 86.8 (C); 60.7 (CH₂); 39.9 (2xCH₃); 25.6 (CH₃); 14.2 (CH₃).

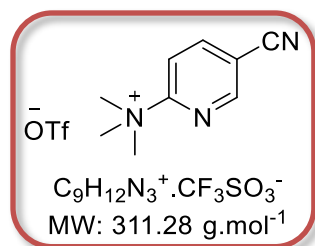
5-Cyano-*N,N,N*-trimethylpyridin-2-aminium chloride (24b-Cl)

To a solution of 6-chloronicotinonitrile (400 mg, 2.90 mmol, 1 eq) in anhydrous THF (2.4 mL) was added trimethylamine 1 M in THF (5.80 mL, 5.80 mmol, 2 eq). The mixture was stirred 16 hours at 60 °C. After cooling at room temperature, solvent was removed under vacuum, then Et₂O (1 mL) was added in order to precipitate the whole product which was then filtered. The precipitate was recovered and dried under vacuum to afford **24b-Cl** (570 mg, 99 %) as a white solid without further purification.

Mp: 179.8-185.7 °C.

¹H NMR (DMSO, 400 MHz): δ 9.21 (dd, ⁴J=2.4 Hz, ⁵J=0.8 Hz, 1H); 8.84 (dd, ³J=8.8 Hz, ⁴J=2.4 Hz, 1H); 8.42 (dd, ³J=8.8 Hz, ⁵J=0.8 Hz, 1H); 3.64 (s, 9H).

¹³C NMR (DMSO, 100 MHz): δ 158.8 (C); 152.0 (CH); 145.2 (CH); 116.5 (CH); 115.7 (C); 111.4 (C); 54.6 (3xCH₃).

5-Cyano-*N,N,N*-trimethylpyridin-2-aminium trifluoromethanesulfonate (24b-OTf)

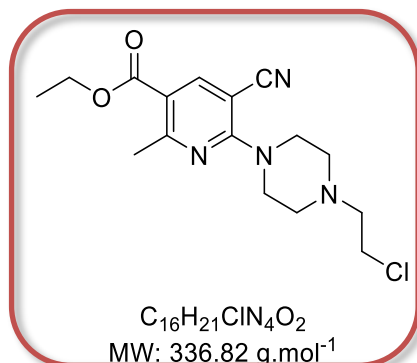
To a solution of **24b-Cl** (400 mg, 2.02 mmol, 1 eq) in anhydrous DCM (5.5 mL) was added TMSOTf (1.03 mL, 5.67 mmol, 2.8 eq). The mixture was stirred 30 min at room temperature, then solvent was removed under vacuum. DCM (15 mL), then Et₂O (3 mL) was added in order to precipitate product. This latter was then filtered. Precipitate was recovered and dried under vacuum to afford **24b-OTf** (584 mg, 93 %) as a white solid without further purification.

Mp: 155.2-157.3 °C.

¹H NMR (DMSO, 400 MHz): δ 9.21 (dd, ⁴J=2.0 Hz, 1H); 8.83 (dd, ³J=8.8 Hz, ⁴J=2.0 Hz, 1H); 8.42 (dd, ³J=8.8 Hz, 1H); 3.61 (s, 9H).

^{13}C NMR (DMSO, 100 MHz): δ 158.8 (C); 152.0 (CH); 145.2 (CH); 121.0 (C, q, $^1J_{\text{C-F}}=322.8$ Hz); 116.3 (CH); 115.7 (C); 111.4 (C); 54.7 (3xCH₃).

Ethyl 6-(4-(2-chloroethyl)piperazin-1-yl)-5-cyano-2-methylnicotinate (42)



To a solution of **25c** (50 mg, 0.22 mmol, 1 eq) in anhydrous DMF (5 mL) was DABCO (30 mg, 0.27 mmol, 1.2 eq). The mixture was stirred 2 hours at room temperature, then water (10 mL) was added and the resulting solution was extracted twice with EtOAc (2x5 mL). The organic layers were combined, washed with brine (10 mL), dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum to afford **42** (54 mg, 72 %) as a brown solid without no further purification.

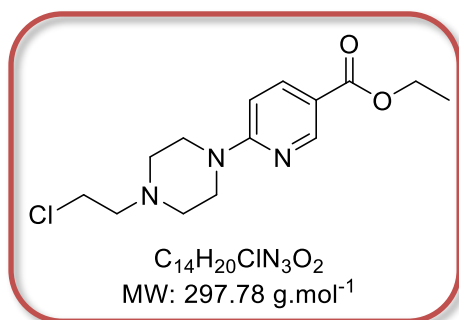
Mp: 90-93 °C.

Rf (heptane/EtOAc 1/1): 0.49.

^1H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.34 (s, 1H); 4.31 (q, $^3J=7.2$ Hz, 2H); 3.97 (t, $^3J=4.8$ Hz, 4H); 3.62 (t, $^3J=6.8$ Hz, 2H); 2.79 (t, $^3J=6.8$ Hz, 2H); 2.71 (s, 3H); 2.64 (t, $^3J=4.8$ Hz, 4H); 1.37 (t, $^3J=7.2$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 164.6 (C); 164.3 (C); 158.1 (C); 147.7 (CH); 118.1 (C); 114.7 (C); 88.8 (C); 60.9 (CH₂); 59.5 (CH₂); 52.9 (2xCH₂); 46.8 (2xCH₂); 40.7 (CH₂); 25.7 (CH₃); 14.3 (CH₃).

LCMS (ESI): m/z : 139 [M+H]⁺.

Ethyl 6-(4-(2-chloroethyl)piperazin-1-yl)nicotinate (43)

To a solution of **21c** (30 mg, 0.13 mmol, 1 eq) in anhydrous DMF (3 mL) was added DABCO (18 mg, 0.16 mmol, 1.2 eq). The mixture was stirred 4 hours at room temperature, then 2 hours at 50 °C. After cooling at room temperature, water was added and the resulting solution was extracted twice with EtOAc (2x 5 mL). The organic layers were combined, washed with brine (10 mL), dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. The crude residue was purified by column chromatography (heptane/EtOAc 90/10 → 50/50) to afford **43** (15 mg, 38 %) as a yellow solid.

Mp: 69.7-71.1 °C.

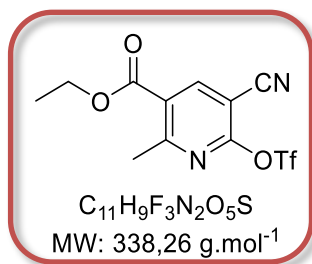
Rf (heptane/EtOAc 1/1): 0.30.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.79 (d, ⁴J=2.4 Hz, 1H); 8.01 (dd, ³J=9.2 Hz, ⁴J=2.4 Hz, 1H); 6.57 (d, ³J=9.2 Hz, 1H); 4.32 (q, ³J=7.2 Hz, 2H); 3.70 (t, ³J=5.2 Hz, 4H); 3.62 (t, ³J=7.0 Hz, 2H); 2.77 (t, ³J=7.0 Hz, 2H); 2.60 (t, ³J=5.2 Hz, 4H); 1.35 (t, ³J=7.2 Hz, 3H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 165.9 (C); 160.5 (C); 150.9 (CH); 138.4 (CH); 115.0 (C); 105.0 (CH); 60.4 (CH₂); 59.7 (CH₂); 52.8 (2xCH₂); 44.5 (2xCH₂); 40.8 (CH₂); 14.3 (CH₃).

LCMS (ESI): *m/z*: 298 [M+H]⁺.

Ethyl 5-cyano-2-methyl-6-(((trifluoromethyl)sulfonyl)oxy)nicotinate (45)



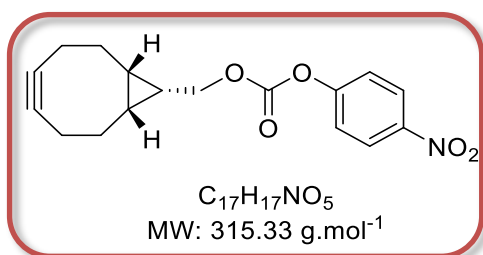
To a solution of **34** (100 mg, 0.49 mmol, 1 eq) in anhydrous DCM (3 mL) was added Et₃N (98 mg, 0.97 mmol, 2 eq). The mixture was stirred at 0 °C, then Tf₂O (164 mg, 0.58 mmol, 5.5 eq) was slowly added. The mixture was stirred 4 hours at room temperature then water (10 mL) was added and the resulting solution was extracted twice with DCM (2x5 mL). The organic layers were combined, dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. The crude residue was purified by column chromatography (heptane/EtOAc 90/10 -> 60/40) to afford **45** (131 mg, 80 %) as a yellow solid.

Mp: 60.5-61.6 °C.

Rf (heptane/EtOAc 7/3): 0.33.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.64 (s, 1H); 4.43 (q, ³J=7.2 Hz, 2H); 2.92 (s, 3H); 1.43 (t, ³J=7.2 Hz, 3H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 165.5 (C); 163.0 (C); 154.9 (C); 146.5 (CH); 125.9 (C); 122.9 (C, q, ²J_{C-F}=319.3 Hz); 111.5 (C); 98.4 (C); 62.5 (CH₂); 25.0 (CH₃); 14.1 (CH₃).

((1*R*,8*S*,9*s*)-Bicyclo[6.1.0]non-4-yn-9-yl)methyl (4-nitrophenyl) carbonate (46)

Compound **46** was synthesized according to a reported procedure.¹³³

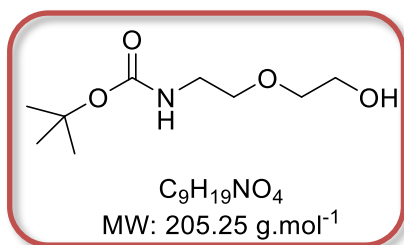
To a solution of ((1*R*,8*S*,9*s*)-bicyclo[6.1.0]non-4-yn-9-yl)methanol (100 mg, 0.67 mmol, 1 eq) in DCM (10 mL) were added pyridine (13 μL, 1.66 mmol, 2.5 eq) and 4-nitrophenylchloroformate (167.7 mg, 0.83 mmol, 1.3 eq). The mixture was stirred 15 min at room temperature, then quenched with saturated NH₄Cl-solution (5 mL), and extracted with DCM (3x5 mL). The organic layer was dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. The crude residue was purified by column chromatography (heptane/EtOAc 90/10) to afford **46** (139 mg, 53 %) as a yellow solid.

Mp: 72-76 °C.

R_f (heptane/EtOAc 1/1): 0.60.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.27 (dt, ³J=9.2 Hz, ⁴J=2.0 Hz, 2H); 7.38 (dt, ⁴J=9.2 Hz, ⁴J=2.0 Hz, 2H); 4.39 (d, ³J=8.0 Hz, 2H); 2.36-2.22 (m, 6H); 1.65-1.55 (m, 2H); 1.55-1.46 (m, 1H); 1.10-1.01 (m, 2H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 155.5 (C); 152.5 (C); 145.3 (C); 125.2 (2xCH); 121.7 (2xCH); 98.7 (2xC); 67.9 (CH₂); 28.9 (2xCH₂); 21.3 (2xCH₂); 20.4 (CH); 17.1 (2xCH).

***tert*-Butyl (2-(2-hydroxyethoxy)ethyl)carbamate (48)**

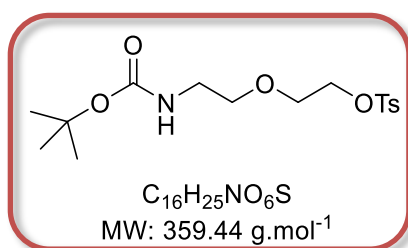
To a solution of 2-(2-aminoethoxy)ethanol (0.95 mL, 9.52 mmol, 1 eq) in DCM (10 mL) was added di-*tert*-butyl dicarbonate (8.74 mL, 19.03 mmol, 2 eq). The mixture was stirred 16 hours at room temperature under argon, then solvent was removed under vacuum. The crude residue was purified by column chromatography (heptane/EtOAc 90/10 -> 0/100) to afford **48** (2.20 g, 100 %) as a colourless oil.

Rf (DCM/MeOH 95/5): 0.32.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 5.11 (br. s, 1H); 3.72 (m, 2H); 3.54 (m, 4H); 3.31 (m, 2H); 1.42 (s, 9H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 156.1 (C); 79.3 (C); 72.1 (CH₂); 70.2 (CH₂); 61.6 (CH₂); 40.3 (CH₂); 28.3 (3xCH₃).

2-(2-((*tert*-Butoxycarbonyl)amino)ethoxy)ethyl 4-methylbenzenesulfonate (49)



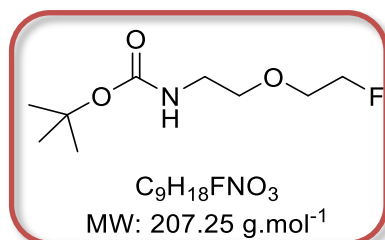
To a solution of **48** (250 mg, 1.22 mmol, 1 eq) in DCM (5 mL) at 0 °C were successively added tosyl chloride (0.90 mL, 2.44 mmol, 2 eq), DIEA (0.64 mL, 3.66 mmol, 3 eq) and DMAP (89 mg, 0.73 mmol, 0.6 eq). The mixture was stirred 1 hour at 0 °C then 16 hours at room temperature and concentrated under vacuum. The crude residue was purified by column chromatography (DCM/acetone 90/10) to afford **49** (352 mg, 80 %) as a yellow oil.

Rf (DCM/acetone 9/1): 0.63.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.80 (d, ³J=8.0 Hz, 2H); 7.35 (d, ³J=8.0 Hz, 2H); 4.80 (br. s, 1H); 4.15 (t, ³J=4.8 Hz, 2H); 3.62 (t, ³J=4.8 Hz, 2H); 3.44 (t, ³J=4.8 Hz, 2H); 3.23 (t, ³J=4.8 Hz, 2H); 2.44 (s, 3H); 1.44 (s, 9H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 155.8 (C); 144.8 (C); 132.9 (C); 129.8 (2xCH); 127.9 (2xCH); 79.3 (C); 70.3 (CH₂); 69.0 (CH₂); 68.3 (CH₂); 40.1 (CH₂); 28.3 (3xCH₃); 21.6 (CH₃).

tert-Butyl (2-(2-fluoroethoxy)ethyl)carbamate (50)



To a solution of **48** (250 mg, 1.22 mmol, 1 eq) in DCM (20 mL) was added Deoxo-fluor® 50 % in THF (0.54 mL, 1.46 mmol, 1.2 eq) at 0 °C. The mixture was stirred 1 hour at 0 °C, then solvent was removed under vacuum. The crude residue was purified by column

chromatography (DCM/acetone 90/10, then DCM/MeOH 95/5) to afford **50** (82 mg, 32 %) as a pale yellow oil.

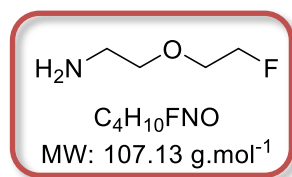
To a solution of **49** (300 mg, 0.84 mmol, 1 eq) in THF (6 mL) was added TBAF 1 M in THF (1 mL, 1.00 mmol, 1.2 eq) at 0 °C. The mixture was stirred 16 hours at room temperature, then solvent was removed under vacuum. The crude residue was purified by column chromatography (heptane/EtOAc 90/10) to afford **50** (76 mg, 44 %) as a pale yellow oil.

Rf (DCM/acetone 9/1): 0.66.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 4.91 (br. s, 1H); 4.55 (dt, ²J_{H-F}=47.6 Hz, ³J=3.6 Hz, 2H); 3.70 (dt, ³J_{H-F}=30 Hz, ³J=3.6 Hz, 2H); 3.56 (t, ³J=5.2 Hz, 2H); 3.33 (m, 2H); 1.44 (s, 9H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 155.9 (C); 82.9 (CH₂, d, ¹J_{C-F}=168 Hz); 79.2 (C); 70.4 (CH₂); 70.0 (CH₂, d, ²J_{C-F}=19.5 Hz); 40.2 (CH₂); 28.3 (3xCH₃).

2-(2-Fluoroethoxy)ethan-1-amine (**47**)

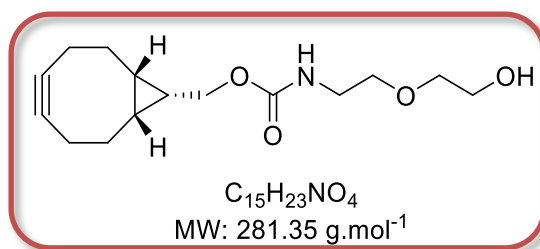


To a solution of **50** (50 mg, 0.24 mmol, 1 eq) in DCM (2 mL) was added TFA (63 μL, 0.41 mmol, 2 eq) at 0 °C. The mixture was stirred 30 minutes at 0 °C, then 6 hours at room temperature. Solvent was then removed under vacuum to afford **47** (24 mg, 93 %) as a pale yellow oil without further purification.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.14 (br. s, 2H); 4.56 (dt, ²J_{H-F}=48.0 Hz, ³J=3.6 Hz, 2H); 3.74 (t, ³J=5.2 Hz, 2H); 4.73 (dt, ³J_{H-F}=30.4 Hz, ³J=3.6 Hz, 2H); 3.16 (t, ³J=5.2 Hz, 2H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 82.9 (CH₂, d, ¹J_{C-F}=167 Hz); 70.2 (CH₂, d, ²J_{C-F}=19 Hz); 66.6 (CH₂); 39.3 (CH₂).

((1*R*,8*S*,9*S*)-Bicyclo[6.1.0]non-4-yn-9-yl)methyl (2-(2-hydroxyethoxy)ethyl)carbamate (51**)**



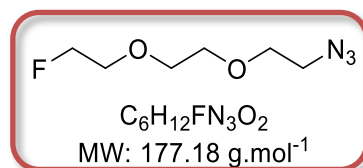
To a solution of **46** (50 mg, 0.16 mmol, 1 eq) in DMF (2 mL) were added 2-(2-aminoethoxy)ethanol (32 μ L, 0.32 mmol, 2 eq) and Et₃N (66 μ L, 0.48 mmol, 3 eq). The mixture was stirred 15 min at room temperature, then concentrated under vacuum, then DCM (5 mL) was added to the solution. The organic layer was washed with NaOH 1 M (10 mL), water (10 mL), dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. The crude residue was purified by column chromatography (DCM/MeOH 100/0 -> 97/3) to afford **51** (37 mg, 82 %) as a pale yellow oil.

Rf (DCM/MeOH 95/5): 0.38.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 5.13 (br. s, 1H); 4.15 (d, ³J=8.0 Hz, 2H); 3.75-3.73 (m, 2H); 3.59-3.55 (m, 4H); 3.41-3.38 (m, 2H); 2.32-2.18 (m, 6H); 1.59-1.55 (m, 2H); 1.40-1.31 (m, 1H); 0.97-0.91 (m, 2H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 156.7 (C, 1H); 98.7 (2x C); 72.2 (CH₂); 70.0 (CH₂); 62.6 (CH₂); 61.5 (CH₂); 40.7 (CH₂); 28.9 (2x CH₂); 21.3 (2x CH₂); 20.0 (2x CH); 17.6 (CH).

1-Azido-2-(2-(2-fluoroethoxy)ethoxy)ethane (56**)**



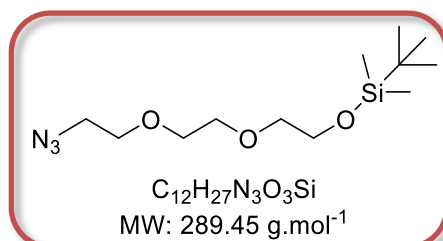
To a solution of **11** (200 mg, 1.14 mmol, 1 eq) in DCM (8 mL) was added Deoxo-fluor® 50 % in THF (50.5 μ L, 1.37 mmol, 1.2 eq) at 0 °C. The mixture was stirred 3 hours at 0 °C. After warming at room temperature, solvent was removed under vacuum. The crude residue was purified by column chromatography (heptane/EtOAc 100/0 -> 50/50) to afford **56** (75 mg, 37 %) as a colourless oil.

Rf (heptane/EtOAc 1/1): 0.42.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 4.57 (dt, ²J_{H-F}=47.7 Hz, ³J=4.1 Hz, 2H); 3.76 (dt, ³J_{H-F}=29.3 Hz, ³J=4.1 Hz, 2H); 3.72-3.66 (m, 6H); 3.39 (t, ³J=5.0 Hz, 2H).

^{13}C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 83.1 (CH₂, d, $^1J_{\text{C-F}}=167.8$ Hz); 70.8 (CH₂); 70.7 (CH₂); 70.4 (CH₂, d, $^2J_{\text{C-F}}=19.9$ Hz); 70.0 (CH₂); 50.6 (CH₂).

1-Azido-2-(2-(2-(tert-butyldimethylsilyl)oxyethoxy)ethoxy)ethane (58)



To a solution of **11** (500 mg, 2.86 mmol, 1 eq) in anhydrous DMF (10 mL) were added imidazole (233.3 mg, 3.43 mmol, 1.2 eq) and TBSCl (86 μL , 3.43 mmol, 1.2 eq). The mixture was stirred 2 days at room temperature, then water (30 mL) was added and the resulting solution was extracted twice with DCM (2x15mL). The organic layers were combined, washed with brine (20 mL), dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. The crude residue was purified by column chromatography (heptane/EtOAc 100/0 -> 90/10) to afford **58** (580 mg, 70 %) as a pale yellow oil.

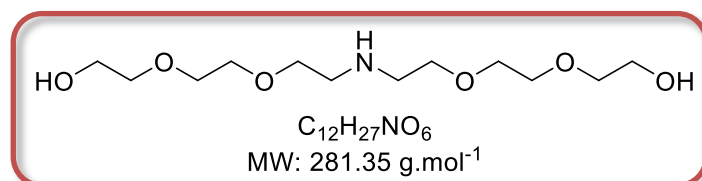
R_f (heptane/EtOAc 1/1): 0.68.

^1H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 3.76 (t, $^3J=5.6$ Hz, 2H); 3.68-3.65 (m, 6H); 3.55 (t, $^3J=5.6$ Hz, 2H); 3.38 (t, $^3J=5.6$ Hz, 2H); 0.88 (s, 9H); 0.05 (s, 6H).

^{13}C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 72.7 (CH₂); 70.7 (CH₂); 70.6 (CH₂); 69.9 (CH₂); 62.6 (CH₂); 50.6 (CH₂); 25.8 (3xCH₃); 18.3 (C); -5.4 (2xCH₂).

LCMS (ESI): m/z : 290 [M+H]⁺.

3,6,12,15-Tetraoxa-9-azaheptadecane-1,17-diol (62)



11 (1000 mg, 5.71 mmol, 1 eq) was dissolved in MeOH (14 mL). After three times degassing of the flask, Pd/C (243 mg, 2.28 mmol, 0.4 eq) was added and the mixture was stirred 2 days under H₂ atm. The mixture was filtered through a pad of Celite and washed three times with MeOH (30 mL). The filtrate was concentrated under vacuum to afford **62** (531 mg, 62 %) as a pale yellow oil.

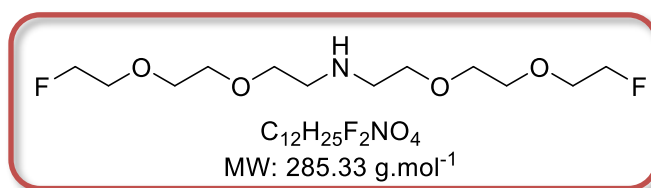
Rf (DCM/MeOH 9/1): 0.03.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 3.69 (t, ³J=4.4 Hz, 4H); 3.64-3.55 (m, 16H); 3.11 (br. s, 4H); 2.79 (t, ³J=4.4 Hz, 4H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 77.3 (2xCH₂); 77.0 (2xCH₂); 76.7 (2xCH₂); 72.7 (2xCH₂); 61.3 (2xCH₂); 48.9 (2xCH₂).

LCMS (ESI): *m/z*: 282 [M+H]⁺.

Bis(2-(2-(2-fluoroethoxy)ethoxy)ethyl)amine (63)



To a solution of **56** (180 mg, 1.016 mmol, 1 eq) in MeOH (5 mL) was added Pd/C 10 % (162.3 mg, 0.169 mmol, 0.15 eq) after three times degassing with Argon. The mixture was stirred 6 hours at room temperature under H₂ atmosphere, then the mixture was filtered through a pad of Celite and the filtrate was recovered and concentrated under vacuum. The crude residue was purified by column chromatography (EtOAc/MeOH + 1 % Et₃N 100/0 -> 97/3) to afford **63** (57 mg, 37 %) as a pale yellow oil.

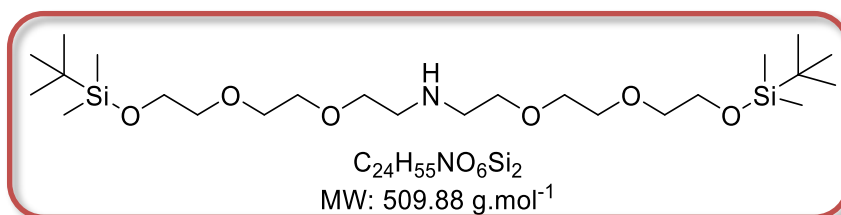
Rf (EtOAc/MeOH 95/5 1 % Et₃N): 0.19.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 4.56 (dt, ²J_{H-F}=47.6 Hz, ³J=4.0 Hz, 4H); 3.74 (dt, ³J_{H-F}=30.0 Hz, ³J=4.0 Hz, 4H); 3.69-3.58 (m, 12H); 2.81 (t, ³J=5.6 Hz, 4H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 83.1 (2xCH₂, d, ¹J_{C-F}=167.9 Hz); 70.7 (2xCH₂); 70.6 (2xCH₂); 70.3 (2xCH₂); 70.2 (2xCH₂, d, ²J_{C-F}=19.9 Hz); 49.1 (2xCH₂).

LCMS (ESI): *m/z*: 286 [M+H]⁺.

Bis(2,2,3,3-tetramethyl-4,7,10-trioxa-3-siladodecan-12-yl)amine (64)



To a solution of **58** (560 mg, 2.59 mmol, 1 eq) in MeOH (20 mL) was added Pd/C 10 % (309.1 mg, 0.389 mmol, 0.15 eq) after three times degassing with Argon. The mixture was

stirred 3 hours at room temperature under H₂ atmosphere. The mixture was filtered through a pad of Celite and the filtrate was recovered and concentrated under vacuum. The crude residue was purified by column chromatography (EtOAc/MeOH + 1 % Et₃N 100/0 → 99/1) to afford **64** (222 mg, 33 %) as a yellow oil.

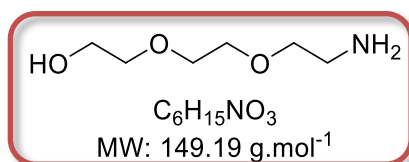
Rf (EtOAc/MeOH 95/5 1 % Et₃N): 0.29.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 3.76 (t, ³J=5.5 Hz, 4H); 3.66-3.63 (m, 4H); 3.61-3.53 (m, 12H); 2.80 (t, ³J=5.4 Hz, 4H); 1.47 (br. s, 1H); 0.89 (s, 18H); 0.06 (s, 12H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 72.6 (2xCH₂); 70.7 (2xCH₂); 70.6 (2xCH₂); 70.4 (2xCH₂); 62.6 (2xCH₂); 49.2 (2xCH₂); 25.9 (6xCH₃); 18.3 (2xC); -5.3 (4xCH₂).

LCMS (ESI): *m/z*: 510 [M+H]⁺.

2-(2-(2-Aminoethoxy)ethoxy)ethan-1-ol (**54**)



To a solution of **11** (200 mg, 1.14 mmol, 1 eq) in anhydrous THF (5 mL) was added PPh₃ (359.5 mg, 1.37 mmol, 1.2 eq) under argon. The mixture was stirred 16 hours at room temperature, then solvent was removed under vacuum and water (15 mL) was added. The mixture was extracted twice with toluene (2x10 mL) and aqueous layer was evaporated under vacuum, then co-evaporated three times with toluene to afford **54** (151 mg, 89 %) as a yellow oil.

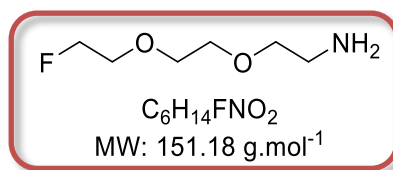
Rf (DCM/MeOH 95/5): 0.60.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 3.73-3.70 (m, 2H); 3.68-3.62 (m, 4H); 3.60-3.59 (m, 2H); 3.54 (t, ³J=5.2 Hz, 2H); 2.87 (t, ³J=5.2 Hz, 2H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 72.6 (CH₂); 71.5 (CH₂); 70.1 (CH₂); 69.9 (CH₂); 61.2 (CH₂); 40.9 (CH₂).

LCMS (ESI): *m/z*: 150 [M+H]⁺.

2-(2-(2-Fluoroethoxy)ethoxy)ethan-1-amine (55)



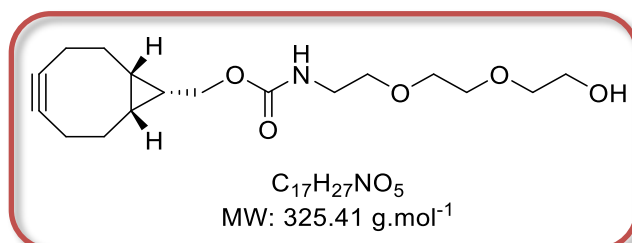
To a solution of **56** (120 mg, 0.68 mmol, 1 eq) in THF (2 mL) was added PPh₃ (213 mg, 0.81 mmol, 1.2 eq). The mixture was stirred 5 hours at room temperature, then 3 eq (37 μL) of water were added. The mixture was stirred 16 hours at room temperature, then solvent was removed under vacuum. The crude residue was purified by column chromatography (DCM/MeOH 1 % Et₃N 99/1 -> 95/5) to afford **55** (102 mg, 99 %) as a brown oil.

Rf (DCM/MeOH 95/5 1 % Et₃N): 0.63.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 4.57 (dt, ²J_{H-F}=47.6 Hz, ³J=4.4 Hz, 2H); 3.75 (dt, ³J_{H-F}=29.6 Hz, ³J=4.4 Hz, 2H); 3.70-3.63 (m, 4H); 3.53 (t, ³J=5.2 Hz, 2H); 2.89 (t, ³J=5.2 Hz, 2H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 83.1 (CH₂, d, ¹J_{C-F}=167.7 Hz); 72.6 (CH₂); 70.7 (CH₂); 70.3 (CH₂, d, ²J_{C-F}=19.8 Hz); 70.1 (CH₂); 41.4 (CH₂).

((1*R*,8*S*,9*S*)-Bicyclo[6.1.0]non-4-yn-9-yl)methyl 2-(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)ethyl carbamate (57)



To a solution of **46** (50 mg, 0.16 mmol, 1 eq) in anhydrous DMF (0.5 mL) were added **54** (28 mg, 0.19 mmol, 1.2 eq) and Et₃N (22 μL, 0.16 mmol, 1 eq). The mixture was stirred 3 hours at room temperature, then a solution of NaOH 1 M (10 mL) was added and the resulting solution was extracted twice with DCM (2x5 mL). The organic layers were combined, dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. The crude residue was purified by column chromatography (toluene/MeOH 100/0 -> 98/2) to afford **57** (43 mg, 83 %) as a colourless oil.

Rf (toluene/MeOH 95/5): 0.23.

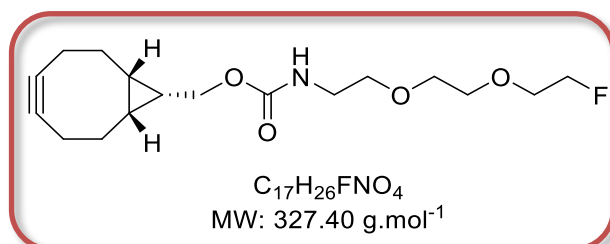
¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 5.34 (br. s, 1H); 4.15 (d, ³J=8.0 Hz, 2H); 3.79-3.73 (m, 2H); 3.70-3.55 (m, 8H); 3.42-3.34 (m, 2H); 2.51 (br. s, 1H); 2.34-2.16 (m, 6H); 1.65-1.51 (m, 2H); 1.43-1.30 (m, 1H); 1.00-0.89 (m, 2H).

^{13}C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 156.7 (C); 98.8 (2x C); 72.5 (CH₂); 70.3 (CH₂); 70.3 (CH₂); 70.1 (CH₂); 62.8 (CH₂); 61.7 (CH₂); 40.7 (CH₂); 29.0 (2xCH₂); 21.4 (2xCH₂); 20.0 (2xCH); 17.7 (CH).

LCMS (ESI): m/z : 326 [M+H]⁺; 348 [M+Na]⁺.

((1*R*,8*S*,9*S*)-Bicyclo[6.1.0]non-4-yn-9-yl)methyl (2-(2-(2-fluoroethoxy)ethoxy)ethyl)carbamate (53)

(2-(2-(2-



To a solution of **46** (30 mg, 0.10 mmol, 1 eq) in anhydrous DMF (0.3 mL) were added **55** (17 mg, 0.12 mmol, 1.2 eq) and Et₃N (13 μL , 0.10 mmol, 1 eq). The mixture was stirred 20 min at room temperature, then NaOH 1 M (10 mL) was added and the resulting solution was extracted twice with DCM (2x5 mL). The organic layers were combined, dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. The crude residue was purified by column chromatography (heptane/EtOAc 100/0 \rightarrow 60/40) to afford **53** (20 mg, 64 %) as a brown oil.

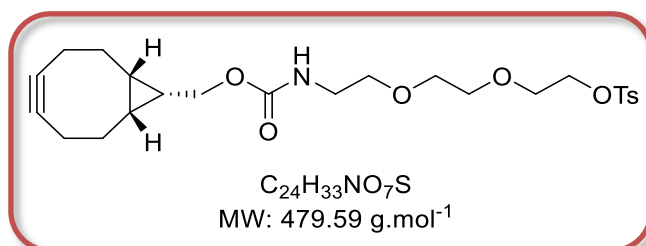
R_f (heptane/EtOAc 1/1): 0.34.

^1H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 5.17 (br. s, 1H); 4.58 (dt, ²J_{H-F}=47.6 Hz, ³J=4.4 Hz; 2H); 4.15 (d, ³J=8.0 Hz; 2H); 3.75 (dt, ³J_{H-F}=29.6 Hz, ³J=4.4 Hz; 2H); 3.70-3.62 (m, 4H); 3.57 (t, ³J=5.2 Hz, 2H); 3.38 (q, ³J=5.2 Hz, 2H); 2.35-2.17 (m, 6H); 1.65-1.51 (m, 2H); 1.42-1.31 (m, 1H); 1.00-0.89 (m, 2H).

^{13}C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 156.7 (C); 98.8 (2x C); 83.1 (CH₂, d, ¹J_{C-F}=168.5 Hz); 70.7 (CH₂); 70.4 (CH₂, d, ²J_{C-F}=19 Hz); 70.2 (CH₂); 70.1 (CH₂); 62.7 (CH₂); 40.7 (CH₂); 29.0 (2xCH₂); 21.4 (2xCH₂); 20.0 (2xCH); 17.7 (CH).

1-((1*R*,8*S*,9*S*)-Bicyclo[6.1.0]non-4-yn-9-yl)-3-oxo-2,7,10-trioxa-4-azadodecan-12-yl methylbenzenesulfonate (52)

4-



To a solution of **53** (33 mg, 0.10 mmol, 1 eq) in DCM (0.5 mL) was added tosyl chloride (23 mg, 0.12 mmol, 1.2 eq), Et₃N (17 μL, 0.12 mmol, 1.2 eq) and DMAP (1 mg, 0.01 mmol, 0.1 eq). The mixture was stirred 1 day at room temperature, then a saturated solution of NH₄Cl (10 mL) was added and the resulting solution was extracted twice with DCM (2x5 mL). The organic layers were combined, washed with brine (5 mL), dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. The crude residue was purified by column chromatography (toluene/EtOAc 100/0 → 25/75) to afford **52** (19 mg, 40 %) as a pale yellow oil.

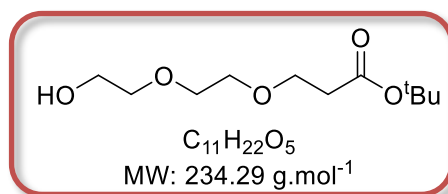
Rf (toluene/EtOAc 3/1): 0.19.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.80 (d, ³J=8.4 Hz, 2H); 7.34 (d, ³J=8.4 Hz, 2H); 5.13 (br. s, 1H); 4.19-4.13 (m, 4H); 3.71-3.68 (m, 2H); 3.60-3.55 (m, 4H); 3.53 (t, ³J=5.2 Hz, 2H); 3.36 (q, ³J=5.2 Hz, 2H); 2.33-2.18 (m, 6H); 1.64-1.55 (m, 2H); 1.37-1.30 (m, 1H); 0.96-0.87 (m, 2H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 156.7 (C); 144.8 (C); 132.9 (C); 129.8 (2xCH); 128.0 (2xCH); 98.8 (2xC); 70.7 (CH₂); 70.2 (CH₂); 70.1 (CH₂); 69.1 (CH₂); 68.7 (CH₂); 62.7 (CH₂); 40.7 (CH₂); 29.0 (2xCH₂); 21.6 (CH₃); 21.4 (2xCH₂); 20.0 (CH); 17.7 (CH).

LCMS (ESI): *m/z*: 502 [M+Na]⁺.

***tert*-Butyl 3-(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)propanoate (**67**)**

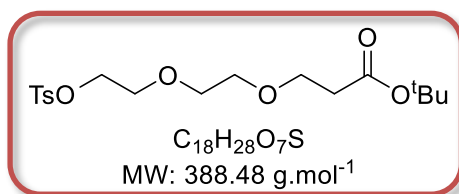


To a suspension of NaH (1.72 mg, 27.5 mmol, 1.1 eq) in anhydrous THF (70 mL) was added diethylene glycol (12.96 mL, 140 mol, 3.5 eq) at 0 °C. After 15 min at 0 °C, *tert*-butyl acrylate (5.71 mL, 40 mmol, 1 eq) was added and the mixture was stirred 16 hours at room temperature. The pH was adjusted to 7-8 by addition of HCl 1 M solution, then a saturated solution of NaHCO₃ was added (120 mL) and the mixture was extracted with DCM (90 mL). The organic layers were combined, dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. The crude residue was purified by column chromatography (heptane/acetone 80/20 → 60/40) to afford **67** (5.070 g, 56 %) as a colourless oil.

Rf (heptane/EtOAc 7/3): 0.25.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 3.74-3.70 (m, 4H); 3.67-3.58 (m, 6H); 2.53-2.47 (m, 2H); 1.44 (s, 9H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 170.9 (C); 80.6 (C); 72.4 (CH₂); 70.3 (2xCH₂); 66.8 (CH₂); 61.7 (CH₂); 36.1 (CH₂); 28.0 (3xCH₃).

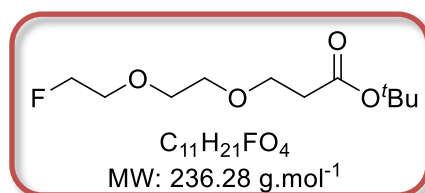
tert-Butyl 3-(2-(2-(tosyloxy)ethoxy)ethoxy)propanoate (68)

To a solution of **67** (469 mg, 2.00 mmol, 1 eq) in DCM (10 mL) were added tosyl chloride (419 mg, 2.20 mmol, 1.1 eq), Et₃N (310 μL, 2.20 mmol, 1.1 eq) and DMAP (24 mg, 0.20 mmol, 0.1 eq). The mixture was stirred 16 hours at room temperature, then a saturated solution of NH₄Cl (30 mL) was added and the mixture was extracted twice with DCM (2x20mL). The organic layers were combined, dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. The crude residue was purified by column chromatography (heptane/EtOAc 75/25) to afford **68** (673 mg, 87 %) as a colourless oil.

Rf (heptane/EtOAc 6/4): 0.40.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.78 (d, ³J=8.4 Hz, 2H); 7.33 (d, ³J=8.4 Hz, 2H); 4.14 (t, ³J=4.8 Hz, 2H); 3.68-3.64 (m, 4H); 3.56-3.52 (m, 4H); 2.47 (t, ³J=6.4 Hz, 2H); 2.44 (s, 3H); 1.43 (s, 9H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 170.8 (C); 144.7 (C); 132.9 (C); 129.8 (2xCH); 127.9 (2xCH); 80.5 (C); 70.6 (CH₂); 70.2 (CH₂); 69.2 (CH₂); 68.6 (CH₂); 66.8 (CH₂); 36.1 (CH₂); 28.0 (3xCH₃); 21.6 (CH₃).

3-(2-(2-Fluoroethoxy)ethoxy)propanoic acid (69)

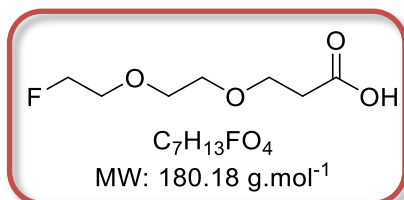
To **68** (155 mg, 0.40 mmol, 1 eq) was added TBAF 1 M in THF (1.20 mL, 1.20 mmol, 3 eq). The mixture was stirred 16h at room temperature, then 4h at 50 °C. After cooling at room temperature, the mixture was concentrated under vacuum. The crude residue was purified by column chromatography (heptane/EtOAc 90/10 -> 80/20) to afford **69** (37 mg, 39 %) as a colourless oil.

Rf (heptane/EtOAc 1/1): 0.55.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 4.56 (dt, ²J_{H-F}=48.0 Hz, ³J=2.8 Hz, 2H); 3.79-3.61 (m, 8H); 2.51 (t, ³J=6.4 Hz, 2H); 1.45 (s, 9H).

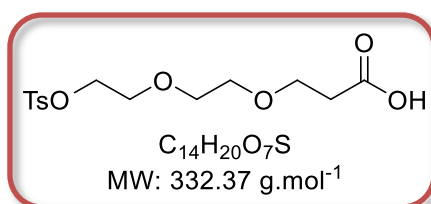
^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ 170.8 (C); 83.1 (CH_2 , d, $^1J_{\text{C-F}}=168$ Hz); 80.5 (C); 70.7 (CH_2); 70.3 (CH_2 , d, $^2J_{\text{C-F}}=19.8$ Hz); 66.9 (CH_2); 36.2 (CH_2); 28.0 ($3\times\text{CH}_3$).

3-(2-(2-Fluoroethoxy)ethoxy)propanoic acid (70)



To a solution of **69** (35 mg, 0.15 mmol, 1 eq) in DCM (0.75 mL) was added TFA (57 μL , 0.74 mmol, 5 eq). The mixture was stirred 16 hours at room temperature, then concentrated under vacuum to afford **70** (100 mg, quantitative) as a crude product used without further purification.

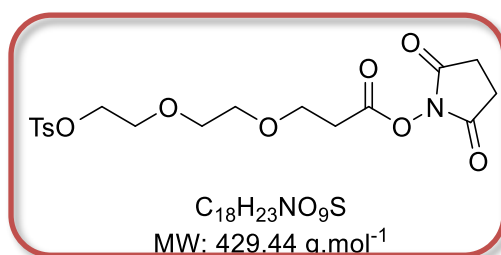
3-(2-(2-(Tosyloxy)ethoxy)ethoxy)propanoic acid (71)



To a solution of **68** (118 mg, 0.30 mmol, 1 eq) in DCM (1.5 mL) was added TFA (115 μL , 1.5 mmol, 5 eq). The mixture was stirred 16 hours at room temperature, then concentrated under vacuum to afford **71** (100 mg, quantitative) as a crude product used without further purification.

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.81 (d, $^3J=8.4$ Hz, 2H); 7.35 (d, $^3J=8.4$ Hz, 2H); 4.16 (t, $^3J=4.8$ Hz, 2H); 3.76 (t, $^3J=6.4$ Hz, 2H); 3.70 (t, $^3J=4.8$ Hz, 2H); 3.63-3.59 (m, 4H); 2.64 (t, $^3J=6.4$ Hz, 2H); 2.45 (s, 3H).

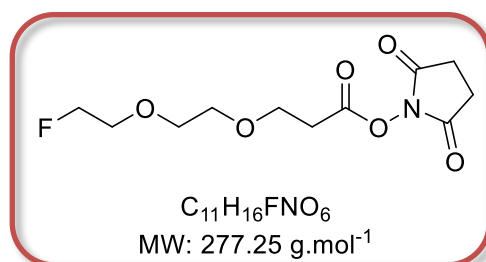
^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ 176.4 (C); 144.8 (C); 132.8 (C); 129.8 (2xCH); 127.9 (2xCH); 70.4 (CH_2); 70.3 (CH_2); 69.2 (CH_2); 68.6 (CH_2); 66.2 (CH_2); 34.7 (CH_2); 21.6 (CH_3).

2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl 3-(2-(2-(tosyloxy)ethoxy)ethoxy)propanoate (72)

To a solution of **71** (100 mg, 0.30 mmol, 1 eq) in DCM (1.5 mL) were added NHS (41 mg, 0.36 mmol, 1.3 eq) and DCC (74 mg, 0.72 mmol, 2.4 eq). The mixture was stirred 24 hours at room temperature. The resulting suspension was filtered and the solid washed with Et₂O (7 mL), then the filtrate was concentrated under vacuum. The crude residue was purified by column chromatography (heptane/EtOAc 50/50 → 25/75) to afford **72** (55 mg, 43 % in 2 steps) as a colourless oil.

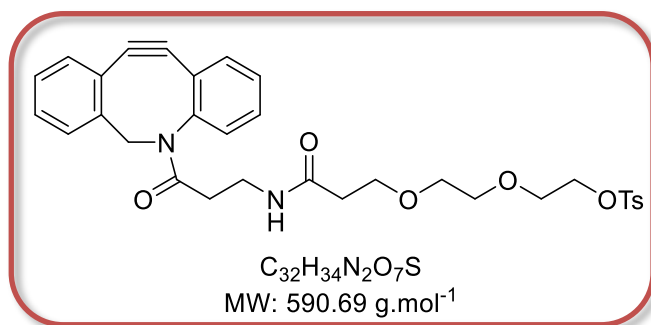
¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.80 (d, ³J=8.4 Hz, 2H); 7.34 (d, ³J=8.4 Hz, 2H); 4.16 (t, ³J=4.8 Hz, 2H); 3.81 (t, ³J=6.4 Hz, 2H); 3.69 (t, ³J=4.8 Hz, 2H); 3.58 (m, 4H); 2.88-2.83 (m, 6H); 2.45 (s, 3H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 168.9 (2xC); 166.7 (C); 144.7 (C); 132.9 (C); 129.7 (2xCH); 127.9 (2xCH); 70.7(CH₂); 70.5 (CH₂); 69.2 (CH₂); 68.7 (CH₂); 65.7 (CH₂); 32.1 (CH₂); 25.5 (2xCH₂); 21.6 (CH₃).

2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl 3-(2-(2-(fluoroethoxy)ethoxy)propanoate (73)

To a solution of **70** (27 mg, 0.15 mmol, 1 eq) in DCM (1.5 mL) were added NHS (19 mg, 0.16 mmol, 1.1 eq) and EDC (52 μL, 0.30 mmol, 2 eq). The mixture was stirred 16 hours at room temperature. The mixture was diluted in DCM (4 mL) and washed with water (5 mL). The organic layers were combined, dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. The crude residue was purified by column chromatography (heptane/EtOAc 50/50) to afford **73** (13 mg, 32 % in 2 steps) as a colourless oil.

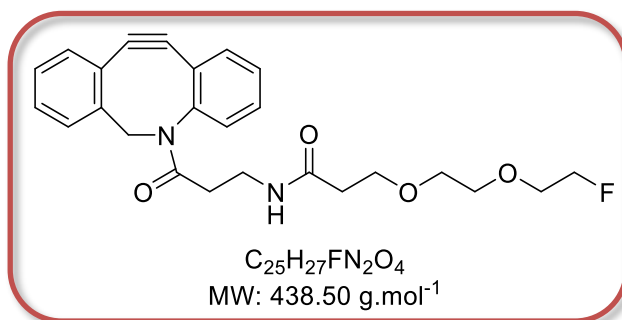
¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 4.57 (dt, ²J_{H-F}=47.6 Hz, ³J=4.4 Hz, 2H); 3.86 (t, ³J=6.4 Hz, 2H); 3.79 (t, ³J=4.4 Hz, 1H); 3.73-3.67 (m, 5H); 2.91 (t, ³J=6.4 Hz, 2H); 2.84 (br. s, 4H).

DBCO-OTs (74)

To a solution of **DBCO-amine** (10.0 mg, 0.036 mmol, 1 eq) in anhydrous DMF (0.5 mL) was added **72** (18.6 mg, 0.043 mmol, 1.2 eq). The mixture was stirred 4 hours at room temperature, then the solution was co-evaporated with a mixture of heptane/toluene 1/1 in order to remove DMF. The crude residue was purified by column chromatography (DCM/MeOH 95.5/0.5 → 98/2) to afford **74** (14 mg, 66 %) as a colourless oil.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.79 (d, $^3J=8.4$ Hz, 2H); 7.66 (d, $^3J=7.2$ Hz, 1H); 7.42-7.26 (m, 9H); 6.52 (m, 1H); 5.12 (d, $^2J=13.6$ Hz, 1H); 4.14 (t, $^3J=4.8$ Hz, 2H); 3.70-3.16 (m, 11H); 2.50-2.45 (m, 1H); 2.44 (s, 3H); 2.29 (m, 2H); 1.94 (ddd, $^2J=16.4$ Hz, $^3J=7.2$ Hz, $^3J=4.4$ Hz, 1H).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ 172.0 (C); 170.9 (C); 151.0 (C); 148.0 (C); 144.8 (C); 132.9 (C); 132.0 (CH); 129.8 (2xCH); 129.0 (CH); 128.5 (CH); 128.3 (CH); 128.2 (CH); 127.9 (2xCH); 127.8 (CH); 127.2 (CH); 123.0 (C); 122.4 (C); 114.7 (C); 107.7 (C); 70.4 (CH_2); 70.1 (CH_2); 69.2 (CH_2); 68.6 (CH_2); 67.1 (CH_2); 55.4 (CH_2); 36.8 (CH_2); 35.0 (CH_2); 34.7 (CH_2); 21.6 (CH_3).

DBCO-F (75)

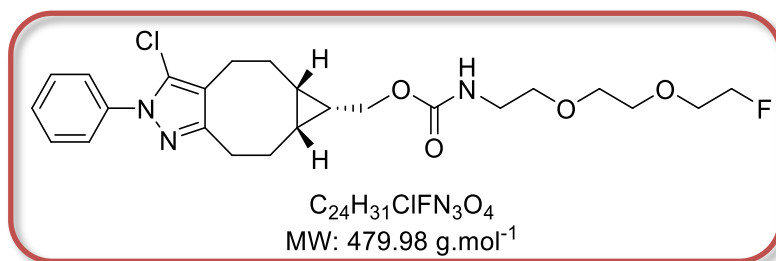
To a solution of **DBCO-amine** (9.6 mg, 0.035 mmol, 1 eq) in anhydrous DMF (0.5 mL) was added **73** (11.6 mg, 0.042 mmol, 1.2 eq). The mixture was stirred 16 hours at room temperature, then the solution was co-evaporated with a mixture of heptane/toluene 1/1 in order to remove DMF. The crude residue was purified by column chromatography (heptane/acetone 60/40) to afford **75** (13 mg, 85 %) as a colourless oil.

R_f (heptane/acetone 1/1): 0.23.

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.67 (d, $^3J=7.6$ Hz, 1H); 7.40-7.26 (m, 7H); 6.57 (t, $^3J=5.2$ Hz, 1H); 5.13 (d, $^2J=13.6$ Hz, 1H); 4.53 (dt, $^2J_{\text{H-F}}=47.6$ Hz, $^3J=4.4$ Hz, 2H); 3.76-3.47 (m, 9H); 3.38-3.21 (m, 2H); 2.48 (ddd, $^2J=16.4$ Hz, $^3J=7.2$ Hz, $^3J=4.4$ Hz, 1H); 2.40-2.26 (m, 2H); 1.96 (ddd, $^2J=16.4$ Hz, $^3J=7.2$ Hz, $^3J=4.4$ Hz, 1H).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ 172.0 (C); 171.0 (C); 151.0 (C); 148.0 (C); 132.0 (CH); 129.0 (CH); 128.5 (CH); 128.3 (CH); 128.2 (CH); 127.8 (CH); 127.2 (CH); 125.5 (CH); 123.0 (C); 122.5 (C); 114.7 (C); 107.7 (C); 83.1 (CH_2 , d, $^1J_{\text{C-F}}=167.6$ Hz); 70.5 (CH_2); 70.3 (CH_2 , d, $^2J_{\text{C-F}}=20.6$ Hz); 70.2 (CH_2); 67.1 (CH_2); 55.4 (CH_2); 36.8 (CH_2); 35.1 (CH_2); 34.7 (CH_2).

((5*a*S,6*S*,6*a*R)-3-Chloro-2-phenyl-2,4,5,5*a*,6,6*a*,7,8-octahydrocyclopropa[5,6]cycloocta[1,2-*c*]pyrazol-6-yl)methyl (2-(2-(2-fluoroethoxy)ethoxy)ethyl)carbamate (76)



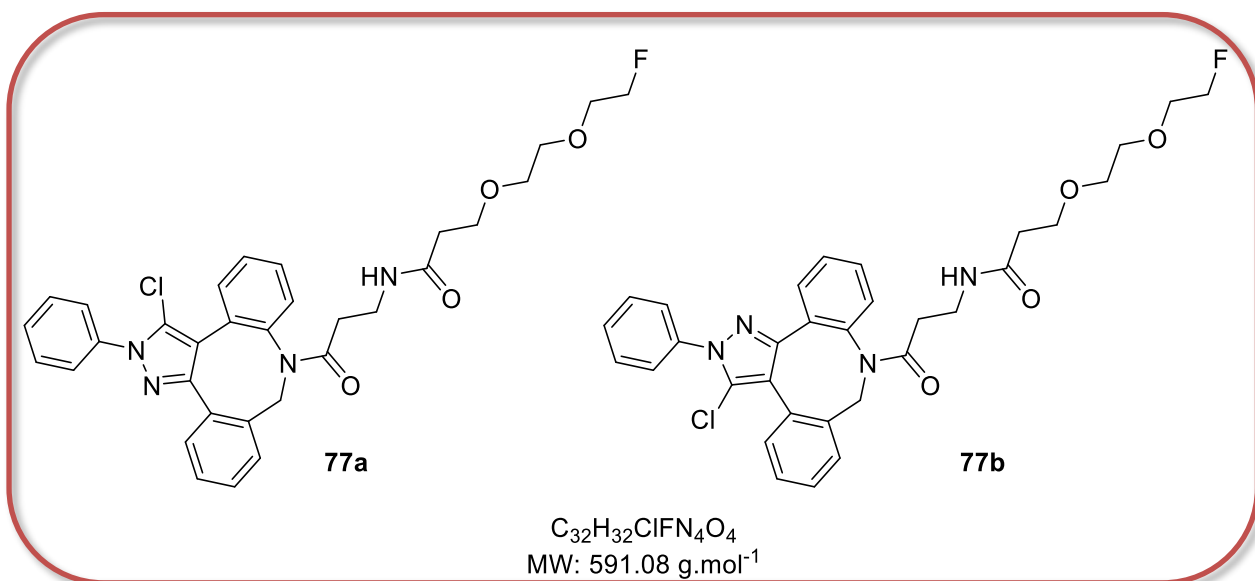
To a solution of **53** (10 mg, 0.03 mmol, 1 eq) in DCM (0.05 mL) was added 5-chloro-1-phenyl-3*H*-pyrazol-1-ium-4-olate **L158** (5.9 mg, 0.03 mmol, 1 eq). The mixture was stirred 3 hours at room temperature, then solvent was removed under vacuum. The crude residue was purified by column chromatography (heptane/EtOAc 100/0 -> 80/20) to afford **76** (12 mg, 82 %) as a pale yellow oil.

Rf (heptane/EtOAc 1/1): 0.29.

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.55-7.52 (m, 2H); 7.48-7.43 (m, 2H); 7.38-7.34 (m, 1H); 5.17 (br. s, 1H); 4.59 (dt, $^2J_{\text{H-F}}=47.6$ Hz, $^3J=4.4$ Hz, 2H); 4.16 (d, $^3J=7.2$ Hz, 2H); 3.75 (dt, $^3J_{\text{H-F}}=29.6$ Hz, $^3J=4.4$ Hz, 2H); 3.70-3.66 (m, 2H); 3.66-3.62 (m, 2H); 3.57 (t, $^3J=4.8$ Hz, 2H); 3.38 (q, $^3J=5.2$ Hz, 2H); 3.04 (ddd, $^2J=15.2$ Hz, $^3J=8.4$ Hz, $^3J=3.2$ Hz, 1H); 2.84 (ddd, $^2J=15.2$ Hz, $^3J=8.4$ Hz, $^3J=2.4$ Hz, 1H); 2.73 (ddd, $^2J=15.2$ Hz, $^3J=8.4$ Hz, $^3J=2.4$ Hz, 1H); 2.48 (ddd, $^2J=15.2$ Hz, $^3J=8.4$ Hz, $^3J=3.2$ Hz, 1H); 2.32-2.21 (m, 2H); 1.52-1.34 (m, 2H); 1.25-1.20 (m, 1H); 1.20-1.12 (m, 2H).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ 156.7 (C); 153.4 (C); 138.5 (C); 128.8 (2xCH); 127.6 (CH); 125.0 (C); 124.7 (2xCH); 118.0 (C); 83.1 (CH_2 , d, $^1J_{\text{C-F}}=168.4$ Hz); 70.7 (CH_2); 70.4 (CH_2 , d, $^2J_{\text{C-F}}=20.5$ Hz); 70.2 (CH_2); 70.1 (CH_2); 62.8 (CH_2); 40.7 (CH_2); 28.0 (CH_2); 23.9 (CH_2); 23.2 (CH_2); 22.6 (CH_2); 20.9 (CH); 20.8 (CH); 18.1 (CH).

***N*-(4-(3-Chloro-2-phenyl-2,9-dihydro-8H-dibenzo[*b,f*]pyrazolo[4,3-*d*]azocin-8-yl)-4-oxobutyl)-3-(2-(2-fluoroethoxy)ethoxy)propanamide (77a)/ *N*-(3-(3-Chloro-2-phenyl-2,8-dihydro-9H-dibenzo[*b,f*]pyrazolo[3,4-*d*]azocin-9-yl)-3-oxopropyl)-3-(2-(2-fluoroethoxy)ethoxy)propanamide (77b)**

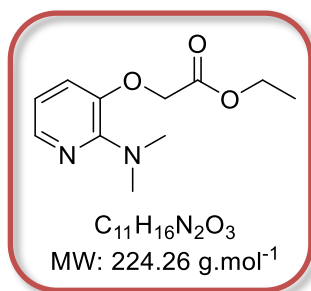


To a solution of **75** (8 mg, 0.02 mmol, 1 eq) in DCM (0.05 mL) was added **L158** (3.6 mg, 0.02 mmol, 1 eq). The mixture was stirred 5 hours at room temperature, then solvent was removed under vacuum. The crude residue was purified by TLC plate chromatography (heptane/acetone 50/50) to afford **77a** and **77b** (6 mg, 69 %) as a yellow oil.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.74-7.69 (m, 2.68H); 7.68-7.64 (m, 1.32H); 7.57-7.16 (m, 22H); 6.88 (t, ³J=6.0 Hz, 1.34 H); 6.77 (t, ³J=6.0 Hz, 0.66 H); 6.15 (d, ²J=16.4 Hz, 1.34 H); 5.95 (d, ²J=15.6 Hz, 0.66 H); 4.61-4.55 (m, 2H); 4.49-4.37 (m, 4H); 3.79-3.50 (m, 16H); 3.43-3.18 (m, 4H); 2.34 (ddd, ³J=7.6 Hz, ³J=6.4 Hz, ⁴J=2.0 Hz, 1.34H); 2.31-2.25 (m, 2.66H); 2.11-2.00 (m, 2H); 1.99-1.89 (m, 0.66 H); 1.85-1.76 (m, 1.34 H).

The ¹H NMR signals of compounds **77a** and **77b** are not all distinguishable.

The ¹³C NMR signals of compounds **77a** and **77b** are not all distinguishable and could not be correctly assigned.

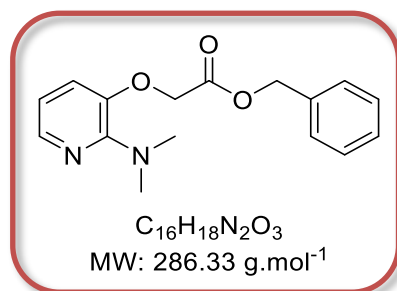
Ethyl 2-((2-(dimethylamino)pyridin-3-yl)oxy)acetate (81)

To a solution of **12** (400 mg, 2.90 mmol, 1 eq) in anhydrous DMF (16 mL) were added ethyl 2-bromoacetate (482 μ L, 4.34 mmol, 1.5 eq) and K₂CO₃ (798 mg, 5.79 mmol, 2 eq) and the mixture was stirred 16 hours at room temperature. After cooling at room temperature, water (50 mL) was added and the resulting solution was extracted twice with EtOAc (2x40 mL). The organic layers were combined, dried over Na₂SO₄, concentrated under vacuum and co-evaporated twice with heptane/toluene 1/1 (5 mL). The crude residue was purified by column chromatography (heptane/EtOAc 90/10 -> 70/30) to afford **81** (472 mg, 73 %) as a light brown oil.

Rf (heptane/EtOAc 1/1): 0.46.

¹H NMR (CDCl₃; 400 MHz): δ 7.90 (dd, ³J=4.8 Hz, ⁴J=1.6 Hz, 1H); 6.94 (dd, ³J=7.6 Hz, ⁴J=1.6 Hz, 1H); 6.72 (dd, ³J=7.6 Hz, ³J=4.8 Hz, 1H); 4.63 (s, 2H); 4.27 (q, ³J=6.8 Hz, 2H); 3.03 (s, 6H); 1.30 (t, ³J=6.8 Hz, 3H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 168.5 (C); 153.2 (C); 144.4 (C); 140.1 (CH); 119.6 (CH); 115.3 (CH); 65.4 (CH₂); 61.4 (CH₂); 40.7 (2xCH₃); 14.1 (CH₃).

Benzyl 2-((2-(dimethylamino)pyridin-3-yl)oxy)acetate (83)

To a solution of **12** (650 mg, 4.70 mmol, 1 eq) in anhydrous DMF (20 mL) was added K₂CO₃ (1,30 g, 9.41 mmol, 2 eq) and the mixture was stirred 15 min at room temperature. Benzyl bromoacetate (1,62 g, 7.06 mmol, 1.5 eq) was then added and the mixture was stirred 6 hours at room temperature, then water (50 mL) was added and the resulting solution was extracted twice with EtOAc (40 mL). The organic layers were combined, dried over Na₂SO₄, concentrated under vacuum and co-evaporated twice with heptane/toluene 1/1 (10 mL).

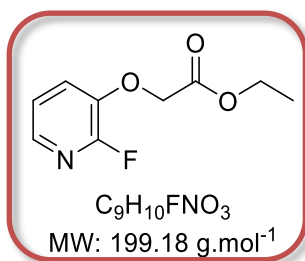
The crude residue was purified by column chromatography (heptane/EtOAc 100/0 -> 50/50) to afford **83** (1,10 g, 81 %) as a light green oil.

Rf (heptane/EtOAc 1/1): 0.60.

¹H NMR (CDCl₃; 400 MHz): δ 7.90 (dd, ³J=4.8 Hz, ⁴J=1.6 Hz, 1H); 7.40-7.31 (m, 5H); 6.92 (dd, ³J=8.0 Hz, ⁴J=1.6 Hz, 1H); 6.69 (dd, ³J=8.0 Hz, ³J=4.8 Hz, 1H); 5.23 (s, 2H); 4.68 (s, 2H); 3.02 (s, 6H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 168.3 (C); 153.2 (C); 144.3 (C); 140.2 (CH); 135.0 (C); 128.6 (2xCH); 128.6 (2xCH); 128.4 (CH); 119.7 (CH); 115.3 (CH); 67.1 (CH₂); 65.4 (CH₂); 40.7 (2xCH₃).

Ethyl 2-((2-fluoropyridin-3-yl)oxy)acetate (**84**)

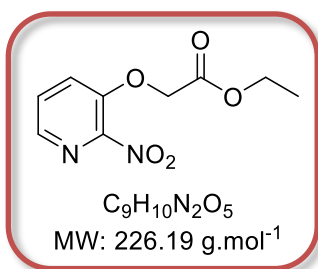


To a solution of 2-fluoropyridin-3-ol (200 mg, 1.77 mmol, 1 eq) in anhydrous DMF (8 mL) were added ethyl 2-bromoacetate (294 μL, 2.65 mmol, 1.5 eq) and K₂CO₃ (488 mg, 3.54 mmol, 2 eq). The mixture was stirred 16 hours at room temperature, then water (30 mL) was added. The solution was extracted twice with EtOAc (2x20 mL). The organic layers were combined, dried over Na₂SO₄, concentrated under vacuum and co-evaporated twice with heptane/toluene 1/1 (2x10 mL). The crude residue was purified by column chromatography (heptane/Et₂O 100/0 -> 70/30) to afford **84** (347 mg, 99 %) as a colourless oil.

Rf (heptane/Et₂O 1/1): 0.45.

¹H NMR (CDCl₃; 400 MHz): δ 7.82 (ddd, ³J=4.8 Hz, ⁴J=1.2 Hz, ⁴J_{H-F}=1.2 Hz, 1H); 7.29 (ddd, ⁴J_{H-F}=9.6 Hz, ³J=8.0 Hz, ⁴J=1.6 Hz, 1H); 7.11 (ddd, ³J=8.0 Hz, ³J=4.8 Hz, ⁵J_{H-F}=0.4 Hz, 1H); 4.71 (s, 2H); 4.27 (q, ³J=7.2 Hz, 2H); 1.29 (t, ³J=7.2 Hz, 3H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 167.9 (C); 153.8 (C, d, ¹J_{C-F}=237.7 Hz); 141.1 (C, d, ²J_{C-F}=25.2 Hz); 139.9 (CH, d, ³J_{C-F}=13.0 Hz); 124.7 (CH, d, ³J_{C-F}=3.8 Hz); 121.7 (CH, d, ⁴J_{C-F}=3.8 Hz); 66.4 (CH₂); 61.6 (CH₂); 14.0 (CH₃).

Ethyl 2-((2-nitropyridin-3-yl)oxy)acetate (85)

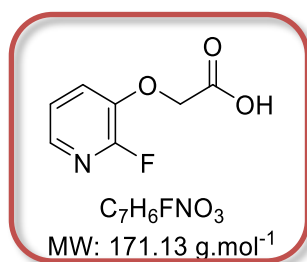
To a solution of 2-nitro-3-hydroxypyridine (700 mg, 5.00 mmol, 1 eq) in anhydrous DMF (28 mL) were added ethyl 2-bromoacetate (831 μ L, 7.50 mmol, 1.5 eq) and K₂CO₃ (1378 mg, 10.00 mmol, 2 eq). The mixture was stirred 16 hours at room temperature and Water (100 mL) was added. The solution was extracted twice with EtOAc (2x70 mL). The organic layers were combined, dried over Na₂SO₄, concentrated under vacuum and co-evaporated twice with heptane/toluene 1/1 (2x10 mL). The crude residue was purified by column chromatography (heptane/EtOAc 90/10 \rightarrow 40/60) to afford **85** (1130 mg, 99 %) as a yellow solid.

Mp: 47.0-48.3 °C.

Rf (heptane 1/1 EtOAc): 0.60.

¹H NMR (CDCl₃; 400 MHz): δ 8.16 (dd, ³J=4.4 Hz, ⁴J=1.6 Hz, 1H); 7.53 (dd, ³J=8.4 Hz, ³J=4.4 Hz, 1H); 7.44 (dd, ³J=8.4 Hz, ⁴J=1.6 Hz, 1H); 4.79 (s, 2H); 4.27 (q, ³J=7.2 Hz, 2H); 1.29 (t, ³J=7.2 Hz, 3H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 167.1 (C); 149.1 (C); 146.3 (C); 140.5 (CH); 128.4 (CH); 124.3 (CH); 66.3 (CH₂); 62.0 (CH₂); 14.0 (CH₃).

2-((2-Fluoropyridin-3-yl)oxy)acetic acid (86)

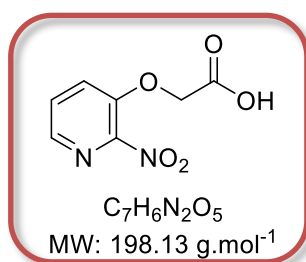
To a solution of **84** (50 mg, 0.25 mmol, 1 eq) in a mixture of THF/water 19/1 (2 mL) was added NaOH (20 mg, 0.50 mmol, 2 eq). The mixture was stirred 16 hours at room temperature. A precipitate was formed, then dissolved with addition of water (1 mL). The solution was extracted twice with EtOAc (2x10 mL). The pH was adjusted to pH=1 with HCl 1 M. The organic layers were combined, dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. The crude residue was not further purified and afforded **86** (42 mg, 99 %) as a white solid.

Mp: 139.8-141.6 °C.

¹H NMR (DMSO; 400 MHz): δ 7.75 (ddd, ³J=4.8 Hz, ⁴J=1.6 Hz, ⁴J_{H-F}=1.6 Hz, 1H); 7.59 (ddd, ⁴J_{H-F}=10.8 Hz, ³J=8.0 Hz, ⁴J=1.6 Hz, 1H); 7.28 (ddd, ³J=8.0 Hz, ³J=4.8 Hz, ⁵J_{H-F}=0.4 Hz, 1H); 4.86 (s, 2H).

¹³C NMR (DMSO, 100 MHz): δ 169.8 (C); 153.0 (C, d, ¹J_{C-F}=233.2 Hz); 141.3 (C, d, ²J_{C-F}=25.9 Hz); 137.7 (CH, d, ³J_{C-F}=13.0 Hz); 124.2 (CH, d, ³J_{C-F}=3.8 Hz); 122.9 (CH, d, ⁴J_{C-F}=3.8 Hz); 65.3 (CH₂).

2-((2-Nitropyridin-3-yl)oxy)acetic acid (**87**)

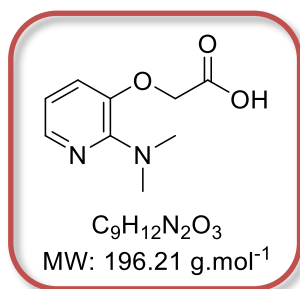


To a solution of **85** (50 mg, 0.22 mmol, 1 eq) in a mixture of THF/water 19/1 (2 mL) was added NaOH (18 mg, 0.44 mmol, 2 eq) and the resulting mixture was stirred 16 hours at room temperature. The resulting white precipitate was dissolved with water (1 mL), the pH was adjusted to pH=1 with HCl 1 M and the solution was extracted twice with EtOAc (2x10 mL). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, concentrated under vacuum to afford **87** (44 mg, 99 %) as a light yellow solid. The crude compound was engaged in the next step without any further purification.

Mp: 178.4-183.2 °C.

¹H NMR (DMSO; 400 MHz): δ 8.13 (dd, ³J=4.4 Hz, ⁴J=1.2 Hz, 1H); 7.90 (dd, ³J=8.4 Hz, ⁴J=1.2 Hz, 1H); 7.74 (dd, ³J=8.4 Hz, ³J=4.4 Hz, 1H); 4.99 (s, 2H).

¹³C NMR (DMSO, 100 MHz): δ 169.4 (C); 148.9 (C); 145.8 (C); 140.1 (CH); 129.6 (CH); 125.7 (CH); 65.7 (CH₂).

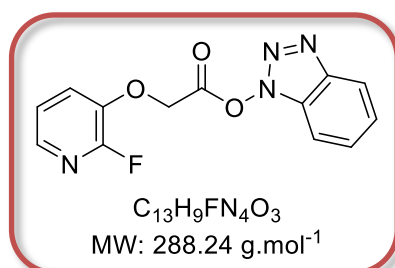
2-((2-(Dimethylamino)pyridin-3-yl)oxy)acetic acid (80**)**

To a solution of **81** (200 mg, 0.89 mmol, 1 eq) in a mixture of THF/water 19/1 (20 mL) was added NaOH (311 μ L, 1.78 mmol, 2 eq). The mixture was stirred 16 hours at 50 °C and THF (10 mL) was added. The mixture was dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under vacuum to afford **80** (172 mg, 98 %) as a pale yellow solid.

Mp: 51.0-53.2 °C.

¹H NMR (DMSO; 400 MHz): δ 7.65 (dd, ³J=4.8 Hz, ⁴J=1.2 Hz, 1H); 6.93 (dd, ³J=7.8 Hz, ⁴J=1.2 Hz, 1H); 6.68 (dd, ³J=7.8 Hz, ³J=4.8 Hz, 1H); 4.19 (s, 2H); 2.91 (s, 6H).

¹³C NMR (DMSO, 100 MHz): δ 171.3 (C); 152.6 (C); 146.0 (C); 137.5 (CH); 118.4 (CH); 115.7 (CH); 68.1 (CH₂); 40.9 (2xCH₂).

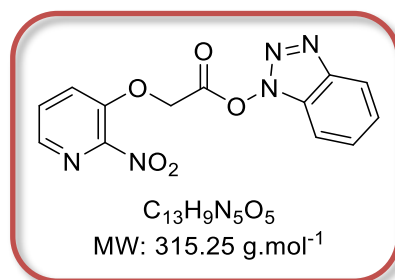
1H-Benzo[d][1,2,3]triazol-1-yl 2-((2-fluoropyridin-3-yl)oxy)acetate (88**)**

To a solution of **86** (40 mg, 0.23 mmol, 1 eq) in anhydrous DCM (3 mL) were added EDC.HCl (90 mg, 0.47 mmol, 2 eq) and HOBT (41 mg, 0.30 mmol, 1.3 eq). The mixture was stirred 1 day at room temperature, then water (3 mL) was added and the solution was extracted twice with EtOAc (2x10 mL). The organic layers were combined, dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. The crude residue was not further purified and afforded **88** (65 mg, 97 %) as a white solid.

Mp: 121.2-123.2 °C.

¹H NMR (CDCl₃; 400 MHz): δ 7.82 (br. d, ³J=8.2 Hz, 1H); 7.75 (ddd, ³J=4.8 Hz, ⁴J=1.6 Hz, ⁴J_{H-F}=1.6 Hz, 1H); 7.66 (br. d, ³J=8.2 Hz, 1H); 7.46-7.35 (m, 2H); 7.28 (ddd, ⁴J_{H-F}=9.6 Hz, ³J=8.0 Hz, ⁴J=1.4 Hz, 1H); 7.09 (ddd, ³J=8.0 Hz, ³J=4.8 Hz, ⁵J_{H-F}=0.4 Hz, 1H); 4.66 (s, 2H).

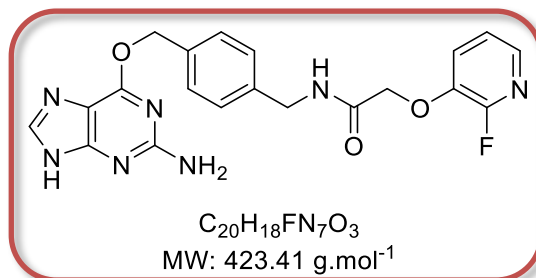
1H-Benzo[d][1,2,3]triazol-1-yl 2-((2-fluoropyridin-3-yl)oxy)acetate (89)



To a solution of **87** (55 mg, 0.30 mmol, 1 eq) in anhydrous DCM (4 mL) were added EDC.HCl (116 mg, 0.61 mmol, 2 eq) and HOBT (53 mg, 0.39 mmol, 1.3 eq). The mixture was stirred 1 day at room temperature, then water (3 mL) was added and the solution was extracted twice with EtOAc (2x10 mL). The organic layers were combined, dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. The crude residue was not further purified and afforded **89** (37 mg, 42 %) as a white solid.

¹H NMR (DMSO; 400 MHz): δ 8.11 (dd, ³J=4.4 Hz, ⁴J=1.2 Hz, 1H); 7.94 (d, ³J=8.4 Hz, 1H); 7.85 (d, ³J=8.4 Hz, 1H); 7.72 (dd, ³J=8.4 Hz, ³J=4.4 Hz, 1H); 7.67 (d, ³J=8.4 Hz, 1H); 7.51-7.45 (m, 1H); 7.40-7.34 (m, 1H); 4.90 (s, 2H).

N-(4-(((2-Amino-9H-purin-6-yl)oxy)methyl)benzyl)-2-((2-fluoropyridin-3-yl)oxy)acetamide (90)



To a solution of **88** (60 mg, 0.21 mmol, 1.1 eq) in anhydrous DMF (3 mL) was added 6-((4-(aminomethyl)benzyl)oxy)-9H-purin-2-amine (51.2 mg, 0.19 mmol, 1 eq). The mixture was stirred 6 hours at room temperature, then DMF was removed and co-evaporated with heptane/toluene 1/1 (2x5 mL). The product was centrifuged twice in MeOH (1 mL), supernatant were removed and solid recovered to afford quite pure **90** (49 mg, 56 %) as a pale yellow solid.

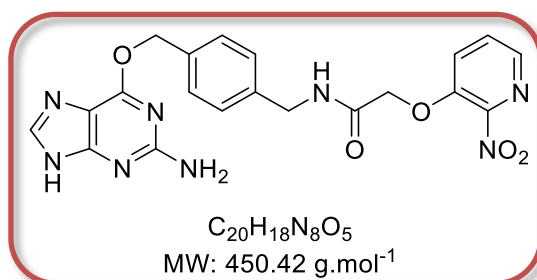
Mp: 181 °C (degradation temperature).

¹H NMR (DMSO; 400 MHz): δ 7.82 (br. s, 1H); 7.63 (ddd, ³J=4.8 Hz, ⁴J=1.2 Hz, ⁴J_{H-F}=1.2 Hz, 1H); 7.52 (d, ³J=8.0 Hz, 2H); 7.44 (d, ³J=8.0 Hz, 2H); 7.33 (ddd, ⁴J_{H-F}=9.6 Hz, ³J=8.0 Hz, ⁴J=1.2 Hz, 1H); 7.19 (ddd, ³J=8.0 Hz, ⁴J=4.8 Hz, ⁵J_{H-F}=0.8 Hz, 1H); 6.29 (br. s, 2H); 5.48 (s, 2H); 4.36 (s, 2H); 3.96 (s, 2H).

^{13}C NMR (DMSO, 100 MHz): δ 170.1 (C); 160.0 (2xC); 153.0 (C, d, $^1J_{\text{C-F}}=234.6$ Hz); 142.4 (C, d, $^2J_{\text{C-F}}=25.1$ Hz); 138.8 (CH); 137.1 (C); 136.2 (CH, d, $^3J_{\text{C-F}}=13.0$ Hz); 135.4 (C); 129.1 (2xCH); 128.9 (2xCH); 123.7 (CH, d, $^3J_{\text{C-F}}=3.9$ Hz); 122.6 (CH, d, $^4J_{\text{C-F}}=3.0$ Hz); 67.6 (CH₂); 66.7 (CH₂); 42.5 (CH₂).

It should be noted that two signals on ^{13}C NMR spectra are not visible.

***N*-(4-(((2-Amino-9H-purin-6-yl)oxy)methyl)benzyl)-2-((2-nitropyridin-3-yl)oxy)acetamide (91)**



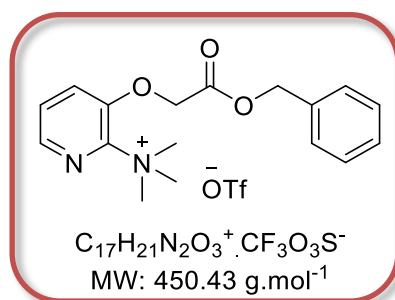
To a solution of **88** (60 mg, 0.21 mmol, 1.1 eq) in anhydrous DMF (3 mL) was added 6-((4-(aminomethyl)benzyl)oxy)-9H-purin-2-amine (51.2 mg, 0.19 mmol, 1 eq). The mixture was stirred 6 hours at room temperature, then DMF was removed and co-evaporated with heptane/toluene 1/1 (2x5 mL). The product was centrifuged twice in MeOH (1 mL), supernatant were removed and solid recovered to afford quite pure **91** (49 mg, 56 %) as a yellow solid.

Mp: 193 °C (degradation temperature).

^1H NMR (DMSO; 400 MHz): δ 8.00-7.98 (m, 1H); 7.82 (br.s, 1H); 7.67-7.55 (m, 2H); 7.53 (d, $^3J=8.0$ Hz, 2H); 7.44 (d, $^3J=8.0$ Hz, 2H); 7.16-7.13 (m, 1H); 6.30 (br. s, 2H); 5.48 (s, 2H); 4.42 (s, 2H); 3.98 (s, 2H).

It should be noted that few signals on ^{13}C NMR spectra are not visible and could not be assigned.

3-(2-(Benzyloxy)-2-oxoethoxy)-*N,N,N*-trimethylpyridin-2-ammonium trifluoromethanesulfonate (92)

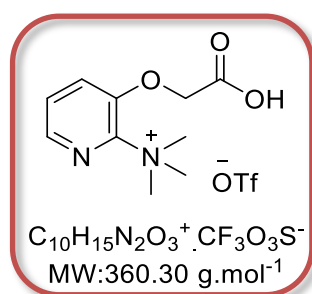


To a solution of **83** (320 mg, 1.12 mmol, 1 eq) in anhydrous toluene (10 mL) was added methyl trifluoromethanesulfonate (164 μ L, 1.46 mmol, 1.3 eq) and NaHCO₃ (469 mg, 5.60 mmol, 5 eq). The mixture was stirred 2 hours at room temperature, then solvent was removed under vacuum and the residue triturated in DCM. The mixture was then filtered and washed with DCM (3x5 mL). The filtrate was recovered, concentrated under vacuum to afford **92** (463 mg, 92 %) as a light yellow oil which was used without any further purification.

¹H NMR (CDCl₃; 400 MHz): δ 8.13 (dd, ³J=4.8 Hz, ⁴J=1.6 Hz, 1H); 7.55 (dd, ³J=8.4 Hz, ³J=4.8 Hz, 1H); 7.48 (dd, ³J=8.4 Hz, ⁴J=1.6 Hz, 1H); 7.39-7.31 (m, 5H); 5.22 (s, 2H); 5.07 (s, 2H); 3.74 (s, 9H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 166.8 (C); 146.1 (C); 142.7 (C); 139.5 (CH); 134.5 (C); 128.8 (CH); 128.7 (CH); 128.6 (2xCH); 128.5 (2xCH); 124.2 (CH); 120.6 (C, q, ¹J_{C-F}=320.5 Hz); 67.7 (CH₂); 65.4 (CH₂); 54.4 (3xCH₃).

3-(Carboxymethoxy)-*N,N,N*-trimethylpyridin-2-aminium trifluoromethanesulfonate (**93**)



A suspension of **92** (300 mg, 0.67 mmol, 1 eq) and Pd/C (106 mg, 0.07 mmol, 0.15 eq) in EtOAc/DCM 4/1 (5 mL) was stirred 2 days at room temperature under H₂ atmosphere. The mixture was filtered through a pad of Celite and the residue was washed three times with EtOAc (5 mL) and three times with DCM (5 mL). The filtrate was recovered and concentrated under vacuum to afford **93** (114 mg, 48 %) as a pale brown oil without further purification.

¹H NMR (DMSO; 400 MHz): δ 8.15 (dd, ³J=4.4 Hz, ⁴J=0.8 Hz, 1H); 7.86 (dd, ³J=8.2 Hz, ⁴J=0.8 Hz, 1H); 7.70 (dd, ³J=8.2 Hz, ³J=4.4 Hz, 1H); 4.88 (s, 2H); 3.66 (s, 9H).

¹³C NMR (DMSO, 100 MHz): δ 169.5 (C); 147.0 (C); 143.1 (C); 139.0 (CH); 128.6 (CH); 125.6 (CH); 66.4 (CH₂); 53.9 (3xCH₃).

2. Radiochemistry

2.1. General procedure for fluorine-18 radiolabeling

All radiochemical yields (RCY) obtained were expressed in percentage and are decay-corrected (d.c.) from the end of bombardment (EOB). The radiochemical purities (RP) were expressed in percentage.

a) Radiosynthesis description

All radiosyntheses were performed using the TRACERLab FX N Pro synthesizer, of which a description is given below (Figure 129).

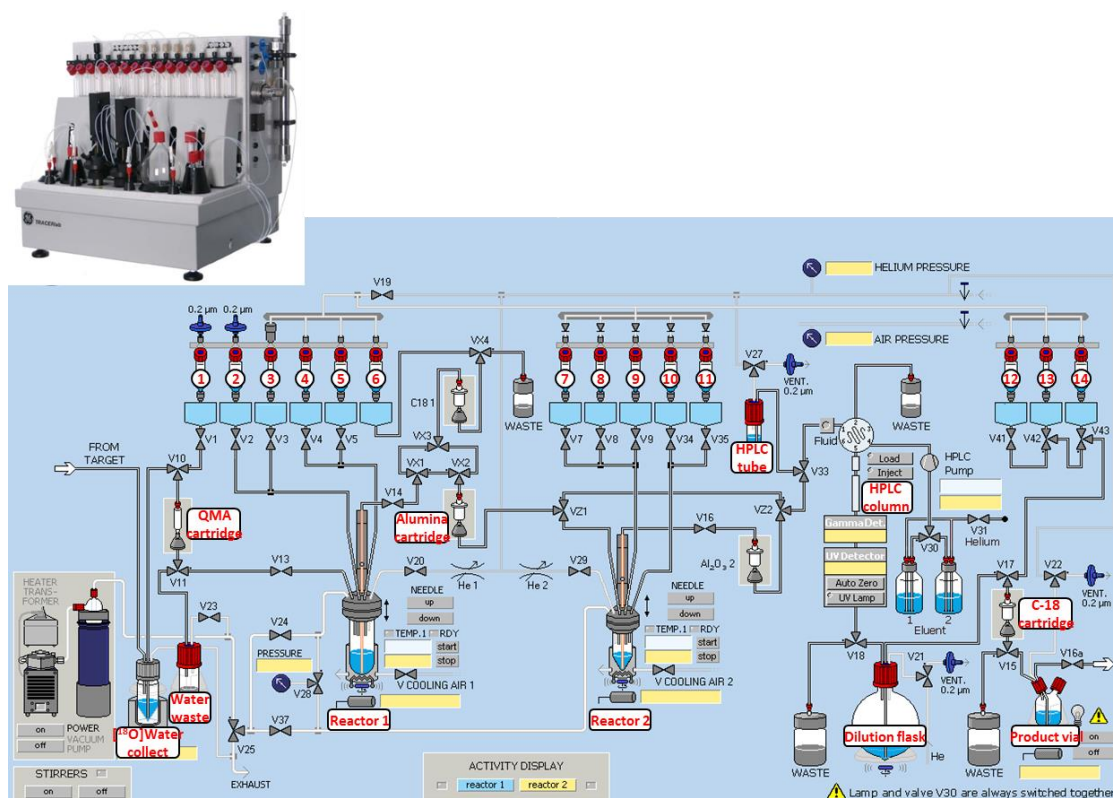


Figure 129. Synthesizer TRACERLab FX N Pro description

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 : $K[^{18}F]/K_{222}$ preparation”, “Time list 2: radiofluorination and pre-purification” and “Time list 3 : purification and formulation”. Before each radiotracer batch production, the synthesizer was cleaned out, purged from any residual chemicals or solvents left-over (reservoirs, reactors and tubings) from a previous radiotracer production and dried.

In order to perform the reaction, the synthesizer is filled in with the solutions and products required for the radiosynthesis as the following procedure in table 1.

Reservoirs	Products
Reservoir 1	1 mL of distilled water and acetonitrile (30 / 70) 1.5 or 4.5 mg of K ₂ CO ₃ 12 to 15 mg of Kryptofix® 222
Reservoir 3	4 to 5 mg of precursor in 0.7 to 1 mL of organic solvent
Reservoir 4	2 mL of HPLC solvent
Reservoir 5	2 mL of HPLC solvent
Reservoir 12	10 mL of distilled water
Reservoir 13	2 mL of ethanol
Reservoir 14	2 mL of distilled water
Dilution flask	20 mL of distilled water

Table 1. Preparation of the TRACERLab FX N Pro

b) Radioisotope production

No carrier added aqueous [¹⁸F]fluoride ion was produced *via* the [¹⁸O(p,n)¹⁸F] nuclear reaction by irradiation of a 2 mL [¹⁸O]water target (> 97 % enriched, CortecNet) on an Cyclone-18 / 9 cyclotron (18 MeV proton beam, IBA) and automatically transferred to the TRACERLab FX N Pro placed in an appropriate lead-shielded hot-cell. Typical production of [¹⁸F]fluoride ion at the end of bombardment for a 25 µA, 30 min (12.5 µA.h) irradiation: 30-35 GBq.

c) K[¹⁸F]F/K₂₂₂ preparation

The irradiated water is passed through an anion exchange resin QMA light (Waters) cartridge to remove the enriched water and fix the [¹⁸F]fluoride anions. The [¹⁸F]fluoride anions are then eluted to the reactor using a solution of potassium carbonate and Kryptofix 222 in a mixture of acetonitrile and water from **reservoir 1**. The K[¹⁸F]F/K₂₂₂ 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.

d) Fluorine-18 prosthetic groups labeling and purification

The precursor for labelling (4 to 5 mg) in solution in dimethylsulfoxide or acetonitrile (0.7 to 1 mL) is added to the dried K[¹⁸F]F/K₂₂₂ complex from **reservoir 3**, and radiofluorination is then performed at temperatures ranging from 90 to 160 °C for 5 to 15 minutes (Table 2). After cooling to 50 °C, the crude is diluted with the HPLC solvent used for the purification step (2 mL) from **reservoir 4** and passed through an alumina *N* (Waters) cartridge. The reactor is then rinsed once with the same HPLC solvent (2 mL) from **reservoir 5** and the solution passed again through the alumina cartridge.

The combined crude solution is transferred to the HPLC injection loop and injection is automatically performed using a fluid detector. Semi-preparative HPLC purification (Table 2)

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 is collected, diluted with water (20 mL) and this solution passed through a Sep-Pak®Plus C18 cartridge (Waters). The cartridge is then rinsed with water (10 mL) from **reservoir 12**, the radiotracer eluted with ethanol (2 mL) from **reservoir 13** and the solution further diluted with water (2 mL) from **reservoir 14**.

e) Quality controls

Analytical HPLC (Table 2) was performed as quality control to confirm the chemical identity of the formulated labelled product, as well as its chemical and radiochemical purities. 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, were 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.

f) Molar activity determination

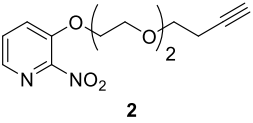
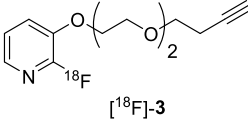
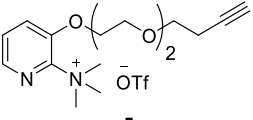
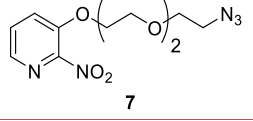
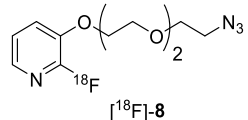
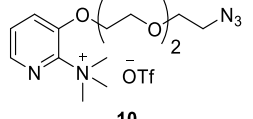
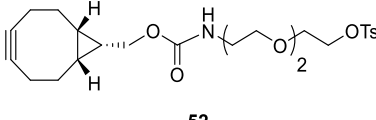
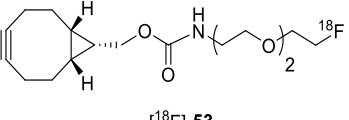
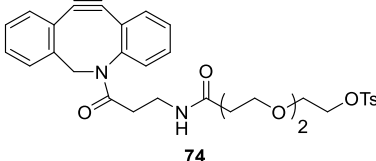
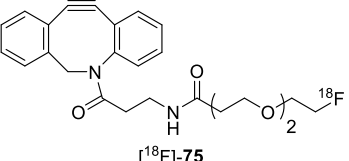
Molar activity of the radiotracer was calculated from three consecutive HPLC analyses and determined as follows: the molar quantity of the radiotracer was determined with the area of the UV peak using a calibration curve whereas the radioactivity was determined by collecting the fraction and measuring in an ionization chamber (Capintec, CRC-15R, France). The molar activity, as a mean of three independent experiments, was calculated by dividing the counted radioactivity by the found molar quantity.

2.2. Fluorine-18 labelling of compounds

a) Prosthetic groups [¹⁸F]fluorination

The [¹⁸F]fluorination of the different prosthetic groups was performed on the TRACERLab FX N pro synthesizer and radiosyntheses specificities were reported on the following table (Table 2) :

Experimental part – Radiochemistry

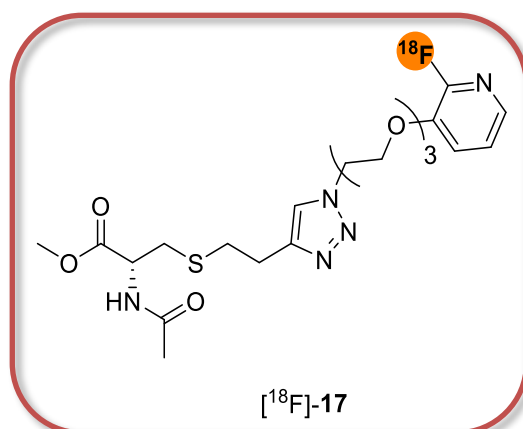
Precursors	Radiofluorination conditions ^[a]	HPLC conditions ^[b]	Retention time (min)	RCY (d.c.) and RP	Quality controls ^[c]	Molar activity	¹⁸ F-compounds
 2	DMSO (0.7 mL) 160 °C, 5 min	A	10-11	35 % > 99 %	(1)/(2) 60/40 2.7 min	118 GBq. μmol ⁻¹	 [¹⁸ F]-3
 5	DMSO (0.7 mL) 160 °C, 5 min	B	≈ 15	21 % > 99 %			
 7	DMSO (0.7 mL) 160 °C, 5 min	A	16-17	39 % > 99 %	(1)/(2) 60/40 2.6 min	145 GBq. μmol ⁻¹	 [¹⁸ F]-8
 10	DMSO (0.7 mL) 160 °C, 5 min	B	12-13	25 % > 99 %			
 52	MeCN (1 mL) 90 °C, 15 min	C	12-13	20 % > 99 %	(1)/(2) 50/50 3.7 min	n.d.	 [¹⁸ F]-53
 74	MeCN (1 mL) 90 °C, 15 min	D	5-6	33 % > 99 %	(1)/(2) 50/50 2.7 min	n.d.	 [¹⁸ F]-75

[a] Radiochemistry conditions : K[¹⁸F]F/K₂₂₂, K₂CO₃.

[b] Zorbax SB-C18 column (9.4x250 mm). Conditions **A**: H₂O/MeOH/THF/H₃PO₄: 65/17.5/17.5/0.1 (v/v/v/v); conditions **B**: H₂O/MeCN/TFA 70/30/0.1 (v/v/v); conditions **C**: H₂O/MeCN/TFA 60/40/0.1 (v/v/v); conditions **D**: H₂O/MeCN/TFA 40/60/0.1 (v/v/v); detection λ=254 nm; flow rate : 5 mL.min⁻¹.

[c] Symmetry column (4.6x50 mm). Quality control conditions: PIC B7 Low UV Reagent in water (1) / PIC B7 Low UV Reagent in water/MeCN 30/70 (2). Flow rate : 2 mL.min⁻¹

Table 2. Radiofluorination of prosthetic groups

b) ^{18}F -compounds of cycloaddition✓ Copper-catalyzed cycloaddition between ^{18}F -**8** and **15**

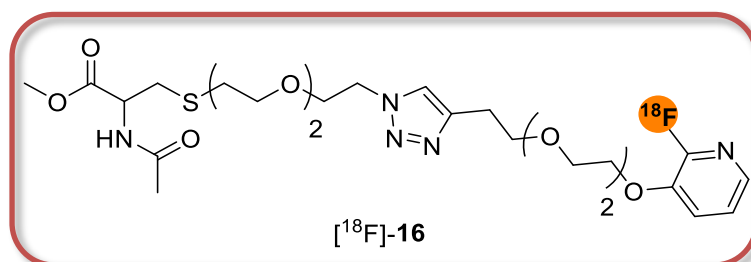
Kinetics of the formation of ^{18}F -**17** was studied firstly in different catalytic systems (CuI/DIEA/sodium ascorbate or CuSO_4 /sodium ascorbate), at different temperatures (room temperature and 40 °C) and secondly with decreasing amounts of compound **15**. The kinetic study was carried out as follows: an aliquot of ^{18}F -**8** (333 to 444 MBq, 3 to 3.7 nmol based on average molar activity of $120 \text{ GBq} \cdot \mu\text{mol}^{-1}$) in a mixture of water and ethanol (50/50, 200 μL) was mixed with **15** in MeCN (1 mg, 4.3 μmol , 100 μL) and aq. solutions of CuSO_4 (3.4 mg, 21.8 μmol , 5 eq, 100 μL)/sodium ascorbate (17.3 mg, 87 μmol , 20 eq, 100 μL) or CuI (8.2 mg, 43 μmol , 10 eq, 100 μL)/sodium ascorbate (17.3 mg, 87 μmol , 20 eq, 100 μL)/DIEA (4 μL) and diluted with H_2O (300 μL) and *t*BuOH (200 μL). The reaction was then left standing at room temperature or heated at 40 °C. Aliquots were withdrawn at 5, 15 and 30 min and analyzed by analytical HPLC (1)/(2) 70/30 (v/v).

The reaction was then repeated (only at 40 °C) with an aliquot of ^{18}F -**8** (333 to 444 MBq, 3 to 3.7 nmol based on an average molar activity of $120 \text{ GBq}/\mu\text{mol}$) in a mixture of H_2O and ethanol (50/50, 200 μL) mixed with aq. solutions of CuSO_4 (3.4 mg, 21.8 μmol , 5 eq., 100 μL)/sodium ascorbate (17.3 mg, 87 μmol , 20 eq., 100 μL) and decreasing amounts of **15** in MeCN (from 1 mg to 0.01 mg, 4.3 μmol to 43 nmol, 100 μL). Aliquots were withdrawn at 5, 15 and 30 min and analyzed by analytical HPLC (1)/(2) 70/30 (v/v).

In these elution conditions, retention times were 5.2 min for ^{18}F -**8** and 2.8 min for ^{18}F -**17**. Conversion was evaluated by integration and comparison of the areas of the peaks of compounds ^{18}F -**8** to ^{18}F -**17** derived from radioactive chromatograms. Radiochemical yield was determined as the ratio between the injected radioactivity (measured with an activity meter) and the collected radioactivity corresponding to ^{18}F -**17** from the HPLC.

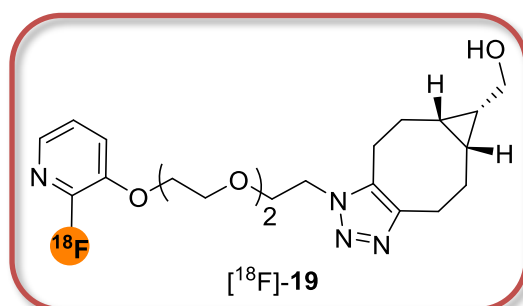
The best conversion yields were obtained with **15** (0.01 mg, 1 eq), CuSO_4 (3.4 mg, 500 eq) and NaAsc (17.3 mg, 2000 eq) at 40 °C to afford ^{18}F -**8** with 100 % conversion yield after 5 minutes reaction.

✓ **Copper-catalyzed cycloaddition between [¹⁸F]-3 and 13**



Kinetics of the formation of [¹⁸F]-16 was studied at different temperatures (room temperature, 40 °C or 70 °C). The kinetic study was carried out as follows: an aliquot of [¹⁸F]-3 (333 to 444 MBq, 3 to 3.7 nmol based on a molar activity of 120 GBq.μmol⁻¹) in a mixture of water and ethanol (50/50, 200 μL) was mixed with 13 in MeCN (1 mg, 4.06 μmol, 100 μL) and aq. solutions of CuSO₄ (3.2 mg, 20.3 μmol, 5 eq, 100 μL)/sodium ascorbate (16.08 mg, 81 μmol, 20 eq, 100 μL) and diluted with H₂O (300 μL) and *t*BuOH (200 μL). The reaction mixture was then left standing at room temperature or heated at 40 °C or 70 °C. Aliquots were withdrawn at 5, 15 and 30 min and analyzed by analytical HPLC (1)/(2) 60/40 (v/v). In these elution conditions, retention times were 3.7 min for [¹⁸F]-3 and 2.4 min for [¹⁸F]-16. Conversion was evaluated by integration and comparison of the areas of the peaks of compounds [¹⁸F]-3 to [¹⁸F]-16 derived from radioactive chromatograms. Radiochemical yield was determined as the ratio between the injected radioactivity (measured with an activity meter) and the collected radioactivity corresponding to [¹⁸F]-16 from the HPLC. The best conversion yields were obtained with 15 (1 mg, 1 eq), CuSO₄ (3.2 mg, 5 eq) and NaAsc (16.08 mg, 20 eq) at 70 °C to afford [¹⁸F]-8 with 24 % conversion yield after 30 minutes reaction.

✓ **Cyclooctyne-promoted cycloaddition between [¹⁸F]-8 and BCN**

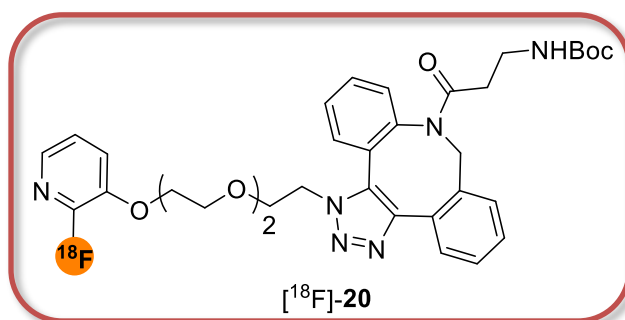


Kinetics of the formation of [¹⁸F]-19 was studied at different temperatures (room temperature or 40 °C). The kinetic study was carried out as follows: an aliquot of [¹⁸F]-8 (333 to 444 MBq, 3 to 3.7 nmol based on a molar activity of 120 GBq.μmol⁻¹) in ethanol (200 μL) in a mixture of water and ethanol (50/50, 200 μL) was mixed with BCN in MeCN/DMSO 2/1 (0.5 mg, 3.3 μmol, 750 μL) and diluted with H₂O (250 μL). The reaction mixture was then left standing at room temperature or heated at 40 °C. Aliquots were withdrawn at 2, 5, 15, 30 and 60 min and analyzed by analytical HPLC (1)/(2) 70/30 (v/v). In these elution conditions retention times were 4.8 min for [¹⁸F]-8 and 2.4 min for [¹⁸F]-19. Conversion was evaluated

by integration and comparison of the areas of the peaks of compounds [^{18}F]-**8** to [^{18}F]-**19** derived from radioactive chromatograms. Radiochemical yield was determined as the ratio between the injected radioactivity (measured with an activity meter) and the collected radioactivity corresponding to [^{18}F]-**19** from the HPLC.

The best conversion yield was obtained with **BCN** (0.5 mg, 1 eq) in a mixture of $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}/\text{MeCN}/\text{DMSO}$ (1.5 mL) at 40 °C to afford [^{18}F]-**19** with 35 % conversion yield after 60 minutes reaction.

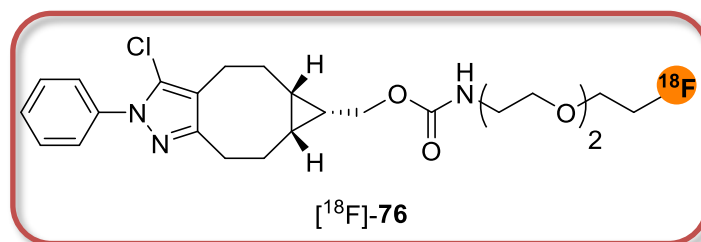
✓ Cyclooctyne-promoted cycloaddition between [^{18}F]-**8** and **18**



Kinetics of the formation of [^{18}F]-**19** was studied at different temperatures (room temperature or 40 °C). The kinetic study was carried out as follows: an aliquot of [^{18}F]-**8** (444 to 481 MBq, 8 to 10 nmol based on a molar activity of 113 GBq. μmol^{-1}) in a mixture of water and ethanol (50/50, 400 μL) was mixed with **18** in MeCN/DMSO 4/1 (0.5 mg, 1.33 μmol , 100 μL) and diluted with $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$ 1.5/1 (500 μL). The reaction mixture was then left standing at room temperature or heated at 40 °C. Aliquots were withdrawn at 2, 5, 15 and 30 min and analyzed by analytical HPLC (1)/(2) 45/55 (v/v). In these elution conditions retention times were 1.3 min for [^{18}F]-**8** and 4.8 min for [^{18}F]-**20**. Conversion was evaluated by integration and comparison of the areas of the peaks of compounds [^{18}F]-**8** to [^{18}F]-**20** derived from radioactive chromatograms. Radiochemical yield was determined as the ratio between the injected radioactivity (measured with an activity meter) and the collected radioactivity corresponding to [^{18}F]-**20** from the HPLC.

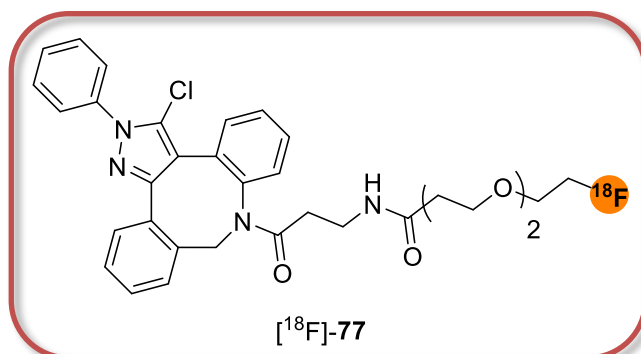
The best conversion yield was obtained with **18** (0.5 mg, 1 eq) in a mixture of $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}/\text{MeCN}/\text{DMSO}$ (1 mL) at 40 °C to afford [^{18}F]-**20** with 98 % conversion yield after 15 minutes reaction.

✓ **Sydnone-promoted cycloaddition between [¹⁸F]-53 and L158**



Kinetics of the formation of [¹⁸F]-76 was studied at different temperatures (room temperature or 40 °C). The kinetic study was carried out as follows: an aliquot of [¹⁸F]-53 (111 to 148 MBq, molar activity was not determined) in a mixture of water and ethanol (50/50, 500 μL) was mixed with **L158** in MeCN (0.32 mg, 1.6 μmol in 200 μL) and diluted with H₂O (300 μL). The reaction mixture was then left standing at room temperature or heated at 40 °C. Aliquots were withdrawn at 5, 15 and 30 min and analyzed by analytical HPLC (1)/(2) 30/70 (v/v). In these elution conditions retention times were 1.3 min for [¹⁸F]-53 and 3.5 min for [¹⁸F]-76. Conversion was evaluated by integration and comparison of the areas of the peaks of compounds [¹⁸F]-53 to [¹⁸F]-76 derived from radioactive chromatograms. Radiochemical yield was determined as the ratio between the injected radioactivity (measured with an activity meter) and the collected radioactivity corresponding to [¹⁸F]-76 from the HPLC. A conversion of 100 % was obtained at 40 °C after 15 minutes reaction.

✓ **Sydnone-promoted cycloaddition between [¹⁸F]-75 and L158**



Kinetics of the formation of [¹⁸F]-77 was studied at different temperatures (room temperature or 40 °C). The kinetic study was carried out as follows: an aliquot of [¹⁸F]-75 (333 to 444 MBq, molar activity was not determined) in a mixture of water and ethanol (50/50, 300 μL) was mixed with **L158** in MeCN (0.4 mg, 2 μmol in 200 μL) and diluted with H₂O (500 μL). The reaction mixture was then left standing at room temperature or heated at 40 °C. Aliquots were withdrawn at 5, 15 and 30 min and analyzed by analytical HPLC (1)/(2) 43/57 (v/v). In these elution conditions retention times were 1.3 min for [¹⁸F]-75 and 4 min for [¹⁸F]-77. Conversion was evaluated by integration and comparison of the areas of the peaks of compounds [¹⁸F]-75 to [¹⁸F]-77 derived from radioactive chromatograms. A conversion of 100 % was obtained at 40 °C after 15 minutes reaction.

Bibliographie

- (1) James, M. L.; Gambhir, S. S. *Phys. Rev.* **2012**, *92* (2), 897–965.
- (2) Skotland, T. *Contrast Media Mol. Imaging* **2012**, *7* (1), 1–6.
- (3) Hutchins, G. D.; Miller, M. A.; Soon, V. C.; Receveur, T. *ILAR J.* **2008**, *49* (1), 54–65.
- (4) Urch, D. S. *Annu. Rep. Prog. Chem., Sect. A: Inorg. Chem.* **2011**, *107* (0), 519–538.
- (5) Pimlott, S. L.; Sutherland, A. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40* (1), 149–162.
- (6) Li, Z.; Conti, P. S. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, *62* (11), 1031–1051.
- (7) Basu, S.; Alavi, A. *J. Nucl. Med.* **2008**, *49* (10), 17N – 37N.
- (8) Garnett, E. S.; Firnau, G.; Nahmias, C. *Nature* **1983**, *305* (5930), 137–138.
- (9) Dolle, F.; Demphel, S.; Hinnen, F.; Fournier, D.; Vaufrey, F.; Crouzel, C. *J. Labelled Compd Radiopharm.* **1998**, *41* (2), 105–114.
- (10) Staudinger, H. *Nobel Lecture* **1953**, 397–419.
- (11) Kuhnast, B.; Dollé, F. *Curr. Radiopharm.* **2010**, *3*, 174–201.
- (12) Akki, S. U.; Werth, C. J.; Silverman, S. K. *Environ. Sci. Technol.* **2015**, *49* (16), 9905–9913.
- (13) Badiani, K. *Int. Pharm. Ind.* **2012**, *4*, 84–90.
- (14) Richter, S.; Wuest, F. *Molecules* **2014**, *19* (12), 20536–20556.
- (15) Reubi, J. C.; Schär, J. C.; Waser, B.; Wenger, S.; Heppeler, A.; Schmitt, J. S.; Mäcke, H. *Eur. J. Nucl. Med.* **2000**, *27* (3), 273–282.
- (16) Bergman, J.; Solin, O. *Nucl. Med. Biol.* **1997**, *24* (7), 677–683.
- (17) Neirinckx, R. D.; Lambrecht, R. M.; Wolf, A. P. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **1978**, *29* (4), 323–327.
- (18) Muchowski, J. M.; Venuti, M. C. *J. Org. Chem.* **1980**, *45* (23), 4798–4801.
- (19) Sood, S.; Firnau, G.; Garnett, E. S. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **1983**, *34* (4), 743–745.
- (20) Jewett, D. M.; Potocki, J. F.; Ehrenkauf, R. E. *J. Fluorine Chem.* **1984**, *24* (4), 477–484.
- (21) Oberdorfer, F.; Hofmann, E.; Maier-Borst, W. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **1988**, *39* (7), 685–688.
- (22) Oberdorfer, F.; Hofmann, E.; Maier-Borst, W. *J. Labelled Compd Radiopharm.* **1988**, *25* (9), 999–1005.
- (23) Satyamurthy, N.; Bida, G. T.; Phelps, M. E.; Barrio, J. R. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **1990**, *41* (8), 733–738.
- (24) Ogawa, M.; Hatano, K.; Oishi, S.; Kawasumi, Y.; Fujii, N.; Kawaguchi, M.; Doi, R.; Imamura, M.; Yamamoto, M.; Ajito, K.; Mukai, T.; Saji, H.; Ito, K. *Nucl. Med. Biol.* **2003**, *30* (1), 1–9.
- (25) Hebel, D.; Kirk, K. L.; Cohen, L. A.; Labroo, V. M. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31* (5), 619–622.
- (26) Labroo, V. M.; Hebel, D.; Kirk, K. L.; Cohen, L. A.; Lemieux, C.; Schiller, P. W. *Int. J. Pept. Prot. Res.* **1991**, *37* (5), 430–439.
- (27) Jewett, D. M.; Toorongian, S. A.; Mulholland, G. K.; Watkins, G. L.; Kilbourn, M. R. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **1988**, *39* (11), 1109–1111.
- (28) Dollé, F.; Roeda, D.; Kuhnast, B.; Lasne, M.-C. In *Fluorine and Health Molecular Imaging, Biomedical Materials and Pharmaceuticals*; 2008; pp 3–65.
- (29) Hamacher, K.; Coenen, H. H.; Stöcklin, G. *J. Nucl. Med.* **1986**, *27* (2), 235–238.
- (30) Angelini, G.; Speranza, M.; Wolf, A. P.; Shiue, C.-Y. *J. Fluorine Chem.* **1985**, *27* (2), 177–191.
- (31) Dolci, L.; Dolle, F.; Jubeau, S.; Vaufrey, F.; Crouzel, C. *J. Labelled Compd Radiopharm.* **1999**, *42* (10), 975–985.

- (32) Ross, T. L.; Ermert, J.; Hocke, C.; Coenen, H. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (25), 8018–8025.
- (33) Pike, V. W.; Aigbirhio, F. I. *J. Chem. Soc.* **1995**, *0* (21), 2215–2216.
- (34) 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* (30), 7751–7755.
- (35) Zischler, J.; Kolks, N.; Modemann, D.; Neumaier, B.; Zlatopolskiy, B. D. *Chem. Eur. J.* **2017**, *23* (14), 3251–3256.
- (36) Petersen, I. N.; Villadsen, J.; Hansen, H. D.; Madsen, J.; Jensen, A. A.; Gillings, N.; Lehel, S.; Herth, M. M.; Knudsen, G. M.; Kristensen, J. L. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15* (20), 4351–4358.
- (37) Wang, L.; Cheng, R.; Fujinaga, M.; Yang, J.; Zhang, Y.; Hatori, A.; Kumata, K.; Yang, J.; Vasdev, N.; Du, Y.; Ran, C.; Zhang, M.-R.; Liang, S. H. *J. Med. Chem.* **2017**, *60* (12), 5222–5227.
- (38) Thonon, D.; Goblet, D.; Goukens, E.; Kaisin, G.; Paris, J.; Aerts, J.; Lignon, S.; Franci, X.; Hustinx, R.; Luxen, A. *Mol. Imaging Biol.* **2011**, *13* (6), 1088–1095.
- (39) Vaidyanathan, G.; Zalutsky, M. R. *Nat. Protoc.* **2006**, *1* (4), 1655–1661.
- (40) Harada, N.; Kimura, H.; Onoe, S.; Watanabe, H.; Matsuoka, D.; Arimitsu, K.; Ono, M.; Saji, H. *J. Nucl. Med.* **2016**, *57* (12), 1978–1984.
- (41) Kim, D. H.; Blacker, M.; Valliant, J. F. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (9), 3678–3686.
- (42) Olberg, D. E.; Arukwe, J. M.; Grace, D.; Hjelstuen, O. K.; Solbakken, M.; Kindberg, G. M.; Cuthbertson, A. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (4), 1732–1740.
- (43) Rosa-Neto, P.; Wängler, B.; Iovkova, L.; Boening, G.; Reader, A.; Jurkschat, K.; Schirmacher, E. *ChemBioChem* **2009**, *10* (8), 1321–1324.
- (44) Wüst, F.; Müller, M.; Bergmann, R. *Radiochimica Acta* **2009**, *92* (4-6), 349–353.
- (45) Hashizume, K.; Hashimoto, N.; Miyake, Y. *J. Org. Chem.* **1995**, *60* (21), 6680–6681.
- (46) Wester, H.-J.; Hamacher, K.; Stöcklin, G. *Nucl. Med. Biol.* **1996**, *23* (3), 365–372.
- (47) Kilbourn, M. R.; Dence, C. S.; Welch, M. J.; Mathias, C. J. *J. Nucl. Med.* **1987**, *28* (4), 462–470.
- (48) Schmitt, S.; Bouteiller, C.; Barré, L.; Perrio, C. *Chem. Commun.* **2011**, *47* (41), 11465–11467.
- (49) De Bruin, B.; Kuhnast, B.; Hinnen, F.; Yaouancq, L.; Amessou, M.; Johannes, L.; Samson, A.; Boisgard, R.; Tavitian, B.; Dollé, F. *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16* (2), 406–420.
- (50) Kuhnast, B.; Dolle, F.; Tavitian, B. *J. Labelled Compd Radiopharm.* **2002**, *45* (1), 1–11.
- (51) Ban, H.; Gavriluk, J.; Barbas, C. F. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (5), 1523–1525.
- (52) Al-Momani, E.; Israel, I.; Buck, A. K.; Samnick, S. *Appl. Rad. Isot.* **2015**, *104*, 136–142.
- (53) Jeon, J.; Shen, B.; Xiong, L.; Miao, Z.; Lee, K. H.; Rao, J.; Chin, F. T. *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23* (9), 1902–1908.
- (54) Inkster, J. A. H.; Colin, D. J.; Seimbille, Y. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13* (12), 3667–3676.
- (55) Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44* (9), 666–676.
- (56) Kölmel, D. K.; Kool, E. T. *Chem. Rev.* **2017**, *117* (15), 10358–10376.
- (57) Poethko, T.; Schottelius, M.; Thumshirn, G.; Herz, M.; Haubner, R.; Henriksen, G.; Kessler, H.; Schwaiger, M.; Wester, H.-J. *Radiochimica Acta* **2004**, *92* (4-6), 317–327.
- (58) Poethko, T.; Schottelius, M.; Thumshirn, G.; Hersel, U.; Herz, M.; Henriksen, G.; Kessler, H.; Schwaiger, M.; Wester, H.-J. *J. Nucl. Med.* **2004**, *45* (5), 892–902.

- (59) Glaser, M.; Morrison, M.; Solbakken, M.; Arukwe, J.; Karlsen, H.; Wiggen, U.; Champion, S.; Kindberg, G. M.; Cuthbertson, A. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19* (4), 951–957.
- (60) Dirksen, A.; Dawson, P. E. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19* (12), 2543–2548.
- (61) Åberg, O.; Pisaneschi, F.; Smith, G.; Nguyen, Q.-D.; Stevens, E.; Aboagye, E. O. *J. Fluorine Chem.* **2012**, *135*, 200–206.
- (62) Chalker, J. M.; Wood, C. S. C.; Davis, B. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (45), 16346–16347.
- (63) Gao, Z.; Gouverneur, V.; Davis, B. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (37), 13612–13615.
- (64) Way, J. D.; Bergman, C.; Wuest, F. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (18), 3838–3841.
- (65) Benson, S. W. *J. Chem. Educ.* **1965**, *42* (9), 502.
- (66) Kerr, J. A. *Chem. Rev.* **1966**, *66* (5), 465–500.
- (67) Roehn, U.; Becaud, J.; Mu, L.; Srinivasan, A.; Stellfeld, T.; Fitzner, A.; Graham, K.; Dinkelborg, L.; Schubiger, A. P.; Ametamey, S. M. *J. Fluorine Chem.* **2009**, *130* (10), 902–912.
- (68) Schirmacher, R.; Lucas, P.; Schirmacher, E.; Wängler, B.; Wängler, C. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52* (16), 1973–1976.
- (69) Becaud, J.; Mu, L.; Karamkam, M.; Schubiger, P. A.; Ametamey, S. M.; Graham, K.; Stellfeld, T.; Lehmann, L.; Borkowski, S.; Berndorff, D.; Dinkelborg, L.; Srinivasan, A.; Smits, R.; Kokschi, B. *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20* (12), 2254–2261.
- (70) Fuchs, P. L. *Handbook of Reagents for Organic Synthesis, Reagents for Silicon-Mediated Organic Synthesis*; John Wiley & Sons, 2013.
- (71) Gens, T. A.; Wethongton, J. A.; Brosi, A. R. *J. Phys. Chem.* **1958**, *62* (12), 1593–1593.
- (72) Rosenthal, M. S.; Bosch, A. L.; Nickles, R. J.; Gatley, S. J. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **1985**, *36* (4), 318–319.
- (73) Schirmacher, R.; Bradtmöller, G.; Schirmacher, E.; Thews, O.; Tillmanns, J.; Siessmeier, T.; Buchholz, H. G.; Bartenstein, P.; Wängler, B.; Niemeyer, C. M.; Jurkschat, K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45* (36), 6047–6050.
- (74) Höhne, A.; Mu, L.; Honer, M.; Schubiger, P. A.; Ametamey, S. M.; Graham, K.; Stellfeld, T.; Borkowski, S.; Berndorff, D.; Klar, U.; Voigtmann, U.; Cyr, J. E.; Friebe, M.; Dinkelborg, L.; Srinivasan, A. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19* (9), 1871–1879.
- (75) Lindner, S.; Michler, C.; Leidner, S.; Rensch, C.; Wängler, C.; Schirmacher, R.; Bartenstein, P.; Wängler, B. *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25* (4), 738–749.
- (76) Amigues, E.; Schulz, J.; Szlosek-Pinaud, M.; Fernandez, P.; Silvente-Poirot, S.; Brillouet, S.; Courbon, F.; Fouquet, E. *ChemPlusChem* **2012**, *77* (5), 345–349.
- (77) Glaser, M.; Iveson, P.; Hoppmann, S.; Indrevoll, B.; Wilson, A.; Arukwe, J.; Danikas, A.; Bhalla, R.; Hiscock, D. *J. Nucl. Med.* **2013**, *54* (11), 1981–1988.
- (78) Butters, M.; Harvey, J. N.; Jover, J.; Lennox, A. J. J.; Lloyd-Jones, G. C.; Murray, P. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49* (30), 5156–5160.
- (79) Ting, R.; Adam, M. J.; Ruth, T. J.; Perrin, D. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (38), 13094–13095.
- (80) Harwig, C. W.; Ting, R.; Adam, M. J.; Ruth, T. J.; Perrin, D. M. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49* (19), 3152–3156.
- (81) Liu, Z.; Pourghasian, M.; Radtke, M. A.; Lau, J.; Pan, J.; Dias, G. M.; Yapp, D.; Lin, K.-S.; Bénard, F.; Perrin, D. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53* (44), 11876–11880.
- (82) Smith, G. E.; Sladen, H. L.; Biagini, S. C. G.; Blower, P. J. *Dalton Trans.* **2011**, *40* (23), 6196–6205.

- (83) McBride, W. J.; Sharkey, R. M.; Karacay, H.; D'Souza, C. A.; Rossi, E. A.; Laverman, P.; Chang, C.-H.; Boerman, O. C.; Goldenberg, D. M. *J. Nucl. Med.* **2009**, *50* (6), 991–998.
- (84) McBride, W. J.; Sharkey, R. M.; Goldenberg, D. M. *EJNMMI Research* **2013**, *3*, 36.
- (85) Malik, N.; Baur, B.; Winter, G.; Reske, S. N.; Beer, A. J.; Solbach, C. *Mol. Imaging Biol.* **2015**, *17* (6), 777–785.
- (86) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40* (11), 2004–2021.
- (87) Pretze, M.; Pietzsch, D.; Mamat, C. *Molecules* **2013**, *18* (7), 8618–8665.
- (88) Nieto-García, O.; Jaffee, M. B.; Mühlberg, M.; Hackenberger, C. P. R. In *Chemoselective and Bioorthogonal Ligation Reactions*; Algar, W. R., Dawson, P. E., Medintz, I. L., Eds.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2017; pp 97–115.
- (89) Hein, J. E. In *Chemoselective and Bioorthogonal Ligation Reactions*; Algar, W. R., Dawson, P. E., Medintz, I. L., Eds.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2017; pp 37–66.
- (90) Brea, R. J.; Devaraj, N. K. In *Chemoselective and Bioorthogonal Ligation Reactions*; Algar, W. R., Dawson, P. E., Medintz, I. L., Eds.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2017; pp 67–95.
- (91) Cramer, N. B.; Bowman, C. N. In *Chemoselective and Bioorthogonal Ligation Reactions*; Algar, W. R., Dawson, P. E., Medintz, I. L., Eds.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2017; pp 117–145.
- (92) Lang, K.; Chin, J. W. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9* (1), 16–20.
- (93) Saxon, E.; Bertozzi, C. R. *Science* **2000**, *287* (5460), 2007–2010.
- (94) Staudinger, H.; Meyer, J. *Helv. Chim. Acta* **1919**, *2*, 635–646.
- (95) Nilsson, B. L.; Kiessling, L. L.; Raines, R. T. *Org. Lett.* **2000**, *2* (13), 1939–1941.
- (96) Saxon, E.; Armstrong, J. I.; Bertozzi, C. R. *Org. Lett.* **2000**, *2* (14), 2141–2143.
- (97) Pretze, M.; Wuest, F.; Peppel, T.; Köckerling, M.; Mamat, C. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51* (49), 6410–6414.
- (98) Mamat, C.; Franke, M.; Peppel, T.; Köckerling, M.; Steinbach, J. *Tetrahedron* **2011**, *67* (25), 4521–4529.
- (99) Gaeta, A.; Woodcraft, J.; Plant, S.; Goggi, J.; Jones, P.; Battle, M.; Trigg, W.; Luthra, S. K.; Glaser, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20* (15), 4649–4652.
- (100) Carroll, L.; Boldon, S.; Bejot, R.; Moore, J. E.; Declerck, J.; Gouverneur, V. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *9* (1), 136–140.
- (101) Vugts, D. J.; Vervoort, A.; Stigter-van Walsum, M.; Visser, G. W. M.; Robillard, M. S.; Versteegen, R. M.; Vulderson, R. C. M.; Herscheid, J. D. M.; van Dongen, G. A. M. S. *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22* (10), 2072–2081.
- (102) Michael, A. J. *J. Prakt. Chem.* **1893**, *48*, 94.
- (103) Huisgen, R.; Grashey, R.; Gotthardt, H.; Schmidt, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1962**, *1* (1), 48–49.
- (104) Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. *J. Org. Chem.* **2002**, *67* (9), 3057–3064.
- (105) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41* (14), 2596–2599.
- (106) Himo, F.; Lovell, T.; Hilgraf, R.; Rostovtsev, V. V.; Noodleman, L.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (1), 210–216.
- (107) Worrell, B. T.; Malik, J. A.; Fokin, V. V. *Science* **2013**, *340* (6131), 457–460.
- (108) Meldal, M.; Tornøe, C. W. *Chem. Rev.* **2008**, *108* (8), 2952–3015.

- (109) Fazio, F.; Bryan, M. C.; Blixt, O.; Paulson, J. C.; Wong, C.-H. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (48), 14397–14402.
- (110) Chan, T. R.; Hilgraf, R.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. *Org. Lett.* **2004**, *6* (17), 2853–2855.
- (111) Lewis, W. G.; Magallon, F. G.; Fokin, V. V.; Finn, M. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (30), 9152–9153.
- (112) Hong, V.; Presolski, S. I.; Ma, C.; Finn, M. G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48* (52), 9879–9883.
- (113) Rodionov, V. O.; Presolski, S. I.; Gardinier, S.; Lim, Y.-H.; Finn, M. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (42), 12696–12704.
- (114) Berg, R.; Straub, B. F. *Beilstein J. Org. Chem.* **2013**, *9*, 2715–2750.
- (115) Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48* (38), 6974–6998.
- (116) Kennedy, D. C.; McKay, C. S.; Legault, M. C. B.; Danielson, D. C.; Blake, J. A.; Pegoraro, A. F.; Stolor, A.; Mester, Z.; Pezacki, J. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (44), 17993–18001.
- (117) Hong, V.; Steinmetz, N. F.; Manchester, M.; Finn, M. G. *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21* (10), 1912–1916.
- (118) Marik, J.; Sutcliffe, J. L. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47* (37), 6681–6684.
- (119) Collet, C.; Maskali, F.; Clément, A.; Chrétien, F.; Poussier, S.; Karcher, G.; Marie, P.-Y.; Chapleur, Y.; Lamandé-Langle, S. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **2016**, *59* (2), 54–62.
- (120) Glaser, M.; Robins, E. G. *J. Labelled Compd Radiopharm.* **2009**, *52* (10), 407–414.
- (121) Wittig, G.; Krebs, A. *Chem. Ber.* **1961**, *94*, 3260–3275.
- (122) Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (46), 15046–15047.
- (123) Saito, F.; Noda, H.; Bode, J. W. *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10* (4), 1026–1033.
- (124) Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44* (9), 666–676.
- (125) Agard, N. J.; Baskin, J. M.; Prescher, J. A.; Lo, A.; Bertozzi, C. R. *ACS Chem. Biol.* **2006**, *1* (10), 644–648.
- (126) Baskin, J. M.; Prescher, J. A.; Laughlin, S. T.; Agard, N. J.; Chang, P. V.; Miller, I. A.; Lo, A.; Codelli, J. A.; Bertozzi, C. R. *PNAS* **2007**, *104* (43), 16793–16797.
- (127) Codelli, J. A.; Baskin, J. M.; Agard, N. J.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (34), 11486–11493.
- (128) Ning, X.; Guo, J.; Wolfert, M. A.; Boons, G.-J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47* (12), 2253–2255.
- (129) Jewett, J. C.; Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (11), 3688–3690.
- (130) Debets, M. F.; Berkel, S. S. van; Schoffelen, S.; Rutjes, F. P. J. T.; Hest, J. C. M. van; Delft, F. L. van. *Chem. Commun.* **2010**, *46* (1), 97–99.
- (131) Kuzmin, A.; Poloukhtine, A.; Wolfert, M. A.; Popik, V. V. *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21* (11), 2076–2085.
- (132) Dommerholt, J.; Rutjes, F. P. J. T.; Delft, F. L. van. *Top. Curr. Chem.* **2016**, *374* (2), 16.
- (133) Dommerholt, J.; Schmidt, S.; Temming, R.; Hendriks, L. J. A.; Rutjes, F. P. J. T.; van Hest, J. C. M.; Lefeber, D. J.; Friedl, P.; van Delft, F. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49* (49), 9422–9425.
- (134) Varga, B. R.; Kállay, M.; Hegyi, K.; Béni, S.; Kele, P. *Chem. Eur. J.* **2012**, *18* (3), 822–828.

- (135) Poole, T. H.; Reisz, J. A.; Zhao, W.; Poole, L. B.; Furdui, C. M.; King, S. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (17), 6167–6170.
- (136) Sun, Y.; Ma, X.; Cheng, K.; Wu, B.; Duan, J.; Chen, H.; Bu, L.; Zhang, R.; Hu, X.; Deng, Z.; Xing, L.; Hong, X.; Cheng, Z. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54* (20), 5981–5984.
- (137) Bouvet, V.; Wuest, M.; Wuest, F. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9* (21), 7393–7399.
- (138) Hausner, S. H.; Marik, J.; Gagnon, M. K. J.; Sutcliffe, J. L. *J. Med. Chem.* **2008**, *51* (19), 5901–5904.
- (139) Arumugam, S.; Chin, J.; Schirrmacher, R.; Popik, V. V.; Kostikov, A. P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21* (23), 6987–6991.
- (140) Carpenter, R. D.; Hausner, S. H.; Sutcliffe, J. L. *ACS Med. Chem. Lett.* **2011**, *2* (12), 885–889.
- (141) Campbell-Verduyn, L. S.; Mirfeizi, L.; Schoonen, A. K.; Dierckx, R. A.; Elsinga, P. H.; Feringa, B. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50* (47), 11117–11120.
- (142) Evans, H. L.; Slade, R. L.; Carroll, L.; Smith, G.; Nguyen, Q.-D.; Iddon, L.; Kamaly, N.; Stöckmann, H.; Leeper, F. J.; Aboagye, E. O.; Spivey, A. C. *Chem. Commun.* **2012**, *48* (7), 991–993.
- (143) Sachin, K.; Jadhav, V. H.; Kim, E.-M.; Kim, H. L.; Lee, S. B.; Jeong, H.-J.; Lim, S. T.; Sohn, M.-H.; Kim, D. W. *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23* (8), 1680–1686.
- (144) Blackman, M. L.; Royzen, M.; Fox, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (41), 13518–13519.
- (145) Kämpchen, T.; Massa, W.; Overheu, W.; Schmidt, R.; Seitz, G. *Chem. Ber.* **1982**, *115* (2), 683–694.
- (146) Devaraj, N. K.; Weissleder, R.; Hilderbrand, S. A. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19* (12), 2297–2299.
- (147) Li, Z.; Cai, H.; Hassink, M.; L. Blackman, M.; D. Brown, R. C.; S. Conti, P.; M. Fox, J. *Chem. Commun.* **2010**, *46* (42), 8043–8045.
- (148) Selvaraj, R.; Liu, S.; Hassink, M.; Huang, C.; Yap, L.; Park, R.; Fox, J. M.; Li, Z.; Conti, P. S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21* (17), 5011–5014.
- (149) Keliher, E. J.; Reiner, T.; Thurber, G. M.; Upadhyay, R.; Weissleder, R. *ChemistryOpen* **2012**, *1* (4), 177–183.
- (150) Wu, Z.; Liu, S.; Hassink, M.; Nair, I.; Park, R.; Li, L.; Todorov, I.; Fox, J. M.; Li, Z.; Shively, J. E.; Conti, P. S.; Kandeel, F. J. *Nucl. Med.* **2013**, *54* (2), 244–251.
- (151) Selvaraj, R.; Giglio, B.; Liu, S.; Wang, H.; Wang, M.; Yuan, H.; Chintala, S. R.; Yap, L.-P.; Conti, P. S.; Fox, J. M.; Li, Z. *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26* (3), 435–442.
- (152) Wang, M.; Svatunek, D.; Rohlfing, K.; Liu, Y.; Wang, H.; Giglio, B.; Yuan, H.; Wu, Z.; Li, Z.; Fox, J. *Theranostics* **2016**, *6* (6), 887–895.
- (153) Van de Watering, F. C. J.; Rijpkema, M.; Perk, L.; Brinkmann, U.; Oyen, W. J. G.; Boerman, O. C. *BioMed Res. Int.* **2014**.
- (154) Jalilian, A. R.; Osso, J. A. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **2017**, *314* (1), 7–21.
- (155) Börjesson, P. K. E.; Jauw, Y. W. S.; Bree, R. de; Roos, J. C.; Castelijns, J. A.; Leemans, C. R.; Dongen, G. A. M. S. van; Boellaard, R. *J. Nucl. Med.* **2009**, *50* (11), 1828–1836.
- (156) Kraeber-Bodéré, F.; Rousseau, C.; Bodet-Milin, C.; Frampas, E.; Faivre-Chauvet, A.; Rauscher, A.; Sharkey, R. M.; Goldenberg, D. M.; Chatal, J.-F.; Barbet, J. *Front. Pharmacol.* **2015**, *6*.
- (157) Patra, M.; Zarschler, K.; Pietzsch, H.-J.; Stephan, H.; Gasser, G. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45* (23), 6415–6431.
- (158) Reiner, T.; Zeglis, B. M. *J. Labelled Compd Radiopharm.* **2014**, *57* (4), 285–290.

- (159) Rossin, R.; Renart Verkerk, P.; van den Bosch, S. M.; Vulders, R. C. M.; Verel, I.; Lub, J.; Robillard, M. S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49* (19), 3375–3378.
- (160) Keinänen, O.; Li, X.-G.; Chenna, N. K.; Lumen, D.; Ott, J.; Molthoff, C. F. M.; Sarparanta, M.; Helariutta, K.; Vuorinen, T.; Windhorst, A. D.; Airaksinen, A. J. *ACS Med. Chem. Lett.* **2016**, *7* (1), 62–66.
- (161) Meyer, J.-P.; Houghton, J. L.; Kozlowski, P.; Abdel-Atti, D.; Reiner, T.; Pillarsetty, N. V. K.; Scholz, W. W.; Zeglis, B. M.; Lewis, J. S. *Bioconjugate Chem.* **2016**, *27* (2), 298–301.
- (162) wyffels, L.; Thomae, D.; Waldron, A.-M.; Fissers, J.; Dedeurwaerdere, S.; Van der Veken, P.; Joossens, J.; Stroobants, S.; Augustyns, K.; Staelens, S. *Nucl. Med. Biol.* **2014**, *41* (6), 513–523.
- (163) E. Hoyle, C.; B. Lowe, A.; N. Bowman, C. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39* (4), 1355–1387.
- (164) Lowe, A. B. *Polym. Chem.* **2010**, *1* (1), 17–36.
- (165) Hoyle, C. E.; Bowman, C. N. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49* (9), 1540–1573.
- (166) Mather, B. D.; Viswanathan, K.; Miller, K. M.; Long, T. E. *Progress in Polymer Science* **2006**, *31* (5), 487–531.
- (167) Xu, H.; Baidoo, K. E.; Wong, K. J.; Brechbiel, M. W. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18* (8), 2679–2683.
- (168) De Kort, M.; Gianotten, B.; Wisse, J. A. J.; Bos, E. S.; Eppink, M. H. M.; Mattaar, E.; Vogel, G. M. T.; Dokter, W. H. A.; Honing, M.; Vonsovic, S.; Smit, M.-J.; Wijkmans, J. C. H. M.; van Boeckel, C. A. A. *ChemMedChem* **2008**, *3* (8), 1189–1193.
- (169) Radu, L. C.; Yang, J.; Kopeček, J. *Macromol. Biosci.* **2009**, *9* (1), 36–44.
- (170) Cai, W.; Zhang, X.; Wu, Y.; Chen, X. *J. Nucl. Med.* **2006**, *47* (7), 1172–1180.
- (171) Berndt, M.; Pietzsch, J.; Wuest, F. *Nucl. Med. Biol.* **2007**, *34* (1), 5–15.
- (172) Cavani, M.; Bier, D.; Holschbach, M.; Coenen, H. H. *J. Labelled Compd Radiopharm.* **2017**, *60* (1), 87–92.
- (173) Kiesewetter, D. O.; Gao, H.; Ma, Y.; Niu, G.; Quan, Q.; Guo, N.; Chen, X. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2012**, *39* (3), 463–473.
- (174) Denholt, C. L.; Kuhnast, B.; Dollé, F.; Hinnen, F.; Hansen, P. R.; Gillings, N.; Kjær, A. *J. Labelled Compd Radiopharm.* **2010**, *53* (13), 774–778.
- (175) Wu, Z.; Li, L.; Liu, S.; Yakushijin, F.; Yakushijin, K.; Horne, D.; Conti, P. S.; Li, Z.; Kandeel, F.; Shively, J. E. *J. Nucl. Med.* **2014**, *55* (7), 1178–1184.
- (176) Patterson, D. M.; Nazarova, L. A.; Prescher, J. A. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9* (3), 592–605.
- (177) Kuhnast, B.; Hinnen, F.; Tavitian, B.; Dollé, F. *J. Labelled Compd Radiopharm.* **2008**, *51* (9), 336–342.
- (178) Inkster, J. A. H.; Guérin, B.; Ruth, T. J.; Adam, M. J. *J. Labelled Compd Radiopharm.* **2008**, *51* (14), 444–452.
- (179) Inkster, J.; Lin, K.-S.; Ait-Mohand, S.; Gosselin, S.; Bénard, F.; Guérin, B.; Pourghiasian, M.; Ruth, T.; Schaffer, P.; Storr, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23* (13), 3920–3926.
- (180) Valdivia, A. C.; Estrada, M.; Hadizad, T.; Stewart, D. J.; Beanlands, R. S.; DaSilva, J. N. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **2012**, *55* (2), 57–60.
- (181) Arksey, N.; Hadizad, T.; Ismail, B.; Hachem, M.; Valdivia, A. C.; Beanlands, R. S.; deKemp, R. A.; DaSilva, J. N. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22* (15), 3931–3937.
- (182) Inkster, J. A. H.; Adam, M. J.; Storr, T.; Ruth, T. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2009**, *28* (11-12), 1131–1143.
- (183) Kuduk, S. D.; DiPardo, R. M.; Bock, M. G. *Org. Lett.* **2005**, *7* (4), 577–579.

- (184) Amaral, S. P.; Fernandez-Villamarin, M.; Correa, J.; Riguera, R.; Fernandez-Megia, E. *Org. Lett.* **2011**, *13* (17), 4522–4525.
- (185) Ermert, J.; Hocke, C.; Ludwig, T.; Gail, R.; Coenen, H. H. *J. Labelled Compd Radiopharm.* **2004**, *47* (7), 429–441.
- (186) Hausner, S. H.; Abbey, C. K.; Bold, R. J.; Gagnon, M. K.; Marik, J.; Marshall, J. F.; Stanecki, C. E.; Sutcliffe, J. L. *Cancer Res.* **2009**, *69* (14), 5843–5850.
- (187) Dolle, F.; Valette, H.; Bottlaender, M.; Hinnen, F.; Vaufrey, F.; Guenther, I.; Crouzel, C. *J. Labelled Compd Radiopharm.* **1998**, *41* (5), 451–463.
- (188) Dolci, L.; Dolle, F.; Valette, H.; Vaufrey, F.; Fuseau, C.; Bottlaender, M.; Crouzel, C. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7* (3), 467–479.
- (189) Clayden, J.; Greeves, N.; Warren, S. *Organic Chemistry*, 2nd ed.; OUP Oxford, 2012.
- (190) Ballinger, J. R.; Bowen, B. M.; Firna, G.; Stephen Garnett, E.; Teare, F. W. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **1984**, *35* (12), 1125–1128.
- (191) Dollé, F. *Curr. Pharm. Des.* **2005**, *11* (25), 3221–3235.
- (192) Honer, M.; Mu, L.; Stellfeld, T.; Graham, K.; Martić, M.; Fischer, C. R.; Lehmann, L.; Schubiger, P. A.; Ametamey, S. M.; Dinkelborg, L.; Srinivasan, A.; Borkowski, S. *J. Nucl. Med.* **2011**, *52* (2), 270–278.
- (193) Olberg, D. E.; Svadberg, A. Method. WO2017072200 (A1), May 4, 2017.
- (194) Yue, X.; Yan, X.; Wu, C.; Niu, G.; Ma, Y.; Jacobson, O.; Shen, B.; Kiesewetter, D. O.; Chen, X. *Mol. Pharmaceutics* **2014**, *11* (11), 3875–3884.
- (195) Walker, M.; Forray, C. Novel Uses of Halogenated Alkyl Sulfonamides. WO2009035855 (A2), March 19, 2009.
- (196) Andersen, S. M.; Aurell, C.-J.; Zetterberg, F.; Bollmark, M.; Ehrl, R.; Schuisky, P.; Witt, A. *Org. Process Res. Dev.* **2013**, *17* (12), 1543–1551.
- (197) Nemoto, H.; Nishiyama, T.; Akai, S. *Org. Lett.* **2011**, *13* (10), 2714–2717.
- (198) Fier, P. S.; Hartwig, J. F. *Science* **2013**, *342* (6161), 956–960.
- (199) Mulder, J. A.; Frutos, R. P.; Patel, N. D.; Qu, B.; Sun, X.; Tampone, T. G.; Gao, J.; Sarvestani, M.; Eriksson, M. C.; Haddad, N.; Shen, S.; Song, J. J.; Senanayake, C. H. *Org. Process Res. Dev.* **2013**, *17* (6), 940–945.
- (200) Shi, Y.-J.; Humphrey, G.; Maligres, P. E.; Reamer, R. A.; Williams, J. M. *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348* (3), 309–312.
- (201) Jana, N.; Nguyen, Q.; Driver, T. G. *J. Org. Chem.* **2014**, *79* (6), 2781–2791.
- (202) Xiong, H.; Hoye, A. T.; Fan, K.-H.; Li, X.; Clemens, J.; Horchler, C. L.; Lim, N. C.; Attardo, G. *Org. Lett.* **2015**, *17* (15), 3726–3729.
- (203) Lopchuk, J. M. *Top. Heterocycl. Chem.* **2012**, 381–413.
- (204) Earl, J. C.; Mackney, A. W. *J. Chem. Soc.* **1935**, 899–900.
- (205) Kier, L. B.; Roche, E. B. *J. Pharm. Sci.* **1967**, *56* (2), 149–168.
- (206) Kawase, M.; Sakagami, H.; Motohashi, N. *Top. Heterocycl. Chem.* **2007**, 135–152.
- (207) Moustafa, M. A.; Gineinah, M. M.; Nasr, M. N.; Bayoumi, W. A. H. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **2004**, *337* (8), 427–433.
- (208) Browne, D. L.; Harrity, J. P. A. *Tetrahedron* **2010**, *66* (3), 553–568.
- (209) Baker, W.; Ollis, W. D.; Poole, V. D. *J. Chem. Soc.* **1950**, 1542–1551.
- (210) Dumitrașcu, F.; Drâghici, C.; Dumitrescu, D.; Tarko, L.; Râileanu, D. *Liebigs Ann./Recl.* **1997**, *1997* (12), 2613–2616.
- (211) Dumitrașcu, F.; Mitan, C. I.; Dumitrescu, D.; Drâghici, C.; Căproiu, M. T. *Arkivoc* **2002**, *2*, 80–86.
- (212) Ito, S.; Turnbull, K. *Synth. Commun.* **1996**, *26* (7), 1441–1446.

- (213) Brown, D. C.; Turnbull, K. *Synth. Commun.* **2013**, *43* (23), 3233–3237.
- (214) Liu, H.; Audisio, D.; Plougastel, L.; Decuypere, E.; Buisson, D.-A.; Koniev, O.; Kolodych, S.; Wagner, A.; Elhabiri, M.; Krzyczmonik, A.; Forsback, S.; Solin, O.; Gouverneur, V.; Taran, F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55* (39), 12073–12077.
- (215) Furuya, T.; Ritter, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (31), 10060–10061.
- (216) Ball, N. D.; Sanford, M. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (11), 3796–3797.
- (217) Huisgen, R.; Gotthardt, H.; Grashey, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1962**, *1* (1), 49–49.
- (218) Ansari, A.; Ali, A.; Asif, M.; Shamsuzzaman. *New J. Chem.* **2016**, *41* (1), 16–41.
- (219) Kumar, K. A.; Jayaroopa, P. *Int. J. Pharm. Tech. Res.* **2013**, *5* (4), 1473–1486.
- (220) Rahman, M. A.; Siddiqui, A. A. *Int. J. Pharm. Sci. Drug. Res.* **2010**, *2* (3), 165–175.
- (221) Padwa, A.; Burgess, E. M.; Gingrich, H. L.; Roush, D. M. *J. Org. Chem.* **1982**, *47* (5), 786–791.
- (222) Fuh Wong, F.; Chang, E.-M.; Chen, T.-H.; Chiang, K.-C.; Yeh, M.-Y. *Heterocycles* **2006**, *68* (5), 1007.
- (223) Fariña, F.; Fernandez, P.; Teresa Fraile, M.; Victoria Martin, M.; Rozario Martin, M. *Heterocycles* **1989**, *29* (5), 967.
- (224) Croce, P. D.; Rosa, C. L.; Zecchi, G. *J. Chem. Soc.* **1985**, 2621–2624.
- (225) Meazza, G.; Zanardi, G.; Piccardi, P. *J. Heterocycl. Chem.* **1993**, *30* (2), 365–371.
- (226) Browne, D. L.; Helm, M. D.; Plant, A.; Harrity, J. P. A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46* (45), 8656–8658.
- (227) Browne, D. L.; Vivat, J. F.; Plant, A.; Gomez-Bengoa, E.; Harrity, J. P. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (22), 7762–7769.
- (228) González-Nogal, A. M.; Calle, M.; Cuadrado, P.; Valero, R. *Tetrahedron* **2007**, *63* (1), 224–231.
- (229) Kolodych, S.; Rasolofonjatovo, E.; Chaumontet, M.; Nevers, M.-C.; Créminon, C.; Taran, F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52* (46), 12056–12060.
- (230) Decuypere, E.; Specklin, S.; Gabillet, S.; Audisio, D.; Liu, H.; Plougastel, L.; Kolodych, S.; Taran, F. *Org. Lett.* **2015**, *17* (2), 362–365.
- (231) Wallace, S.; Chin, J. W. *Chem. Sci.* **2014**, *5* (5), 1742–1744.
- (232) Plougastel, L.; Koniev, O.; Specklin, S.; Decuypere, E.; Créminon, C.; Buisson, D.-A.; Wagner, A.; Kolodych, S.; Taran, F. *Chem. Commun.* **2014**, *50* (66), 9376–9378.
- (233) Narayanam, M. K.; Liang, Y.; Houk, K. N.; Murphy, J. M. *Chem. Sci.* **2016**, *7* (2), 1257–1261.
- (234) Teare, H.; Robins, E. G.; Kirjavainen, A.; Forsback, S.; Sandford, G.; Solin, O.; Luthra, S. K.; Gouverneur, V. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49* (38), 6821–6824.
- (235) Corey, E. J.; Venkateswarlu, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94* (17), 6190–6191.
- (236) Lange, M.; Pettersen, A. L.; Undheim, K. *Tetrahedron* **1998**, *54* (21), 5745–5752.
- (237) An, I.-H.; Seong, H.-R.; Ahn, K.-H. *Bull. Kor. Chem. Soc.* **2004**, *25* (3), 420–422.
- (238) Kushwaha, D.; Xu, P.; Kováč, P. *RSC Adv.* **2017**, *7* (13), 7591–7603.
- (239) Chalfie, M.; Tu, Y.; Euskirchen, G.; Ward, W. W.; Prasher, D. C. *Science* **1994**, *263* (5148), 802–805.
- (240) Tsien, R. Y. *Ann. Rev. Biochem.* **1998**, *67* (1), 509–544.
- (241) Giepmans, B. N. G.; Adams, S. R.; Ellisman, M. H.; Tsien, R. Y. *Science* **2006**, *312* (5771), 217–224.
- (242) Shaner, N. C.; Steinbach, P. A.; Tsien, R. Y. *Nat. Meth.* **2005**, *2* (12), 905–909.
- (243) Shaner, N. C.; Patterson, G. H.; Davidson, M. W. *J. Cell Science* **2007**, *120* (24), 4247–4260.

- (244) Andresen, M.; Schmitz-Salue, R.; Jakobs, S. *Mol. Biol. Cell* **2004**, *15* (12), 5616–5622.
- (245) Hinner, M. J.; Johnsson, K. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2010**, *21* (6), 766–776.
- (246) Griffin, B. A.; Adams, S. R.; Tsien, R. Y. *Science* **1998**, *281* (5374), 269–272.
- (247) Adams, S. R.; Campbell, R. E.; Gross, L. A.; Martin, B. R.; Walkup, G. K.; Yao, Y.; Llopis, J.; Tsien, R. Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (21), 6063–6076.
- (248) Stroffekova, K.; Proenza, C.; Beam, K. G. *Pflügers Arch - Eur. J. Physiol.* **2001**, *442* (6), 859–866.
- (249) Halo, T. L.; Appelbaum, J.; Hobert, E. M.; Balkin, D. M.; Schepartz, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (2), 438–439.
- (250) Uchinomiya, S.; Nonaka, H.; Fujishima, S.; Tsukiji, S.; Ojida, A.; Hamachi, I. *Chem. Commun.* **2009**, *0* (39), 5880–5882.
- (251) Nonaka, H.; Fujishima, S.; Uchinomiya, S.; Ojida, A.; Hamachi, I. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19* (23), 6696–6699.
- (252) Keppler, A.; Gendreizig, S.; Gronemeyer, T.; Pick, H.; Vogel, H.; Johnsson, K. *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21* (1), 86–89.
- (253) Juillerat, A.; Heinis, C.; Sielaff, I.; Barnikow, J.; Jaccard, H.; Kunz, B.; Terskikh, A.; Johnsson, K. *ChemBioChem* **2005**, *6* (7), 1263–1269.
- (254) Tomat, E.; Nolan, E. M.; Jaworski, J.; Lippard, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (47), 15776–15777.
- (255) Srikun, D.; Albers, A. E.; Nam, C. I.; Iavarone, A. T.; Chang, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (12), 4455–4465.
- (256) Gautier, A.; Juillerat, A.; Heinis, C.; Corrêa, I. R.; Kindermann, M.; Beaufils, F.; Johnsson, K. *Chem. Biol.* **2008**, *15* (2), 128–136.
- (257) Los, G. V.; Encell, L. P.; McDougall, M. G.; Hartzell, D. D.; Karassina, N.; Zimprich, C.; Wood, M. G.; Learish, R.; Ohana, R. F.; Urh, M.; Simpson, D.; Mendez, J.; Zimmerman, K.; Otto, P.; Vidugiris, G.; Zhu, J.; Darzins, A.; Klaubert, D. H.; Bulleit, R. F.; Wood, K. V. *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3* (6), 373–382.
- (258) England, C. G.; Luo, H.; Cai, W. *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26* (6), 975–986.
- (259) Miller, L. W.; Cai, Y.; Sheetz, M. P.; Cornish, V. W. *Nat. Meth.* **2005**, *2* (4), 255–257.
- (260) Calloway, N. T.; Choob, M.; Sanz, A.; Sheetz, M. P.; Miller, L. W.; Cornish, V. W. *ChemBioChem* **2007**, *8* (7), 767–774.
- (261) Gallagher, S. S.; Sable, J. E.; Sheetz, M. P.; Cornish, V. W. *ACS Chem. Biol.* **2009**, *4* (7), 547–556.
- (262) Chen, I.; Howarth, M.; Lin, W.; Ting, A. Y. *Nat. Meth.* **2005**, *2* (2), 99–104.
- (263) Slavoff, S. A.; Chen, I.; Choi, Y.-A.; Ting, A. Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (4), 1160–1162.
- (264) Reymond, L.; Lukinavičius, G.; Umezawa, K.; Maurel, D.; Brun, M. A.; Masharina, A.; Bojkowska, K.; Mollwitz, B.; Schena, A.; Griss, R.; Johnsson, K. *Chimia* **2011**, *65* (11), 868–871.
- (265) Corrêa Jr, I. R. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *20*, 36–45.
- (266) Benke, A.; Olivier, N.; Gunzenhäuser, J.; Manley, S. *Nano Lett.* **2012**, *12* (5), 2619–2624.
- (267) Bosch, P. J.; Corrêa, I. R.; Sonntag, M. H.; Ibach, J.; Brunsveld, L.; Kanger, J. S.; Subramaniam, V. *Biophys. J.* **2014**, *107* (4), 803–814.
- (268) Cole, N. B.; Donaldson, J. G. *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7* (3), 464–469.
- (269) Gautier, A.; Nakata, E.; Lukinavičius, G.; Tan, K.-T.; Johnsson, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (49), 17954–17962.

-
- (270) Bojkowska, K.; Santoni de Sio, F.; Barde, I.; Offner, S.; Verp, S.; Heinis, C.; Johnsson, K.; Trono, D. *Chem. Biol.* **2011**, *18* (6), 805–815.
- (271) Vaidyanathan, G.; Affleck, D. J.; Cavazos, C. M.; Johnson, S. P.; Shankar, S.; Friedman, H. S.; Colvin, M. O.; Zalutsky, M. R. *Bioconjugate Chem.* **2000**, *11* (6), 868–875.
- (272) Schirmacher, R.; Mühlhausen, U.; Wängler, B.; Schirmacher, E.; Reinhard, J.; Nagel, G.; Kaina, B.; Piel, M.; Wießler, M.; Rösch, F. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43* (36), 6301–6304.

Titre : Stratégies innovantes pour le radiomarquage de macro-biomolécules au fluor-18 pour des applications en imagerie moléculaire *in vivo*

Mots clés : Macromolécules, Chimie click, Pyridines, SNAP-tag, Fluor-18, TEP

Résumé : Le radiomarquage des macro-biomolécules au fluor-18 représente un défi majeur en radiochimie vu leur importance en imagerie moléculaire. Les macro-biomolécules et en particulier les peptides offrent une diversité moléculaire et un ciblage *in vivo* souvent plus spécifiques et sélectifs que les molécules de plus faibles poids moléculaires. Cependant, les conditions standards de radiomarquage au fluor-18 seraient destructrices pour de tels composés et ne peuvent être utilisées directement. Peu de méthodes directes de radiomarquage existent et présentent certains inconvénients (température encore élevée, activité molaire faible, méthodes peu versatiles...). C'est pourquoi, le radiomarquage par approche prosthétique en deux étapes reste une méthode de choix. Cette stratégie séquentielle implique tout d'abord la préparation d'une molécule radiofluorée, appelée groupe prosthétique, puis sa conjugaison à la macro-biomolécule dans des conditions chimiques biocompatibles.

L'objectif de ce travail de thèse a consisté à développer de nouvelles méthodes générales de radiomarquage de macro-biomolécules visant *in fine* des applications de radiomarquage direct *in vivo*. Les enjeux principaux ont été la diminution du temps de

marquage pour améliorer les procédés de radiosynthèse compte tenu de la demi-vie du fluor-18 (109,8 min), le besoin d'automatisation ainsi que la vitesse et la bioorthogonalité des réactions de conjugaison pour des applications en milieu complexe et dilué.

Tout d'abord, l'étude de trois réactions de chimie click, CuAAC, SPAAC et SPSAC, de vitesse et de biocompatibilité croissantes a été considérée. Le développement de groupes prosthétiques spécifiques de chacune d'entre elles ainsi que leur conjugaison sur des composés modèles ont ensuite été étudiés.

Par la suite, une étude méthodologique sur la radiofluorination de pyridines substituées a été initiée afin d'obtenir des entités radiomarquables dans des conditions suffisamment douces permettant la « pré-conjugaison » à la macro-biomolécule avant l'étape de radiofluorination.

Enfin, l'utilisation d'un étiquetage enzymatique, le SNAP-tag, a également été explorée et un substrat radiofluoré spécifique synthétisé.

Ces différentes approches ont permis d'élargir le panel des méthodes permettant un radiomarquage efficace et biocompatible de macro-biomolécules.

Title: Development of novel strategies for the radiolabeling of biologics with fluorine-18 for *in vivo* molecular imaging applications

Keywords: Biologics, Click chemistry, Pyridines, SNAP-tag, Fluorine-18, PET

Abstract: Fluorine-18 radiolabeling of biologics is a challenge in radiochemistry due to their increasing interest in molecular imaging. Biologics, and particularly peptides, offer molecular diversity and often higher specific and selective *in vivo* targeting compared to low molecular weight molecules. However, fluorine-18-radiolabeling standard conditions could not be used directly because biologics would suffer from these drastic conditions. Only a few direct radiolabeling methods are available and present some drawbacks (high temperature, low molar activity, lack of versatility...). Therefore, a two-steps prosthetic radiolabeling approach remains the method of choice. This sequential strategy involves the preparation of a fluorine-18-labeled molecule, called prosthetic group, which is then conjugated with the macromolecule in biocompatible chemical conditions.

The aim of this PhD work was to develop new general methods for the radiolabeling of biologics directed toward *in vivo* radiolabeling applications. Major issues were time and radiosynthesis processes with regard to the

fluorine-18 half life, automatization as well as constant rate and bioorthogonality of conjugation reactions for applications in complex and diluted environment. The first part is devoted to the study of three click chemistry reactions, CuAAC, SPAAC and SPSAC leading to enhanced reaction rates and biocompatibility. Specific prosthetic groups were developed for each reaction and their conjugation was studied with model compounds.

Furthermore, a methodological study involving the radiofluorination of substituted pyridines was initiated for the production of entities for mild radiolabeling conditions compatible with a "pre-conjugation" to the biologics before radiofluorination.

Finally, an enzymatic labeling approach using the SNAP-tag self-labeling enzyme was explored and a specific radiofluorinated substrate was synthesized.

These different approaches allowed an extent of the panel of methods for effective and biocompatible radiolabeling of biologics.

